

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA A LAS HIPOACUSIAS
NEUROSENSORIALES NO SINDRÓMICAS DE ORIGEN GENÉTICO
MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE EXOMA CLÍNICO

TESIS DOCTORAL

Raquel Muguera Iraola
2020

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	0
ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
1. Anatomía y fisiología de la audición	1
2. Diagnóstico de la hipoacusia.....	8
2.1. Pruebas audiológicas objetivas.....	8
2.1.1. Audiometría por respuestas eléctricas (Potenciales Evocados Auditivos)	8
2.1.2. Otoemisiones acústicas (OEA)	9
2.1.3. Impedanciometría.....	9
2.2. Pruebas audiológicas subjetivas	10
2.2.1. Audiometrías conductuales	10
2.2.2. Audiometría tonal pura.....	10
2.3. Programa de cribado auditivo neonatal	11
3. Hipoacusia.....	12
4. Tratamiento de la hipoacusia	15
4.1. Audioprótesis externas	15
4.2. Implante coclear	15
5. Genética de la hipoacusia	18
5.1. Genes codificantes de proteínas de las uniones en hendidura (<i>gap junctions</i>)	20
5.1.1. Gen <i>GJB2</i>	21

Índice

5.1.2. Gen <i>GJB6</i>	25
5.2. Genes que codifican proteínas de las uniones estrechas	26
5.2.1. Gen <i>CLDN14</i>	27
5.2.2. Gen <i>MARVELD2</i>	28
5.2.3. Gen <i>ILDR1</i>	29
5.3. Genes codificantes de proteínas del citoesqueleto	29
5.3.1. Gen <i>ACTG1</i>	29
5.3.2. Gen <i>DIAPH1</i>	30
5.4. Genes codificantes de miosinas	30
5.4.1. Gen <i>MYO7A</i>	31
5.4.2. Gen <i>MYO6</i>	32
5.4.3. Gen <i>MYO3A</i>	33
5.4.4. Gen <i>MYO15A</i>	34
5.5. Genes codificantes de proteínas de adhesión	37
5.5.1. Gen <i>CDH23</i>	38
5.5.2. Gen <i>PCDH15</i>	39
5.6. Genes codificantes de proteínas de los canales iónicos	39
5.6.1. Gen <i>KCNQ4</i>	40
5.6.2. Gen <i>SLC26A4</i>	41
5.7. Otros genes de relevancia en hipoacusia	41
5.7.1. Gen <i>OTOF</i>	41

5.7.2. Gen <i>STRC</i>	43
5.7.3. Gen <i>COCH</i>	45
5.7.4. Gen <i>TMPRSS3</i>	46
5.7.5. Gen <i>TMC1</i>	47
5.7.6. Gen <i>TECTA</i>	48
5.7.7. Gen <i>WFS1</i>	50
5.7.8. Gen <i>POU3F4</i>	52
5.7.9. Genes mitocondriales	52
5.7.10. Gen <i>BSND</i>	53
5.7.11. Gen <i>LOXHD1</i>	54
6. Priorización de genes en los estudios genéticos de hipoacusia	54
7. Características genéticas de la población vasca	58
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	- 61 -
III. MATERIAL Y MÉTODOS	- 65 -
1. Selección de pacientes y controles	67
2. Esquema del estudio genético	69
3. Toma de muestra y extracción de ADN	71
4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	71
4.1. PCR convencional	71
4.2. Long Range PCR (LR-PCR)	75
4.3. <i>Nested</i> -PCR (PCR anidada)	76

Índice

5. Secuenciación Sanger.....	78
6. Mini-secuenciación (<i>SNaPshot</i> [®])	79
7. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA)	82
8. <i>PCR digital</i> (<i>Digital Droplet PCR</i> , ddPCR)	83
9. <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS)	85
A. Preparación de las librerías.....	86
B. Enriquecimiento.....	86
C. Secuenciación.....	88
D. Análisis bioinformático	90
E. Definición de los paneles de genes.....	92
F. Interpretación de las variantes	95
IV. RESULTADOS	97
1. Características de la cohorte de pacientes	98
2. Clasificación genética de los pacientes.....	99
3. Resultados globales.....	100
3.1. Pacientes diagnosticados.....	102
3.2. Pacientes no diagnosticados.....	109
3.3. Resultados del Panel 2 (genes de evidencia moderada), Panel 3 (genes de baja evidencia) y Panel 4 (<i>deafness+mouse</i>)	111
4. Resultados por genes.....	124
4.1. Gen <i>GJB2</i>	124
4.2. Gen <i>STRC</i>	130

4.3. Gen <i>OTOF</i>	133
4.4. Genes mitocondriales <i>MT-RNR1</i> y <i>MT-TS1</i>	135
4.5. Gen <i>MYO15A</i>	137
4.6. Gen <i>TECTA</i>	140
4.7. Gen <i>BSND</i>	143
4.8. Gen <i>LOXHD1</i>	144
4.9. Gen <i>MYO6</i>	145
4.10. Gen <i>MYO7A</i>	147
4.11. Gen <i>TMC1</i>	149
4.12. Gen <i>TMPRSS3</i>	152
4.13. Gen <i>WFS1</i>	152
4.14. Gen <i>ILDR1</i>	155
4.15. Gen <i>MYH14</i>	156
4.16. Gen <i>ESPN</i>	158
4.17. Gen <i>PCDH15</i>	159
4.18. Gen <i>SIX5</i>	160
4.19. Gen <i>SOX10</i>	161
5. Variantes nuevas.....	162
IV. DISCUSIÓN	- 163 -
Prevalencia de los genes implicados en HA no sintromica de origen genético en el País Vasco	165
Evidencias adicionales en relación a asociaciones gen-hipoacusia no definitivas	172

Índice

Identificación de genes candidatos asociados a HA en base a modelos de ratón	179
Correlaciones genotipo-fenotipo.....	179
Identificación de variantes nuevas	191
V. CONCLUSIONES.....	- 195 -
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	199

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AD	Autosómico dominante
AR	Autosómico recesivo
ASND	<i>Auditory neuropathy spectrum disorder</i>
B	<i>Benigno</i>
BIAP	<i>Bureau International d'Audiophonologie</i>
CADD	<i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
CAPV	Comunidad Autónoma del País Vasco
CC	Célula ciliada
CCE	Célula ciliada externa
CCI	Célula ciliada interna
CNV	Cambio en el número de copias (del inglés <i>copy number variant</i>)
CNV	<i>Copy number variation (alteración en el número de copias)</i>
CPEO	Oftalmoplejía crónica progresiva externa
CRT	<i>Cyclic Reversible Termination</i>
Cx	Conexina
Cx26	Conexina 26
Cx30	Conexina 30
dB	Decibelios

Abreviaturas

dB HL	Decibelios de pérdida de audición (del inglés <i>decibels in hearing level</i>)
dbSNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
ddPCR	<i>Droplet Digital PCR</i>
DFNA	Hipoacusia no sindrómica autosómica dominante
DFNA1	Hipoacusia no sindrómica autosómica dominante asociada al gen <i>DIAPH1</i>
DFNA11	Hipoacusia no sindrómica autosómica dominante asociada al gen <i>MYO7A</i>
DFNA2	Hipoacusia no sindrómica autosómica dominante asociada al gen <i>KCNQ4</i>
DFNA20/26	Hipoacusia no sindrómica autosómica dominante asociada al gen <i>ACTG1</i>
DFNA22	Hipoacusia no sindrómica autosómica dominante asociada al gen <i>MYO6</i>
DFNA3	Hipoacusia no sindrómica autosómica dominante asociada al gen <i>GJB2</i>
DFNA36	Hipoacusia no sindrómica autosómica dominante asociada al gen <i>TMC1</i>
DFNA6/14/38	Hipoacusia no sindrómica autosómica dominante asociada al gen <i>WFS1</i>
DFNA8/12	Hipoacusia no sindrómica autosómica dominante asociada al gen <i>TECTA</i>
DFNA9	Hipoacusia no sindrómica autosómica dominante asociada al gen <i>COCH</i>
DFNB	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva
DFNB1	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>GJB2</i>
DFNB12	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>CDH23</i>
DFNB16	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>STRC</i>
DFNB2	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>MYO7A</i>
DFNB21	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>TECTA</i>
DFNB23	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>PCDH15</i>

Abreviaturas

DFNB29	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>CLDN14</i>
DFNB3	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>MYO15A</i>
DFNB30	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>MYO3A</i>
DFNB37	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>MYO6</i>
DFNB4	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>SLC26A4</i>
DFNB42	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>ILDR1</i>
DFNB49	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>MARVELD2</i>
DFNB7	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>TMC1</i>
DFNB73	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>BSND</i>
DFNB77	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>LOXHD1</i>
DFNB8/10	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>TMPRSS3</i>
DFNB9	Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva asociada al gen <i>OTOF</i>
DFNX	Hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma X
DFNX2	Hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma X asociada al gen <i>POU3F4</i>
DIDMOAD	Síndrome de Wolfram (del inglés <i>diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness</i>)
DVD	<i>Deafness Variant Database</i>
EU-HEAR	<i>European Concerted Action Programme on Genetic Hearing Impairment</i>
HA	Hipoacusia
HANS	Hipoacusia neurosensorial
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>

Abreviaturas

HHL	<i>Hereditary Hearing Loss webpage</i>
HUA	Hospital Universitario Araba
HUB	Hospital Universitario Basurto
HUC	Hospital Universitario de Cruces
HUD	Hospital Universitario Donostia
Hz	Hercios
IC	Implante coclear
KID	Síndrome de queratitis-ictiosis con HA (del inglés <i>Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome</i>)
LR-PCR	<i>Long-range PCR</i>
MELAS	Encefalomiopatía, acidosis láctica y episodios <i>stroke-like</i>
MIDD	Diabetes e hipoacusia de herencia materna (del inglés <i>maternally inherited diabetes and deafness</i>)
MLPA	<i>Multiplexed Ligation Probe Assay</i>
MORL	<i>Molecular Otolaryngology & Renal Research Laboratories</i>
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i>
OEA	Otoemisiones acústicas
OEAE	Otoemisiones acústicas espontáneas
OEAP	Otoemisiones acústicas provocadas
OI	Oído interno
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>

Abreviaturas

OMS	Organización Mundial de la Salud
ORL	Otorrinolaringología
P	Patogénico
PB	Probablemente benigno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEA	Potenciales auditivos evocados
PEAee	Potenciales auditivos evocados de estado estable
PEATC	Potenciales auditivos evocados de tronco cerebral
PEATC-a	Potenciales auditivos evocados de tronco cerebral automáticos
PP	Probablemente patogénico
<i>pSTRC</i>	Pseudogén de homología con el gen STRC
RP	Retinosis pigmentaria
SBS	<i>Sequencing by Synthesis</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
VSI	<i>Variante de significado incierto</i>
XLR	Herencia ligada al cromosoma X recesiva

I. INTRODUCCIÓN

1. Anatomía y fisiología de la audición

La audición es la transformación de las ondas sonoras en señales neurales que se produce gracias a las estructuras que conforman el oído (1).

Anatómicamente, el oído está formado por tres partes: el oído externo, el oído medio y el oído interno.

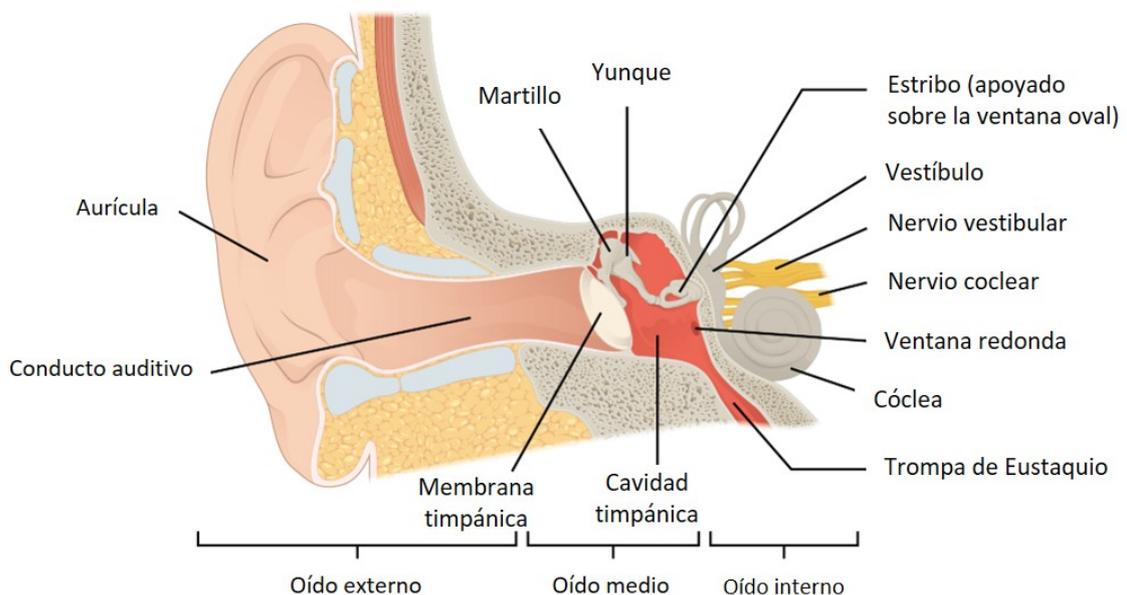


Figura 1. Estructura del oído. Modificado de Biga et al. (2).

El **oído externo** está formado por el pabellón auricular y el canal auditivo externo, que llega hasta la membrana timpánica. Su función es recoger y canalizar las ondas sonoras del exterior.

El **oído medio** está ubicado en la porción petrosa del hueso temporal. Contiene una cadena de tres huesecillos (martillo, yunque y estribo) que conducen y amplifican el sonido desde la membrana timpánica al oído interno.

El **oído interno (OI) o laberinto** es un sistema complejo de cavidades y canales llenos de fluido situado en el centro de la pirámide petrosa del hueso temporal. Funcionalmente está compuesto por dos unidades: el **sistema vestibular**, formado por el vestíbulo y los canales semicirculares y que contiene

Introducción

los receptores del equilibrio, y la **cóclea**, que contiene los receptores de la audición. Estos receptores sensoriales son terminaciones altamente especializadas del VIII par craneal, también llamado nervio vestibulococlear.

El órgano auditivo: la cóclea

La cóclea es una estructura de forma espiral que recuerda a la concha de un caracol. En su parte interna está dividida por tres escalas o rampas: la escala vestibular, la escala media (conducto coclear) y la escala timpánica (Figura 2).

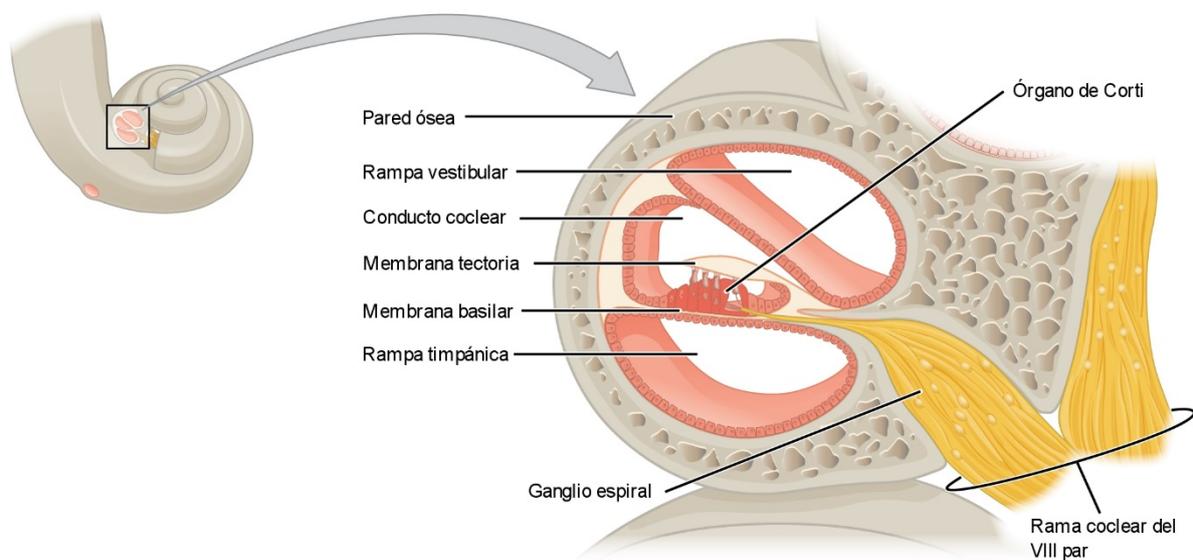


Figura 2. Sección transversal de la cóclea. Modificado de Biga et al. (2).

La **escala vestibular** se sitúa en la parte superior y se conecta con el estribo mediante la ventana oval. La rampa inferior es la **escala timpánica**, que termina en la ventana redonda. La escala vestibular y la escala timpánica se comunican entre ellas en el extremo apical de la cóclea mediante el helicotrema. Entre ambas se encuentra la **escala media o conducto coclear**. La escala media y la escala timpánica están separadas por la membrana basilar, donde se encuentra el **órgano de Corti**, receptor de la audición. Tanto la escala vestibular como la escala timpánica contienen perilinfa, rica en sodio, mientras que la escala media está llena de endolinfa, de alto contenido en potasio y bajo en sodio. La composición de estos líquidos es fundamental en la transmisión de la señal auditiva (3).

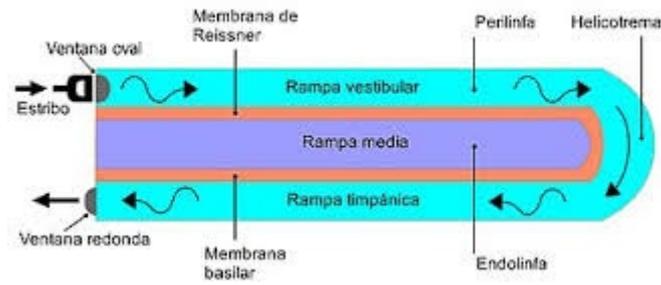


Figura 3. Representación esquemática de la cóclea.

El **órgano de Corti** contiene dos tipos de células ciliadas (CC) organizadas formando el siguiente patrón: 4.000 **células ciliadas internas (CCI)** en una única fila y 12.000 **células ciliadas externas (CCE)** colocadas en tres filas paralelas. Sobre ellas se sitúa la **membrana tectoria**, una estructura gelatinosa formada por tejido conectivo extracelular que cubre los cilios y juega un papel clave en la transformación del sonido en estimulación mecánica (mecanotransducción)(1).

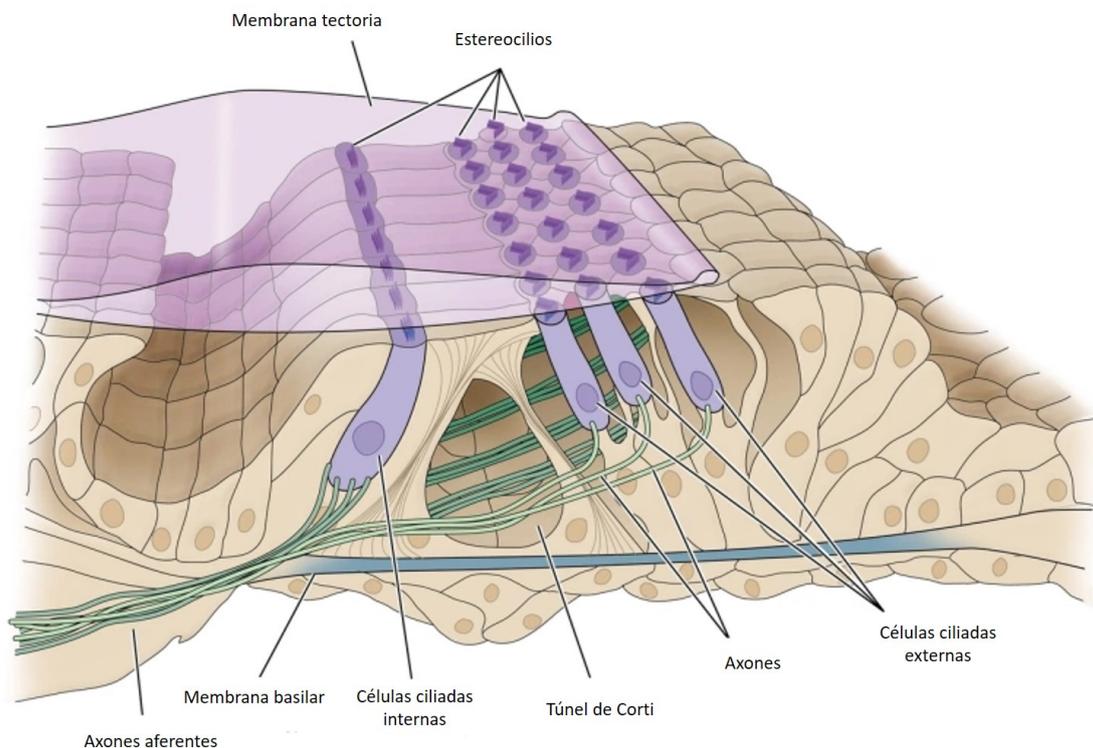


Figura 4. El órgano de Corti. Modificado de Le son (4).

Introducción

Las CC son células epiteliales cilíndricas caracterizadas por tener un grupo de cilios en su superficie apical. Estos grupos de cilios están formados por 10-300 **estereocilios** verticales, cilíndricos y compuestos de filamentos polimerizados de actina (5). Los estereocilios están dispuestos por tamaño en forma de escalera, formando dos filas en las CCI y tres filas en las CCE (Figura 5). Las puntas de los estereocilios más largos de las CCE se insertan en la membrana tectoria.

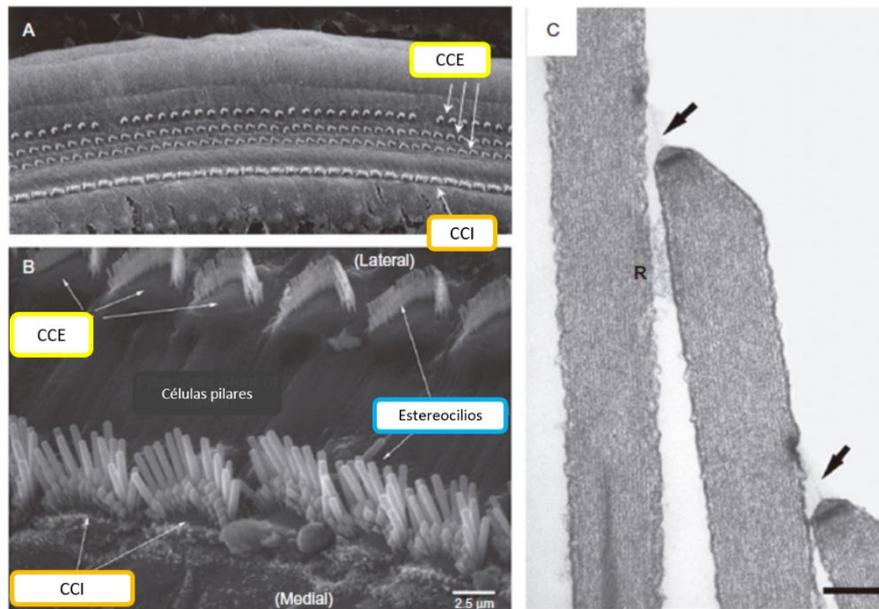


Figura 5. A: Estructura de los estereocilios en tres filas de células ciliadas externas (CCE) y una única fila de células ciliadas internas (CCI), en cóclea de chinchilla. B: Disposición en escalera de los estereocilios (dos filas en CCI y tres filas en CCE). C: Estereocilios de cóclea de cerdo de Guinea. Las flechas señalan las uniones apicales y la R indica uniones laterales entre los estereocilios. Modificado de Hayes et al. (1).

Los estereocilios de cada célula están unidos entre sí por diferentes tipos de conectores, de forma que todos los estereocilios de una CC se mueven juntos como una unidad. Además, tienen uniones apicales (*tip links*) que unen el cuerpo de un estereocilio con la punta del estereocilio adyacente, de menor tamaño. Estas uniones apicales están relacionadas con la activación mecánica de los canales iónicos en la membrana de los estereocilios y juegan un papel importante en la transducción de la CC (Figura 6) (1).

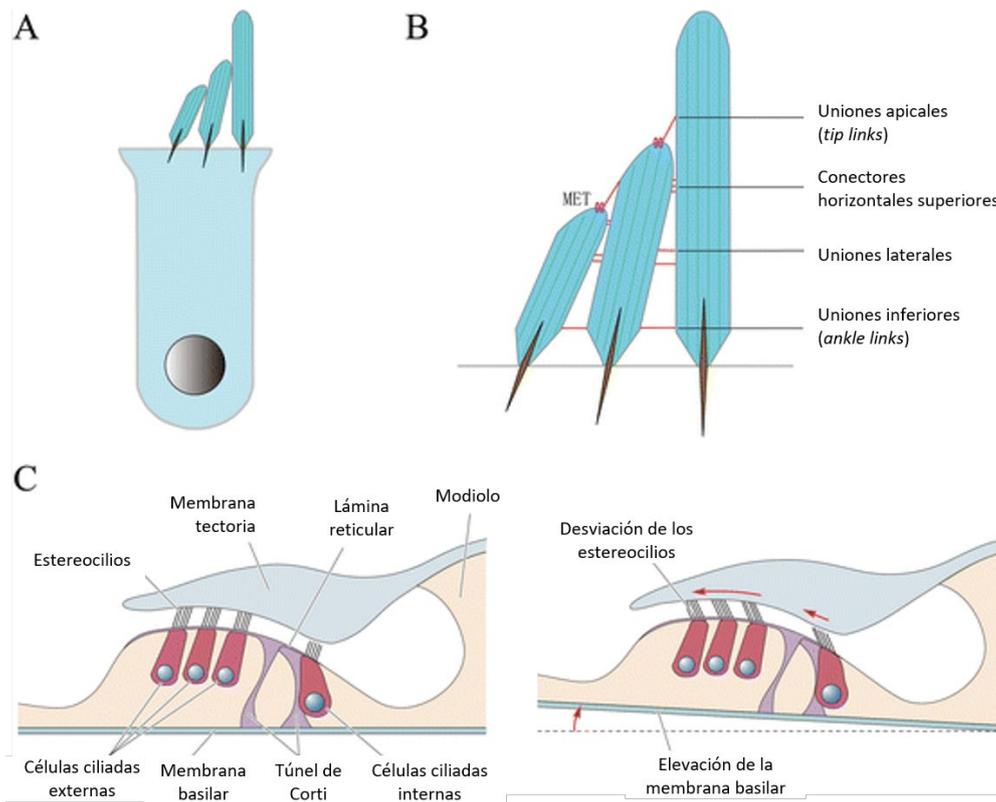


Figura 6. Estereocilios: estructura y función. A: esquema de una célula ciliada. B: esquema de uniones extracelulares que conectan a los estereocilios entre sí; MET: canal de estimulación mecánica. C: Desviación de los estereocilios inducida por las ondas de sonido. Modificado de Xu et al. (6).

La audición

La audición es el proceso mediante el cual el oído transforma las vibraciones sonoras ambientales en impulsos nerviosos que son recibidos en el cerebro, donde son interpretados como sonidos.

A lo largo de este proceso la energía sonora sufre tres transformaciones: 1) las vibraciones del aire se convierten en vibraciones de la membrana timpánica; 2) estas vibraciones se conducen y amplifican mediante la cadena de huesecillos hasta la ventana oval; 3) se producen ondas de presión sobre el líquido dentro de la cóclea que desplazan la membrana basilar, lo que provoca la desviación de los estereocilios del órgano de Corti (1).

Las CCI son los auténticos receptores sensoriales, y el 95% de las fibras del nervio auditivo que se proyectan hacia el cerebro provienen de estas células. Las terminaciones de las CCE son mayoritariamente de axones eferentes que provienen del cerebro (7).

Introducción

La endolinfa contiene alta concentración de iones potasio y un potencial endococlear altamente positivo. Durante la estimulación acústica, cuando los estereocilios se desvían hacia el de mayor longitud, la tensión generada en las uniones apicales provoca la apertura de los canales iónicos de activación mecánica, permitiendo la entrada de iones positivos desde la endolinfa (principalmente potasio, pero también calcio) al interior de las CCI y provocando su despolarización (excitación). Este proceso se conoce como **mecanotransducción**. La despolarización de las CCI provoca la liberación de neurotransmisores en su superficie basal y la propagación de la señal nerviosa al centro auditivo cerebral. La desviación de las CCI en el sentido contrario produce su hiperpolarización (inhibición) (8) (Figura 7).

El flujo de iones potasio al interior de las CC a través de los canales de mecanotransducción causa la acumulación de dichos iones en la base de las CC si no se eliminan rápidamente. La eliminación de estos iones potasio y su reciclaje y transporte de vuelta a la endolinfa son importantes y necesarios para el mantenimiento de la función normal de las CC y la audición (9).

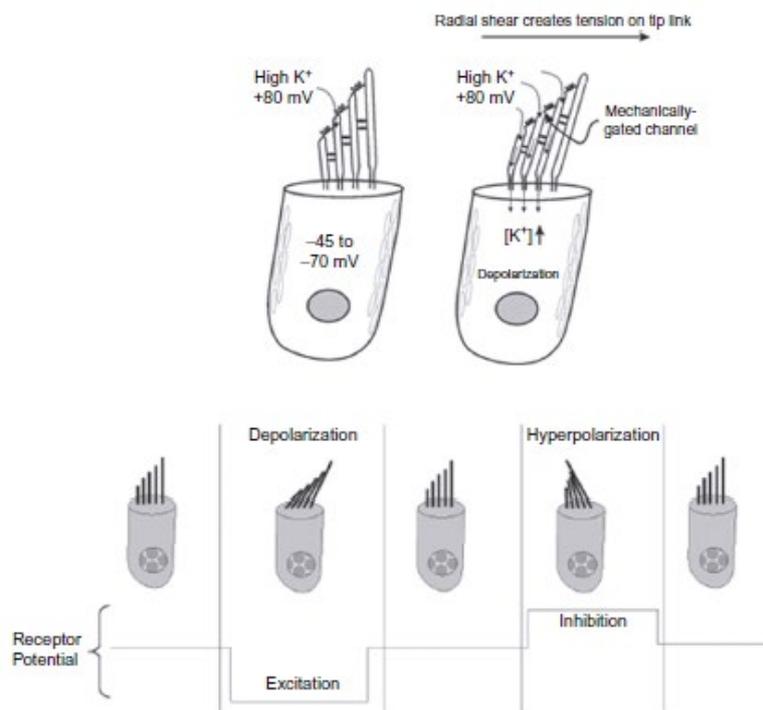


Figura 7. Diagrama esquemático de la mecanotransducción en las células ciliadas cocleares (1).

Por el contrario, las CCE responden a la despolarización y a la hiperpolarización alterando su forma celular, alargándose y acortándose, cualidad que se conoce como **electromotilidad**. Esto les permite amplificar aún más la vibración de la membrana basilar, lo que conduce a una mayor activación de las

CCI adyacentes. La electromotilidad de las CCE parece ser la responsable de las otoemisiones acústicas (OEA) del oído, que son sonidos de baja intensidad producidos por el oído interno espontáneamente o en respuesta a estimulación sonora. La vibración de la membrana basilar generada por las CCE produce movimientos en los fluidos cocleares que son transmitidos hacia el estribo y de ahí a la membrana timpánica. Las OEA proporcionan un método para estudio de la función de las CCE, ya que reflejan la electromotilidad de las mismas.

En resumen, las CCI y las CCE son funcionalmente diferentes: la información auditiva se envía al cerebro a través de las sinapsis aferentes que inervan principalmente las CCI, mientras que las CCE están implicadas en la amplificación del sonido y reciben inervación principalmente eferente, que las inhibe presumiblemente como mecanismo de protección frente a traumatismos acústicos producidos por sonidos excesivamente altos (10).

Debido a los cambios graduales en las características del órgano de Corti, como la altura de los estereocilios y la anchura y el grosor de la membrana basilar, las CC de distintas posiciones a lo largo del conducto coclear son estimuladas a diferentes frecuencias: las CC de la base de la escala media responden a las frecuencias más altas y las CC apicales a las frecuencias más bajas (Figura 8).

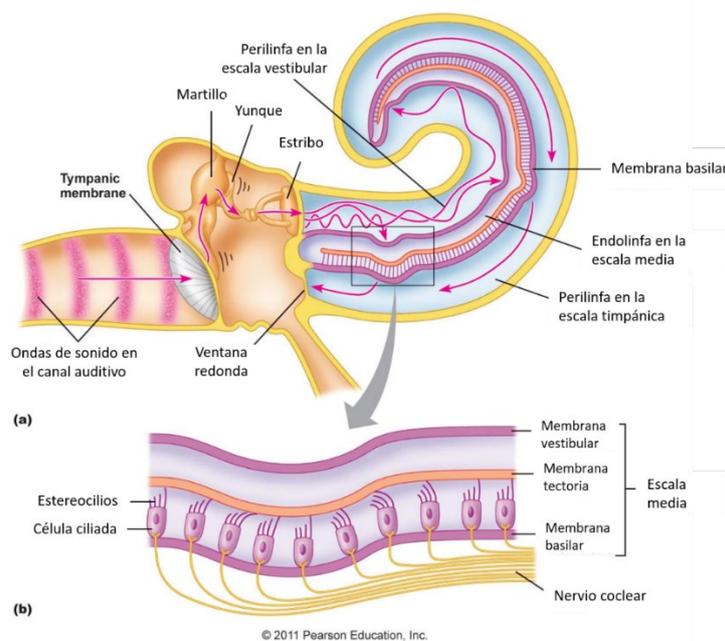


Figura 8. Recepción de distintas frecuencias en el oído interno (11).

2. Diagnóstico de la hipoacusia

La evaluación diagnóstica de un paciente con hipoacusia debe incluir anamnesis, exploración física con otoscopia, así como pruebas audiológicas, de imagen y laboratorio (12). Sin embargo, la aproximación es diferente en función de si el paciente es un recién nacido, un niño de corta edad o un adulto.

En general, ante un paciente (no recién nacido) con hipoacusia que presenta examen otoscópico normal, se procede a las pruebas audiológicas para saber si la HA es conductiva (también llamada de transmisión), neurosensorial (de percepción) o mixta (combinación de ambas). Estas pruebas audiológicas pueden ser objetivas o subjetivas.

2.1. Pruebas audiológicas objetivas

Los test objetivos o fisiológicos determinan el estado funcional del sistema auditivo y no requieren colaboración por parte del paciente, por lo que pueden realizarse a cualquier edad. Entre éstos se incluyen:

2.1.1. Audiometría por respuestas eléctricas (Potenciales Evocados Auditivos)

Este grupo incluye los procedimientos de medición de potenciales eléctricos que se generan tras la aplicación de un estímulo auditivo (potenciales evocados auditivos, PEA).

Los PEA son fluctuaciones de voltaje generados en el sistema nervioso en respuesta a un estímulo adecuado. Hay distintos tipos de PEA en función del tiempo que tardan en llegar a la corteza desde que se genera el estímulo, como por ejemplo los potenciales microfónicos cocleares, sin latencia, y los PEA de tronco cerebral (PEATC), de latencia corta. Estas pruebas han supuesto un gran avance en el diagnóstico de HA en la población pediátrica y especialmente en el cribado neonatal de HA, para el que se utilizan principalmente los PEATC junto con las otoemisiones acústicas (OEA) (13).

a) PEA de tronco cerebral (PEATC)

Los PEATC (en inglés, *auditory brain-stem response, ABR*) usan un estímulo sonoro (*click*, sonido transitorio producido por un impulso eléctrico de milisegundos de duración) para provocar respuestas electrofisiológicas que se originan en el VIII nervio craneal y en el tronco del encéfalo, que serán grabadas con electrodos. Estos potenciales evocados no permiten identificar las HA de bajas frecuencias ni tampoco proporcionan información sobre los umbrales de audición.

b) PEATC automatizados (PEATC-a)

Variante de los PEATC que requiere menor preparación del paciente. Al detectar automáticamente la señal, no requiere su interpretación por un profesional y evita el sesgo del observador. Es una de las pruebas utilizadas en el cribado neonatal de hipoacusia.

c) Potenciales evocados auditivos de estado estable (PEAee)

Los PEAee (en inglés, *auditory steady-state response testing, ASSR*) son una variante de los PEATC que mediante algoritmos matemáticos proporcionan información de umbrales a frecuencias que los PEATC no proporcionan, obteniéndose un audiograma similar al obtenido por audiometría tonal.

2.1.2. Otoemisiones acústicas (OEA)

Las OEA son sonidos que se originan dentro de la cóclea normal y que se miden en el canal auditivo externo utilizando una sonda con un micrófono y un transductor. Las OEAs se originan por contracción de las CCE cocleares, por lo que reflejan principalmente la actividad de las mismas y están presentes aunque exista alteración del nervio auditivo.

Dependiendo del estímulo utilizado se diferencian varios tipos de otoemisiones, como son las OEA espontáneas (OEAE), generadas sin necesidad de estímulo, y las OEA provocadas (OEAP), que se generan por estimulación con sonidos o *clicks*.

Las OEAP están presentes en la mayoría de individuos normoyentes. Debido a que la mayoría de las HA cursan con pérdida de las células ciliadas, las OEA desaparecen o están reducidas en personas con HA superior a 30-40 dB, por lo que este método es uno de los utilizados en el cribado neonatal de HA en recién nacidos.

Sin embargo, presenta varias limitaciones: existen algunas etiologías de HA como la neuropatía auditiva que están causadas por disfunción de las vías neurales y no de la cóclea, por lo que los pacientes siguen presentando OEA y la HA no puede ser detectada mediante esta prueba. Además, no permite evaluar el grado de HA, por lo que no sustituye al audiograma tonal.

2.1.3. Impedanciometría

La impedanciometría incluye un conjunto de pruebas que se utilizan para la valoración del oído medio y el tímpano, la funcionalidad del VII y VIII par craneal, y de la función de la trompa de Eustaquio (13).

2.2. Pruebas audiológicas subjetivas

La evaluación de la audición por métodos subjetivos requiere cierta colaboración por parte del paciente y se realiza mediante la **audiometría tonal**. Este método permite localizar la lesión, diferenciando entre hipoacusias de conducción e hipoacusias neurosensoriales. Consiste en la obtención de los umbrales de audición para las distintas frecuencias, entendiendo como umbral auditivo la intensidad mínima que una persona necesita para detectar la presencia de un sonido el 50% de las veces (13).

Entre las audiometrías se incluyen las audiometrías conductuales y la audiometría tonal pura.

2.2.1. Audiometrías conductuales

Hay varios tipos y se utilizan en niños de hasta 2,5 años de edad, en los que la colaboración del paciente es difícil o imposible. El niño, tras recibir un estímulo auditivo, emitirá respuestas automáticas o voluntarias observables por el examinador.

Se basan en las respuestas que el niño según su edad y grado de maduración puede llevar a cabo. En recién nacidos, se observará su comportamiento ante los sonidos (apertura de ojos de par en par, fijación de la mirada, detención de la succión, sobresalto, etc). En edades más avanzadas, se evaluará si responde a su nombre, si imita sonidos, su vocabulario, uso de oraciones, etc. (13).

2.2.2. Audiometría tonal pura

La audiometría tonal pura es la determinación de la intensidad más baja a la cual un individuo oye un tono puro. Se usan frecuencias desde 250 hasta 8000 Hz y la intensidad o volumen se mide en decibelios *Hearing Level* (dB HL). El umbral medio de un adulto normoyente es 0 dB HL. Se evalúan los umbrales de detección y discriminación del habla.

Se realizan dos tipos de audiometría tonal:

- La audiometría de **conducción aérea** presenta los sonidos mediante auriculares, y los umbrales dependen del estado del canal externo, del oído medio y del oído interno.
- La audiometría de **conducción ósea** presenta los sonidos a través de un vibrador que se coloca en el hueso mastoideo o en la frente, por lo que evita los oídos externo y medio y los umbrales dependen del estado del oído interno.

Algunas variantes de la audiometría tonal pura que completan el estudio audiológico son la **audiometría tonal enmascarada**, en la cual se aplica un sonido en el oído contrario para verificar la respuesta real del oído testado; y la **audiometría verbal**, que evalúa la percepción y reconocimiento auditivo de la palabra hablada mediante diferentes pruebas como el test de bisílabas y el test de frases, entre otros.

Los datos obtenidos de la audiometría tonal se representan en un gráfico llamado audiograma, donde en abscisas se colocan las frecuencias en Hz y en ordenadas, en sentido descendente, las pérdidas en relación al eje 0 dB que representa el umbral normal, en dB HL (Figura 9). Los umbrales de conducción aérea del oído derecho se representan con círculos rojos y los del izquierdo con espas azules, y se unen entre ellos mediante una línea continua. Los umbrales de conducción ósea se representan con los símbolos “<” en rojo y “>” en azul para el oído derecho y el oído izquierdo, respectivamente (Figura 9).

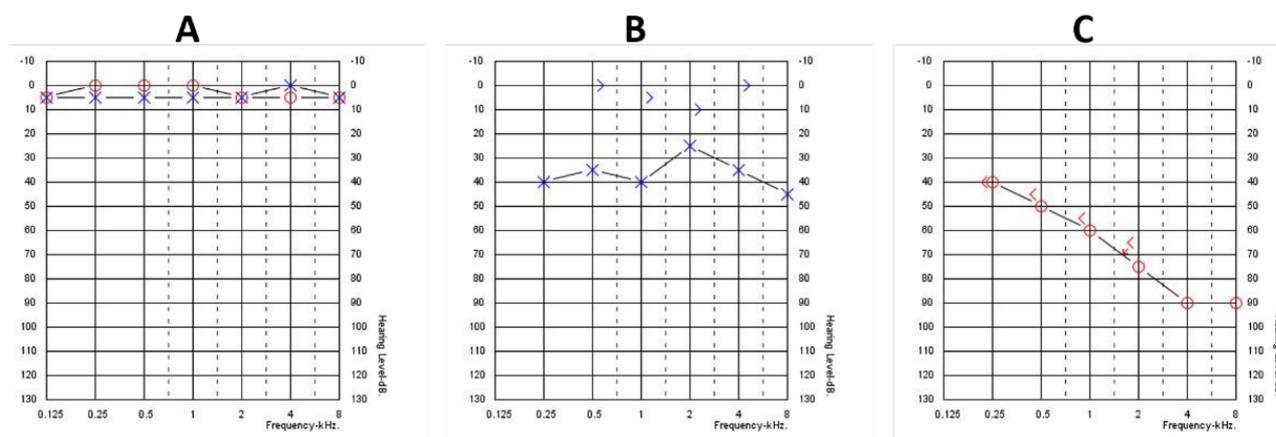


Figura 9. Ejemplos de audiogramas. A: normoacusia bilateral. B: hipoacusia conductiva del oído izquierdo, donde se observa la diferencia entre la conducción ósea (normal) y la conducción aérea (hipoacusia). C: hipoacusia neurosensorial del oído derecho, en la que no hay gap entre la conducción aérea y la ósea.

2.3. Programa de cribado auditivo neonatal

El cribado neonatal de la HA congénita se puede realizar mediante dos tecnologías: las otoemisiones acústicas (OEA) y los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral automatizados (PEATC-a). Ambas técnicas ofrecen resultados objetivos, aunque se diferencian en el modo de ejecución, en la parte del sistema auditivo que estudia cada una de ellas y en el coste.

Programa de cribado auditivo neonatal en Euskadi

El programa de detección precoz de HA en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) se inició en junio de 2003, estableciendo como prueba de cribado las otoemisiones acústicas (OEA) realizadas en varias fases con el fin de evitar falsos positivos. En 2012 se rediseñó el programa sustituyendo el cribado con OEA por los potenciales evocados auditivos automatizados (PEATC-a), considerado *gold standard* a nivel internacional, ya que permite explorar toda la vía auditiva del recién nacido (14).

El programa se realiza en dos fases (Figura 10): en la primera fase o **fase de cribado** se realizan los PEATC-a al recién nacido, generalmente en el área de maternidad antes de darle el alta hospitalaria, y en todo caso antes del mes de vida. Los niños recién nacidos que no superan este cribado pasan a la **fase de diagnóstico**, en la que se realizan los PEATC con umbrales antes de que el niño cumpla 3 meses y se derivan a los centros de referencia de HA de los Servicios de Otorrinolaringología de los cuatro Hospitales Universitarios de la CAPV, donde se evaluarán los resultados.

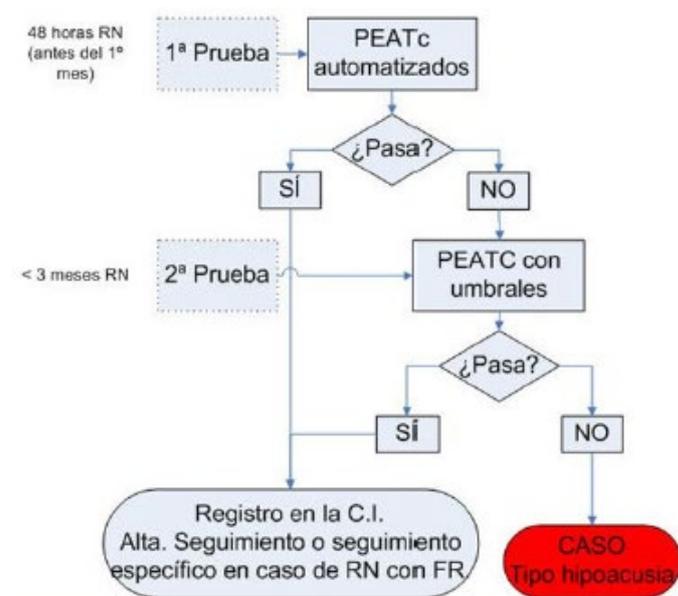


Figura 10. Algoritmo de la prueba de cribado neonatal auditivo utilizado actualmente en Euskadi (14).

3. Hipoacusia

El sonido puede describirse en términos de frecuencia (tono), que se mide en hercios (Hz), y en intensidad (volumen), que se mide en decibelios (dB). Una persona con audición normal puede procesar frecuencias entre 20 y 20.000 Hz a intensidades de 0 a 140 dB.

La hipoacusia o pérdida de audición ocurre cuando se pierde todo o parte del rango normal de audición (15). El grado de pérdida de audición se mide en **dB HL** (decibelios de pérdida de audición, del inglés *decibels in hearing level*). El **umbral de 0 dB HL** para cada frecuencia es un valor de referencia que se refiere al nivel al cual los adultos jóvenes normales perciben un tono el 50% de las veces. La audición se considera normal si los umbrales de un individuo están por debajo de 15 dB respecto a los umbrales normales (16), es decir, entre 0 y 15 dB HL.

La clasificación de las hipoacusias se puede hacer en base a diferentes criterios:

- a) En función de la presencia o ausencia de otros síntomas:
 - a. **HA sindrómica**: cuando ocurre junto con otras alteraciones clínicas.
 - b. **HA no sindrómica**: cuando no se asocia a otros signos o síntomas.

- b) En base a la localización de la lesión:
 - a. **HA conductiva**: causada por anomalías del oído externo y/o medio.
 - b. **HA neurosensorial**: por alteración funcional de estructuras del oído interno. En función de la estructura disfuncional:
 - a. Sensorial: cuando la lesión se localiza en las CC.
 - b. Central: por alteraciones en el córtex cerebral.
 - c. Trastorno del espectro de neuropatía auditiva (*auditory neuropathy spectrum disorder, ANSD*): incluye un grupo amplio de patologías que se caracterizan por el fallo en la transmisión del sonido desde la cóclea al cerebro, debido a defectos en la función sináptica de las CCI o en la conducción neural. Se caracteriza por presencia de otoemisiones acústicas (OEA) (por el funcionamiento normal de las CCE) con alteración de los potenciales evocados del tronco cerebral (PEATC) (por fallo en la transmisión de la señal al cerebro) (ver sección 3.1.).
 - c. **HA mixta**: por alteración conductiva y neurosensorial.

En Estados Unidos el 90% de la HA es neurosensorial y se asume que lo mismo ocurre en Europa (17).

- c) En base al grado de pérdida de audición:

Existen varias clasificaciones que establecen umbrales similares pero ligeramente diferentes para definir el grado de hipoacusia. La mayoría utilizan cuatro categorías de hipoacusia, en

Introducción

base a la media de los umbrales a las frecuencias 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz y 4000 Hz en el mejor oído (Tabla 1).

Tabla 1. Grados de hipoacusia. ^aOrganización Mundial de la Salud (18). ^bEuropean Concerted Action Programme on Genetic Hearing Impairment (19). ^cBureau International d'Audiophonologie (20).

Grado de HA	Clasificación OMS ^a	Clasificación EU-HEAR ^b	Clasificación BIAP 02/1 ^c
	dB HL	dB HL	dB HL
Audición normal	<26	<20	≤20
Leve	26-40	20-40	21-40
Moderada	41-60	41-70	1 ^{er} grado: 41-55 2 ^o grado: 56-70
Severa	61-80	71-95	1 ^{er} grado: 71-80 2 ^o grado: 81-90
Profunda	>81	>95	1 ^{er} grado: 91-100 2 ^o grado: 101-110 3 ^{er} grado: 111-119 HA total (cofosis): >120

- d) En función del momento de inicio de la HA:
- Congénita:** cuando se manifiesta desde el nacimiento.
 - Prelingual o prelocutiva:** antes del desarrollo del lenguaje (en general, dos años de edad).
 - Perilingual o perilocutiva:** cuando la hipoacusia aparece durante la adquisición del lenguaje.
 - Postlingual o postlocutiva:** cuando ocurre después del desarrollo normal del lenguaje.
 - De inicio en edad adulta.**
 - Presbiacusia:** pérdida de audición asociada al envejecimiento.
- e) En base a las frecuencias sonoras a las que afecta:
- HA de frecuencias bajas:** <500 Hz
 - Ha de frecuencias medias:** 500-2000 Hz
 - Ha de frecuencias altas:** >2000 Hz

- f) En función del origen genético:
- a. **HA genética:** causada por alteraciones en el genoma; puede presentarse en el nacimiento o en edades más avanzadas.
 - b. **HA no genética (adquirida):** consecuencia de factores ambientales como infecciones (ej.: meningitis, otitis media), lesiones traumáticas (ej.: perforación del tímpano, fractura craneal, traumatismos acústicos), o tóxicos (ej.: antibióticos aminoglucósidos, cisplatino). Sin embargo, también en las HA adquiridas pueden estar implicados factores genéticos modificadores, que pueden influir en el inicio, la gravedad y la estabilidad de la HA no genética.

4. Tratamiento de la hipoacusia

4.1. Audioprótesis externas

Las audioprótesis externas, prótesis auditivas o audífonos son aparatos electrónicos que amplifican el sonido, lo procesan y lo conducen hacia el oído hipoacúsico para que llegue de manera eficiente, ajustándose al rango auditivo dinámico del paciente (21).

Un audífono está formado por cuatro elementos fundamentales: el micrófono, que recoge la señal acústica y la convierte en eléctrica; el amplificador, que procesa y amplifica esta señal eléctrica en base al grado de HA; el auricular, que recibe esa señal eléctrica y la transforma de nuevo en energía acústica y la transmite al oído; y la batería, necesaria para el funcionamiento del dispositivo.

Su uso está indicado en los pacientes en los que la HA no pueda solucionarse con un tratamiento médico y/o quirúrgico, y generalmente se recomienda cuando los umbrales superan los 30-40 dB HL en las frecuencias conversacionales (21).

4.2. Implante coclear

El implante coclear (IC) es un dispositivo electrónico que consiste en una parte externa que se coloca detrás de la oreja y una segunda parte que se coloca quirúrgicamente bajo la piel. Está formado por un micrófono que recoge el sonido ambiental; un procesador, que selecciona los sonidos recogidos por el micrófono; un transmisor y receptor/estimulador, que recibe señales del procesador y las convierte en impulsos eléctricos; y un *array* de electrodos, que recoge los impulsos del estimulador y los envía a diferentes regiones del nervio auditivo (22).

Introducción

La primera cirugía de IC de un único canal se realizó en 1961 por House and Doyle y, desde entonces, ha revolucionado el cuidado de niños y adultos con HA. Además de incluir adultos y niños con HA neurosensorial de severa a profunda que no mejoran con audífonos, las indicaciones de IC también han cambiado considerablemente y actualmente incluyen niños tan pequeños como 12 meses de edad y adultos con audición retenida a bajas frecuencias (23). Este aspecto es importante, ya que la estimulación precoz del sistema auditivo es fundamental para el desarrollo y el reconocimiento del habla. Se ha demostrado que en niños con HA congénita o prelingual, el éxito del IC sólo se consigue cuando se realiza dentro del periodo de máxima plasticidad auditiva, que corresponde a los primeros 6 años de vida. Es más, si la introducción del IC se lleva a cabo antes de los dos años de edad, el resultado es mejor y más rápido (24).

Sin embargo, los resultados del IC no siempre son óptimos. Mientras que la mayoría de usuarios de IC obtienen unos resultados excelentes de audición y reconocimiento del habla, una minoría no consigue los niveles de audición esperados. Esta variabilidad ocurre tanto en niños como en adultos. Uno de los predictores más potentes de los resultados postoperatorios del IC son los factores clínicos asociados con la HA, como la duración de la HA, el estatus socioeconómico y los umbrales audiométricos preoperatorios. Desde el punto de vista clínico, hay pocas contraindicaciones al IC, aunque hay un acuerdo general en que los resultados son pobres en pacientes con ausencia de nervio coclear, ya que la falta de dicho nervio impide que el estímulo eléctrico del IC llegue al tronco cerebral. Para estos pacientes, se ha conseguido una mejora en los resultados mediante el implante de tronco cerebral.

Hay evidencias crecientes de que tanto las alteraciones cualitativas como las cuantitativas en el nervio auditivo pueden afectar al resultado del implante coclear. Los datos muestran que individuos con lesiones que afectan primariamente el sistema sensorial coclear y la sinapsis, que son evitados por el IC, tienen resultados óptimos. Sin embargo, los pacientes con lesiones que afectan al nervio auditivo muestran resultados pobres con IC, probablemente porque la transmisión neural de la señal eléctrica desde el IC está afectada.

Desde los primeros años del IC se ha intentado determinar los factores por los que algunos individuos experimentan peores o mejores resultados que los esperados preoperatoriamente. Una revisión reciente ha propuesto una clasificación de las lesiones del sistema auditivo en función del componente afectado (23): sensorial, responsable de la mecanotransducción (CC); sináptico, que es la sinapsis en sí e incluye el sitio presináptico (base de la CC) y el postsináptico (dendritas terminales de ganglio espiral); y la parte neural, formado por el ganglio espiral y el nervio auditivo (Figura 11).

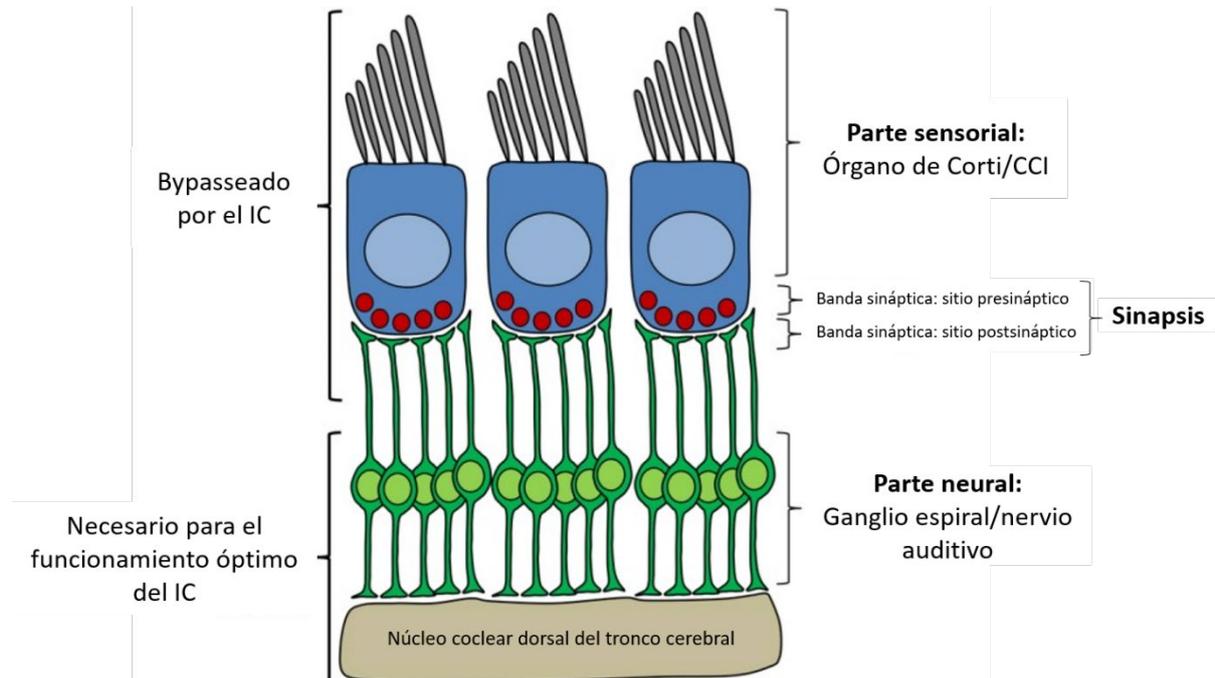


Figura 11. Componentes del sistema auditivo. Modificado de Shearer et al. (23). IC: implante coclear; CCI: célula ciliada interna.

El IC evita las partes sensorial y sináptica para estimular directamente los somata del ganglio espiral. En base a esto, en teoría, la salud del órgano de Corti o de la sinapsis no afectará al resultado del IC; mientras que la salud del ganglio espiral (o más generalmente, del nervio auditivo), de la sinapsis entre el ganglio espiral y el núcleo coclear del tronco cerebral, o del córtex auditivo pueden afectar negativamente la transmisión eléctrica del sonido proporcionada por el IC, dando lugar teóricamente a resultados subóptimos del IC.

Siguiendo esta clasificación de las partes del sistema auditivo, se podrían agrupar los genes implicados en la HA en base al componente al que afectan, para poder así predecir el resultado del IC. Por ejemplo, entre los genes que afectan a la parte sensorial (coclear) estarían *GJB2*, *SLC26A4*, *CDH23*, *MYO7A*, o *LOXHD1*. En estos pacientes, el resultado esperado del IC es excelente, ya que el IC evita la parte defectuosa del sistema auditivo. En cuanto a las alteraciones genéticas que afectan a la sinapsis (sinaptopatías), tendríamos las presinápticas (genes *OTOF*, *CACNA1D*, *CABP2*, *SLC17A8*) y las postsinápticas (genes *DIAPH3*, *OPA1*, *ROR1*, *ATP1A3*). Por último, tendríamos las alteraciones en genes que afectan al ganglio espiral y al nervio auditivo (e.g., *TIMM8A*, *AIFM1*, *NARS2*) y las neuropatías desmielinizantes hereditarias, que afectan al nervio auditivo (e.g., genes *MPZ* y *PMP22*, causantes de la neuropatía hereditaria de Charcot-Marie-Tooth).

Desde un punto de vista práctico, los avances en el entendimiento de los IC generalmente no alterarán el cuidado del paciente actualmente. Sin embargo, en el futuro próximo, conforme emerjan dispositivos de IC y terapias moleculares más a medida, el entendimiento del sitio de la lesión del sistema auditivo será crucial.

5. Genética de la hipoacusia

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 6% de la población mundial presenta hipoacusia, de los cuales 34 millones son niños (7%) (25).

La hipoacusia neurosensorial (HANS) es la alteración sensorial más frecuente en la infancia, con una prevalencia de 1-2 casos por cada 1.000 recién nacidos que aumenta a 3-4/1.000 entre adolescentes (26). Aproximadamente el 50% de las HANS en niños son debidas a causas genéticas (27), de las cuales el 70% son no sindrómicas y el 30% sindrómicas (28) (Figura 12).

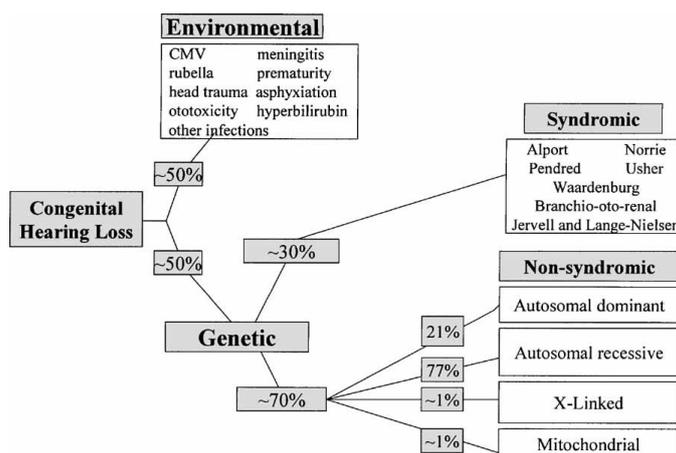


Figura 12. Causas de hipoacusia (28).

La HANS no sindrómica puede transmitirse de forma autosómica recesiva (AR) (70-80%), autosómica dominante (AD) (15%), ligada al cromosoma X (1%) o de forma matrilineal (mitocondrial). La HA mitocondrial ocurre en el 1% de los casos en el mundo occidental (29), pero ha sido descrita hasta en un 15-20% de las HANS familiares en España (30, 31). Como norma general, las formas recesivas se asocian a HA congénita o prelingual y severa-profunda, mientras que las formas autosómicas dominantes son esencialmente postlinguales (16).

A día de hoy, se han identificado más de 100 genes asociados a HA no sindrómica (32). Históricamente, estos genes fueron identificados como *loci* y denominados como DFNA si eran de herencia AD, DFNB si la herencia AR y DFNX en el caso de los de herencia ligada al cromosoma X, y eran numerados en el

orden en el que habían sido descubiertos. En la actualidad, se van conociendo los genes correspondientes a cada *locus* y la información se actualiza de forma regular en la página *Hereditary Hearing Loss Homepage* (32). Esta página web fue creada a partir del proyecto HEAR del *European Working Group on Genetics of Hearing Impairment*, y actualmente se actualiza y mantiene gracias a la colaboración entre Richard Smith y Eliot Shearer, de la Universidad de Iowa (Iowa, Estados Unidos), y Guy Van Camp y Manou Sommen, de la Universidad de Amberes (Amberes, Bélgica).

Además de la gran heterogeneidad genética, también se observa en la HA una gran heterogeneidad alélica, con un gran número de variantes patogénicas diferentes descritas en cada gen, la mayoría de las cuales son variantes patogénicas privadas o individuales de cada familia. Sin embargo, en unos pocos casos específicos existen variantes patogénicas recurrentes, como ocurre con los genes *GJB2*, *SLC26A4*, *OTOF*, *MT-RNR1* y *COCH* (33).

Las investigaciones realizadas en las dos últimas décadas han revelado que la epidemiología de la HA hereditaria varía en función de la población. Sin embargo, exceptuando el caso del gen *GJB2*, la información actual disponible sobre la población europea es limitada, y lo mismo ocurre en el caso de la población española (34). Este hecho impide valorar la contribución de cada gen a la etiología genética de la HA neurosensorial en esta población.

Por otra parte, las variantes patogénicas reportadas en población caucásica no son representativas de toda la población europea, ya que en algunos casos pueden existir diferencias considerables entre distintas regiones de Europa. A esto se añade el hecho de que las frecuencias mutacionales estimadas de algunos genes de gran tamaño pueden estar sesgadas debido a que su estudio no se ha generalizado hasta la aparición de la tecnología de secuenciación masiva. Estas limitaciones subrayan la necesidad de realizar estudios en profundidad para determinar la epidemiología de HA en diferentes poblaciones (33).

En la actualidad se han identificado más de 70 genes causantes de HA no sindrómica autosómica recesiva (32). De éstos, los más prevalentes son, en orden de frecuencia: *GJB2*, *SLC26A4*, *MYO15A*, *OTOF*, *CDH23* y *TMC1* (33). En cuanto a las HA de herencia AD, se han identificado más de 40 genes asociados (32). Aunque ninguno de ellos es especialmente prevalente respecto a los demás, se podría decir que los genes más frecuentes en HA AD son *WFS1*, *KCNQ4*, *COCH* y *GJB2* (33). Además, *WFS1*, *COCH* y *TECTA* causan HA con fenotipos auditivos característicos reconocibles.

La HA ligada al cromosoma X y la HA mitocondrial son poco frecuentes, suponiendo menos del 1% de todas las clases de HA (33), aunque pueden existir diferencias entre distintas poblaciones. Hasta la

fecha se han mapeado 6 *loci* de HA ligados al cromosoma X, con 5 genes identificados: *PRPS1* para DFNX1, *POU3F4* para DFNX2, *SMPX* para DFNX4, *AIFM1* para DFNX5 y *COL4A6* para DFNX6 (32).

Los genes causales de la HANS pueden clasificarse en base a su función en el oído interno, entre las cuales se incluyen las proteínas de las uniones en hendidura, proteínas de uniones estrechas, proteínas del citoesqueleto, proteínas transmembrana (35) y otros genes de funciones variadas. Las familias de genes más relevantes se describen a continuación.

5.1. Genes codificantes de proteínas de las uniones en hendidura (*gap junctions*)

Las uniones en hendidura o uniones gap (en inglés, gap junctions) son zonas especializadas que conectan los citoplasmas de células adyacentes permitiendo el paso libre de iones y moléculas de una célula a otra. El oído interno consta de distintos tipos de células de soporte implicadas en el soporte físico y fisiológico de las CC, y en el mantenimiento de la homeostasis coclear. El desarrollo y funcionamiento de estas células de soporte depende de interacciones finamente equilibradas en las que intervienen las uniones en hendidura (36).

Las funciones hipotéticas de las uniones en hendidura en la cóclea incluyen el reciclaje de iones potasio, el aporte de nutrientes y energía, la señalización intracelular, la generación de potencial endococlear y el mantenimiento de la homeostasis de la perilinfa y la endolinfa, y la participación en la amplificación coclear activa. Además, recientemente se ha reportado que también juegan un papel importante en la reparación epitelial en la cóclea. Por tanto, la alteración de estas uniones puede influir en muchos aspectos de la función coclear (37).

Las proteínas que forman las uniones en hendidura son las **conexinas**. Seis subunidades de conexina forman un conexón, que al unirse con el conexón de la célula adyacente formará el canal intercelular de la unión en hendidura (Figura 13), conectando los citoplasmas de ambas células.

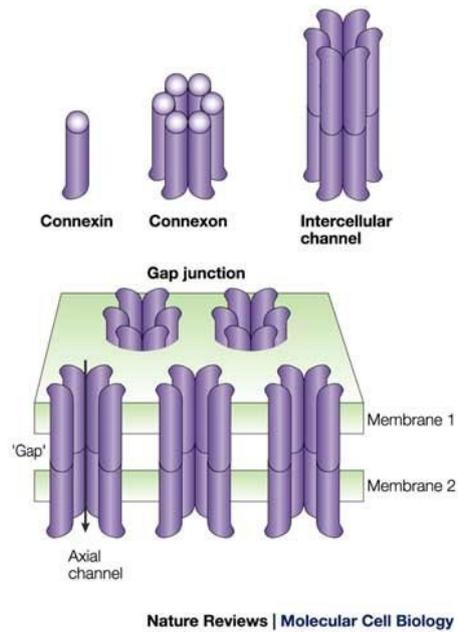


Figura 13. Conexinas, connexones, canales intercelulares y uniones en hendidura (38).

Dos genes codificantes de conexinas han sido relacionados con la HA neurosensorial no sindrómica: *GJB2* y *GJB6*, que codifican las proteínas conexina 26 y conexina 30, respectivamente.

5.1.1. Gen *GJB2*

El gen *GJB2* (en inglés, *Gap Junction Protein Beta-2*, OMIM*121011) se localiza en la región q12.11 del cromosoma 13 y codifica la proteína **conexina 26** (Cx26). Estructuralmente, el gen *GJB2* es un gen pequeño que contiene dos exones, y sólo parte del segundo es codificante (Figura 14). Se expresa en muchos tejidos diferentes; en la cóclea humana, se expresa en casi todos los tipos de células con excepción de las CC (36).



Figura 14. Estructura del gen *GJB2*. La línea gris indica el intrón. En color rojo claro se muestra la región codificante del gen en el exón 2; en rojo oscuro, las regiones no codificantes (39).

Introducción

Un monómero de Cx26 es una proteína de 226 aminoácidos que consiste en 4 hélices transmembrana (TM1-TM4) unidas por dos *loops* extracelulares (E1 y E2) y un *loop* intracelular de menor tamaño, con extremos N- y C-terminales en el lado citosólico de la membrana (Figura 15).

El monómero de Cx26, tras ser sintetizado en el retículo endoplasmático, experimenta una maduración conformacional en el aparato de Golgi y se ensambla con otros monómeros de Cx26 o de otras conexinas como Cx30, formando hexámeros homoméricos o heteroméricos. Estos hexámeros se denominan conexones y son transportados a la membrana plasmática. Una vez allí, los conexones pueden mantenerse como hemicanales, permitiendo el transporte de moléculas de pequeño tamaño entre el citosol y el espacio extracelular, o contactar con otro conexón de una célula adyacente para formar un canal intercelular. La superposición de cientos de canales intercelulares en forma de placas crea las uniones en hendidura, que conectan directamente los citoplasmas de las dos células formando un sincitio funcional (36).

Las variantes patogénicas en el gen *GJB2* son causa de HA no sindrómica AR DFNB1 (OMIM#220290) e HA no sindrómica AD DFNA3 (OMIM#60154). Además, este gen también se ha relacionado con HA sindrómicas AD como la HA con queratitis-ictiosis (OMIM#148210) y la queratoderma palmoplantar con HA (OMIM#148350).

Las primeras hipótesis sobre los mecanismos patogénicos implicados en el gen *GJB2* proponían que las variantes patogénicas en este gen podrían impedir el emparejamiento de las uniones en hendidura y afectar al reciclaje de potasio, provocando la acumulación de este ion en el espacio extracelular alrededor de las CC, lo que las dañaría causando HA (40). Sin embargo, este mecanismo no ha sido demostrado experimentalmente y los resultados de estudios más recientes son inconsistentes con esta teoría (41). Por tanto, aunque se sigue considerando que el reciclaje de potasio es fundamental para la audición, los nuevos datos demuestran que su alteración no es el mecanismo principal de patogenicidad en la HA relacionada con el gen *GJB2*. El mecanismo sigue sin estar claro y se cree que podrían estar implicados otros factores como alteraciones del desarrollo coclear o de la electromotilidad de las CCE (37).

La HA asociada a este gen está causada principalmente por variantes patogénicas de herencia AR que inactivan los dos alelos del gen reduciendo o eliminando la proteína Cx26 en la membrana plasmática. Se han descrito muchos tipos de alteraciones: grandes deleciones que eliminan el gen *GJB2* en su totalidad o elementos reguladores esenciales para su expresión, variantes patogénicas puntuales que

interfieren en la función del promotor o en el *splicing*, y variantes patogénicas puntuales en la región codificante del gen (36).

Las variantes patogénicas de la región codificante del gen *GJB2* pueden ser variantes de truncamiento de proteína (variantes que interrumpen la transcripción por generación de un codón de parada prematuro, dando lugar a una proteína más corta o a ausencia de la expresión de proteína (42) o de cambio de sentido (en inglés, *missense*) (Figura 15). Debido a que la región codificante completa del gen *GJB2* está en el último exón, estos ARNm con codones de parada prematuros escaparían de la eliminación por el mecanismo de degradación del ARNm mediada por mutaciones terminadoras (en inglés, *nonsense-mediated decay, NMD*), por lo que presumiblemente las proteínas son sintetizadas, aunque de forma truncada. Esto afectará a su plegamiento y polimerización y serán retenidas en el retículo endoplásmico, dando lugar a una pérdida total de función. Las variantes patogénicas de cambio de sentido dan lugar a sustituciones de aminoácido en la proteína, y en función del residuo afectado pueden afectar a su función o a su plegamiento, oligomerización o estabilidad estructural (43).

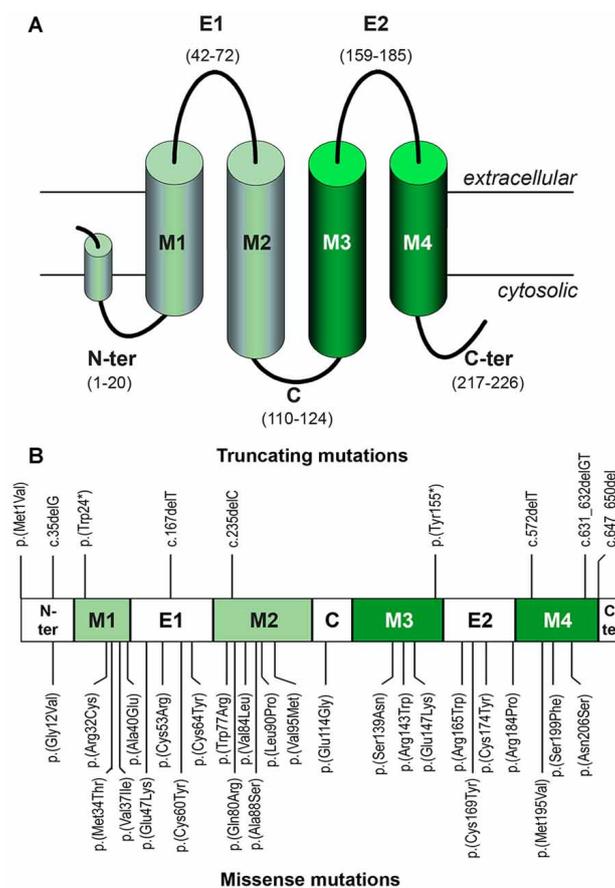


Figura 15. Organización topológica del monómero Cx26 con sus distintos elementos estructurales. Las hélices se representan como cilindros, en color verde claro las que forman la parte hidrofílica del poro y en verde oscuro las que se exponen al

Introducción

ambiente hidrofóbico de la membrana lipídica. Las hélices M2 y M3 se proyectan hacia el citoplasma. B: localización de algunas de las variantes patogénicas de truncamiento y de cambio de sentido en este gen (43).

La DFNB1 es mayoritariamente prelingual aunque no siempre congénita, lo que significa que algunos pacientes podrían pasar el cribado neonatal de hipoacusia sin ser detectados y desarrollar HA severa unos meses después. Se ha estimado que esta penetrancia incompleta al nacimiento puede ser mayor del 6.9% (44). Además, también se han descrito casos postlinguales, generalmente en asociación con variantes patogénicas específicas como la c.-22-2A>C (43).

La gravedad de la HA DNFB1 puede ser desde leve hasta profunda, con gran variabilidad intra e interfamiliar incluso entre individuos con la misma variante. Se ha observado que aquellos que presentan dos variantes patogénicas de truncamiento de la proteína cursan con un fenotipo más severo que los pacientes con dos variantes patogénicas de cambio de sentido, y que en los pacientes con genotipo truncamiento/cambio de sentido el fenotipo es intermedio entre ambos grupos (45, 46). Entre las variantes patogénicas de cambio de sentido se han identificado alelos hipomorfos de baja penetrancia (c.101T>C, p.Met34Thr y c.109G>A, p.Val37Ile), que cuando se presentan en heterocigosis compuesta con otra variante patogénica en *GJB2* dan lugar a fenotipos variables, desde audición normal hasta HA leve-moderada de inicio tardío y progresiva (45). Pero además de estos factores, la gran variabilidad en la HA DNFB1 podría ser atribuida, al menos en parte, a la influencia de modificadores genéticos (43).

Respecto a las variantes patogénicas en *GJB2* asociadas a formas autosómicas dominantes de HA, éstas afectan a residuos específicos de la proteína (Figura 16) y pueden causar DFNA3 no sindrómica o formas sindrómicas como el síndrome de Vohwinkel, síndrome de HA con queratitis e ictiosis (en inglés, *keratitis-ichthyosis-deafness syndrome*, KID), síndrome de Bart-Pumphrey, Queratoderma Palmoplantar e Histrix-ictiosis. Aunque el mecanismo patogénico exacto mediante el cual algunas variantes en Cx26 causan fenotipos únicos cutáneos es aún desconocido, se ha postulado que las distintas sustituciones de aminoácido causan diferentes cambios conformacionales en la estructura tridimensional de la proteína, lo que da lugar a distintos fenotipos dependiendo de las propiedades del aminoácido sustituido. Aparentemente, producen alteración o ganancia de función de los hemicanales, que causan enfermedad cutánea debido a un efecto negativo en la Cx26 silvestre y otras conexinas coexpresadas en la piel, como la conexina 30 (Cx30) (46). Aunque todas estas variantes patogénicas son de herencia AD, recientemente se ha descrito una variante nueva causante de KID de herencia AR en una familia de origen saudí (46).

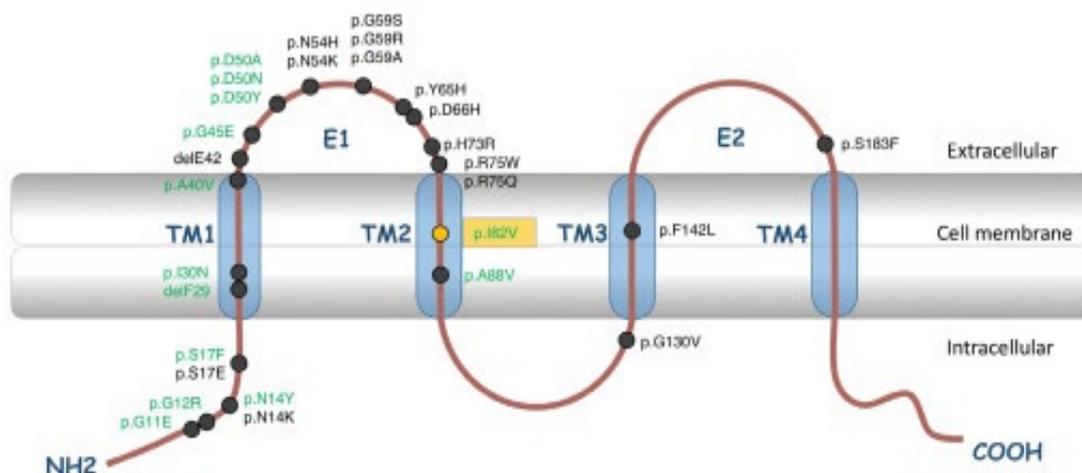


Figura 16. Esquema de la estructura de la proteína conexina 26 y variantes patogénicas causantes de formas sindrómicas de HA asociadas a alteraciones cutáneas. En verde se resaltan las variantes patogénicas asociadas al fenotipo KID. En amarillo, variante causante de KID de herencia AR descrita recientemente (46).

El gen *GJB2* es con diferencia el más prevalente en la HA. Las variantes patogénicas en *GJB2* son la causa más frecuente de HANS AR en la mayoría de poblaciones mundiales y en algunas representa hasta el 50% de HANS AR (47). Hasta la fecha, se han descrito 355 variantes patogénicas causantes de HA en este gen (48), que se distribuyen con diferentes frecuencias entre las distintas etnias. La variante c.35delG es la más frecuente en la mayoría de poblaciones caucásicas y puede suponer hasta el 70% de todas las variantes patogénicas en *GJB2* (45). Sin embargo, la frecuencia de portadores de c.35delG difiere significativamente entre distintas poblaciones europeas, donde parece existir un gradiente con frecuencias hasta dos veces mayores en el sur que en el norte de Europa (49). En España, la variante c.35delG es la más frecuente debido a un efecto fundador. Otras variantes patogénicas frecuentes en poblaciones específicas son c.167delT en judíos Ashkenazi y c.235delC en japoneses (33).

5.1.2. Gen *GJB6*

El gen *GJB6* (OMIM*604418) se encuentra en el locus DFNB1 al igual que el gen *GJB2* y codifica la proteína **conexina 30** (Cx30). Las variantes patogénicas puntuales en este gen causan síndrome de Clouston (displasia ectodérmica hidrótica), de herencia AD y caracterizado por distrofia de uñas, alopecia e hiperqueratosis palmoplantar, que no presenta hipoacusia.

Aunque inicialmente se postuló una interacción digénica entre *GJB2* y *GJB6* como causa de DFNB1 (50), posteriormente se demostró que las variantes patogénicas que silencian la expresión del gen *GJB6* no causan HA en humanos (51) y que la importancia de este gen en la DFNB1 radica en que los

Introducción

genes *GJB6* y *GJB2* comparten un elemento regulador en *cis* localizado en la región 5' del gen *GJB6* (52). Algunas de las deleciones del gen *GJB6*, frecuentes en muchas poblaciones y en especial en la española, afectan a dicha región reguladora y provocan la pérdida de expresión del gen *GJB2*, causando DFNB1 cuando se encuentran en homocigosis o en *trans* con otra variante patogénica en *GJB2*.

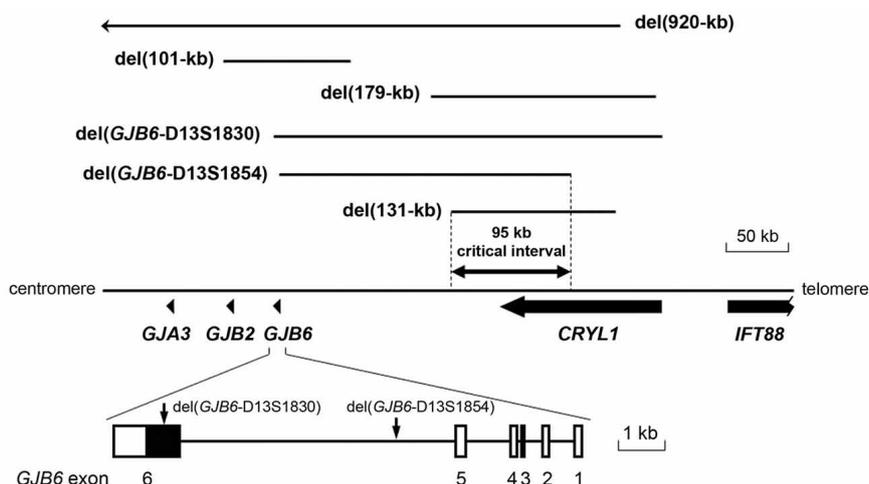


Figura 17. Grandes deleciones responsables de HA en el cromosoma 13q12 y la región crítica mínima candidata donde se sospecha que está situado el elemento regulador en *cis* de la expresión del gen *GJB2* (36).

Las deleciones más frecuentes en *GJB6* son *del(GJB6-D13S1830)*, de 309 kb, y *del(GJB6-D13S1854)*, de 232 kb (Figura 17). Estas deleciones presentan distinta frecuencia y distribución geográfica: la variante *del(GJB6-D13S1830)* es muy frecuente a nivel mundial y especialmente en España, donde en un estudio multicéntrico se observó que representa el 7.6 y 9.7% de los alelos de DFNB1 en Madrid y Barcelona, respectivamente (53). La variante *del(GJB6-D13S1854)* es menos frecuente a nivel mundial y se ha encontrado principalmente en España y Reino Unido, suponiendo en España un 2,2% de todos los alelos patogénicos de DFNB1 (54).

5.2. Genes que codifican proteínas de las uniones estrechas

Las uniones estrechas (en inglés, *tight junctions*) juegan un papel fundamental en la creación de una barrera entre los distintos componentes del órgano de Corti, ayudando a mantener el potencial endococlear. Por tanto, las proteínas de las uniones estrechas como las claudinas, la tricelulina y las proteínas de la familia de las angulinas son críticas para la audición (35).

A continuación, se describen las principales proteínas implicadas en estas uniones intercelulares.

5.2.1. Gen *CLDN14*

Las **claudinas** son una familia de proteínas con cuatro dominios transmembrana que se localizan en las uniones estrechas entre dos células. En mamíferos se han descrito 24 claudinas, codificadas por genes diferentes y con expresión específica de tejido (55).

El gen *CLDN14* (OMIM*605608) codifica la proteína claudina 14 y se expresa principalmente en cóclea, hígado y riñón. Esta proteína se localiza en las uniones estrechas apicales de las CC del órgano de Corti y de otros tejidos, y aumenta la resistencia transepitelial mediante la disminución de la permeabilidad a cationes, particularmente de potasio (35).

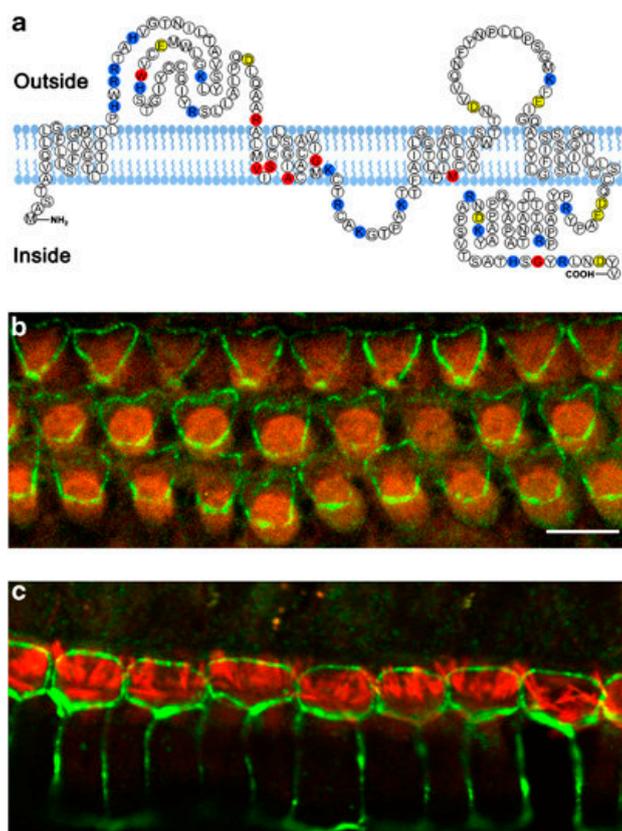


Figura 18. (a) Esquema de la proteína claudina 14 humana. (b) Localización de la claudina 14 (verde) en las uniones estrechas bicelulares y apicales, entre las CCE y las células de Deiters. (c) Localización de la claudina 14 (verde) en las uniones estrechas entre CCI y células pilares y entre dos células pilares adyacentes. Los filamentos de actina se resaltan en rojo. Escala = 5 μ m (56).

Las variantes patogénicas en este gen causan HA neurosensorial AR DFNB29 (OMIM#614035), que generalmente es de inicio prelingual, severa-profunda y estable (16, 57), aunque se ha descrito gran variabilidad inter e intrafamiliar (56). En la actualidad, se han descrito 15 variantes patogénicas en el

gen *CLDN14* (48), y es una causa frecuente de HA AR en población paquistaní, donde supone un 2,25% de HA (56).

5.2.2. Gen *MARVELD2*

Las proteínas responsables de las uniones estrechas tricelulares también se han asociado a hipoacusia (58). Estas uniones se encuentran en los ápices de las células poligonales, en las esquinas formadas entre tres células epiteliales (Figura 19). Entre estas proteínas se encuentran la tricelulina y la proteína ILDR1 (angulina-2).

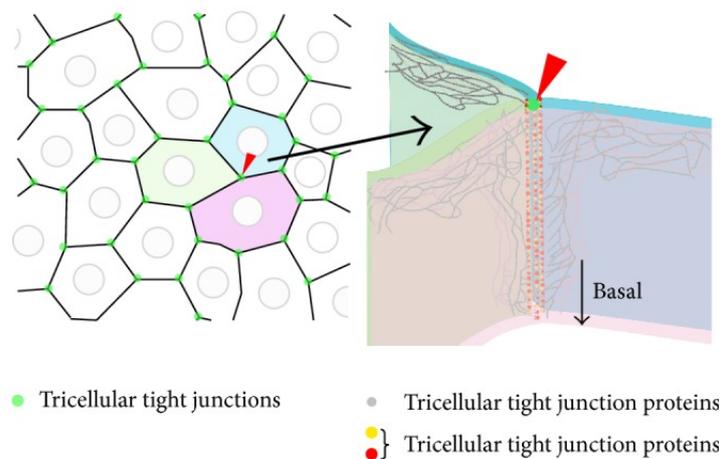


Figura 19. Imagen esquemática de una unión estrecha tricelular. Las uniones estrechas entre dos células sellan los espacios intercelulares (líneas negras). Sin embargo, las esquinas donde convergen tres células (puntos verdes) no pueden ser ocluidas completamente por las uniones bicelulares y puede quedar un canal central. Las proteínas de las uniones estrechas tricelulares (puntos rojos y amarillos) se localizan en ese "canal" y forman una barrera (58).

La **tricelulina** es una proteína con cuatro dominios transmembrana que pertenece a la familia MARVEL. Está codificada por el gen *MARVELD2* (OMIM*610572), y se localiza a lo largo de las uniones estrechas intercelulares del epitelio del oído interno.

Las variantes patogénicas en este gen causan DFNB49 (OMIM# 610153), hipoacusia AR prelingual, estable y moderada-profunda, y ha sido reportada como causa frecuente de HA en población paquistaní y en romaníes del centro de Europa (59). Se han descrito 17 variantes patogénicas asociadas a HA en este gen (48).

5.2.3. Gen *ILDR1*

La proteína *ILDR1*, también conocida como **angulina-2**, pertenece a la familia de las angulinas, que regulan la localización de la tricolina en las uniones estrechas tricelulares, y está codificada por el gen *ILDR1* (*immunoglobulin-like domain-containing receptor 1*, OMIM*609739).

Las variantes patogénicas que provocan pérdida de función del gen *ILDR1* causan HA AR DFNB42 (OMIM#609646) (60), que suele ser de inicio prelingual y moderada-severa (16). Se han descrito 29 variantes patogénicas en este gen (48), la mayoría de ellas en familias de Paquistán, Corea del Sur e Irán. Las variantes patogénicas generalmente dan lugar a truncamiento prematuro de la proteína y presentan un audiograma plano con HA severa en todas las frecuencias. Sin embargo, se ha observado que en algunas variantes patogénicas de cambio de sentido que afectan al dominio *Ig-like* de la proteína, el audiograma es característico, con audición normal en frecuencias bajas y una caída brusca a HA severa en altas frecuencias (61).

5.3. Genes codificantes de proteínas del citoesqueleto

El citoesqueleto está compuesto por una red de filamentos organizados en el citoplasma celular. La capacidad de la célula para moverse, su morfología y la organización de sus componentes celulares dependen de su citoesqueleto. En esta red intervienen tres tipos de filamentos: los filamentos intermedios, los microtúbulos y los filamentos de actina.

Son varios los genes de proteínas citoesqueléticas asociados a HA, entre los que se encuentran el gen *ACTG1*, que codifica la γ -actina, el gen *DIAPH1*, que regula la polimerización de filamentos de actina, y varias miosinas (35).

5.3.1. Gen *ACTG1*

El gen *ACTG1* (OMIM*102560) codifica la **γ -actina**, que es la actina predominante en las CC del oído interno. Esta proteína puede encontrarse en forma monomérica o globular (G-actina), o polimerizada formando filamentos en estructuras celulares (F-actina), como ocurre en los estereocilios de las CC del oído interno.

La F-actina sufre en los estereocilios un proceso conocido como *treadmilling*, que consiste en la adición de nuevos monómeros de ATP-actina en un extremo de los filamentos (en la punta del estereocilio) mientras se liberan monómeros de ADP-actina en el otro extremo (en la base del estereocilio). En este

Introducción

proceso intervienen distintas proteínas colaboradoras, algunas de las cuales son necesarias para la audición normal (62).

Las variantes patogénicas en *ACTG1* pueden afectar al agrupamiento de los filamentos, a la polimerización o al movimiento de las miosinas en las CC, obstruyendo la reparación de la estructura coclear cuando está dañada por el ruido o la edad, y causando así HA postlingual progresiva de herencia AD (DFNA20/26, OMIM#604717) (35).

5.3.2. Gen *DIAPH1*

El gen *DIAPH1* (OMIM*602121) codifica la proteína ***diaphanous homolog-1***, que juega un papel importante en la regulación de la polimerización y el ensamblaje de las estructuras de F-actina en las CC cocleares. En la cóclea de ratón, el gen *Diaph1* se expresa en las células pilares internas (células de soporte), en la base de las CCE y en las CCE, así y como en las estructuras neuronales de la espiral ganglionar y en el nervio coclear (63).

Variantes patogénicas en *DIAPH1* fueron asociadas al primer locus de HA neurosensorial no sindrómica AD (DFNA1, OMIM#124900) en 1997. Esta HA se presenta como progresiva, con inicio en la primera década de la vida. Sin embargo, posteriormente se han descrito asociaciones de este gen con HA y trombocitopenia en ocasiones subclínica, lo que hace sospechar que en realidad este gen esté relacionado con HA sindrómica (63). Este aspecto sigue siendo materia de discusión actual en diferentes grupos de expertos, debido a evidencias insuficientes o contradictorias (64, 65).

5.4. Genes codificantes de miosinas

Las **miosinas**, una superfamilia con más de 35 clases, son una de las primeras proteínas asociadas a hipoacusia humana. Son moléculas motoras que contienen tres dominios principales: una cabeza motora N-terminal muy conservada que une actina y ATP; una región reguladora (cuello) con un número variable de motivos IQ que unen calmodulina; y una región C-terminal correspondiente a la cola, que varía entre las distintas clases de miosinas y que es responsable de la especificidad funcional de cada una de ellas (66).

La cabeza motora de la miosina contiene dos subdominios, uno de unión a actina y otro de unión a ATP, que le permiten asociarse y disociarse de las fibras de actina efectuando un movimiento a lo largo

de los filamentos (15). En el oído interno, las miosinas tienen funciones especializadas asociadas con los estereocilios (67) (Figura 20).

Las miosinas se clasifican en miosinas convencionales de dos cabezas (miosinas II), responsables de la contracción muscular, y las miosinas no convencionales. Varias miosinas no convencionales han demostrado tener un papel crucial en el oído interno causando HANS no sindrómica AR: *MYO3A*, *MYO6*, *MYO7A* y *MYO15A*, además de dos miosinas convencionales no musculares: *MYH9* y *MYH14*. La variabilidad interindividual de la hipoacusia relacionada con estos genes es elevada y no se ha encontrado una asociación clara entre genotipo y fenotipo (66).

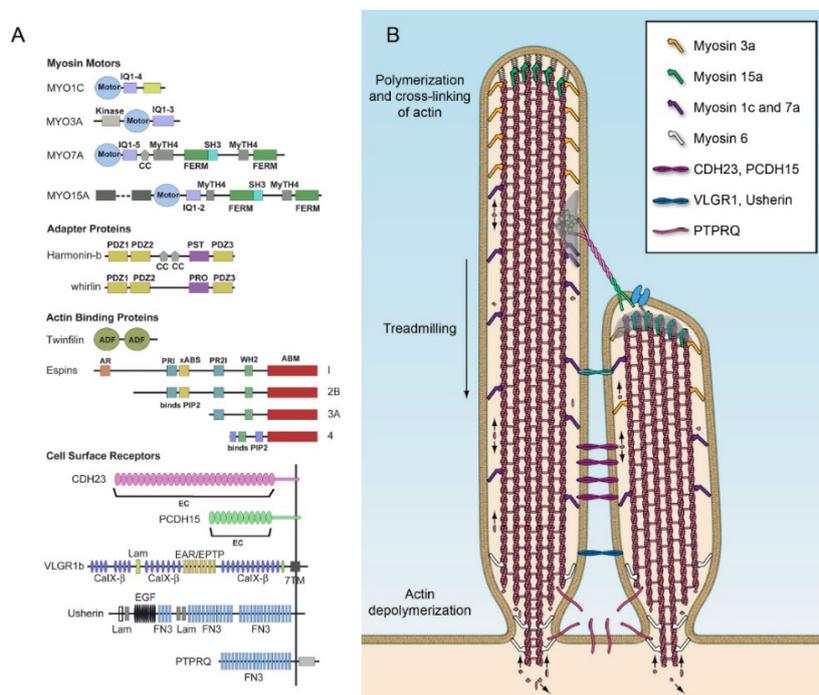


Figura 20. Proteínas de los grupos estereociliares. A: Dominios estructurales de las diferentes proteínas implicadas en lo estereocilios. B: Diagrama de dos estereocilios indicando la distribución de algunas de las moléculas implicadas (68).

5.4.1. Gen *MYO7A*

El gen Miosina VIIA (*MYO7A*, OMIM*276903) se localiza en la región cromosómica 11q35.3 y codifica la proteína **miosina VIIA** de la superfamilia de las miosinas no convencionales, formada por un dominio motor altamente conservado N-terminal, cinco regiones IQ, un dominio α -hélice SAH, dos dominios MyTh4, dos dominios FERM y un dominio SH3 (Figura 21).

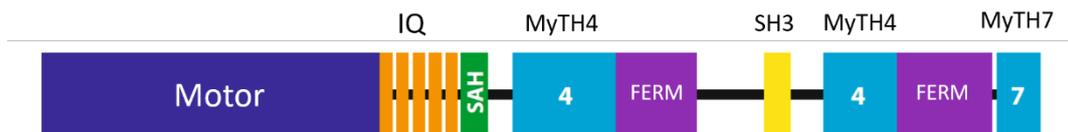


Figura 21. Dominios de la proteína miosina VIIa. Motor: dominio cabeza motora, IQ: motivo IQ-binding; SAH: dominio α -hélice; MyTH4: dominio myosin tail homology 4; SH3: dominio Src homology 3; FERM: dominio 4.1 protein-ezrin-radixin-moesin; MyTH7: dominio myosin tail homology 7. Modificado de Masters et al. (69).

La miosina VIIa se expresa en el citoplasma y en el estereocilio de las CC cocleares (67). Estudios en ratones han demostrado que esta proteína está directamente implicada en la regulación de la longitud de los estereocilios.

El gen *MYO7A* (OMIM#276903) causa el síndrome de Usher tipo 1B (OMIM# 276900), HA no sindrómica AR DFNB2 (OMIM#600060) o HA no sindrómica AD DFNA11 (OMIM#601317).

5.4.2. Gen *MYO6*

El gen *MYO6* (OMIM*600970) codifica la miosina VI, que es una proteína motora reversa, es decir, que se mueve hacia el extremo negativo de los filamentos de actina, en sentido contrario a otras miosinas. En el oído interno esto significa que, a diferencia de otras, la miosina VI se mueve a lo largo de los filamentos de actina hacia la base del estereocilio (67). Interviene en procesos como el transporte de vesículas de membrana y la migración celular, y es necesaria para la integridad estructural de las CC del oído interno.

Estructuralmente, la miosina VI, al igual que todas las miosinas motoras, consiste en un dominio motor N-terminal altamente conservado que puede unir ATP y filamentos de actina. Los cambios conformacionales en el dominio motor generados por la hidrólisis de ATP se transmiten a través de la región de conversión dando lugar a un gran movimiento del brazo adyacente. El dominio C-terminal de la miosina VI contiene un dominio de hélice alfa central seguido de un dominio globular de unión al elemento a transportar (en inglés, *cargo binding domain*, CBD) (Figura 22).



Figura 22. Dominios de la proteína MYO6. Motor: dominio cabeza motora; IQ: motivo IQ-binding; SAH: dominio único α -hélice; CBD: dominio cargo-binding. Modificado de Masters et al. (69).

Las variantes patogénicas en el gen *MYO6* dan lugar a HA no sindrómica AD DFNA22 (OMIM#606346) (70) o HA no sindrómica AR DFNB37 (OMIM#607821), lo que posiblemente refleja diferencias en la fisiopatología de las variantes patogénicas (71).

La mayoría de casos de DFNA22 presentan HA progresiva de inicio en la juventud, con un empeoramiento marcado a partir de los 40 años de edad. Además, parece existir una correlación genotipo-fenotipo de manera que, si la variante no altera la función del dominio motor, la HA es más leve y de inicio más tardío (72). Por otra parte, si la variante es de cambio de sentido, se especula que podría afectar a la formación de los homodímeros de miosina VI necesaria para algunas de sus funciones, de manera que actuaría de forma dominante negativa, dando lugar a mayor impacto fenotípico (70). En contraste, las variantes patogénicas de *splicing* o de cambio del marco de lectura llevarían a *nonsense-mediated decay* (NMD) de los alelos mutados, resultado en una reducción o ausencia de la expresión de proteína. Al parecer, tanto el exceso de proteína como el defecto pueden causar HA. Sin embargo, las HA causadas por alteraciones cuantitativas en la miosina VI parecen ser menos severas que la HA resultante de una proteína mutante, que puede actuar de forma dominante (71).

En la actualidad, se han descrito más de 80 variantes patogénicas en *MYO6A* (48), y la HA AD DFNA22 causada por variantes en este gen constituye una de las principales causas de HA en población japonesa, donde se ha descrito en un 2.4% de los pacientes con HA AD (71). Este gen también es de gran relevancia en población europea, donde en un estudio publicado en Holanda se ha descrito como principal causa de HA AD, además de estar relacionado con HA AR (73).

5.4.3. Gen *MYO3A*

La **miosina IIIa** está codificada por el gen *MYO3A* (OMIM*606808). Esta miosina tiene una estructura única que la diferencia de las demás, ya que contiene un dominio quinasa en su extremo N-terminal que parece regular su cinética motora.

Introducción

En las CC cocleares, la miosina III se expresa en la punta del estereocilio, por lo que se especula que está implicada en el proceso de mecanotransducción. Además, se ha reportado que interactúa con la proteína espina, codificada por el gen *ESPN* e implicada también en la hipoacusia, y que cuando se coexpresan producen alargamiento de los estereocilios y regulan entre ambas la longitud de los mismos (67).

Las variantes patogénicas en el gen *MYO3A* causan HA no sindrómica AR DFNB30 (OMIM#607101).

5.4.4. Gen *MYO15A*

Las variantes patogénicas en el gen *MYO15A* causan HA congénita y severa-profunda AR DFNB3 (OMIM#600316), que suele ser de inicio prelingual, severa-profunda y estable (16), aunque algunas variantes pueden presentarse como fenotipos más leves.

El gen *MYO15A* (OMIM*602666) se localiza en el cromosoma 17p11.2. Este gen consta de 66 exones y codifica la proteína **miosina XVa**, que se expresa principalmente en el oído interno y en la glándula pituitaria (69). La miosina XVa se localiza en la punta de los estereocilios e interviene en el alargamiento, el desarrollo y la disposición en forma de escalera de los estereocilios y en la polimerización de los filamentos de actina (15).

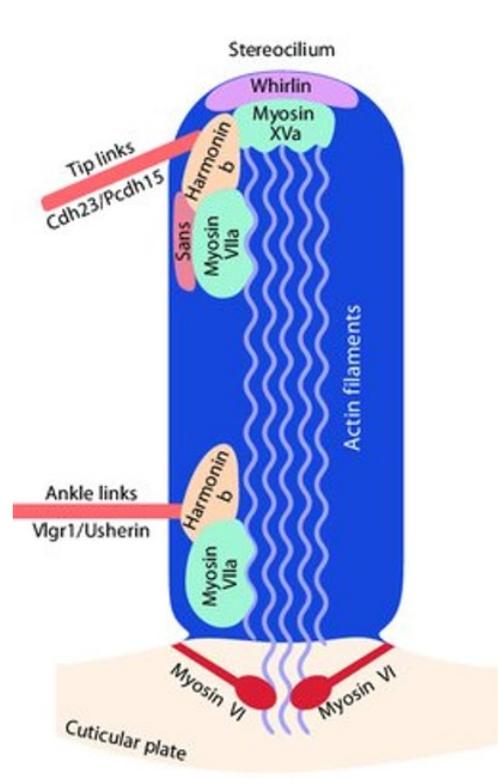


Figura 23. Ilustración esquemática de un estereocilio con las principales proteínas que componen su estructura y la de las uniones apicales y basales. Modificado de (67).

La miosina XVa presenta tres isoformas codificadas por distintos transcritos: las isoformas 1 y 2 se expresan en el oído interno y la isoforma 3 en la glándula pituitaria (74).

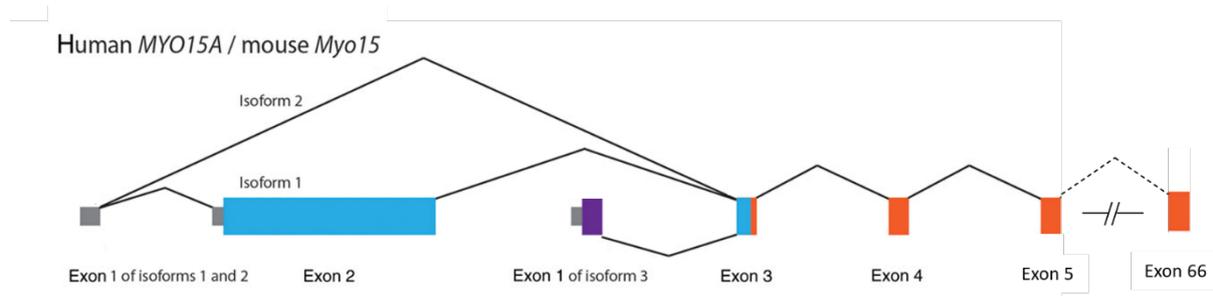


Figura 24. Representación esquemática del gen MYO15A con los sitios de inicio de transcripción que dan lugar a cada una de las isoformas de la proteína miosina XVa. Modificado de (74).

La transcripción de las isoformas 1 y 2 se inicia en el exón 1, mientras que la isoforma 3 utiliza un sitio alternativo de inicio de transcripción en un exón 1 diferente localizado en el intrón 2. La isoforma 1 contiene un dominio N-terminal codificado por un exón 2 gigante, un dominio motor, dos motivos IQ

Introducción

y una cola formada por dos dominios MyTH4, dos dominios FERM, un dominio SH3 y un extremo C-terminal (75). El transcrito que codifica la isoforma 2 no contiene el exón 2 gigante, por lo que dicha isoforma carece de dominio N-terminal (Figura 25).

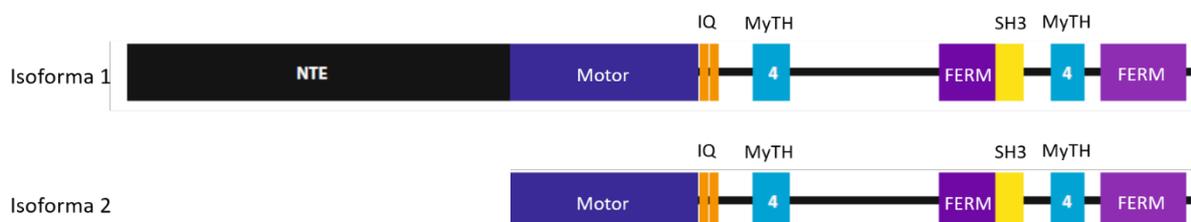


Figura 25. Isoformas 1 y 2 de la proteína miosina XVa y dominios de cada una de ellas. NTE: dominio N-terminal. Modificado de (69).

La función de las isoformas 1 y 2 y su expresión a lo largo de la vida son diferentes, de manera que la isoforma 2 predomina en los estadios iniciales del desarrollo y la elongación de los estereocilios y posteriormente es sustituida por la isoforma 1, que es responsable del mantenimiento de los mismos (76).

Estas diferencias en la función de las isoformas 1 y 2 parecen traducirse en una expresión clínica diferente de las variantes patogénicas en función de la isoforma a la que afectan. Se ha postulado que las variantes patogénicas en la región codificante del dominio N-terminal, que afectan solamente a la isoforma 1, presentan una HA más leve con restos de audición en bajas frecuencias, mientras que las variantes patogénicas en dominios que afectan a ambas isoformas presentan HA profunda a todas las frecuencias (74). Sin embargo, la correlación genotipo-fenotipo del gen *MYO15A* parece ser más compleja, ya que conforme se describen más casos de HA relacionados con este gen se observa que variantes patogénicas en el dominio N-terminal también causan HA congénita severa o profunda y variantes patogénicas que afectan a otros dominios también causan HA más leves, y se han descrito variaciones intrafamiliares entre individuos con la misma variante (75).

Las primeras variantes patogénicas en *MYO15A* causantes de DFNB3 fueron identificadas hace más de 20 años en dos familias consanguíneas de India (77). Sin embargo, el cribado de los 66 exones de este gen suponía un esfuerzo excesivo y rara vez se estudiaba este gen en familias con HA, por lo que su contribución a la hipoacusia ha estado infravalorada a lo largo de este tiempo hasta la aparición de la

NGS. En la actualidad, las variantes patogénicas en *MYO15A* son una causa bien conocida de hipoacusia AR a nivel mundial, siendo la tercera causa más frecuente de hipoacusia (74). En la actualidad se han descrito hasta 255 variantes patogénicas en este gen (48). Las variantes descritas en la bibliografía y su localización se muestran a continuación en la Figura 26.

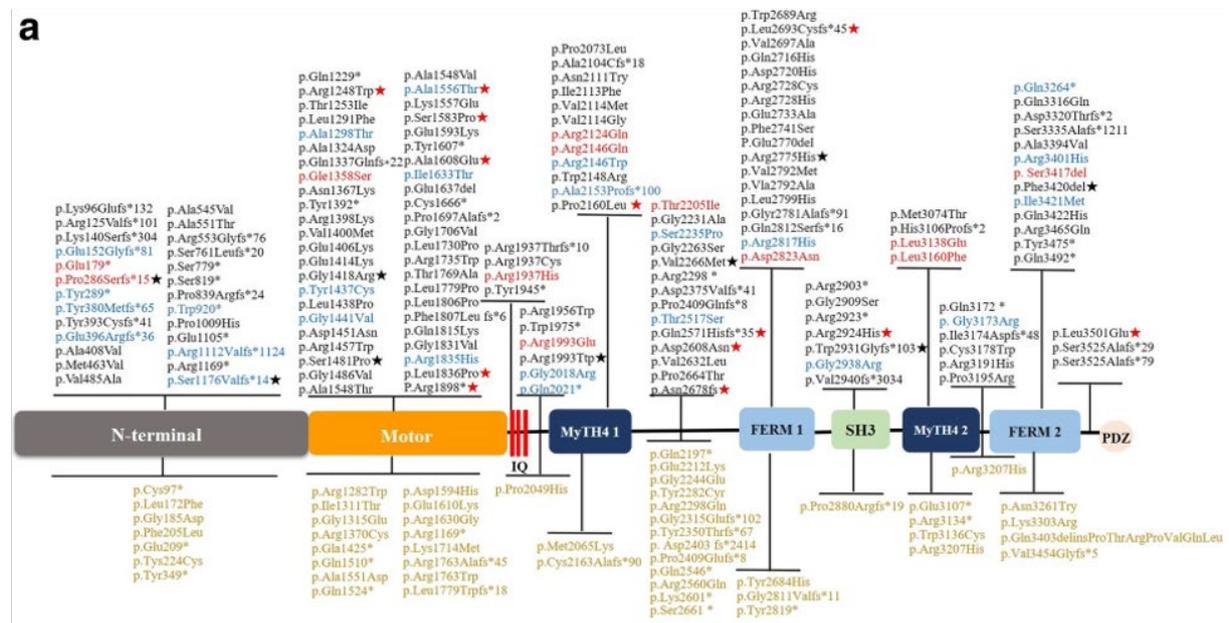


Figura 26. Dominios de la proteína miosina XVa, variantes descritas previamente en la literatura y fenotipos auditivos relacionados. En azul, variantes asociadas a fenotipos más leves; en rojo, variantes descritas en asociación a fenotipos severos y leves, en marrón, variantes reportadas sin descripción del fenotipo. Modificado de Zhang et al. (75).

En España, sólo se ha reportado un paciente con HA causada por alteración del gen *MYO15A* (34), en un paciente con HA congénita bilateral DFNB3, que presentaba dos variantes patogénicas, una de ellas conocida, en el dominio FERM1, y la otra no descrita previamente, en el dominio SH3. Por desgracia, no se aporta más información sobre el fenotipo de dicho paciente en esa publicación.

5.5. Genes codificantes de proteínas de adhesión

Las proteínas de adhesión son un grupo diverso de familias que incluye las integrinas, selectinas, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y las cadherinas. Todas ellas se proyectan hacia el exterior de la superficie celular, donde facilitan las interacciones y uniones entre células o con la matriz extracelular (15).

5.5.1. Gen *CDH23*

Las **cadherinas** son un subgrupo de la superfamilia de las moléculas de adhesión que promueven las uniones celulares y dependen de la presencia de iones de calcio para su funcionamiento adecuado. A lo largo de su estructura molecular, estas proteínas contienen motivos repetitivos de unión a calcio llamados dominios EC y un motivo citoplasmático que les permite su conexión a la red del citoesqueleto (15).

La cadherina 23, codificada por el gen *CDH23* (OMIM*605516), interactúa con la proteína protocadherina 15 para formar las uniones apicales entre los estereocilios (Figura 27). Estas uniones están implicadas en la organización de los grupos de los estereocilios y en la apertura de los canales de mecanotransducción, por lo que el papel de estas proteínas en la audición es fundamental (78).

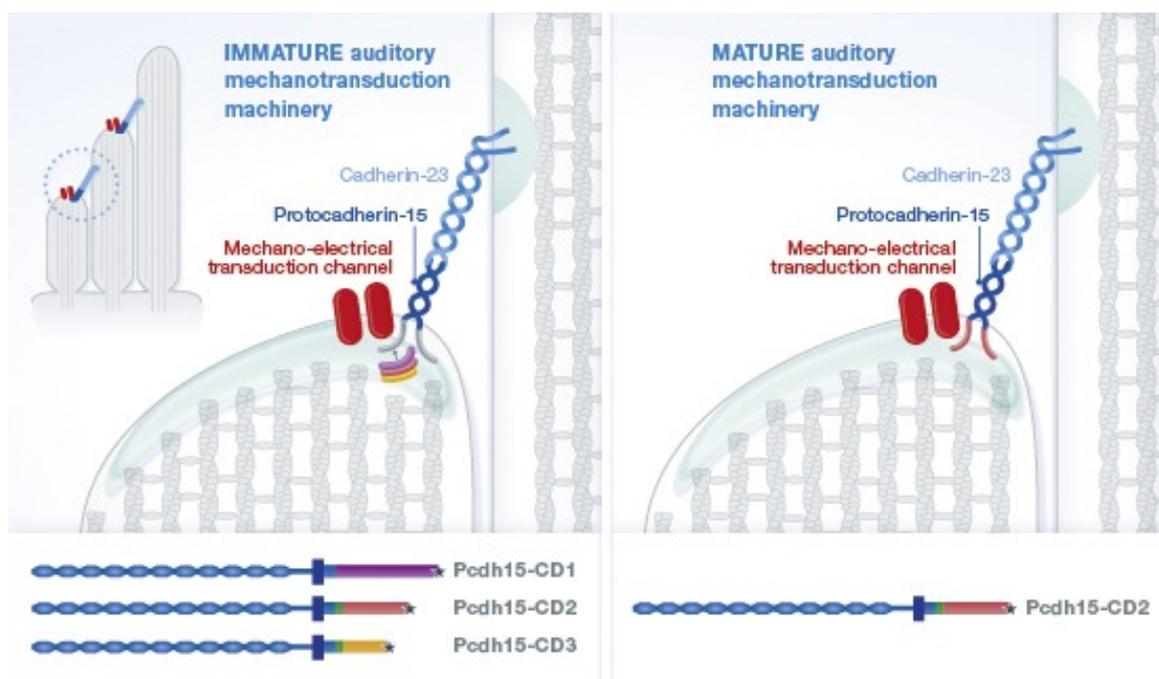


Figura 27. Representación esquemática de una unión apical entre dos estereocilios, formada por las proteínas cadherina-23 y protocadherina-15. Modificado de Pepermans et al. (79).

La hipoacusia por variantes patogénicas en el gen *CDH23* se asocia al síndrome de Usher 1D (OMIM#601067), que se presenta con HA, retinitis pigmentaria y disfunción vestibular, y a HA no sindrómica DFNB12 (OMIM#601386), de inicio congénito o prelingual y severa-profunda (16). Sin

embargo, conforme se van reportando más casos, se ha observado que algunas variantes patogénicas se asocian a HA postlingual moderada (78) y que en algunos casos puede incluso asemejarse a la HA debida a la edad (presbiacusia) (80).

Se han descrito 326 variantes patogénicas en este gen (48). Los estudios genotipo-fenotipo sugieren que las variantes patogénicas de cambio de sentido o alteraciones que mantienen el marco de lectura causan HANS no sindrómica AR, mientras que las variantes patogénicas de truncamiento de proteína causan síndrome de Usher 1D. Esta correlación sin embargo no es absoluta, ya que se han identificado variantes patogénicas *inframe* en pacientes Usher. Ninguna variante en *CDH23* predomina como causa de síndrome de Usher 1D o HA no sindrómica AR.

La relevancia del gen *CDH23* como causa de HA, que hace unos años no era estudiado debido a su gran tamaño, es cada vez mayor debido a su alta prevalencia en algunas poblaciones como Japón, donde se ha descrito como la tercera causa más frecuente de HA después de *GJB2* y *SLC26A4* (80).

5.5.2. Gen *PCDH15*

El gen *PCDH15* (OMIM*605514) codifica otro miembro de la superfamilia de las cadherinas, la **protocadherina 15**, que junto con la cadherina 23 forma las uniones apicales entre los estereocilios (Figura 27).

Al igual que en el caso del gen *CDH23*, las variantes patogénicas en *PCDH15* pueden causar tanto HA sindrómica (síndrome de Usher 1F, OMIM#602083) como no sindrómica (DFNB23, OMIM# 609533) (15). En general, se considera que las variantes patogénicas de truncamiento producen síndrome de Usher 1F, mientras que las variantes patogénicas de cambio de sentido son causa de DFNB23 (81). Sin embargo, la asociación entre el gen *PCDH15* y la HA DFNB23 se considera aún limitada, debido al bajo número de variantes reportados y a la falta de información sobre los datos clínicos en varios de los casos publicados, que no permiten descartar una aparición tardía de retinosis pigmentaria en los pacientes (64).

5.6. Genes codificantes de proteínas de los canales iónicos

En el oído interno, los canales iónicos tienen un papel fundamental en el reciclaje y mantenimiento de la homeostasis iónica de la endolinfa, que es crucial para la transducción auditiva normal. A lo largo

Introducción

de los años se han identificado varios genes, sindrómicos y no sindrómicos, que codifican los canales iónicos y los transportadores (15).

5.6.1. Gen *KCNQ4*

El gen *KCNQ4* (OMIM*603537) codifica una proteína que forma parte del canal de potasio dependiente de voltaje. Esta proteína tiene seis dominios transmembrana y un segmento *loop* que hace de poro (Figura 28). El canal está compuesto por 4 unidades de proteína que forman un homo/heterotetramero (15).

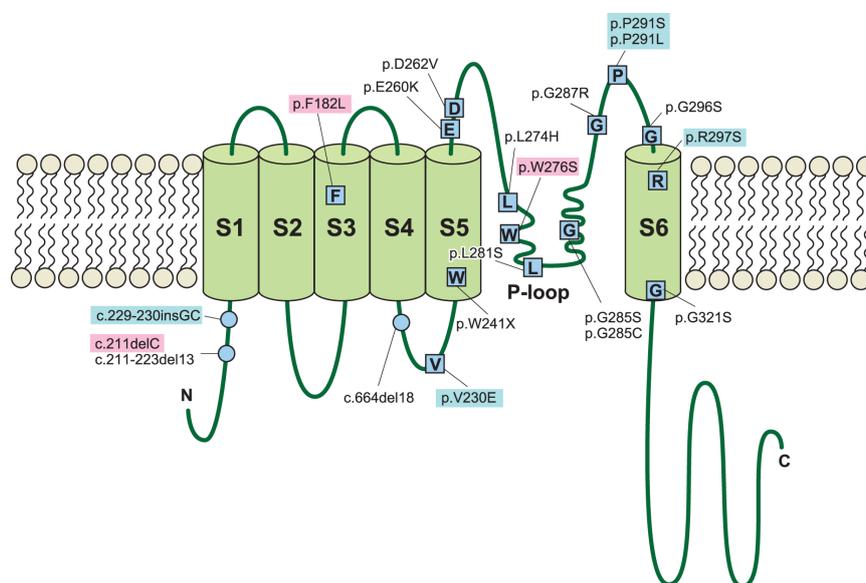


Figura 28. Estructura de la proteína *KCNQ4*: seis dominios transmembrana (S1-S6) y el P-loop, y varias de las variantes patogénicas descritas previamente en la bibliografía. Modificado de Naito et al. (82).

Las variantes patogénicas en *KCNQ4* causan HA no sindrómica AD (DFNA2, OMIM#600101) que se caracteriza por ser de inicio postlingual en la segunda década de la vida, progresiva y de altas frecuencias (16, 82). Ha sido descrito como uno de los genes causales más frecuentes de HANS AD (83).

Variantes patogénicas en el gen *KCNQ1* (OMIM*607542), que pertenece a la misma familia, pueden causar síndrome QT largo (OMIM#192500) y síndrome cardioauditivo de Jervell y Lange-Nielsen (OMIM#220400) (35).

Se han descrito 44 variantes patogénicas diferentes (48) en el gen *KCNQ4*. Se ha propuesto una relación genotipo-fenotipo, según la cual las variantes patogénicas de cambio de sentido causan HA de inicio en edad joven y que afecta a todas las frecuencias debido a un probable efecto dominante-negativo mediante el cual la proteína interfiere con la subunidad normal del canal. En el caso de las variantes patogénicas de pérdida de función, parece que causan un fenotipo más leve, de inicio más tardío y que afecta solamente a frecuencias altas (33). Variantes patogénicas en este gen se han descrito en el 6,6% de las HA neurosensoriales AD en Japón, siendo la primera causa de HA neurosensorial AD en ese país, donde la variante más prevalente es c.211delC (68% de todas las variantes patogénicas en *KCNQ4*) (82).

5.6.2. Gen *SLC26A4*

El gen *SLC26A4* (OMIM*605646) codifica la proteína **pendrina**, que funciona como transportador de iones cloruro, yoduro y bicarbonato en las membranas celulares. Se expresa mayoritariamente en cóclea, tiroides y riñón.

La disfunción de la pendrina da lugar a un fenotipo variable que va desde el síndrome de Pendred (OMIM#274600), que se manifiesta con HA y bocio eutiroideo, hasta la HA no sindrómica aislada con acueducto vestibular alargado DFNB4 (OMIM#600791) (35). Estos fenotipos pueden ser difíciles de diferenciar, ya que el bocio generalmente no se manifiesta hasta la adolescencia y los individuos afectados dentro de una misma familia pueden ser discordantes respecto a la enfermedad tiroidea (83).

Las variantes patogénicas en *SLC26A4* son la segunda causa más frecuente de HANS AR (33, 84). Se han descrito 506 variantes patogénicas diferentes en este gen (48). Las variantes patogénicas predominantes difieren entre poblaciones, siendo c.1246A>C (p.Thr416Pro) y c.1001G>A (p.Gly334Glu) las más prevalentes en caucásicos, c.2168A>G (p.His723Arg) en japoneses y coreanos, y c.919-2A>G en chinos de la etnia Han (84).

5.7. Otros genes de relevancia en hipoacusia

5.7.1. Gen *OTOF*

El gen *OTOF* (OMIM*603681) se localiza en la citobanda 2p23 y codifica la proteína **otoferlina**. La otoferlina pertenece a una familia de proteínas citosólicas ancladas a la membrana plasmática que contienen varios dominios de unión a calcio (dominios C2) e intervienen en la exocitosis de vesículas

Introducción

sinápticas. En el OI, la expresión de otoferlina es alta en las CCI y menor en las CCE, y es esencial para la liberación de neurotransmisores por las CCI (33).

Las variantes patogénicas en el gen *OTOF* provocan una fusión defectuosa de las vesículas sinápticas, que afecta a la liberación de glutamato en el espacio sináptico y por tanto a la neurotransmisión (85). Como consecuencia, las terminaciones del nervio auditivo no se activan o se activan de forma desincronizada, por lo que, aunque se mantenga cierto grado de audición residual, la percepción del habla está afectada. Debido a su menor nivel de expresión en las CCE, la afectación de estas células es menor (33).

Las alteraciones en el gen *OTOF* dan lugar a HA no sindrómica AR DFNB9 (OMIM#601071), que puede presentarse como dos fenotipos diferentes: HA prelingual no sindrómica, generalmente bilateral, congénita y severa-profunda; y de forma menos frecuente como neuropatía auditiva no sindrómica sensible a la temperatura (*temperature-sensitive nonsyndromic auditory neuropathy*, TS-NSAN), que consiste en audición normal o hipoacusia leve en condiciones normales y aparición de HA severa-profunda en presencia de fiebre. Cuando la fiebre se resuelve, la audición vuelve a su estado normal (86).

La hipoacusia DFNB9 se presenta inicialmente con otoemisiones acústicas (OEA) preservadas y potenciales evocados auditivos del tronco cerebral (PEATC) ausentes, sugiriendo neuropatía auditiva. Sin embargo, con el tiempo las OAE desaparecen por afectación de las CCE y el test electrofisiológico es más consistente con un defecto coclear. La distinción entre neuropatía auditiva y defecto coclear es importante, ya que los implantes cocleares pueden ser de poco valor para personas con neuropatía auditiva, pero se ha observado que son efectivos en individuos con HA asociada al gen *OTOF* (86).

Se han descrito fenotipos de HA de menor grado en sujetos con algunas variantes patogénicas de cambio de sentido en el gen *OTOF*, en los que aparentemente la otoferlina mantiene una función residual preservando cierto grado de audición. Además, en el caso de algunos pacientes con variantes de cambio de sentido se ha descrito una neuropatía auditiva transitoria sensible a temperatura: los umbrales auditivos son normales o ligeramente elevados cuando están afebriles, pero al aumentar su temperatura corporal aparecen grados variables de HA que puede llegar a ser profunda algunos casos (85).

Puesto que el nervio auditivo funciona correctamente, los implantes cocleares en los pacientes con variantes patogénicas en *OTOF* proporcionan un rendimiento similar al obtenido con otras hipoacusias cocleares (87), restaurando tanto la sensibilidad auditiva como la percepción del habla (81).

Se han descrito 192 variantes patogénicas causantes de HA en el gen *OTOF* (48). En población española, la variante más frecuente es la c.2485C>T (p.Gln829*) y supone la tercera causa más frecuente de HANS AR prelingual en este grupo (88).

5.7.2. Gen *STRC*

El gen *STRC* (OMIM*606440) codifica la **estereocilina**, una proteína estructural extracelular de gran tamaño que se encuentra en los estereocilios de las células ciliadas externas (CCE) cocleares.

La estereocilina forma parte de los conectores horizontales superiores localizados entre los estereocilios, y de las uniones de los estereocilios más largos a la membrana tectoria (Figura 29). Ambos elementos son importantes para la adecuada cohesión y posicionamiento de los estereocilios en el oído interno (89). La disrupción del gen *STRC* provoca disfunción de las CCE (90).

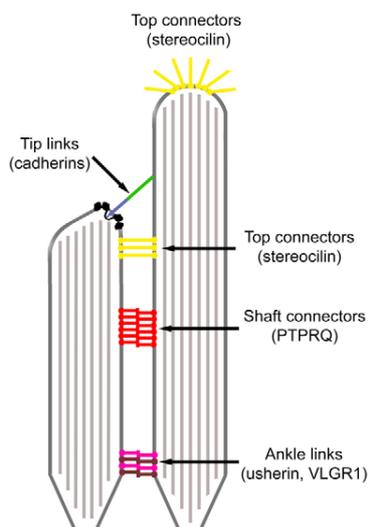


Figura 29. Diferentes uniones presentes en los estereocilios y proteínas implicadas. Las uniones en las que interviene la proteína estereocilina se representan en amarillo (91).

El gen *STRC* se localiza en una región compleja del cromosoma 15 que incluye una duplicación en tándem, dando lugar a un pseudogén (*pSTRC*) que conserva al 100% la primera mitad de la región funcional del gen *STRC* (incluidos exones e intrones). A lo largo de todo el *locus*, *STRC* y *pSTRC* presentan una homología del 98.9% y son idénticos en >99% si tenemos en cuenta sólo la región codificante (Figura 30) (92). Dicho pseudogén es inactivo debido a la presencia de una variante sin sentido en el exón 20; sin embargo, su alta homología con *STRC* hace complicado su estudio.

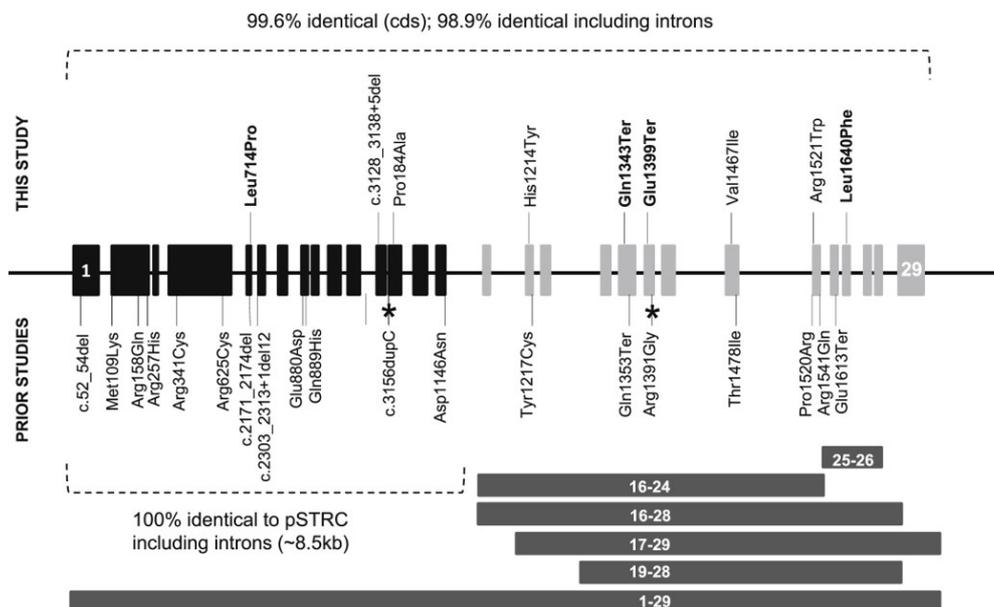


Figura 30: Imagen esquemática del gen *STRC* y su pseudogén *pSTRC*, y localización de las variantes. Las cajas negras representan exones con 100% de identidad con *pSTRC*. Las cajas grises indican exones con pares de bases divergentes. Las barras grises representan deleciones del gen *STRC*. Modificado de Mandelker et al. (88).

La arquitectura genómica de esta región, rica en duplicaciones segmentarias por recombinación homóloga no alélica (en inglés, *non-allelic homologous recombination*, NAHR), la hace propensa a grandes deleciones y/o duplicaciones también conocidas como alteraciones en el número de copias (en inglés, *copy number variations*, CNV) en los genes que se localizan en ella. Por tanto, su estudio requiere una aproximación combinada capaz de detectar los grandes reordenamientos y las variantes puntuales y que evite las interferencias técnicas que genera el pseudogén.

Las deleciones y variantes patogénicas bialélicas en el gen *STRC* causan HA autosómica recesiva DFNB16 (OMIM#603720), que suele ser leve-moderada, de inicio prelingual y lentamente progresiva, sin llegar nunca a HA completa (93). Además de las grandes deleciones, se han descrito 42 variantes puntuales patogénicas en este gen (48). En un estudio reciente sobre la relación genotipo-fenotipo de las alteraciones en *STRC* se ha observado que, en los pacientes con variantes patogénicas en heterocigosis compuesta (deleción y variante puntual en *trans*), existen diferencias audiológicas en función de la naturaleza de esta variante: si la variante es de cambio de sentido causa una HA más leve de inicio tardío, mientras que si provoca el truncamiento prematuro de la proteína el inicio es precoz y la HA moderada. Además, los pacientes con variantes patogénicas sin sentido tienen HA en todas las frecuencias, mientras que en los pacientes con una variante de cambio de sentido las frecuencias afectadas son principalmente las del rango del habla (90).

Debido a la complejidad de su análisis, la prevalencia de HA causada por el gen *STRC* ha sido desconocida durante mucho tiempo. Sin embargo, varios estudios recientes han demostrado que las alteraciones del gen *STRC* son causa frecuente de HANS de herencia AR. Las alteraciones patogénicas bialélicas en este gen son responsables del 6% y 5,5% de las HANS en Alemania y la República Checa respectivamente (94, 95), el 2% de pacientes con HA hereditaria (sindrómica y no sindrómica) de Holanda (69) y el 4% de pacientes con HA de Francia (96). El 4,3% de las HANS leve moderadas en población japonesa se han atribuido a deleciones homocigotas en este gen (97). Entre un estudio con 1.119 pacientes de distintas etnias realizado en Estados Unidos se observó que en la población caucásica la frecuencia de HA por *STRC* era similar a la relacionada con *GJB2* (21% y 20%, respectivamente), y lo mismo ocurría en población hispana (16% y 14%) (98). En el caso de la población española, aunque la información disponible muestra la misma tendencia, es escasa, con una sola publicación científica al respecto donde se describe el gen *STRC* entre las causas frecuentes de HANS (2/50 pacientes con HANS severa-profunda no causada por *GJB2/GJB6*, *OTOF* ni *MT-RNR1*), después de *ACTG1* y *USH2A* (34).

Respecto a la frecuencia de portadores heterocigotos de deleciones de *STRC* en población general, en un estudio realizado mediante el cribado de deleciones en *STRC* en controles sanos y la revisión de los datos públicos disponibles sobre CNV, estimaron una frecuencia de portadores en heterocigosis de la deleción de aproximadamente un 1,6% (89). Otros autores describen frecuencias de portadores similares o mayores, como es el caso de Japón, con un 2,6% (93)(99). No existe bibliografía sobre la frecuencia de portadores en población española.

5.7.3. Gen *COCH*

El gen *COCH* (en inglés, *coagulation factor C homology*, OMIM*603196) se localiza en el cromosoma 14q12-13 y codifica para la proteína **cochlina**. Contiene 12 exones y está estructuralmente organizado en un péptido señal corto SP, un dominio N-terminal de homología al factor C (FCH, también conocido como LCCL) y dos dominios *von Willebrand factor A-like* (vWFA-1 y 2) (100) (Figura 31).

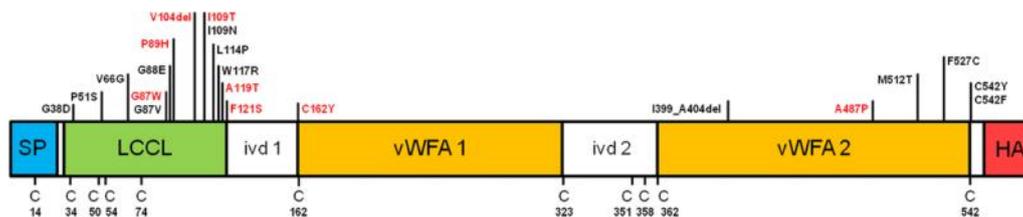


Figura 31. Representación esquemática de los dominios de la proteína cochlina: un péptido señal N-terminal, un dominio LCCL, dos dominios vWFA y *fosdominios ivf1*, y varias de las variantes reportadas. C= residuo de cisteína. Modificado de Bae *et al.* (101).

Las variantes patogénicas en el gen *COCH* son causa de HA no sindrómica AD DFNA9 (OMIM#601369), que suele ser de inicio tardío (desde 2ª a 4ª década de la vida) y progresiva, con grados variables de disfunción vestibular (97). Sin embargo, se han descrito fenotipos diferentes, como es el caso de una variante localizada en el dominio vWFA1 que segregaba de forma AD en una familia china, con aparición a menor edad de la habitual (17 años) (102), y el caso descrito por Janssens de Varebeke *et al.* (96), donde identifican una variante sin sentido en homocigosis en una familia con HA AR, congénita, moderada y con disfunción vestibular. Las variantes patogénicas AD en este gen suelen ser de cambio de sentido con un efecto presumiblemente dominante-negativo o de ganancia de función, que causa deterioro vestibular e HA de inicio tardío. En el caso de la herencia AR reportada, la variante genera un codón de parada prematuro que hace al ARNm susceptible de *nonsense-mediated decay* (NMD) (96).

Se han descrito 31 variantes patogénicas en el gen *COCH* (48).

5.7.4. Gen *TMPRSS3*

El gen *TMPRSS3* (*transmembrane protease, serine 3*, OMIM*605511) se localiza en la región cromosómica 21q22.3. Este gen codifica la proteína **TMPRSS3**, una serinproteasa formada por un dominio transmembrana, un dominio A receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLRA), un dominio receptor *scavenger* rico en cisteína (SRCR) y un dominio serinproteasa C-terminal (Figura 32). Esta proteína juega un papel fundamental en el mantenimiento de una concentración baja de iones sodio en la endolinfa del oído interno mediante la activación de los canales de sodio ENaC, que están regulados por actividad serinproteasa (103).

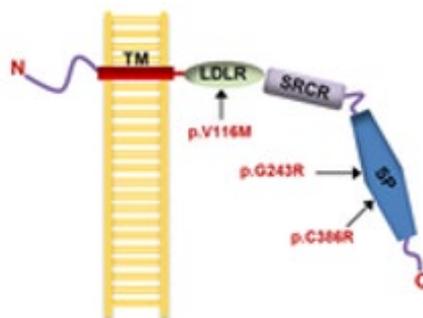


Figura 32. Representación esquemática de la proteína TMPRSS3 y localización de algunas variantes patogénicas publicadas. Modificado de Ganapathy et al. (104).

Las variantes patogénicas en el gen *TMPRSS3* producen HA no sindrómica AR 8/10 (DFNB8/10, OMIM#601072), que puede dar lugar a dos fenotipos diferentes: HA de inicio prelingual DFNB10, o la forma postlingual con inicio tardío, como es el caso de DFNB8 (105). La hipoacusia puede ser leve o severa, dependiendo de la naturaleza de las variantes implicadas y de los dominios a los que éstas afectan (99), probablemente debido a la diferente influencia de las variantes patogénicas en su actividad proteasa. Se ha propuesto que variantes patogénicas en los dominios SRCR y LDLRA afectan al plegamiento del dominio catalítico o alteran el reconocimiento y la unión del sustrato a la proteasa (99). Las heterocigosis compuestas de una variante leve y una severa causan HA postlingual DFNB8, mientras que la combinación de dos variantes patogénicas severas da lugar a una HA profunda con inicio prelingual (DFNB10). Aparentemente, se puede predecir el genotipo en base a la posición o la naturaleza de truncamiento/no truncamiento de la variante (99).

Se han reportado 84 variantes causantes de HA en este gen (48). La prevalencia de HA por variantes patogénicas en *TMPRSS3* es de aproximadamente 1.8% en población paquistaní, del 5% en turcos con HA AR profunda, 2.5% en un estudio sobre HANS AR en Corea y 4.6% de pacientes chinos con HANS AR negativos para *GJB2* y *SLC26A4*.

5.7.5. Gen *TMC1*

El gen *TMC1* (*transmembrane channel-like protein 1*, OMIM*606706) se localiza en la región cromosómica 9q21.13 y codifica la proteína integral de membrana **TMC1**. Esta proteína, junto con la proteína *TMC2*, forma parte de los canales de mecanotransducción de las CC del oído interno, contribuyendo a su permeabilidad (106) (Figura 33).

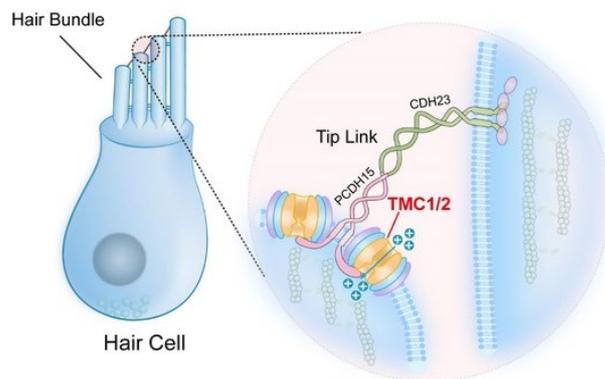


Figura 33. Proteínas TMC1/2 en la transducción auditiva. Modificado de Jia et al. (107).

Las alteraciones en el gen *TMC1* causan HA no sintomática autosómica recesiva 7/11 (DFNB7, OMIM#600974), que suele ser profunda y congénita o prelingual, o HA no sintomática autosómica dominante 36 (DFNA36, OMIM#606705), menos frecuente, generalmente progresiva y de inicio más tardío.

En la actualidad, se han descrito más de 100 variantes patogénicas causantes de HA en este gen según HGMD (48), la mayoría de ellas de truncamiento de proteína y algunas de cambio de sentido. Las variantes patogénicas de pérdida de función causan HA de herencia AR y en casi todos los casos se expresan con un fenotipo similar, caracterizado por HA prelingual o congénita severa-profunda. Las variantes patogénicas de cambio de sentido causan HA AD DFNA36, aunque son poco frecuentes y se asocian a HA progresiva de inicio tardío. Se han descrito unas pocas variantes patogénicas de cambio de sentido en familias norteamericanas y japonesas (46).

Su prevalencia varía en función de la etnia, pero ha sido descrita como una de las causas más frecuentes de HANS AR en familias consanguíneas (33) y es causa frecuente de HA en países como Turquía, Paquistán, Sudán, Túnez, Irán e India (46).

5.7.6. Gen *TECTA*

El gen *TECTA* (OMIM*602574) se localiza en la región cromosómica 11q23 y codifica para α -tectorina, uno de los principales componentes no colagenosos de la membrana tectoria del oído interno. Los modelos de ratón con HA por variantes patogénicas en *TECTA* presentan deformación de la membrana tectoria, aunque el mecanismo exacto mediante el cual estas variantes patogénicas causan HA no se conoce todavía (108).

Estructuralmente, la α -tectorina es una glicoproteína modular de gran tamaño que sufre modificación postraduccional para dar lugar a tres fragmentos covalentemente unidos por puentes disulfuro: el dominio entactina (ENT), la región zonadhesina (ZA), el dominio C-terminal zona pellucida (ZP), y tres dominios *trypsin inhibitor-like* ricos en cisteína (TIL) (109) (Figura 34).

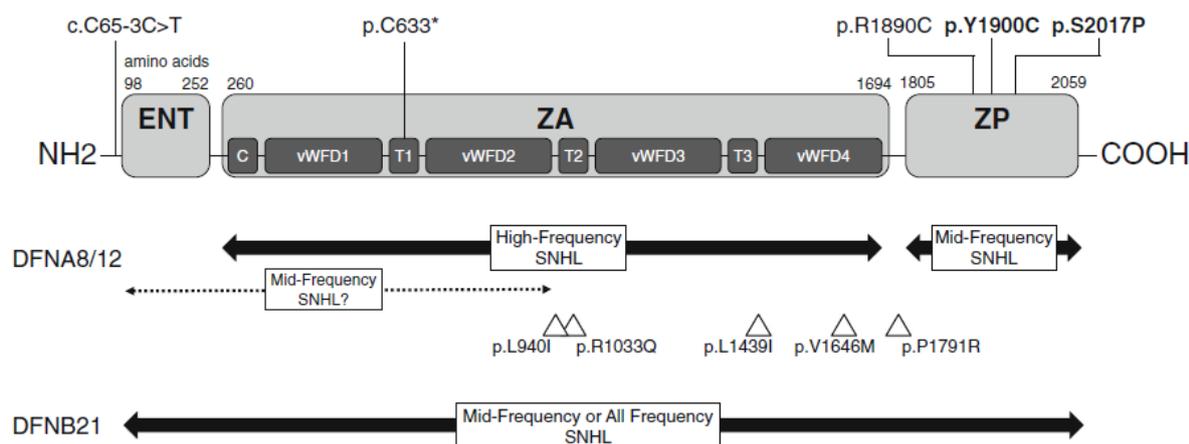


Figura 34. Dominios de la proteína α -tectorina y correlación genotipo-fenotipo de las variantes patogénicas descritas por Yamamoto et al. (104). Las flechas negras indican fenotipos establecidos y las flechas discontinuas representan fenotipos propuestos. Los triángulos indican las posiciones de las variantes VSI encontradas en dicho estudio.

Las variantes patogénicas de cambio de aminoácido en el gen *TECTA* causan HA no sindrómica AD (DFNA8/12, OMIM#601543), mientras que las variantes patogénicas que generan codones de parada prematuros causan HA no sindrómica AR (DFNB21, OMIM#603629).

El perfil audiológico asociado con la DFNA8/12 depende del dominio y el residuo afectado. Si la variante afecta a los residuos de cisteína, la HA es progresiva; si afecta a otros residuos, la HA es estable. Los fenotipos establecidos indican que las variantes patogénicas de cambio de sentido en el dominio ZP causan HA de frecuencias medias, mientras que las de cambio de sentido en la región ZA causan HA de frecuencias altas, aunque este último aspecto no ha sido confirmado en un estudio reciente en población japonesa (110).

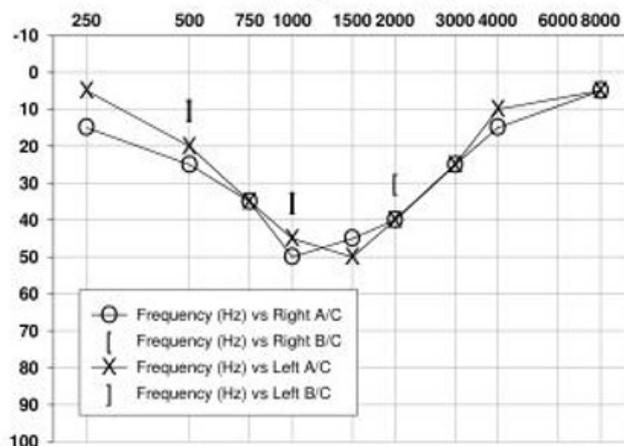


Figura 35. Audiograma característico de HA relacionada con el gen *TECTA*: HA en frecuencias medias, también llamado “en forma de U” o “cookie-bite”. Modificado de <https://www.slideserve.com/skyla/personalized-medicine-of-deafness>.

La frecuencia de HA causada por variantes patogénicas en *TECTA* en España es del 4% de las HA AD (109), 3-5% de las HA AD en Estados Unidos (94), y en población japonesa ha sido descrita como la segunda causa más importante de HA neurosensorial AD, después del gen *KCNQ4* (110). A día de hoy, se han descrito más de 100 variantes patogénicas causantes de HA en este gen (48), la mayoría de cambio de sentido y asociadas a HA AD.

5.7.7. Gen *WFS1*

El gen *WFS1* (OMIM*606201) codifica una glicoproteína de 890 aminoácidos llamada **wolframina**, localizada predominantemente en el retículo endoplasmático, que se cree que participa en la regulación de la homeostasis del calcio en la célula.

Las variantes patogénicas en *WFS1* pueden causar HA sindrómica AR (síndrome de Wolfram, OMIM#222300), también conocido como DIDMOAD (en inglés, *diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness*), síndrome Wolfram-like AD (diabetes mellitus de inicio en adulto, HA progresiva de frecuencias bajas y moderadas de inicio en la primera década de la vida, y atrofia óptica de inicio juvenil, OMIM#614296), o HA no sindrómica AD DFNA6/14/38 (OMIM#600965), de frecuencias bajas. Además, este gen parece también estar implicado en la susceptibilidad a diabetes mellitus y posiblemente a alteraciones psiquiátricas, aunque su papel exacto en estas enfermedades debe aún ser determinado (33).

La HA AD de frecuencias bajas por *WFS1* es poco frecuente pero claramente diferenciable, afectando sólo a frecuencias bajas (≤ 2000 Hz) y con audición normal en frecuencias altas (Figura 36). Con la edad, la audición en frecuencias altas se pierde y el perfil audiológico se aplanan (33). El síndrome de Wolfram se caracteriza por diabetes mellitus, discapacidad intelectual, atrofia óptica e HA a altas o a todas las frecuencias con distintos grados de severidad desde leve a profunda (111).

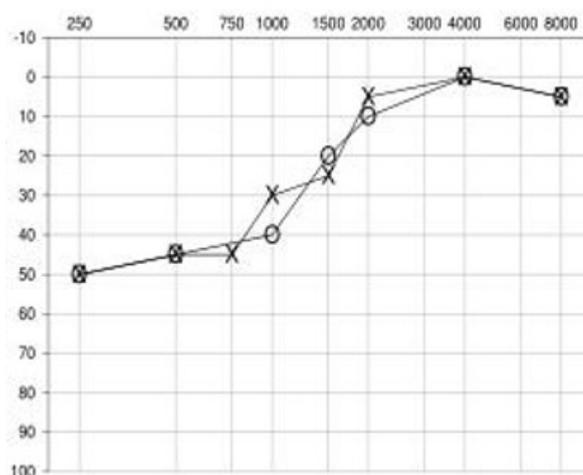


Figura 36. Audiograma característico de HA relacionada con el gen *WFS1*: HA de frecuencias bajas. Modificado de <https://www.slideserve.com/skyla/personalized-medicine-of-deafness>.

Se han identificado 375 variantes patogénicas en el gen *WFS1* (48). Como regla general, las variantes patogénicas AD asociadas a la forma no sindrómica suelen ser variantes de cambio de sentido y se han encontrado casi siempre en el dominio C-terminal; mientras que las variantes sindrómicas AR causantes de síndrome de Wolfram suelen ser de truncamiento, son numerosas y se distribuyen a lo largo de todo el gen. En familias con HA de frecuencias bajas, se encuentran variantes patogénicas en *WFS1* en el 30-80% de los pedigrís, dependiendo de si las familias han sido seleccionadas por análisis de ligamiento previo al análisis de variantes en *WFS1*. Dos variantes patogénicas parecen ocurrir de forma recurrente en algunas poblaciones específicas: c.424_426ins16 en población española y c.1362_1377del16 en la italiana (33). Además, algunas variantes patogénicas como la c.2146G>A han sido descritas asociadas a HA en varias familias independientes y racialmente diferentes, lo que sugiere que puede ser un *hot spot* mutacional (111).

5.7.8. Gen *POU3F4*

El gen *POU3F4* (OMIM*300039) codifica el factor de transcripción ***POU domain class 3 transcription factor 4***, que juega un papel fundamental en la diferenciación neuronal (112).

Los pacientes con variantes patogénicas en *POU3F4* presentan DFNX2 (OMIM#304400), que se caracteriza por HA de herencia ligada al cromosoma X, severa-profunda bilateral, ocasionalmente con un componente conductivo y de edad de inicio variable (112). Además, a menudo presentan también anomalías del hueso temporal y fijación del estribo. El componente de HA conductiva, que puede estar presente o no, es debido a la fijación del estribo de la cadena osicular. En pacientes con este tipo de anomalías se puede dar pérdida de perilinfa durante la cirugía del oído interno, que resulta en una pérdida de audición inmediata junto con vértigo y tinnitus. Por tanto, la evaluación previa a la cirugía del estribo o al implante coclear es imprescindible. Una vez tenido en cuenta ese aspecto, el implante coclear en pacientes con DFNX2 puede ser llevado a cabo de forma segura y con buen resultado final (113).

La hipoacusia DFNX2 es la hipoacusia ligada al cromosoma X más frecuente en humanos, suponiendo casi un 50% de las HA no sindrómicas ligadas al cromosoma X. Varios estudios han reportado que algunas mujeres portadoras de variantes patogénicas en *POU3F4* también pueden presentar HA (113).

A día de hoy, se han descrito 87 variantes patogénicas en *POU3F4*, de las cuales 18 son grandes reordenamientos (deleciones, inversiones y duplicaciones) en la región 5' del gen (48) que contiene elementos potencialmente reguladores del mismo (112).

5.7.9. Genes mitocondriales

El ADN mitocondrial humano es una molécula circular de doble cadena que codifica 13 subunidades de proteínas, 2 ARN ribosómicos (ARNr) y 22 ARN de transferencia (ARNt).

El gen que codifica el RNA ribosómico mitocondrial 12S (*MT-RNR1*, OMIM*561000) se encuentra en el DNA mitocondrial, entre los nucleótidos 648 y 1601 del mismo. El gen *MT-TS1* (OMIM*590080) codifica el RNA de transferencia para el aminoácido serina (tRNA-Ser) y se localiza entre los nucleótidos 7445 y 7516 del DNA mitocondrial.

Las variantes patogénicas en estos genes causan HA mitocondrial no sindrómica, que se caracteriza por HA neurosensorial de inicio y severidad variables. Las variantes patogénicas en *MT-RNR1* se asocian a predisposición a ototoxicidad por aminoglucósicos independiente de dosis y/o HA de inicio

tardío. Las variantes en *MT-TS1* causan generalmente HA no sindrómica de inicio en la infancia, aunque en algunas familias se ha descrito también la presencia de keratoderma palmoplantar (114).

La variante m.1555A>G en el gen *MT-RNR1* es causa de HA no sindrómica asociada a tratamiento con aminoglucósidos, que puede ser instantánea y es independiente de dosis; generalmente es bilateral, moderada-profunda e irreversible. Sin embargo, también puede causar HA no sindrómica mitocondrial sin exposición previa a aminoglucósidos, debido probablemente a la presencia de otros factores genéticos y/o ambientales adicionales. En este caso, se suele preservar la audición normal hasta la edad adulta (115). En los casos de heteroplasmia, la proporción de la variante generalmente se correlaciona con el grado de HA. La variante m.1494C>T en el mismo gen también ha sido descrita como causa de HA por exposición a aminoglucósidos.

Las variantes patogénicas mitocondriales están presentes en menos del 1% de los niños con HA prelingual, pero son más frecuentes a edades más tardías. En la población caucásica, al menos el 5% de la HA postlingual no sindrómica está causada por variantes patogénicas en DNA, representando la causa más frecuente de HA después de la variante c.35delG en el gen *GJB2* (116). En otras poblaciones como la china o la española esta frecuencia puede ser incluso mayor, habiéndose descrito en España una prevalencia de la variante m.1555A>G de hasta el 25% (117).

Según estudios más recientes, las variantes patogénicas mitocondriales más frecuentes causantes de HA no sindrómica son m.1555A>G en el gen *MT-RNR1* y la variante m.3243A>G en el gen *MT-TL1*. La variante m.1555A>G se asocia a HA no sindrómica y a ototoxicidad por aminoglucósidos, mientras que la m.3243A>G se asocia a MELAS (encefalomiopatía, acidosis láctica y episodios *stroke-like*), al síndrome de diabetes e HA de herencia materna (MIDD) y a oftalmoplejía crónica progresiva externa (CPEO). Además, varias variantes patogénicas más se han asociado a HA no sindrómica, como por ejemplo m.1494C>T en el gen *MT-RNR1*, m.7445A>G, c.7472insC y m.7511T>C en el gen *MT-TS1*, aunque ocurren con menos frecuencia (118).

5.7.10. Gen *BSND*

El gen *BSND* (OMIM*606412) se localiza en la citobanda 1p32 y codifica la proteína **barttina**, una subunidad accesoria de los canales de cloruro CLC-K, que se expresan predominantemente en el riñón y en el oído interno (OI) y son esenciales para la reabsorción de cloruro sódico en el asa de Henle y para la secreción de potasio en el OI. La barttina se une a CLC-K y mejora su estabilidad, estimula su salida desde el retículo endoplásmico y su inserción en la membrana plasmática, y es esencial para su activación (119, 120).

Introducción

Las variantes patogénicas bialélicas en *BSND* pueden causar HA no sindrómica AR (DFNB73) o síndrome de Bartter tipo IV (AR), caracterizado por nefropatía con pérdida de sal e HA (121) (16).

En la actualidad se han descrito 20 variantes patogénicas en este gen (48), con un único caso publicado en España (34).

5.7.11. Gen *LOXHD1*

El gen *LOXHD1* (*Lipoxygenase Homology Domain-containing 1*, OMIM*613072) se localiza en la región cromosómica 18q21.1. Este gen codifica una proteína formada por 15 dominios PLAT (policistina/lipooxigenasa/alfa-toxina) expresada en la membrana de los estereocilios maduros que juega un papel importante en el mantenimiento de la función de las células ciliadas cocleares.

Estudios en ratones modificados *samba* han demostrado que el desarrollo de los estereocilios no se ve afectado, pero la función de las células ciliadas está dañada y finalmente degeneran (Grillet, 2009).

Las variantes patogénicas bialélicas en el gen *LOXHD1* causan HA AR DFNB77 (DFNB77), que típicamente es de inicio postlingual, moderada-profunda y progresiva (16), con mayor afectación de frecuencias medias-altas durante la infancia. Sin embargo, también se han reportado casos de HA profunda congénita no progresiva (122) (Edvardson, 2011).

6. Priorización de genes en los estudios genéticos de hipoacusia

Con los avances en la tecnología de secuenciación genómica, el número de relaciones gen-enfermedad descritos ha aumentado rápidamente en los últimos años. El año 2010 fue crucial en la investigación de la HA, ya que aparecieron los primeros logros en la identificación de nuevos genes de forma rápida mediante las tecnologías de NGS de alto rendimiento. Estas tecnologías han sido utilizadas para cribados a gran escala coste-efectivos de una variedad de genes y regiones de interés, que van desde pequeños paneles de genes hasta genomas completos (123).

Sin embargo, las evidencias que apoyan esas asociaciones gen-enfermedad varían ampliamente, complicando la evaluación de las variantes patogénicas en un entorno clínico (123) y convirtiendo la interpretación de las variantes en el principal cuello de botella del diagnóstico genético (124). Además, el impacto clínico de variantes encontradas en genes que no tienen un papel claro en la enfermedad es difícil de valorar y podría traer como consecuencia diagnósticos incorrectos, falta de evaluaciones

necesarias y/o el manejo incorrecto del paciente y su familia. Este escenario resalta la necesidad de un método estandarizado para evaluar las evidencias que implican a un gen en una enfermedad y por tanto determinen la validez clínica de esa asociación (123).

Ante este escenario, se han desarrollado distintas iniciativas internacionales como *ClinGen* y *PanelApp*, que se resumen a continuación.

El ***Clinical Genome Resource (ClinGen)*** (61) es un recurso creado por el *National Institutes of Health* (NIH) de Estados Unidos para definir y evaluar la validez clínica de esas relaciones gen-enfermedad a lo largo de una variedad de enfermedades Mendelianas. *ClinGen* se basa en un método sistemático de revisión y evaluación de las evidencias por diversos grupos de expertos a nivel internacional, y proporciona una medida semicuantitativa que después se correlaciona con una clasificación cualitativa: *Definitiva, Fuerte, Moderada, Limitada, Sin evidencia reportada* o *Evidencia conflictiva*. Este sistema basado en evidencias facilitará el uso más informado de las variantes genómicas en los entornos clínico y de investigación (123).

Estas clasificaciones de validez clínica gen-enfermedad resultan muy útiles para los laboratorios clínicos en el momento de decidir qué genes incluir en los paneles dirigidos a enfermedades, o para decidir cómo categorizar, priorizar y emitir resultados de secuenciación de exoma/genoma. Pueden decidir, por ejemplo, no modificar el manejo clínico en base a variantes con validez clínica limitada. Además, los investigadores pueden utilizar también esta herramienta para evaluar la validez clínica de sus propias asociaciones recientemente descubiertas e identificar genes prometedores para futuros trabajos con el fin de aumentar la evidencia disponible y obtener una clasificación *Fuerte* o *Definitiva*. Además, estas evaluaciones de validez clínica pueden ser útiles para las sociedades profesionales a la hora de hacer recomendaciones o guías para diagnósticos genéticos clínicos. Por último, proporcionará unos fuertes cimientos para la medicina genómica (123).

Panel App (62) es una base de conocimiento de acceso público basada en paneles virtuales de genes, revisados y evaluados por la comunidad científica internacional. Esta herramienta fue desarrollada por *Genomics England (UK Department of Health and Social Care)* dentro del Proyecto 100.000 Genomas, cuyo objetivo es secuenciar e interpretar los genomas completos de 100.000 de pacientes con enfermedades raras y sus familias y de pacientes con cáncer, dentro del *National Health Service England (NHSE)* (125).

El objetivo principal de *PanelApp* es utilizar la experiencia y el conocimiento existente para establecer un panel diagnóstico de genes para cada enfermedad aplicable a la interpretación de los resultados

del Proyecto 100.000 Genomas, y promover la estandarización de paneles de genes en el Reino Unido y a nivel internacional. El contenido de *PanelApp* está disponible públicamente, lo que permite que los paneles de genes sean consultados, revisados y/o descargados a través de la web y son aptos para la inclusión en un algoritmo bioinformático automatizado para análisis genómico. Los paneles virtuales se aplican para análisis de genoma de los participantes del *100.000 Genomes Project*, y *PanelApp* formará el repositorio de paneles de genes en el *NHS Genomics Medicine Service*.

Cada gen, una vez evaluada su relación con de una determinada enfermedad, recibe una categoría de color (125), que se resume de la siguiente manera (Figura 37):

- 1) Gen *verde*: las variantes potencialmente causantes de enfermedad dentro de un gen verde han sido identificadas en ≥ 3 casos o familias no relacionadas entre sí que presentan el fenotipo o la enfermedad, o en 2-3 familias no relacionadas donde hay datos funcionales adicionales. Por tanto, la evidencia para esa asociación gen-enfermedad es alta.
- 2) Gen *ámbar*: la evidencia para esa asociación gen-enfermedad es moderada y no llega a las evidencias necesarias para el nivel verde.
- 3) Gen *rojo*: la evidencia disponible para la asociación gen-enfermedad es insuficiente, por lo que no está indicado incluirlo en paneles clínicos (Figura 25).

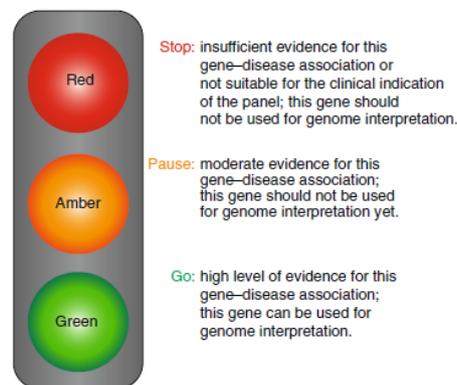


Figura 37. Sistema de semáforo utilizado por *PanelApp* para el nivel de evidencia. Modificado de Martín et al. (125).

Las guías de *PanelApp* para que un gen sea clasificado como verde se basan en las guías existentes en los proyectos *ClinGen* y *Deciphering Developmental Disorders* (<https://decipher.sanger.ac.uk/ddd#ddgenes>).

En el campo de la hipoacusia, existen varios grupos de expertos que se dedican a recopilar la información publicada sobre los genes y/o las variantes descritas relacionadas con esta patología, para posteriormente compartirla en páginas web de acceso gratuito de Internet. Aunque no todas las variantes y los genes incluidos en estas bases de datos presentan el mismo nivel de evidencia, esta información sirve como guía para orientarse a la hora de definir un panel de genes útil para el diagnóstico genético de la hipoacusia a nivel clínico. Además, estos expertos han creado en colaboración con *ClinGen* unas nuevas especificaciones para la clasificación de las variantes de hipoacusia, en base a los criterios previamente definidos por la ACMG (27).

Algunos de estos grupos de expertos y bases de datos de hipoacusia hereditaria son los siguientes:

- **Hereditary Hearing Loss Homepage (HHL)** (<https://hereditaryhearingloss.org/>): página web creada y mantenida mediante la colaboración entre la Universidad de Iowa (Estados Unidos) y la Universidad de Amberes (Bélgica), cuyo objetivo es proporcionar una revisión actualizada de la genética de la HA hereditaria para investigadores y clínicos que trabajan en esta área. Esta página proporciona información sobre todos los genes y *locus* conocidos que han sido asociados HA no sindrómica monogénica en la bibliografía, y se actualiza mensualmente.
- **Deafness Variation Database (DVD)** (<http://deafnessvariationdatabase.org/>): base de datos creada por el *Molecular Otolaryngology & Renal Research Laboratories (MORL)* de la Universidad de Iowa, que incluye todas las variantes identificadas por este laboratorio en los pacientes estudiados mediante su panel OtoSCOPE®, que incluye 152 genes para el cribado genético de HA. Cada variante detectada es revisada y clasificada por expertos en HA del MORL y las evidencias disponibles y su clasificación son descritas brevemente y referenciadas en la base de datos DVD.
- **The Connexin-deafness homepage** (<http://perelman.crg.es/deafness/>): página web editada y mantenida por el Centro de Regulación Genómica (<https://www.crg.eu/>) (Barcelona, España) que compila las variantes patogénicas y polimórficas descritas en los genes codificantes de conexas asociadas a hipoacusia.

Toda esta información debe ser revisada y valorada con el fin de definir los genes más interesantes a incluir en un estudio genético de hipoacusia, en función de si el objetivo buscado es diagnóstico o investigación, valorando las ventajas e inconvenientes que conlleva incluir genes con más o menos evidencias sobre su relación con la causa de hipoacusia.

7. Características genéticas de la población vasca

La población vasca constituye un grupo peculiar dentro de población europea debido a particularidades geográficas, culturales y de idioma, que a lo largo de la historia la han llevado a mezclarse en menor grado con otras poblaciones y a diferenciarse genéticamente en algunos aspectos (126).

Aunque la población actual del País Vasco tiene una significativa contribución de otras poblaciones debido a la inmigración a partir de inicios del siglo XX, sigue enriquecida en población ancestral vasca, sobre todo en las regiones de Vizcaya y Guipúzcoa.

Esto hace que observemos en esta población distribuciones atípicas de grupos sanguíneos, del sistema *HLA* u otros marcadores genéticos (126), así como de enfermedades hereditarias o variantes patogénicas (127), probablemente como consecuencia del efecto fundador y de la selección positiva o negativa.

Sin embargo, no se han encontrado en la literatura estudios sobre las características genéticas de la hipoacusia en la población vasca.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La hipoacusia es la alteración sensorial más frecuente en los países desarrollados, con una prevalencia de hasta 2 a 4 casos por 1000 recién nacidos, y en más de la mitad de los casos la etiología es genética (Smith, 2005). La identificación de la alteración molecular responsable es esencial para proporcionar un adecuado consejo genético, estimar el riesgo de recurrencia, conocer el pronóstico y valorar las opciones terapéuticas.

El diagnóstico genético de la hipoacusia no sindrómica supone un gran reto debido a su gran heterogeneidad de *locus*, con más de 100 genes identificados hasta la actualidad (32) y muchos aún por descubrir, lo que hace necesario combinar distintas aproximaciones para su diagnóstico. La revolución de la genética en los últimos años gracias al desarrollo de la tecnología de secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*, NGS) ha supuesto un gran avance tanto en la investigación de esta patología como en su diagnóstico; sin embargo, la tasa diagnóstica media sigue siendo de un 40% (128).

Por otra parte, la población vasca constituye un grupo peculiar dentro de población europea debido a particularidades geográficas, culturales y de idioma, que a lo largo de la historia la han llevado a mezclarse en menor grado con otras poblaciones y a diferenciarse genéticamente en algunos aspectos (126). Aunque la población actual del País Vasco tiene una significativa contribución de otras poblaciones debido a la inmigración a partir de inicios del siglo XX, sigue enriquecida en población ancestral vasca, sobre todo en las regiones de Vizcaya y Guipúzcoa. No existen estudios previos de caracterización genética de la hipoacusia en población vasca. Teniendo en cuenta que esta población presenta características genéticas diferenciadas en algunas patologías (126, 127), podemos esperar que la hipoacusia sea una de ellas.

Por tanto, en este trabajo nos planteamos la siguiente hipótesis:

La gran heterogeneidad genética de la hipoacusia no sindrómica hace que el rendimiento diagnóstico actual no supere el 50%, por lo que existe aún un gran número de genes por descubrir. Por otro lado, la población vasca se plantea como un particular escenario que por sus características intrínsecas puede presentar un espectro mutacional de hipoacusia diferente al observado en otras poblaciones. El análisis del exoma clínico puede ser una herramienta muy útil para aumentar la tasa diagnóstica de esta patología genética y además permitirá la identificación de nuevas variantes patogénicas y/o

genes causales de hipoacusia no descritos previamente, así como nuevas evidencias a favor o en contra de la patogenicidad de genes ya conocidos. Además, se podrían encontrar variantes patogénicas recurrentes en la población vasca que nos permitan definir nuevas correlaciones genotipo-fenotipo.

Objetivo general

Teniendo en cuenta la hipótesis principal de este estudio, el objetivo general es caracterizar la etiología genética de la hipoacusia no sindrómica en una cohorte de pacientes del País Vasco, describiendo en esta población el espectro mutacional de genes causales ya conocidos e identificando otros no descritos previamente, así y como definir correlaciones genotipo-fenotipo.

Objetivos secundarios

Para la consecución del objetivo general definido se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Describir el **espectro mutacional de los genes conocidos** asociados a hipoacusia no sindrómica y su prevalencia en una cohorte de pacientes residentes en el País Vasco.
2. Proporcionar **evidencias adicionales** a favor o en contra de la asociación a hipoacusia de genes con evidencia insuficiente o discordante.
3. Detectar **nuevas variantes patogénicas** no descritas previamente en genes conocidos de hipoacusia.
4. Identificar **nuevos genes** potencialmente asociados a hipoacusia.
5. Identificar **variantes patogénicas recurrentes en esta población** y correlacionarlas con su fenotipo.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Selección de pacientes y controles

Los pacientes incluidos en este estudio fueron identificados en la Unidad de Genética del Hospital Universitario Donostia (Servicio Vasco de Salud – Osakidetza) durante el periodo 2014-2018. Dichos pacientes fueron remitidos desde los servicios de Otorrinolaringología (ORL) de distintos centros de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), como el Hospital Universitario de Basurto, el Hospital Universitario de Cruces, el Hospital Universitario Araba, y el propio Hospital Universitario Donostia, todos integrantes del Servicio Vasco de Salud – Osakidetza.

Criterios de inclusión

Se incluyeron en este estudio aquellos pacientes que cumplen todos los siguientes criterios:

- Hipoacusia no sindrómica
- Hipoacusia congénita o de inicio pediátrico (≤ 18 años de edad)
- Hipoacusia bilateral, o hipoacusia unilateral con antecedentes familiares de hipoacusia

Todos los pacientes seleccionados pertenecían a familias no emparentadas entre sí y se obtuvo el consentimiento informado firmado del paciente o sus progenitores o tutores legales para su estudio genético y de investigación.

Criterios de exclusión

Se excluyeron los pacientes que presentaron alguno de los siguientes criterios:

- otras causas posibles de hipoacusia (e.g. infección congénita por citomegalovirus (CMV), antecedentes de meningitis, traumatismos acústicos, etc.)
- hipoacusia sindrómica
- pacientes emparentados con otro paciente ya seleccionado

Para determinar la frecuencia de portadores sanos con deleciones del gen *STRC* en heterocigosis sobre la población general se seleccionaron aleatoriamente las muestras de 200 pacientes remitidos a la Unidad de Genética del Hospital Universitario Donostia para estudios genéticos no relacionados con hipoacusia.

Características de los pacientes

La valoración clínica de los pacientes fue llevada a cabo por los Servicios de ORL de cada centro solicitante del estudio genético. Se revisó la historia clínica de cada paciente en Osabide Global

Material y Métodos

(historia clínica informatizada) y se recogieron los parámetros de interés. Los datos demográficos, clínicos y genéticos de cada paciente fueron registrados en archivos Excel para su posterior análisis.

Para las características audiológicas de la hipoacusia (tipo de HA, grado, configuración audiométrica, rango de frecuencia, simetría y progresión) se utilizaron las recomendaciones para la descripción de datos audiológicos del grupo europeo para el estudio de correlaciones genotipo-fenotipo GENDEAF (19). Los datos registrados y los criterios utilizados para su clasificación fueron los siguientes:

1. Sexo.
2. Origen geográfico: provincia de residencia y etnia del paciente, si se conoce.
3. Patrón de herencia de la hipoacusia.
4. Edad de inicio:
 - a. Congénita
 - b. Prelingual
 - c. Perilingual
 - d. Postlingual
5. Tipo de Hipoacusia:
 - a. Conductiva: relacionada con alteraciones del oído externo o medio. La audiometría presenta umbrales normales (<20 dB HL) de conducción ósea y una diferencia (*gap*) entre las conducciones aérea y ósea >15 dB HL en la media de los umbrales a 500, 1000 y 2000 Hz.
 - b. Neurosensorial: relacionada con alteraciones del oído interno o del nervio coclear, con un *gap* aire/hueso <15 dB HL en la media de los umbrales a 500, 1000 y 2000 Hz.
 - c. Mixta: causada por una combinación de alteraciones en el oído externo o medio y en el oído interno o el nervio coclear. En la audiometría se observa un umbral >20 dB HL en la conducción ósea junto con un *gap* aire/hueso >15 dB HL en la media de los umbrales a 500, 1000 y 2000 Hz.
6. Grado de hipoacusia: valorado en el oído con mejor audición y clasificado en función de la media de los umbrales a las frecuencias 500, 1000 y 2000 Hz:
 - a. Leve: 20-40 dB HL
 - b. Moderada: 41-70 dB HL
 - c. Severa: 71-95 dB HL
 - d. Profunda: > 95 dB HL
7. Configuración audiométrica: forma que presenta la curva del audiograma:

- a. HA de bajas frecuencias ascendente: >15 dB de diferencia entre el peor umbral a bajas frecuencias respecto al de las altas frecuencias.
 - b. HA de frecuencias medias en forma de "U": >15 dB de diferencia entre el peor umbral en las frecuencias medias y los umbrales de frecuencias bajas y altas.
 - c. HA de altas frecuencias:
 - i. De caída suave: 15-29 dB HL de diferencia entre la media de los umbrales a 500 y 1000 Hz y la media de los umbrales a 4000 y 8000 Hz.
 - ii. De caída brusca: >30 dB HL de diferencia entre la media de los umbrales a 500 y 1000 Hz y la media de los umbrales a 4000 y 8000 Hz.
 - iii. Plano: <15 dB HL de diferencia entre la media de 250, 500 Hz, la media entre 1000 y 2000 Hz y la media de 4000 y 8000 Hz.
8. Rangos de frecuencia:
- a. Frecuencias bajas: ≤ 500 Hz
 - b. Frecuencias medias: > 500 Hz y ≤ 2000 Hz
 - c. Frecuencias altas: > 2000 Hz y ≤ 8000 Hz
 - d. Frecuencias altas extendidas: > 8000 Hz
9. Unilateral/bilateral:
- a. Unilateral: cuando la media de 500, 1000 y 2000 Hz de uno de los oídos es < 20 dB HL).
 - b. Bilateral: la media de 500, 1000 y 2000 Hz del mejor oído es peor de 20 dB HL. Además, si > 10 dB HL de diferencia entre los oídos en al menos dos frecuencias, se considerará asimétrica.
10. Progresión: se considera progresiva cuando existe un empeoramiento > 15 dB en la media de los umbrales a las frecuencias de 500, 1000 y 2000 Hz en un periodo de 10 años.

2. Esquema del estudio genético

Debido a la heterogeneidad genética y a la gran variedad de variantes patogénicas implicadas en la hipoacusia, el estudio genético se diseñó teniendo en cuenta distintas aproximaciones técnicas y niveles. El esquema del estudio se muestra en la Figura 38.

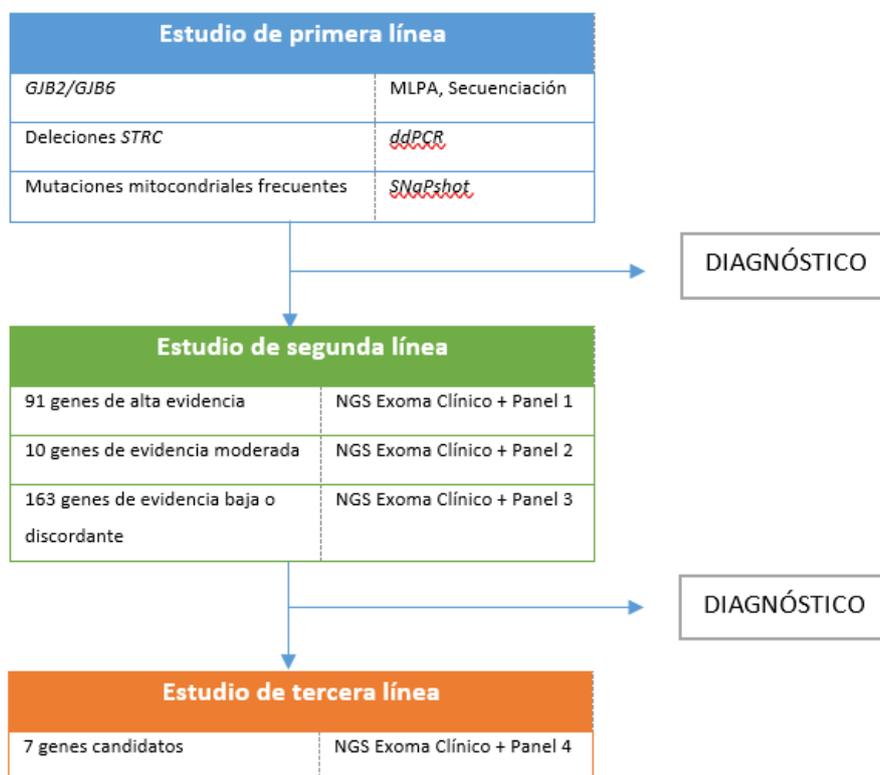


Figura 38. Representación esquemática del algoritmo diagnóstico y las técnicas utilizadas en este trabajo. MLPA: Multiplexed Ligation Probe Assay; ddPCR: Droplet Digital PCR; NGS: Next Generation Sequencing.

Los estudios diagnósticos se iniciaron con un **estudio de primera línea** o estudio básico para el cribado de las causas más frecuentes de hipoacusia, que incluye el estudio de HA AR DFNB1 asociada a los genes *GJB2* y *GJB6*, HA AR DFNB16 por deleciones en el gen *STRC* e hipoacusia mitocondrial mediante el análisis de las variantes patológicas más frecuentes en población española.

Los pacientes no diagnosticados en el estudio básico pasaron al **estudio de segunda línea**, que consistió en la secuenciación del exoma clínico por *Next Generation Sequencing* (NGS) seguido de un filtrado de variantes por paneles virtuales de genes de mayor a menor evidencia (Paneles 1, 2 y 3). Los individuos negativos para los niveles anteriores fueron sometidos a un **estudio de tercera línea** que consistió en el filtrado de los datos del exoma clínico mediante un panel virtual de genes candidatos a hipoacusia (Panel 4).

Las técnicas y los paneles de genes utilizados se describen con más detalle en los siguientes apartados.

3. Toma de muestra y extracción de ADN

Se extrajo sangre periférica en tubos con el anticoagulante EDTA. La extracción de ADN se realizó de forma automatizada en el equipo *MagNA Pure Compact* (Roche, Basilea, Suiza). La medida de la concentración y la calidad del ADN obtenido se llevó a cabo mediante el equipo *Nanodrop 2000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos).

Una vez extraído el ADN, se guardó una alícuota de sangre de cada paciente con el fin de disponer de una segunda extracción de ADN para la confirmación de las variantes de interés encontradas.

4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.1. PCR convencional

Se utilizó la técnica de PCR convencional para la amplificación de regiones de interés previa a la secuenciación por el método de Sanger de la región codificante (exón 2) y regiones intrónicas adyacentes del gen *GJB2*, para confirmación de las variantes patogénicas puntuales patogénicas, probablemente patogénicas o variantes candidatas de significado incierto detectadas por otras técnicas como *Multiplex Ligation Probe Assay* (MLPA) y/o *Next Generation Sequencing* (NGS).

Los cebadores utilizados fueron obtenidos de publicaciones o diseñados mediante los programas *Primer3Plus* (129) o *Exon Primer* (130). Los cebadores para la amplificación del gen *GJB2* se diseñaron con cola M13 en su región 5' para después poder secuenciar los productos de la amplificación con un cebador universal M13. Para evitar posibles fallos de amplificación debido al efecto *allele drop-out*, se comprobó con el programa *SNPCheck* (131) la ausencia de polimorfismos de nucleótido único (en inglés, *single nucleotide polymorphism*, SNP) en las regiones de hibridación de los cebadores. En caso de existir algún SNP, se rediseñaron los cebadores hasta conseguir un nuevo par sin SNP o en su defecto, con SNPs de frecuencia poblacional <0.1% (MAF<0.001). Además, se comprobó la ausencia de emparejamientos inespecíficos con las herramientas *SNPCheck* (131) y/o *UCSC In-silico PCR* (132).

Los cebadores para PCR convencional utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores utilizados en este trabajo para amplificación por PCR convencional.

Gen	Exón	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Aplicaciones	Fuente
<i>ACTG1</i>	4	TTTCTCCACACATCACACTGG	GATGCTGTGTACCGAGGA	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>CEMIP</i>	17	GAGCTCTCTGGGGCTGAA	TGTCCCGGCTCTAATCATCT	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>CLDN14</i>	3a	CTCCCTTGGCTTCATTAGGG	GTACAGGGCCTGGCCAAT	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>CLDN14</i>	3b	GCGGCATGAAGTTTGAGATT	CATTTCTCGCATTACATT	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>

Material y Métodos

DIAPH1	24	CCAGAATGTGTATAGACTGAAG	CAGGAAGTTTTCTTCCCTTCC	PCR, Sanger	Primer3Plus
ESPN	8	AGGGGTCTAGGAAGTCAGC	AGATTCCCTCCCTTTCAG	PCR	Primer3Plus
ESPN	10	CACAGTGTCTCAGGCATCG ^b	AAAAAGAAAGAAAATGGGAGGT	PCR	Primer3Plus
EYA1	12	CATGTTCTTCCACTGTCATATTCT	ACCAACAAACCTCTGTCTCACT	PCR, Sanger	Primer3Plus
GATA3	3	CCTTCTCTCCTGCCCTTT	AGGCACTCTTCTCGTCTG	PCR, Sanger	Primer3Plus
GJB2	1	CTCATGGGGGCTCAAAGGAAC ^a	CCCAAGGACGTGTGGTCC ^a	PCR, Sanger	Primer3Plus
GJB2	2a	GTGATTCTGTGTGTGC ^a	CCTTCTGGGTTTTGATCTCC ^a	PCR, Sanger	Primer3Plus
GJB2	2b	AGAAGAAGAGGAAGTTCATCA ^a	CCTCTCATGCTGTCTATTC ^a	PCR, Sanger	Primer3Plus
GJB2	2c	ACGCTGCAGACGATCCTG	CCAGACACTGCAATCATGAAC	PCR, Sanger	Primer3Plus
del(GJB6-D13S1830)		TTTAGGGCATGATTGGGGTGA	CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT	PCR	Castillo et al. (52)
del(GJB6-D13S1854)		TCATAGTGAAGAAGAACTCGATGC	CAGCGGTACCCTAGTTGTGGT	PCR	Castillo et al. (52)
GJB6_CTRL_E1		CGTCTTTGGGGTGTGCTT	CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAG	PCR	Castillo et al. (52)
ILDR1	3	TGGGAACCCCTATTGCT	CAGCAGAAAGAAATGGGAAA	PCR, Sanger	Primer3Plus
ILDR1	4	CCAGGTCTTGAGGGTGTGAT	GGCTTGCTTATTCTGGTTTTT	PCR, Sanger	Primer3Plus
KCNQ1	7	CTTAGGCGTCTGCACAGGAG	CAAGACACCAGTGCCAGAT	PCR, Sanger	Primer3Plus
LOXHD1	2	CAGGCCACACAGGATTC	TGGGTCCCAGAACCTAATCA	PCR, Sanger	Primer3Plus
LOXHD1	31	CTGAGGGGGAAGGAAGGTC	CAGCTCCAGCACCTCCAC	PCR, Sanger	Primer3Plus
MARVELD2	2a	GACATGATCCTGTTGGTCTCC	AAAAGTTCTCCAGGAGTCAGG	PCR, Sanger	Primer3Plus
MARVELD2	2b	TGCCATCAAGATACCACCA	GCTGTGACACAAGCAAAGACA	PCR, Sanger	Primer3Plus
MARVELD2	2d	GGTGGCCCTAACTGAATTT	GCTTCTGTTTTGAGCGCTAT	PCR, Sanger	Primer3Plus
MARVELD2	4	AAGAATGAATTGAGGGTTTTT	CTGAAAATGAAAGACAAA	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYH9	2	TGAGTGATCTGTGTGGCTGA	GTGAGGGTGATGGGAAGACC	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYH14	14	CTTCAACCACACCATGTTTCG	CCAGCAGAGGAGGAGCTAGA ^b	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYH14	20	AATCACCCCTTCCCTAT	CCCTGACACCTAGAGCCATC	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYH14	27	CTCTGTGAGAGCGGCTGAG	GTGACCCATGCTGCTTAC	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYO3A	13	TTTGGTGGAAATGAAATGGTG	CATGCTTTTATATTGCTCATT	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYO6	25	TGCCAAAAGTACTAAAGGATGAA	AAGGACGTTTTCTATACAATTTCAA	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYO7A	8	TCCAGGCTAGTTCCTGATG	AGCCAGCTCCCTACAATCCT	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYO7A	6	GAGTCCCTGTGGGTTGTGAC	CCTGGGTCTATTCTGCATC ^b	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYO7A	21	GGTGCCATGGAAGCTCCT	CCCCATAGGTCCCCTTC	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYO7A	41	GTCCCTGGTCTCCACAGT	AGAGGCTTAAGGCCACTTT	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYO15A	2b	GCGCAGCTCCCTGAATCT	TATCAGCAGCTGGATCCTCA	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYO15A	2a	TGTTTGGGAAGGAGAAGCTG	CAGTGGGAGAGGGTCTG	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYO15A	2c	TGTTTGGGAAGGAGAAGCTG	GTAGCCGAAGCGTTTGTAGG	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYO15A	12	GAGGTGTGGGAGCTTAGAGG	TCGGGAGTACATGAGGTGTG	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYO15A	13	CCGGCCCTGTTTTTCATA	CACAAAGGATCGGCACAAG	PCR, Sanger	Primer3Plus
MYO15A	27b	CACTCCCAACCTGACATCT	AGCCTGGAGTCGAGGAGTC	PCR, Sanger	Primer3Plus
OPA1	25	TTCCTTTATTTCAACTGCCTTCA	AATGCCTGAATAAAATGAACAA	PCR, Sanger	Primer3Plus
OTOF	6	TGGCTCTTCTGTGTTGTGTG	CTATCCAGGAGGGCCTTT	PCR, Sanger	Primer3Plus
OTOF	14	ACGCCCTCACCTGTGCTC	TGAAGAGAGGGCATCTCACAT	PCR, Sanger	Primer3Plus
OTOF	21	ACAACCCCTTTGTGATGG	AGAGCCAGCCCTGGATGAG	PCR, Sanger	Primer3Plus
OTOF	22	GGCTCAATCAGGAGGCTAGA	CCTGTCACTCAGGCTTCCA	PCR, Sanger	Primer3Plus
OTOF	35	GCAGGACAAAAGCCAGAGAC	CAGTGGTGGGAGGTGAGTG	PCR, Sanger	Primer3Plus
OTOF	41	GGAGGGAGAGGAGAGCTGAT	AAGGCCATCTGGACCTGAG	PCR, Sanger	Primer3Plus
SLC26A4		TTTCTGTTCTCGCTCTTCC	ACCGAAAGTCGGGCCTCT	PCR, Sanger	Primer3Plus
SLC26A4	19	AAAAGGAGGAGCTACAAAACCTT ^b	GACTTGTGTAATGTTTGCATTT	PCR, Sanger	Primer3Plus
SIX5	3	CTGGAACCTAAGCGCAGGAAC	ACTGGGTACAGTTCCAAGG	PCR, Sanger	Primer3Plus

<i>SOX10</i>	4	CACCTGCCTCTAACCTGCTT	GAGATCCAGGCGGAGTGTC	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>SOX10</i>	4A	CCTGCCTCTAACCTGCTTCC	GTGAGACCGTGGGCAGAG	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>TJP2</i>	13	AGGAGAAGCTGTGTTGAGTGCT	TCATCATGTGGGGTTTCCTT	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>TECTA</i>	7	TGAGTTGCTTTGCCTTCCTT	AGAGACTGTCATGGGGATG	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>TECTA</i>	10a	TCACAAACACACATGCACTCA	CCATCAAAGGTGAGGTAGTGG	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>TECTA</i>	15	TGGCACAATGCACTAGCTTC	AAAAGCAATGCTACCAGCAAA	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>TECTA</i>	12	AGCAATGGCCATGAGAAAAC	TGAAGTGGGAAAATTGGTCA ^c	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>TMC1</i>	12	TGATCACATGTGTGGCTCAG	GCCGTGGGTTTCAGAATAAA ^b	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>TMC1</i>	18	AATTGCAGTCTTCAAGCCAAT	TGAAACATGTGCTGTGTCCA	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>USH2A</i>	61	GTGTGCAGCTGTCACTGGTT	GCCCTAAGTGAAGAAAATGAGA	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>USH2A</i>	65	TTTGGTTGCCAATTCGTTT	TGGAGGGAAAAACAAAACA	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>WFS1</i>	8	GTGGTGGGGATGGTGAAGT	CAGACTCGGCCTGTTGT ^b	PCR, Sanger	<i>Primer3Plus</i>
<i>WFS1</i>	8a	AGGGTGGTCAGAGGGAGG	AGGCTCAGGTAGCTGGTAC	PCR, Sanger	<i>Exon Primer</i>
<i>WHRN</i>	1A	CCCTAGGATCCAGCCACTG	CGTGTATTGGTCGAAGAGCA	PCR, Sanger	<i>Exon Primer</i>
<i>WHRN</i>	10	CCCTAGGATCCAGCCACTG	CGTGTATTGGTCGAAGAGCA	PCR, Sanger	<i>Exon Primer</i>

^a Cebador con cola M13.

^b Cebador con SNP de MAF<0.001.

^c Cebador con SNP de MAF>0.001 (rs139261614).

Para la detección de las dos grandes deleciones recurrentes **del(*GJB6-D13S1830*)** y **del(*GJB6-D13S1854*)** en el gen *GJB6* y región promotora del gen *GJB2* se utilizó una adaptación del método descrito por (54), que se basa en la realización de PCR utilizando cebadores flanqueantes de los puntos de corte de cada deleción, de manera que la amplificación sólo se produce si alguna de estas dos deleciones está presente. Además, se utilizan cebadores para el exón 1 del gen *GJB6*, como control interno de PCR y para diferenciar deleciones heterocigotas vs homocigotas (ya que tanto **del(*GJB6-D13S1830*)** como **del(*GJB6-D13S1854*)** incluyen el exón 1). La amplificación se visualiza por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Los cebadores utilizados fueron los descritos por Castillo et al. (54) y sus secuencias se exponen en la Tabla 2. En la Figura 6 se muestra de forma esquemática la disposición de los distintos cebadores utilizados en el ensayo y la interpretación del mismo una vez realizada la migración del producto de amplificación en gel de agarosa.

Material y Métodos

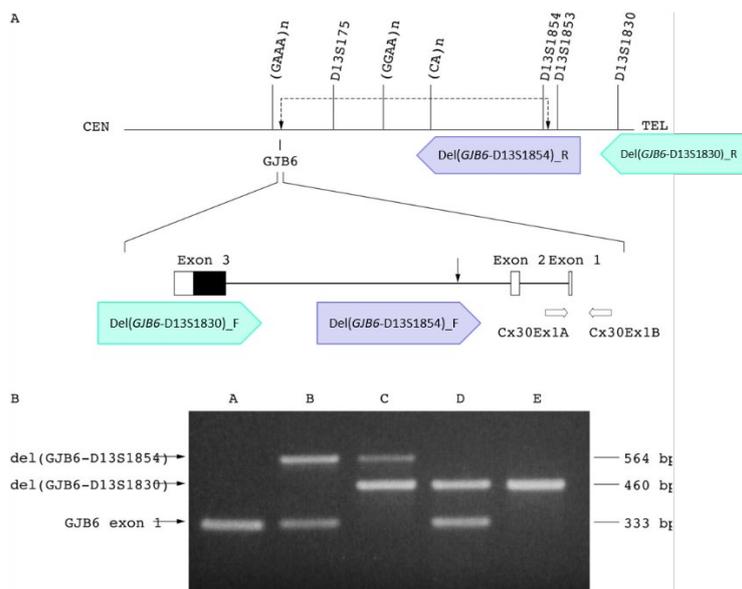


Figura 6. Ensayo para la detección de las deleciones del(GJB6-D13S1830) y del(GJB6-D13S1854). (A) Esquema de los cebadores utilizados. (B) Separación en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a las deleciones y al exón 1 del GJB6. A la derecha se muestran sus tamaños (pb). A: no mutado; B: heterocigoto del(GJB6-D13S1854)/no mutado; C: heterocigoto compuesto del(GJB6-D13S1854)/del(GJB6-D13S1830); D: heterocigoto del(GJB6-D13S1830)/no mutado; E: homocigoto del(GJB6-D13S1830). Modificado de Castillo et al. (52).

Para la amplificación de regiones de ADN de hasta 600 pb de tamaño se utilizó el kit de amplificación *HotStarTaq Master Mix Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). La amplificación se llevó a cabo en termocicladores *T100* (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos). La mezcla de reacción por muestra y las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

PCR convencional					
Reactivo	Concentración final	Volumen (µL)	Condiciones de reacción		
			Tiempo	Temperatura	
<i>HotStar Master Mix</i>	1x	10	15 min	95°C	40 ciclos
Cebador <i>Forward</i>	10 µM	1	30 s	95°C	
Cebador <i>Reverse</i>	10 µM	1	30 s	58°C	
H ₂ O	-	7	1 min	72°C	
ADN	variable	1	7 min	73°C	
Volumen total (µL)		20	∞	4°C	

LR-PCR Fragmento 1				
Reactivo	Volumen (μL)		Condiciones de PCR	
			Tiempo	Temperatura
LR PCR Buffer	2		∞	93°C
dNTP Mix	1		3 min	93°C
Cebador <i>Forward</i>	STRC_LR1_F	0.8	15 s	93°C
Cebador <i>Reverse</i>	STRC_LR1_R	0.8	30 s	62°C
LR PCR Enzyme Mix	0.2		17 min	68°C
H2O	11.2		5 min	68°C
ADN	4		∞	4°C
Volumen total	20			

37 ciclos

LR-PCR Fragmento 2				
Reactivo	Volumen (μL)		Condiciones de PCR	
			Tiempo	Temperatura
LR PCR Buffer	2		∞	93°C
dNTP Mix	1		3 min	93°C
Cebador <i>Forward</i>	STRC_LR2_F	0.8	15 s	93°C
Cebador <i>Reverse</i>	STRC_LR2_R	0.8	30 s	64°C
LR PCR Enzyme Mix	0.2		17 min	68°C
H2O	11.2		5 min	68°C
ADN	4		∞	4°C
Volumen total	20			

37 ciclos

Una vez finalizada la PCR, los productos obtenidos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,6%.

Estos productos de LR-PCR se utilizaron después para continuar con la amplificación por PCR anidada.

4.3. *Nested*-PCR (PCR anidada)

Para el estudio de variantes patogénicas puntuales en el gen *STRC* se realizaron PCR anidadas sobre los productos de amplificación de las LR-PCR, siguiendo el método descrito por Vona *et al.* (90). Para ello, se utilizó una dilución 1:1000 del producto de la LR-PCR como sustrato.

Los cebadores utilizados se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Cebadores utilizados para Nested-PCR sobre los productos LR1 y LR2¹(90).

Nombre	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')
STRC_E1	GTGTCAGTGGAGCCTCAGGT	ATCCCCAGTTCTGCTCACTG
STRC_E2A	GATCCAGGTAGGGAACCTGTG	ACACAGTCAGACGGCCC
STRC_E2B	GCTGGGAGCCTTAGCTCCTG	CCCTCAGAACTGGTCTCCTG
STRC_E3	CTGGGACTGGGATGTGG	TGCTCAAGGTCATATGGCTAG
STRC_E4A	TCAGGGTCAGAATCTTCAGC	AGCAGGCCAGCACAGAG
STRC_E4B	CACGACCAGTTTCTCTGATG	GGATGGTCCCAGTGGTG
STRC_E4C	CAGGCCAATGCAGGATAAGT	TTCTAGGAGCTTTCCCTCTGG
STRC_E4D	CACGCCTACACTATCTCCTC	TCTAGAGCTGTGTGCTTCAA
STRC_E5-6	GACAAGCATCCCAGCAAG	CCTCCTCCCACTAAAGCAAG
STRC_E7	TGGAGCCTAGTGTTCAGAGG	GCACATTGCCTATCTGGC
STRC_E8-9	GACAGCAGGGCTACAGAGG	TCTTCTAGAACACCGACCC
STRC_E10	TGTACCCATACCATCTGCTG	CAAGTTGACACAATGGGAAAG
STRC_E11	GGGAAATTCAGATGTGGGATTA	ATTCTCTTGACTGGGGCTCA
STRC_E12-13	GCCTTAGGAACCCACTTAGG	AAGATGCCTTCTCCCAAC
STRC_E14	AGGGAAGGCCTTTCATACC	AGGGTAGTGTGGGAGGTAGC
STRC_E15	TTTGGTCCCTTTCCACC	AGGGCTAAGGGATAGGTAAAG
STRC_E16	TCGAGAGAAGAGTGGGCAT	GTCCTTTGGCTCTAGTCAGG
STRC_E17-18	TTACGGTGGATGAACATCTG	AAACTACCTCCTCCAGGGC
STRC_E19	GCTGCGGACTGTGGGTTT	CTTCCTTAAGCAATGAGCCAG
STRC_E20	TCTGGGCTCATTGCTTAAGG	ACACAGGGCTCCAGGGGA
STRC_E21	TCCATATTCTTAAGGTCCCC	CCTGTCTGTTTTTGCACTC
STRC_E22	GGAGACTGCAAAACAGAGAC	AACTCCAGAACTACAGAATTC
STRC_E23	CAGTGCTACCATTAATCTCTGAAT	GGTAACCACTGCTTTCGTC
STRC_E24	GAGGAAACTAAAGAAAAGGCAAA	AATTCCTTGGGCTTTAGATGAT
STRC_E25	CCTTCTTTCTATCTTTTGTG	CTTCCTCCATGGGACCAGAC
STRC_E26	GAAAGAAGGATCATGAAGGTCTG	TAAACACCTCAGGCCCC
STRC_E27-28	CTTTGGGAGTAGTTAGAGAAGGTC	TCTAAGAGCCAGACAGCACC
STRC_E29	ACAGGCAGAGCGCTAATTC	TCAGGATGCACTTCTGTTTG

El programa de amplificación utilizado se describe a continuación:

PCR anidada				
Reactivo	Concentración final	Volumen (µL)	Condiciones de reacción	
			Tiempo	Temperatura
HotStart Master Mix	1x	10	∞	94°C
Cebador Forward	10 µM	1	2 min	94°C
Cebador Reverse	10 µM	1	30 s	94°C
H ₂ O	-	7	30 s	70°C

2 ciclos

¹ A todos los cebadores de la Tabla 5 se les añadió una cola M13.

ADN	variable	1	30 s	72°C	
Volumen total (µL)	20		30 s	94°C	
			30 s	67°C	2 ciclos
			30 s	72°C	
			30 s	94°C	33 ciclos
			30 s	65°C	
			30 s	72°C	
			5 min	72°C	
			∞	4°C	

5. Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger se utilizó para el estudio de la región codificante del gen *GJB2* y para la confirmación de las variantes puntuales halladas por otras técnicas (MLPA, NGS).

Para la purificación de los productos de la PCR se usó el reactivo *ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos).

Para la secuenciación se utilizó el reactivo *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Nimagen, Nijmegen, Holanda). Los cebadores utilizados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que los que se usaron para la amplificación, excepto en el caso de los que llevaron cola M13 que se secuenciaron con cebadores universales M13. La mezcla de la reacción por muestra y el programa de ciclado utilizados fueron los siguientes:

Secuenciación Sanger			
Reactivo	Volumen (µL)	Condiciones de reacción	
		Tiempo	Temperatura
<i>5X Sequencing Buffer</i>	2.2	45 s	96°C
<i>BigDye 3.1</i>	0.4	10 s	96°C
Cebador (10uM)	0.5	5 s	50°C
H ₂ O	7.9	2 min	60°C
Producto PCR	1	∞	4°C
Volumen total (µL)	12		

Los productos de la reacción de secuenciación se purificaron en placas *Performa DTR V3 96-well* (Edge Bio, San Jose, Estados Unidos). Una vez purificados se analizaron por electroforesis capilar en el secuenciador automático *ABI3130xl Genetic Analyzer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) de 16 capilares.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia de referencia del gen correspondiente en el programa *SeqScape v2.5* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos).

6. Mini-secuenciación (*SNaPshot*[®])

El estudio de las variantes mitocondriales más frecuentes causantes de hipoacusia se hizo mediante método de mini-secuenciación o *SNaPshot*. Este método permite analizar simultáneamente varias variantes en un mismo ensayo y conocer si dichas variantes se encuentran en homoplasmia o heteroplasmia, estimando el porcentaje de variante de forma semicuantitativa.

Las variantes estudiadas fueron m.1555A>G y m.1494C>T en el gen *MT-RNR1* y m.7445A>C y m.7511T>C en el gen *MT-TS1*. Se amplificaron simultáneamente estos genes mitocondriales por PCR *multiplex* con cebadores diseñados con *Primer3Plus* (129) (Tabla 5).

Tabla 5. Cebadores utilizados para amplificación de los genes *MT-RNR1* y *MT-TS1* por PCR *multiplex*.

Nombre	Cebador <i>Forward</i> (5'-3')	Cebador <i>Reverse</i> (5'-3')
MT-RNR1-PCR	GGTCGAAGGTGGATTTAGCA	TTGGGTGCTTTGTGTTAAGC
MT-TS1	GAACCTCCATAAACCTGGA	GCTGCATGTGCCATTAAGAT

La mezcla de reacción y el programa de amplificación utilizados fueron los siguientes:

PCR multiplex			
Reactivo	Volumen (µL)	Condiciones de reacción	
		Tiempo	Temperatura
<i>HotStarTaq Master Mix (2x)</i>	10	15 min	95°C
Cebador MT-RNR1-PCR-F	0.4	30 s	95°C
Cebador (MT-RNR1-PCR-R)	0.4	1 min 30 s	59°C
Cebador (MT-TS1-F)	0.4	1 min 30 s	72°C
Cebador (MT-TS1-R)	0.4	15 min	72°C
H ₂ O	6.4	∞	4°C
ADN	2		
Volumen total (µL)	20		

30 ciclos

El producto de la PCR se purificó enzimáticamente mediante *ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Estados Unidos).

A continuación, se llevó a cabo la reacción de mini-secuenciación o *SNaPshot* con el kit *SNaPshot™ Multiplex Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Estados Unidos). La reacción de mini-secuenciación se basa en el uso de *cebadores de extensión*, específicos para la región inmediatamente anterior al

nucleótido que se quiere estudiar, junto con nucleótidos *dideoxi* marcados con fluorescencia. Al hibridar estos cebadores a su región complementaria en el ADN de estudio, la ADN polimerasa añadirá un único nucleótido *dideoxi* marcado con un fluoróforo en su extremo 3', terminándose así la reacción de extensión. La lectura del fluoróforo permitirá identificar la base añadida en la reacción de extensión (Figura 40).

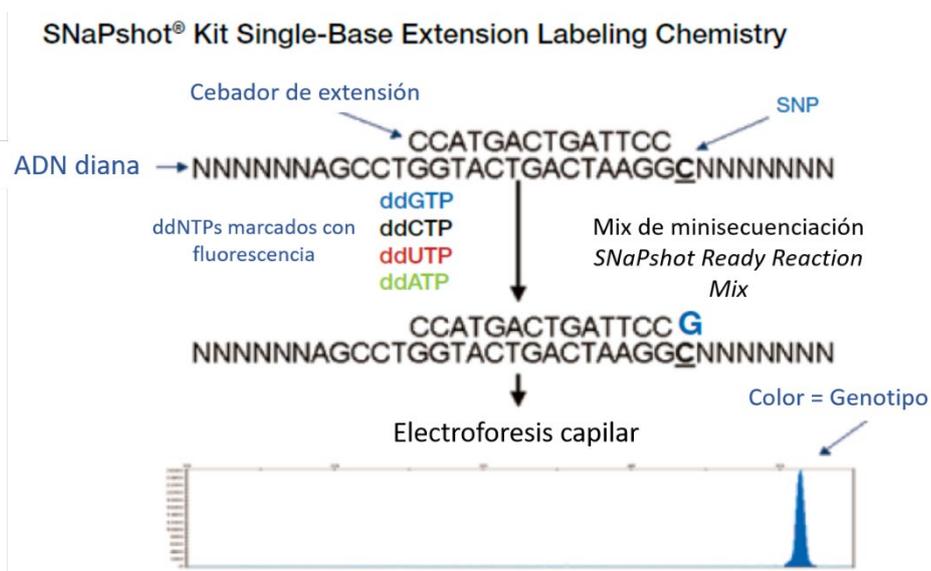


Figura 40: Esquema de reacción de mini-secuenciación (SNaPshot) (<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/>).

Reacción de extensión				
Reactivo	Volumen (µL)	Condiciones de reacción		
		Tiempo	Temperatura	
<i>SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix</i>	5	10 s	96°C	25 ciclos
Cebador de extensión 1	0.5	5 s	50°C	
Cebador de extensión 2	0.5	30 s	60°C	
Cebador de extensión 3	0.5	∞	4°C	
Cebador de extensión 4	0.5			
Producto de la purificación <i>ExoSAP</i>	3			
Volumen total (µL)	10			

Los cebadores de extensión o secuenciación utilizados se diseñaron con *Primer3Plus* (129) siguiendo las recomendaciones del fabricante del kit y se describen en la Tabla 6. Se diseñaron utilizando la secuencia inmediatamente adyacente al nucleótido que se quiso estudiar. En el caso de las variantes

patogénicas en las posiciones m.1494 y m.7511, los cebadores de extensión se diseñaron utilizando la hebra negativa.

Con el fin de poder identificar después cada variante, se añadieron distintas colas del tetranucleótido (GACT)_n a cada cebador, de manera que se obtienen fragmentos de diferente tamaño que se pueden separar por electroforesis capilar.

Tabla 6. Cebadores de extensión utilizados para la detección de las variantes mitocondriales por SNaPshot.

Nombre	Secuencia (5´-3´)	Hebra de ADN	Tamaño (nt)
MT-RNR1_seq-1494_F	GACTGACTGAAATGTCCTTTGAAGTATACTTGAGGAG	(-)	37
MT-RNR1_seq-1555_F	GACTGACTGACTTAAAACCCCTACGCATTTATAGAGGAG	(+)	41
MT-TS1_seq-7445_F	GACTGACTGACTGACTGTGCGAAGAACCCGTATACATAAAATCTAG	(+)	45
MT-TS1_seq-7511_F	GACTGACTGACTGACTGACTGAGAAATGGTTTTCTAATACCTTTTTGAA	(-)	50

El producto de la reacción se purificó mediante placas *Performa DTR V3 96-well* (Edge Bio, San Jose, Estados Unidos) y se preparó una dilución 1:10 del producto purificado para su posterior análisis por electroforesis capilar.

El análisis se realizó en el secuenciador automático *ABI3130xl Genetic Analyzer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) de 16 capilares, utilizando el marcador de peso molecular *GeneScan-120 LIZ*.

Los resultados fueron analizados en el programa *GeneMapper* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos), utilizando el siguiente código de colores para identificar los nucleótidos:

Código de colores <i>SNaPshot</i>	
A	verde
T	rojo
C	negro
G	azul

Material y Métodos

Las variantes en heteroplasmia se detectaron por la presencia de dos picos (normal y mutado) en la posición (tamaño) correspondiente. El grado de heteroplasmia se calculó de forma semicuantitativa usando las áreas de cada pico mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Heteroplasmia (\%)} = A_m * 100 / (A_m + A_{wt})$$

Donde:

A_m = área del pico mutado

A_{wt} = área del pico nativo

7. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

La detección de grandes deleciones frecuentes asociadas de hipoacusia se hizo mediante la técnica MLPA. Para ello se utilizó el kit de reactivo *SALSA MLPA EK1 (MRC Holland, Amsterdam, Holanda)*, que incluye los reactivos generales necesarios para realizar la técnica, junto con el kit *SALSA MLPA Probemix P163-E1 (MRC Holland, Amsterdam, Holanda)*, que contiene las sondas específicas para genes asociados a hipoacusia.

El kit *SALSA MLPA Probemix P163-E1* está diseñado para detectar deleciones o duplicaciones de los genes *GJB2*, *GJB3*, *GJB6*, *POU3F4*, *WFS1*, deleciones *upstream* del gen *POU3F4* y seis variantes patogénicas puntuales o *indels* específicas en el gen *GJB2*. Las sondas incluidas en este kit se describen en la Tabla 8. Las secuencias de cada sonda están disponibles en la web de la casa comercial (133).

Tabla 7. Sondas SALSA MLPA Probemix P163 para las regiones relacionadas con hipoacusia

Gen	Transcrito	Sonda SALSA MLPA	Región diana	Longitud (nt)
<i>GJB2</i>	NM_004004.6	21979-L19379	Exón 1	178
		22362-L31524	Exón 1	247
		22413-L31695	Variante IVS1+1G>A (no mutado), intrón 1	267
		09862-L09256	Variante c.35delG (no mutado), exón 2	172
		13150-L14407	Variante c.101T>C (no mutado), exón 2	274
		09118-L30816	Variante c.313del14 (no mutado), exón 2	312
		05365-L04756	Exón 2	328
		13126-L30618	Variante c.167delT (no mutado), exón 2	396
		13127-L15168	Variante c.235delC (no mutado), exón 2	402
<i>GJB3</i>	NM_001005752.1	05367-L04758	Exón 1	190
		05368-L31484	Exón 2	241
		05369-L23138	Exón 2	292
<i>GJB6</i>	NM_001110219.3	05370-L04761	Exón 2	162
		05371-L04762	Exón 3	196
		06701-L04763	Exón 4	282
		22189-L31241	Exón 5	259

		05374-L04765	Exón 5	337
POU3F4	NM_000307.4	21762-L14398	Upstream	146
		21748-L30413	Upstream	202
		21763-L14400	Upstream	364
		21764-L14397	Upstream	390
		13139-L14396	Upstream	418
		13142-L14399	Upstream	463
		13144-L14401	Upstream	481
		21761-L13889	Exón 1	127
		12771-L13887	Exón 1	436
WFS1	NM_006005.3	05375-L30787	Exón 1	149
		05376-L04767	Exón 2	229
		05377-L11414	Exón 3	166
		05378-L04769	Exón 4	252
		05379-L04770	Exón 5	184
		06702-L09985	Exón 6	319
		06699-L04772	Exón 7	208
		21747-L30412	Exón 8	132
		21749-L30414	Exón 8	425
CRYL1	No especificado	21750-L30617	13q12	445
		21751-L30416	13q12	493
LATS2	No especificado	06704-L03639	13q12	355
PSPC1	No especificado	02399-L06768	13q12	223
ZMYM2	No especificado	21765-L30428	13q12	471

El protocolo de trabajo utilizado fue el descrito por la casa comercial (134). El análisis de los resultados se hizo mediante el programa *Coffalyser* (MRC Holland, Amsterdam, Holanda).

8. PCR digital (Digital Droplet PCR, ddPCR)

El estudio de grandes deleciones en el gen *STRC* se hizo por tecnología de PCR digital con el sistema *QX200 Droplet Digital PCR System* (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos).

Para ello se utilizaron cebadores y sonda específicos para el intrón 23 del gen *STRC* descritos por Mandelker *et al.* (88) y para el exón 1 del gen de referencia *RPP30*, descritos por (135) (Tabla 8).

Tabla 8. Cebadores y sondas para detección de CNVs del gen *STRC* por ddPCR (88).

Gen	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')	Sonda (5'-3')
<i>STRC</i>	GGCATCTCCAATCACTTCTTGTT	AGAAATAGGGATCAAAGGAGTATTACAGA	FAM-TATTATCTCCTAAGCCCTATACAT-MGBNFQ
<i>RPP30</i>	GATTTGGACCTGCGAGCG	GCGGCTGTCTCCACAAGT	VIC-CTGACCTGAAGGCTCT-MGBNFQ

Los ADN en estudio se ajustaron a una concentración de 20 ng/μL antes de iniciar el protocolo. La preparación de la mezcla de reacción por cada muestra y cada gen se llevó a cabo de la siguiente manera:

Ensayo <i>STRC (Mix 1 – Target)</i>		Ensayo <i>RPP30 (Mix 2 – Referencia)</i>	
Reactivo	Volumen (µL)	Reactivo	Volumen (µL)
Cebador <i>forward (100 uM)</i>	9.9	Cebador <i>forward (100 uM)</i>	9.9
Cebador <i>reverse (100 uM)</i>	9.9	Cebador <i>reverse (100 uM)</i>	9.9
Sonda (100 uM)	2.8	Sonda (100 uM)	2.8
H2O	27.4	H2O	27.4
Volumen total (µL)	50	Volumen total (µL)	50

A continuación, se preparó por cada muestra la siguiente mezcla:

<i>Mix 3 (Target + Referencia)</i>	
Reactivo	Volumen (µL)
<i>ddPCR SuperMix</i>	11 µL
<i>Mix 1 - Target</i>	1.1 µL
<i>Mix 2 - Referencia</i>	1.1 µL

Para cada paciente se realizaron tres réplicas del ensayo, por lo que se preparó la siguiente mezcla de reacción final por muestra:

Mezcla por muestra (para 3 réplicas)	
<i>Mix 3</i>	39.6 µL
ADN paciente	3 µL
H2O	23.4 µL

La generación de las gotas se llevó a cabo en el equipo *Droplet Generator* y se utilizó el *PX1 Plate Sealer* para el sellado de las placas (ambos de *Bio-Rad*, Hercules, Estados Unidos). La reacción de PCR digital se realizó en un termociclador *C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos)* y las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

Duración	Temperatura	40 ciclos
10 min	95°C	
30 s	94°C	
1 min	61,2°C	

10 min	98°C
∞	4°C

Una vez finalizada la reacción la lectura se llevó a cabo en el lector *QX200 Droplet Reader* (*Bio-Rad*, Hercules, Estados Unidos). El análisis de los resultados se realizó mediante el programa *QuantaSoft* (*Bio-Rad*, Hercules, Estados Unidos).

9. Next Generation Sequencing (NGS)

La secuenciación masiva en paralelo o *Next Generation Sequencing* (NGS) consiste en la secuenciación simultánea de millones de fragmentos de ADN. Esta tecnología ha sido adoptada rápidamente en el laboratorio clínico por su capacidad de analizar simultáneamente múltiples genes o regiones con un único test y por la gran reducción de su coste en los últimos años. En el caso de la hipoacusia, patología que presenta gran heterogeneidad de *locus*, esta tecnología ha supuesto un gran avance.

La tecnología de NGS engloba distintas plataformas con diferencias entre sí a nivel de principio químico utilizado, método de detección, etc. Sin embargo, en general todas ellas se basan en los mismos pasos básicos: extracción de ADN, preparación de librerías, enriquecimiento de las zonas de interés y secuenciación (Figura 41).

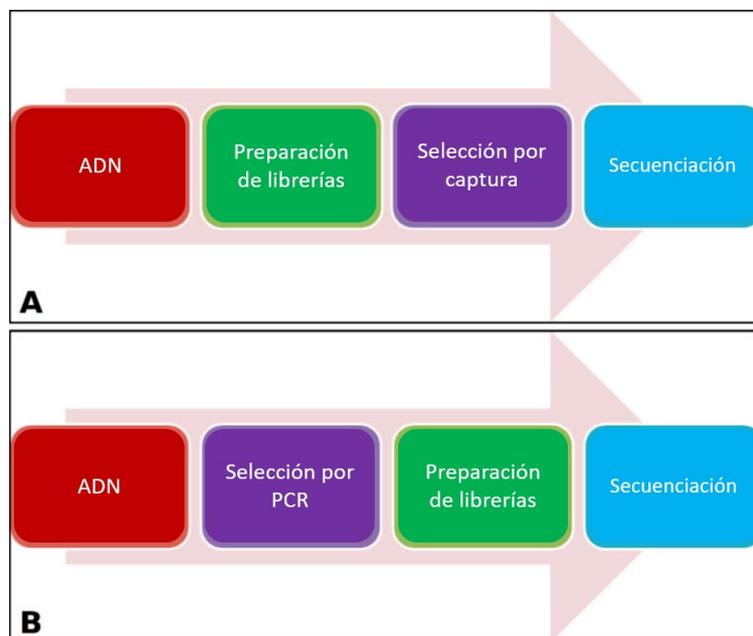


Figura 41. Esquema de los pasos generales de la secuenciación masiva, modificado de Yohe et al. (136). A: Enriquecimiento por captura: partiendo del ADN inicial se preparan las librerías, se sigue con la selección de las regiones de interés por captura, para terminar con la secuenciación. B: Enriquecimiento por PCR: El paso de selección por PCR ocurre previamente o en combinación con la preparación de las librerías.

Material y Métodos

La tecnología elegida para este trabajo fue la **targeted resequencing** de *Illumina*, que consiste en el aislamiento y secuenciación de un grupo de genes o regiones de interés del genoma, lo que reduce el tiempo y el coste de secuenciación y permite una secuenciación de mayor profundidad con mayor nivel de cobertura. Las regiones diana (*target*) se conocen como *paneles* y pueden ser diseñadas por el consumidor o paneles comerciales diseñados por el fabricante.

En nuestro caso, el *target* o panel elegido fue el **exoma clínico**: la región codificante de más de 4.000 genes asociados a patología humana (genes *OMIM*). Se eligió este panel debido a que nos permite disponer de gran cantidad de información e ir filtrándola por *paneles virtuales* de forma dinámica, pudiendo incorporar al análisis nuevos genes de interés en cualquier momento sin necesidad de repetir la secuenciación.

A. Preparación de las librerías

Se hizo por **enriquecimiento por captura** con los *kits* de preparación de librerías *Trusight One Sequencing Panel* (*Illumina Inc.*, San Diego, Estados Unidos) y *Clinical Exome Solution V2* (*Sophia Genetics SA*, Saint Sulpice, Suiza) (Figura 42).

Este paso consiste en la fragmentación del ADN y la adición de adaptadores a sus extremos. Los **adaptadores** son oligonucleótidos que pueden incluir *códigos de barras* o *índices* moleculares (para poder unir varias muestras), cebadores de PCR universales, secuencias de hibridación para unir el ADN a una superficie y secuencias de reconocimiento para iniciar la secuenciación. El término **librería** se refiere a los fragmentos de ADN con adaptadores que están ya listos para iniciar la secuenciación. El tamaño del ADN entre los adaptadores se conoce como *insert size* y corresponde al fragmento de ADN de interés (136).

Para la cuantificación del ADN de partida se utilizó el fluorómetro *Qubit* (*Thermo Fischer Scientific*, Waltham, Estados Unidos) y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa. Para la preparación de las librerías se utilizaron los protocolos recomendados por las casas comerciales de cada *kit*. La medida de la cantidad y calidad de las librerías se llevó a cabo en un equipo *BioAnalyzer 2100* (*Agilent Technologies, Inc.*, Santa Clara, Estados Unidos).

B. Enriquecimiento

Tanto en la secuenciación de paneles de genes como en la de exomas completos la librería se somete a **enriquecimiento**, que consiste en la selección de las regiones de interés. El enriquecimiento puede

realizarse por hibridación con secuencias complementarias (secuenciación por captura) o por PCR (secuenciación por amplicones). La elección de la estrategia de enriquecimiento depende del objetivo deseado: la secuenciación por captura es preferida para regiones genómicas grandes y la PCR para regiones más pequeñas que se quieran enriquecer en mayor medida (136). En nuestro caso, donde la región de interés es de gran tamaño, se eligió el enriquecimiento por **captura**.

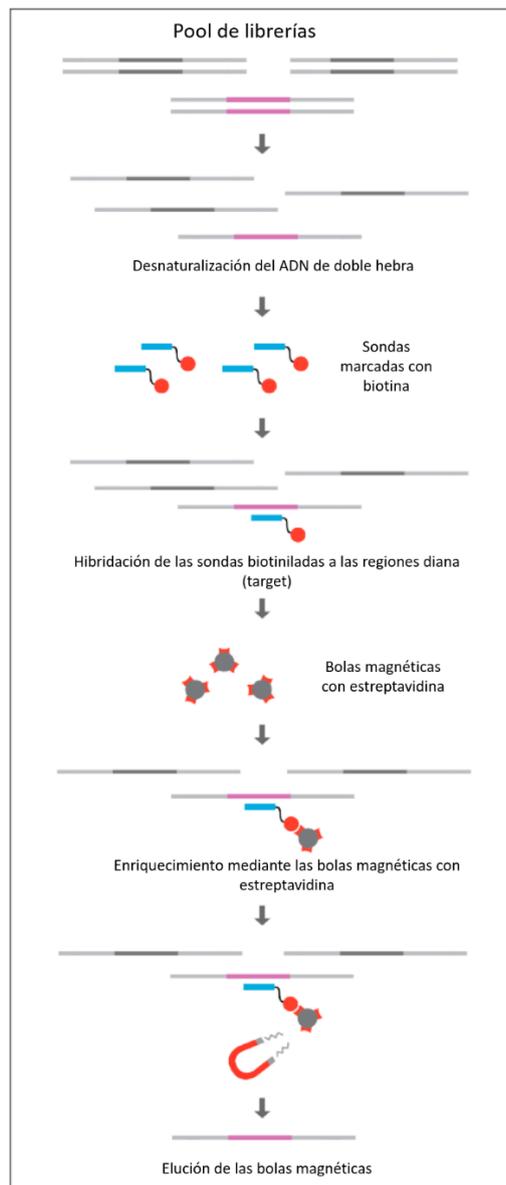


Figura 42. Esquema de enriquecimiento de las librerías por sondas de captura.

C. Secuenciación

Para la secuenciación de las librerías se utilizó la tecnología de **secuenciación por síntesis** (*Sequencing by Synthesis, SBS*) de *Illumina* y se llevó a cabo en los equipos *MiSeq* o *NextSeq* (*Illumina Inc.*, San Diego, Estados Unidos) con lecturas *paired end*.

El primer paso de la secuenciación es la **generación de clusters**: consiste en inmovilizar cada fragmento de ADN de la librería y amplificarlo clonalmente para generar una señal lo suficientemente grande para ser detectada (Figura 43).

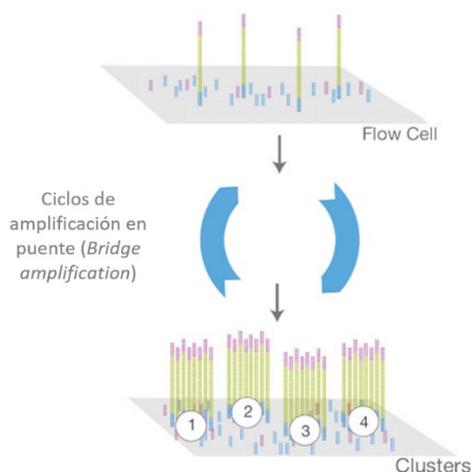


Figura 43. Generación de clusters o agrupaciones clonales en superficie sólida de la tecnología *Illumina* (Modificado de <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html?langsel=/es/>).

En el caso de *Illumina*, esto se consigue mediante *amplificación en puente* en una célula de flujo (*flow cell*) que contiene en su superficie secuencias complementarias a los adaptadores de los fragmentos de DNA. La amplificación clonal crea un *cluster* o agrupación con aproximadamente 1000 copias idénticas a un único fragmento de ADN de partida aislado físicamente de otras moléculas de DNA.

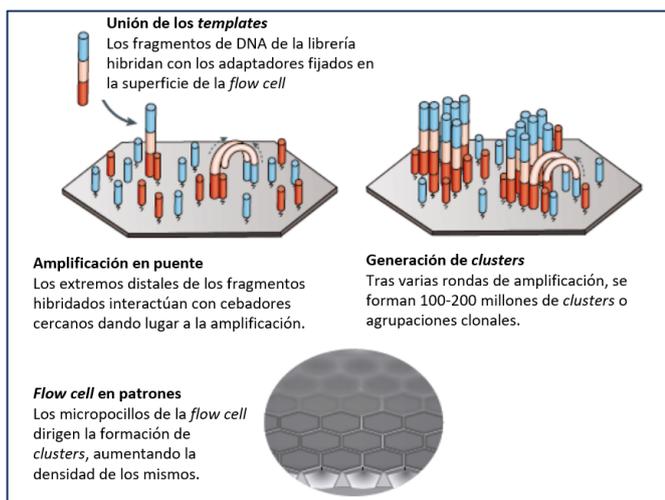


Figura 44. Amplificación en puente en fase sólida de la tecnología *Illumina* (modificado de Goodwin et al. (137)).

Una vez generados los *clusters* se puede

iniciar la secuenciación. Los secuenciadores *Illumina* utilizan la tecnología **SBS con terminación cíclica**

reversible (*cyclic reversible termination, CRT*) y detección por fluorescencia. Se añaden nucleótidos terminadores marcados con fluorescencia y gracias a una polimerasa, el nucleótido marcado se unirá a la cadena que se está elongando y terminará la reacción. Los nucleótidos no unidos remanentes se eliminan por lavado y la excitación con láser produce una emisión de fluorescencia que se registra simultáneamente para cada *cluster* de DNA. A continuación, el marcador fluorescente y el bloqueante del nucleótido unido se escinden y empieza el siguiente ciclo de síntesis (*terminación reversible*).

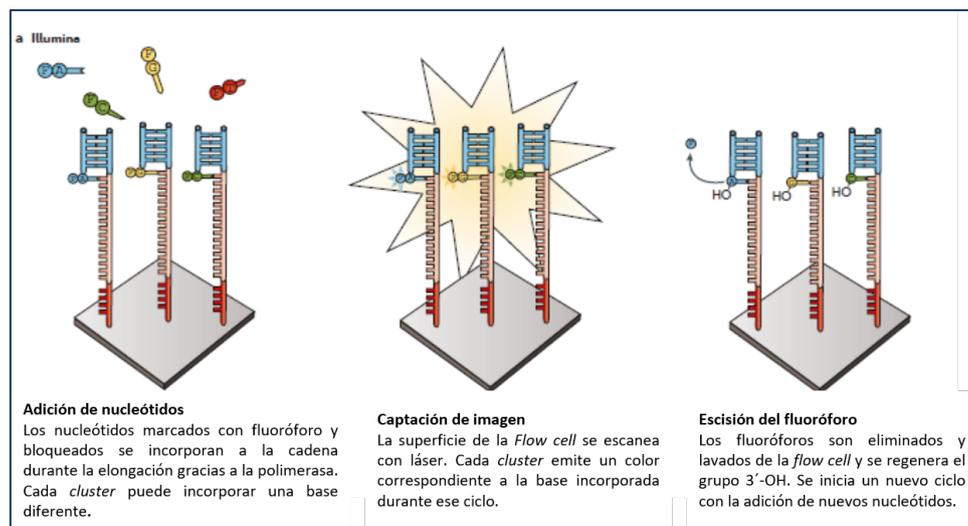


Figura 45. Representación esquemática de la secuenciación por síntesis con terminación cíclica reversible de Illumina. Modificado de Goodwin et al. (137).

D. Análisis bioinformático

Un algoritmo bioinformático (en inglés, *pipeline*) es a una serie de procesos computacionales utilizados para transformar las señales brutas obtenidas de la secuenciación NGS en resultados interpretables. Un algoritmo bioinformático típico incluye tres niveles de análisis (Figura 46):

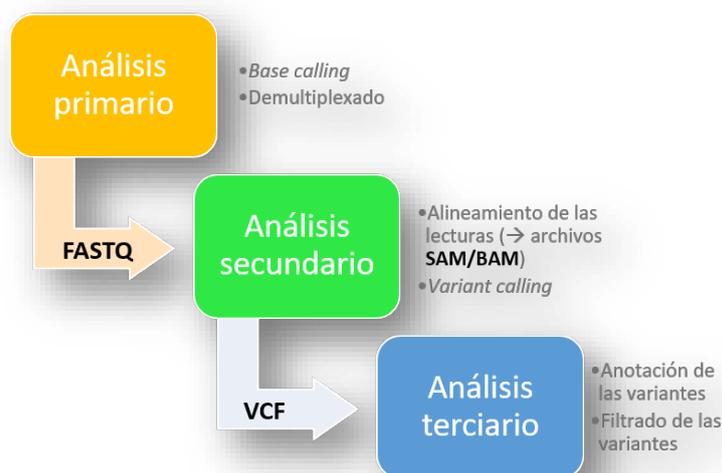


Figura 46. Niveles de análisis de un algoritmo o pipeline bioinformático.

D.1. Análisis primario

El análisis primario se realiza en el propio secuenciador y consiste en los siguientes procesos:

- Base calling o llamada de las bases:** a cada señal generada en el secuenciador se le asigna un nucleótido con un intervalo de confianza determinado (*Phred-like score* o *Q score*).
- Demultiplexado:** gracias a los índices añadidos durante la preparación de las librerías, las lecturas de cada muestra se separan de las demás para poder analizarlas.
- Trimming de los adaptadores:** las secuencias correspondientes a los adaptadores se eliminan de cada lectura generada, para obtener sólo la secuencia correspondiente al fragmento de ADN de interés.

Esto da como resultado los archivos FASTQ. Estos datos se someten a un análisis de calidad para valorar la distribución de longitud de las lecturas, los Q scores, el contenido en GC, etc. La determinación de la calidad de la secuenciación se realiza mediante la herramienta *FastQC* (138).

D.2. Análisis secundario

Para el análisis secundario se utilizan herramientas bioinformáticas que pueden ser gratuitas o comerciales. En nuestro caso, el análisis secundario se hizo mediante la plataforma *DNANexus* (*DNANexus, Inc.*, Mountain View, Estados Unidos) en el caso de los paneles *TruSight One* y con el programa *Sophia DDM* (*Sophia*) en el caso del panel *Clinical Exome* de *Sophia*.

El análisis secundario consiste en los siguientes pasos:

- a) **Alineamiento de las lecturas:** las lecturas generadas se mapean contra un genoma de referencia, en nuestro caso el genoma humano GRCh37. La herramienta utilizada para lecturas cortas como es nuestro caso es el alineador *Burrows-Wheeler Aligner (BWA)*. En este paso se generan archivos de formato *sequence alignment map (SAM)* o binary form of SAM (BAM).
- b) **Llamada de las variantes (en inglés, *variant calling*):** las lecturas ya alineadas se comparan con la secuencia de referencia y se identifican las variantes respecto a ella. Existen distintos programas para la detección de variantes. En el nuestro caso se utilizó el *Genome Analysis Toolkit (GATK)*, dentro del pipeline de *DNANexus*. Este proceso da lugar a los archivos *Variant Call Format (VCF)*, que consiste en un listado de todas las variantes detectadas y su frecuencia alélica. Este formato de archivo es el que menos memoria ocupa y el más manejable computacionalmente (139).

La lista de las variantes del archivo VCF contendrá todas las variantes de la muestra, incluyendo las comunes, por lo que se someterá a interpretación mediante el análisis terciario.

D.3. Análisis terciario

El análisis terciario consiste en la anotación y filtrado de las variantes contenidas en el archivo VCF.

- a) **Anotación de las variantes:** las variantes detectadas se anotan respecto a bases de datos como *Human Genome Variation Society*, predictores de su efecto en la transcripción y traducción, dbSNP, OMIM, ClinVar, etc.
- b) **Filtrado de las variantes:** el filtrado puede hacerse por frecuencia en población general, genes de interés, modos de herencia o incluso patologías.

En nuestro caso, el análisis terciario a partir del VCF se llevó a cabo mediante la herramienta bioinformática *Alissa Interpret (Agilent Technologies, Inc.*, Santa Clara, Estados Unidos), que permite

crear algoritmos de filtrado y generar bases de datos propias de las variantes conforme se van clasificando.

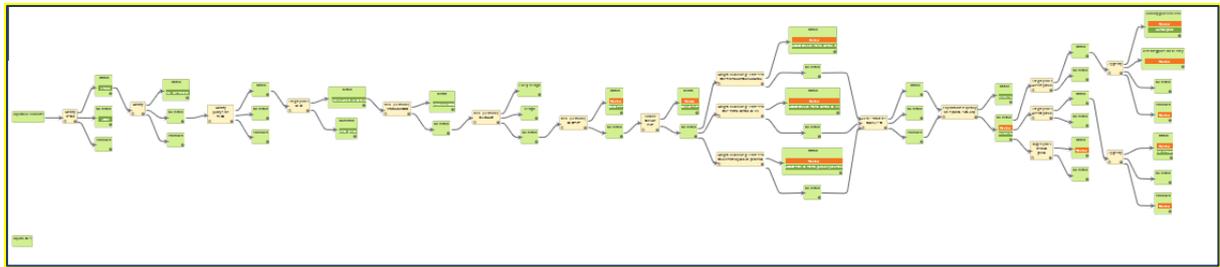


Figura 47: Ejemplo de algoritmo de filtrado para el análisis de hipoacusias en el programa Alissa Interpret (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Estados Unidos).

E. Definición de los paneles de genes

Para el filtrado de las variantes se diseñaron distintos paneles virtuales de genes basados en los descritos en *PanelApp* de *Genomics England* (62). De los paneles definidos por *PanelApp*, elegimos los genes incluidos en los paneles de exoma clínico disponibles en nuestro laboratorio (*TruSight One* y *Clinical Exome Sophia*).

Panel 1

Panel virtual de genes de alta evidencia de ser causa de hipoacusia (91 genes si se utilizó *TruSight One* y 93 genes si se utilizó *Clinical Exome Sophia*). Los genes incluidos en este panel y los transcritos de referencia analizados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Genes incluidos en el Panel 1 y transcritos de referencia utilizados. ^a Sólo disponible en Clinical Exome Sophia. ^b Sólo disponible en TruSight One.

PANEL 1							
Gen	Transcrito	Gen	Transcrito	Gen	Transcrito	Gen	Transcrito
ABHD12	NM_001042472.2	ESRRB	NM_004452.3	MARVELD2	NM_001038603.2	SALL1	NM_002968.2
ACTG1	NM_001199954.1	EYA1	NM_000503.5	MASP1	NM_001879.5	SALL4	NM_020436.3
ADGRV1^a	NM_032119.3	EYA4	NM_004100.4	MITF	NM_000248.3	SERPINB6	NM_004568.5
ALMS1	NM_015120.4	FGF3	NM_005247.2	MSRB3	NM_198080.3	SIX1	NM_005982.3
ATP6V1B1	NM_001692.3	GATA3	NM_001002295.1	MYH14	NM_001145809.1	SLC26A4	NM_000441.1
BCS1L	NM_004328.4	GIPC3	NM_133261.2	MYH9	NM_002473.5	SLC4A11	NM_001174090.1
BSND	NM_057176.2	GJB2	NM_004004.5	MYO15A	NM_016239.3	SMPX	NM_014332.2
CABP2^a	NM_001318496.1	GJB3	NM_024009.2	MYO3A	NM_017433.4	SNAI2	NM_003068.4
CDH23	NM_022124.5	GPSM2	NM_013296.4	MYO6	NM_004999.3	SOX10	NM_006941.3
CHD7	NM_017780.2	GRHL2	NM_024915.3	MYO7A	NM_000260.3	SOX2	NM_003106.2
CIB2	NM_006383.3	GRXCR1	NM_001080476.2	OPA1	NM_130837.2	STRC	NM_153700.2
CLDN14	NM_144492.2	HOXA2	NM_006735.3	OTOA	NM_144672.3	TECTA	NM_005422.2
CLRN1	NM_001195794.1	HSD17B4	NM_001199291.2	OTOF	NM_194248.2	TIMM8A	NM_004085.3
COCH	NM_004086.2	ILDR1	NM_001199799.1	OTOG^a	NM_001277269.1	TMC1	NM_138691.2
COL11A2	NM_080680.2	KARS	NM_001130089.1	PAX2	NM_003990.4	TMIE	NM_147196.2
COL4A5	NM_033380.1	KCNE1	NM_000219.3	PAX3	NM_181457.3	TMPRSS3	NM_024022.2
COL4A6	NM_033641.3	KCNJ10	NM_002241.4	PCDH15	NM_001142763.1	TPRN	NM_001128228.2
DFNA5 (GSDME)	NM_001127453.1	KCNQ1	NM_000218.2	PDZD7	NM_001195263.1	TRIOBP	NM_001039141.2
DFNB59 (PJKV)	NM_001042702.3	KCNQ4	NM_004700.3	PNPT1^a	NM_033109.4	USH1C	NM_153676.3
DNMT1	NM_001130823.1	KIT	NM_000222.2	POU3F4	NM_000307.4	USH1G	NM_173477.3
DSPP	NM_014208.3	LARS2^b	NM_015340.3	POU4F3	NM_002700.2	USH2A	NM_206933.2
EDN3	NM_207034.2	LHFPL5	NM_182548.3	PRPS1	NM_002764.3	WFS1	NM_006005.3
EDNRB	NM_000115.3	LOXHD1	NM_144612.6	PTPRQ	NM_001145026.1	WHRN	NM_015404.3
ESPN	NM_031475.2	LRTOMT	NM_001145308.4	RDX^b	NM_001260494.1		

Panel 2

Panel que incluye 10 genes (9 en los casos en los que se utilizó el panel *Clinical Exome Sophia*) con evidencia moderada sobre su relación causal con la hipoacusia. Los genes de este panel y los transcritos utilizados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Genes incluidos en el Panel 2 y transcritos de referencia utilizados. ^a Sólo disponible en TruSight One.

PANEL 2			
Gen	Transcrito	Gen	Transcrito
ATP2B2	NM_001330611.1	HGF	NM_000601.5
DIABLO	NM_019887	KITLG	NM_000899.4
DIAPH3	NM_001042517.1	MIR96	NR_029512
GJB6	NM_001110219	SIX5	NM_175875.4
HARS2	NM_012208.3	TNC^a	NM_002160.4

Panel 3

Panel de genes de evidencia insuficiente o contradictoria (163 genes si se utilizó *TruSight One*, 155 genes si se utilizó *Clinical Exome Sophia*) (Tabla 11).

Tabla 11. Genes incluidos en el Panel 3 y transcritos de referencia utilizados. ^a Sólo disponible en TruSight One.

PANEL 3							
Gen	Tránsito	Gen	Tránsito	Gen	Tránsito	Gen	Tránsito
<i>ABHD5</i>	NM_016006	<i>DIAPH1</i>	NM_0052194	<i>KCNMA1</i>	NM_001014797.2	<i>RPGR</i>	NM_001034853.1
<i>ACAN</i>	NM_013227.3	<i>DIO2^a</i>	NM_001324462.1	<i>LAMA2</i>	NM_000426.3	<i>RPS6KA3</i>	NM_004586.2
<i>ACTB</i>	NM_001101.3	<i>DLX5</i>	NM_005221.5	<i>LARGE1</i>	NM_004737.4	<i>SCARB2</i>	NM_005506.4
<i>ALDH1A2</i>	NM_001206897.1	<i>DMD</i>	NM_004010.3	<i>LFNG</i>	NM_001040167.2	<i>SCRIB</i>	NM_182706.4
<i>APAF1</i>	NM_181861.1	<i>EPHB2</i>	NM_004442.7	<i>LHX3</i>	NM_179138.6	<i>SDHD</i>	NM_003002.4
<i>AQP4</i>	NM_004028.4	<i>ERBB4</i>	NM_005235.2	<i>LRP2</i>	NM_004525.2	<i>SLC12A6</i>	NM_133647.1
<i>ARSB</i>	NM_000046.3	<i>ERCC1</i>	NM_001983	<i>MAFB</i>	NM_005461.4	<i>SLC17A8</i>	NM_139319.2
<i>ATP1A2</i>	NM_000702.2	<i>ERCC2</i>	NM_000400.3	<i>MIR182</i>	NR_029614.1	<i>SLC19A2</i>	NM_006996.3
<i>ATP2B2</i>	NM_001330611.1	<i>ERCC3</i>	NM_000122.1	<i>MKKS</i>	NM_018848.3	<i>SLC1A3</i>	NM_004172.4
<i>ATP6VOA4</i>	NM_020632.2	<i>ERCC4</i>	NM_005236	<i>MPV17</i>	NM_002437.5	<i>SLC26A5</i>	NM_198999.2
<i>ATP8B1</i>	NM_005603.6	<i>ERCC5</i>	NM_000123.3	<i>MSX2</i>	NM_002449.4	<i>SLC29A3</i>	NM_018344.5
<i>AXIN1</i>	NM_003502.3	<i>ESR2</i>	NM_001291712.1	<i>MTAP</i>	NM_002415.3	<i>SLC33A1</i>	NM_004733.3
<i>BBS1</i>	NM_024649.4	<i>FAS</i>	NM_152872.3	<i>MYO1A</i>	NM_001256041.1	<i>SMS</i>	NM_004595.4
<i>BBS4</i>	NM_033028.4	<i>FGFR1</i>	NM_023110.2	<i>MYO1C</i>	NM_001080779.1	<i>SOBP</i>	NM_018013.3
<i>BCAP31^a</i>	NM_001139457.2	<i>FGFR2</i>	NM_000141.4	<i>MYO1F</i>	NM_012335.3	<i>SOD1</i>	NM_000454.4
<i>BCR</i>	NM_004327.3	<i>FGFR3</i>	NM_000142.4	<i>NARS2</i>	NM_024678.5	<i>SOX9</i>	NM_000346.4
<i>BDNF</i>	NM_170731.4	<i>FKBP14</i>	NM_017946	<i>NAV2</i>	NM_001244963.1	<i>SPINK5</i>	NM_006846.3
<i>BLOC1S6</i>	NM_012388.3	<i>FOXC1</i>	NM_001453	<i>NDP</i>	NM_000266.4	<i>SPRY2</i>	NM_005842.3
<i>BMP4</i>	NM_001202.4	<i>FOXG1</i>	NM_005249	<i>NEU1^a</i>	NM_000434.4	<i>ST3GAL5</i>	NM_003896.4
<i>BTD</i>	NM_001281723.2	<i>FOXI1</i>	NM_012188	<i>NEUROD1</i>	NM_002500.4	<i>TBC1D24</i>	NM_001199107.2
<i>CACNA1D</i>	NM_000720.3	<i>FZD3</i>	NM_017412	<i>NF1</i>	NM_000267.3	<i>TBL1X</i>	NM_005647.3
<i>CACNB2</i>	NM_000724.3	<i>FZD6</i>	NM_003506.3	<i>NLRP3</i>	NM_004895.4	<i>TBX1</i>	NM_080647.1
<i>CACNG2</i>	NM_006078.3	<i>GFI1</i>	NM_005263	<i>NOTCH1</i>	NM_017617.5	<i>TBX10</i>	NM_005995.4
<i>CASP3^a</i>	NM_004346.2	<i>GJA1^a</i>	NM_000165.5	<i>NR2F1</i>	NM_005654.5	<i>TCF21</i>	NM_003206.3
<i>CATSPER2</i>	NM_172095.2	<i>GJB1</i>	NM_001097642.2	<i>NTF3</i>	NM_001102654.1	<i>TCOF1</i>	NM_001135243.1
<i>CCDC50</i>	NM_178335.2	<i>GJB4</i>	NM_1523212.2	<i>NTRK2</i>	NM_006180.4	<i>TGFB2</i>	NM_001135599.3
<i>CD151</i>	NM_004357.4	<i>GLI3</i>	NM_000168.3	<i>NTRK3</i>	NM_0010123382	<i>THRA</i>	NM_003250.5
<i>CDKN1B</i>	NM_004064.4	<i>GPX1^a</i>	NM_000581.3	<i>OTOR^a</i>	NM_020157.3	<i>THRB</i>	NM_000461.5
<i>CEACAM16</i>	NM_001039213	<i>GRID1</i>	NM_017551.2	<i>OTX2</i>	NM_021728.3	<i>TJP2</i>	NM_004817.4
<i>CELSR1</i>	NM_014246.1	<i>GSTM1</i>	NM_000561.3	<i>PHEX</i>	NM_000444.6	<i>TMPRSS5</i>	NM_030770.3
<i>CHRNA9</i>	NM_017581.3	<i>GSTP1</i>	NM_00085.3	<i>PITX2</i>	NM_153426.2	<i>TNFRSF11B</i>	NM_002546.4
<i>CISD2</i>	NM_001008388.4	<i>GSTT1</i>	NM_000853.3	<i>PMP22</i>	NM_000304.2	<i>TRMU</i>	NM_018006.5
<i>COL11A1</i>	NM_080629.2	<i>GUSB</i>	NM_000181.3	<i>POLD1</i>	NM_001256849.1	<i>TRPV4</i>	NM_021625.4
<i>COL2A1</i>	NM_001844.4	<i>HAL</i>	NM_002108.3	<i>POLH</i>	NM_006502.2	<i>TSHR</i>	NM_000369.2
<i>COL4A3</i>	NM_000091.4	<i>HARS</i>	NM_002109.5	<i>POLR1C</i>	NM_203290.4	<i>TYRP1</i>	NM_000550.2
<i>COL4A4</i>	NM_000092.4	<i>HMX2</i>	NM_005519.1	<i>POLR1D</i>	NM_15972.3	<i>VANGL2</i>	NM_20335.2
<i>COL9A1</i>	NM_001851.4	<i>HOXA1</i>	NM_005522.4	<i>POU1F1</i>	NM_001122757.2	<i>XPA</i>	NM_000380.3
<i>COL9A2</i>	NM_001852.3	<i>HTRA2</i>	NM_013247.4	<i>PROP1</i>	NM_006261.4	<i>XPC</i>	NM_004627.4
<i>COL9A3</i>	NM_001853.3	<i>IGF1</i>	NM_001111293.2	<i>PRRX1</i>	NM_022716.3	<i>YAP1^a</i>	NM_001282101.1
<i>CRYM</i>	NM_001888.4	<i>JAG1</i>	NM_000214.3	<i>PTK7</i>	NM_002821.4		
<i>DDB2</i>	NM_000107.2	<i>JAG2</i>	NM_002226.4	<i>RASA1</i>	NM_002890.3		

Panel 4

Panel de 7 genes candidatos de hipoacusia. La selección de estos genes se hizo por búsqueda bibliográfica en PubMed utilizando los términos “*deafness + mouse*” y “*deafness + mouse + cilium*”, y posteriormente se eligió los que estaban disponibles en los paneles de exoma clínico utilizados en este trabajo. El objetivo de esta búsqueda fue identificar genes relacionados con patología ciliar en cuyos estudios experimentales con ratones *knockout* se hubiese detectado sordera como efecto inesperado o secundario según la bibliografía científica publicada (Tabla 12).

Tabla 12. Genes incluidos en el panel 4 y transcritos de referencia utilizados. ^a Sólo disponible en TruSight One.

PANEL 4			
Gen	Tránsito	Gen	Tránsito
PEX6	NM_000287.3	CLU	NM_001831.3
TULP1	NM_003322.5	NPTN	NM_012428.3
TULP3^a	NM_001160408.1	CEMIP	NM_001293298.1
SESN2	NM_031459.4		

F. Interpretación de las variantes

La interpretación de las variantes para diagnóstico de la hipoacusia se hizo siguiendo la guía del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (140). Esta guía asigna evidencias en base a varios criterios respecto a una variante en particular y proporciona reglas para combinación de todos los criterios para clasificar que una variante es patogénica, probablemente patogénica, incierta, LB o N. Los criterios incluyen frecuencias alélicas de la variante en de bases de datos poblacionales y prevalencia de una variante en afectos, datos de segregación, estudios funcionales, tipo de variante y su efecto según los predictores, similaridad de la variante con otras variantes patogénicas conocidas, modelos computacionales de efecto y el modo de herencia (136).

Sólo se analizaron las variantes de las regiones codificantes y las regiones intrónicas adyacentes de cada gen (exones +/- 10 pb) con una cobertura mayor a 20x. Para la priorización y clasificación de las variantes se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

- Modo de herencia
- Presencia y clasificación en bases de datos de hipoacusia:
 - ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)
 - Deafness Variation Database (DVD) (<http://deafnessvariationdatabase.org/>)
 - HGMD Professional (Qiagen) (48)
 - ClinGen Variant Browser (<https://erepo.clinicalgenome.org/evrepo/>)(61)
- Frecuencia en la población general: GnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). Sólo se analizaron las variantes a una frecuencia poblacional <1%.
- Naturaleza de la variante (cambio de aminoácido, truncamiento de la proteína...)
- Predictores bioinformáticos: Varsome (<https://varsome.com/>), Alamut Visual (Interactive Biosoftware), CADD (<https://cadd.gs.washington.edu/>).
- Dominio afectado de la proteína.

Material y Métodos

- Asociaciones gen-patogenicidad descritas: ClinGen Gene Validity Curation Browser (<https://search.clinicalgenome.org/kb/gene-validity>).
- Mecanismos de patogenicidad
- Información científica publicada.
- Segregación de la variante con la hipoacusia.

IV. RESULTADOS

1. Características de la cohorte de pacientes

Se incluyeron en el estudio 100 pacientes de la CAV-Euskadi: 82 del Hospital Universitario Donostia (HUD, Donostia-San Sebastián), 10 del Hospital Universitario de Cruces (HUC, Barakaldo), 4 del Hospital Universitario de Basurto (HUB, Bilbao) y 4 del Hospital Universitario Araba (HUA, Vitoria-Gasteiz). Por provincias, 54 pacientes provenían de Gipuzkoa, 34 de Bizkaia y 8 de Araba. En 4 casos no constaban datos demográficos sobre el lugar de residencia (Figura 48).

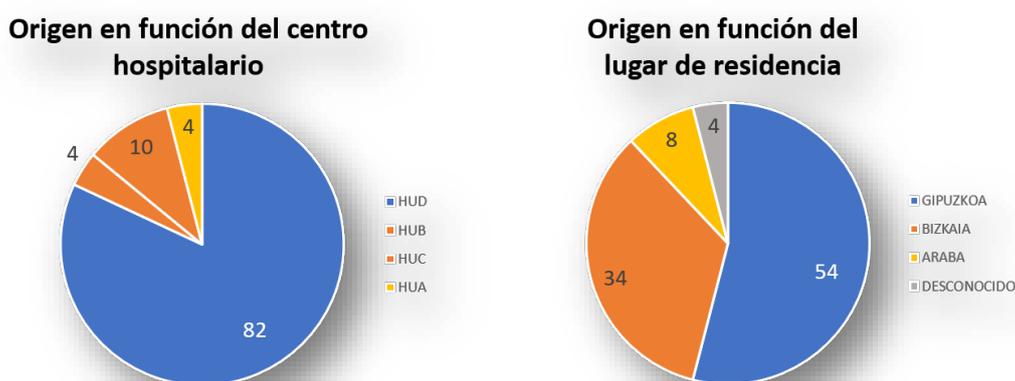


Figura 48. Origen de los pacientes estudiados en función del centro solicitante del estudio y del lugar de residencia de los pacientes. HUD: Hospital Universitario Donostia; HUB: Hospital Universitario de Basurto; HUC: Hospital Universitario de Cruces; HUA: Hospital Universitario Araba.

Las características más comunes de dichos pacientes fueron: sexo femenino (55%), hipoacusia congénita (62%), profunda (30%), simétrica bilateral (53%), estable (54%) y tratada con IC unilateral o bilateral (54%). El 50% de los pacientes refería antecedentes familiares de hipoacusia y 5 pacientes (5%) reportaron la existencia de consanguinidad en su familia (Figura 49).

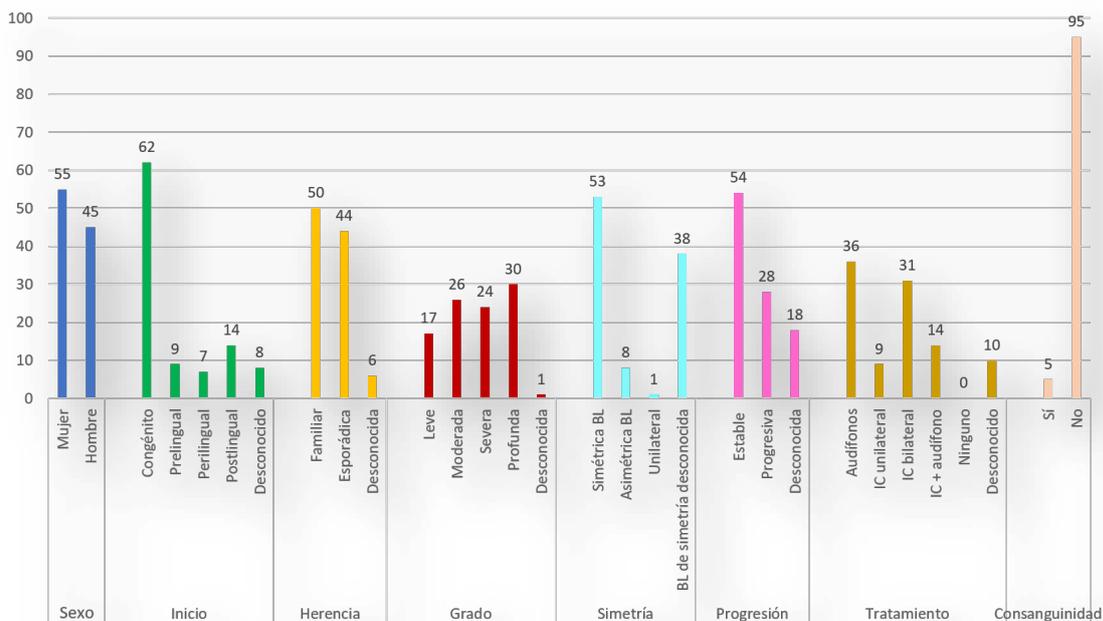


Figura 49: Características de los pacientes incluidos en el estudio. Cada categoría se representa en un color. Las columnas representan el porcentaje de pacientes de cada categoría.

2. Clasificación genética de los pacientes

Las variantes obtenidas tras la aplicación de los algoritmos de filtrado se clasificaron siguiendo los criterios del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (140) en una de las siguientes clases:

- ✦ Clase 1: Variante Benigna (B)
- ✦ Clase 2: Variante Probablemente Benigna (PB)
- ✦ Clase 3: Variante de Significado Incierto (VSI)
- ✦ Clase 4: Variante Probablemente Patogénica (PP)
- ✦ Clase 5: Variante Patogénica (P)

Las variantes identificadas y clasificadas como benignas (clase 1) o probablemente benignas (clase 2) no se muestran en este trabajo.

Se consideró **RESULTADO POSITIVO o DIAGNÓSTICO** aquel que cumplía alguno de los siguientes criterios:

Resultados

- Una variante P/PP en heterocigosis en un gen de herencia autosómico dominante (AD).
- Una variante P/PP en homocigosis en un gen de herencia autosómico recesivo (AR).
- Dos variantes P/PP en heterocigosis en un gen de herencia AR.
- Una variante P/PP y una variante VSI en heterocigosis en un gen de herencia AR.
- Una variante P/PP en hemicigosis en un gen ligado al cromosoma X de herencia recesiva (XLR).

Se consideró **RESULTADO NO CONCLUYENTE** aquel que presentaba una o más VSI que cumplían el modo de herencia de la patología asociada al gen, pero no reunían los criterios para atribuirles una clasificación de carácter patogénico ni benigno según los criterios de la ACMG. Entre estos resultados no concluyentes, los que por sus características y evidencias aparentaban una mayor probabilidad de causalidad se denominaron **variantes candidatas** en este trabajo y se valoran en una sección independiente de los resultados.

Se consideró **RESULTADO NEGATIVO** aquel cuyas variantes, independientemente de su clasificación, no cumplían con el modo de herencia de la patología asociada al gen (e.g., portadores de una variante patogénica en heterocigosis en un gen recesivo) o aquellas que no presentaban ninguna variante VSI, PP ni P en los genes analizados.

3. Resultados globales

De los 100 pacientes incluidos en este estudio, 62 fueron positivos (62%). El estudio de primera línea permitió diagnosticar a 32 pacientes (52% de los diagnósticos totales), mientras que 30 (48%) fueron diagnosticados con el estudio de segunda línea gracias al Panel 1 de genes de alta evidencia (Figura 50).

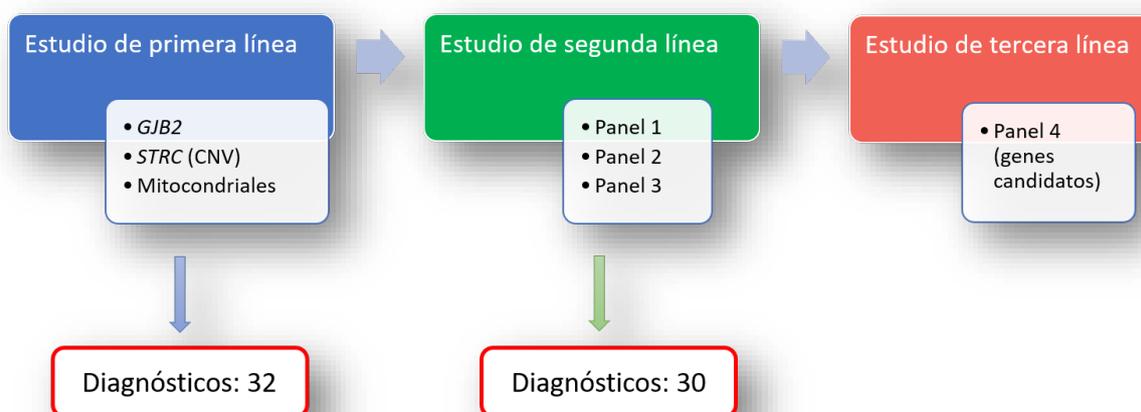


Figura 50. Diagnósticos obtenidos en este trabajo.

Los Paneles 2 (genes de evidencia moderada) y Panel 3 (genes de evidencia limitada o discrepante) no aportaron diagnósticos adicionales (Figura 51), aunque permitieron el hallazgo de nuevas evidencias sobre alguno de los genes incluidos en los mismos, que se discuten en el apartado IV de esta tesis.

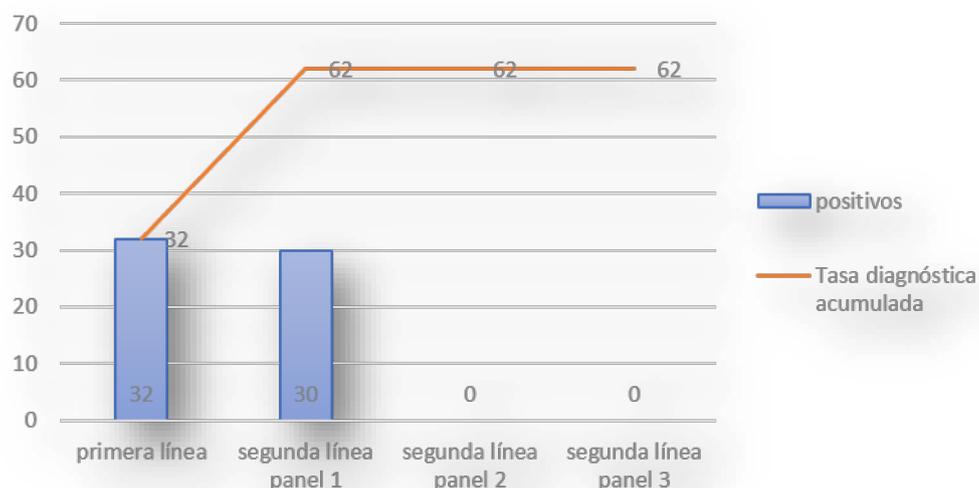


Figura 51. Tasa de diagnóstico genético de hipoacusia en este trabajo. Las barras azules representan el número de casos positivos. La línea roja representa la tasa diagnóstica acumulada (%).

De los pacientes no diagnosticados, 20 resultados fueron no concluyentes (53%) y los 18 restantes (47%) fueron negativos (Figura 52).

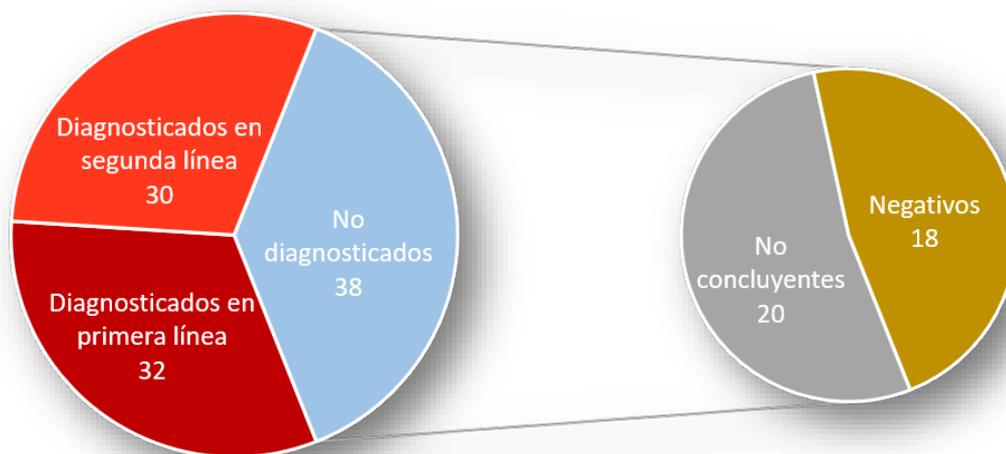


Figura 52. Resultados globales positivos, negativos o no concluyentes obtenidos.

Resultados

3.1. Pacientes diagnosticados

En la Tabla 13 se muestran las variantes genéticas, así como las patologías y herencias asociadas, de los 62 pacientes diagnosticados.

Tabla 13. Pacientes diagnosticados y variantes causales de HA identificadas en cada caso, con la patología asociada y su modo de herencia. Las variantes nuevas se resaltan en color rosa. AD: autosómico dominante. AR: autosómico recesivo.

ID Paciente	Gen	Variante		Estado	Patología	Modo de Herencia
P001	STRC	delección		Homocigosis (CNV=0)	DFNB16	AR
P002	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Homocigosis	DFNB1A	AR
P005	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Homocigosis	DFNB1A	AR
P006	STRC	c.4403G>C	p.Arg1468Pro	Heterocigosis	DFNB16	AR
		Delección		Heterocigosis (CNV=1)		
P010	OTOF	c.2485C>T	p.Gln829*	Homocigosis	DFNB9	AR
P011	STRC	delección		Homocigosis (CNV=0)	DFNB16	AR
P012	STRC	delección		Homocigosis (CNV=0)	DFNB16	AR
P013	GJB2	c.71G>A	p.Trp24*	Heterocigosis	DFNB16	AR
		c.250G>C	p.Val84Leu	Heterocigosis		
P015	BSND	c.23G>A	p.Arg8Gln	Homocigosis	DFNB73	AR
P016	MYH14	c.3439G>A	p.(Glu1147Lys)	Heterocigosis	DFNA4	AD
P017	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Heterocigosis	DFNB1A	AR
	GJB6	del(GJB6-D13S1830)		Heterocigosis		
P018	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Homocigosis	DFNB1A	AR
P019	STRC	delección		Homocigosis (CNV=0)	DFNB16	AR
P020	MYO6	c.2544delA	p.Lys848Asnfs*9	Heterocigosis	DFNA22	AD
P023	ILDR1	c.434G>A	p.Cys145Tyr	Heterocigosis	DFNB42	AR
		c.280G>A	p.Asp94Asn	Heterocigosis		
P025	OTOF	c.1404delA	p.Val469Cysfs*27	Heterocigosis	DFNB9	AR
		c.5125G>T	p.Asp1709Tyr	Heterocigosis		
P028	MYO15A	c.2740G>A	p.Glu914Lys	Heterocigosis	DFNB3	AR
		c.6004delG	p.Glu2002Argfs*27	Heterocigosis		
P029	OTOF	c.2485C>T	p.Gln829*	Heterocigosis	DFNB9	AR
		c.4275G>A	p.Trp1425*	Heterocigosis		
P030	MYH14	c.1656G>A	p.(Pro552=)	Heterocigosis	DFNA4A	AD
P032	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Heterocigosis	DFNB1A	AR
		c.617A>G	p.Asn206Ser	Heterocigosis		
P033	MYO15A	c.1657delC	p.Arg553Glyfs*76	Homocigosis	DFNB3	AR

P035	<i>BSND</i>	c.23G>A	p.Arg8Gln	Homocigosis	DFNB73	AR
P036	<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Homocigosis	DFNB1A	AR
P038	<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Homocigosis	DFNB1A	AR
P042	<i>MT-RNR1</i>	m.1555A>G	-	Homoplasmia	HA asociada o no a aminoglucósidos	matrilineal
P043	<i>LOXHD1</i>	c.4663G>T	p.Gln78Serfs*20	Heterocigosis	DFNB77	AR
		c.232delC	p.Glu1555*	Heterocigosis		
P046	<i>STRC</i>	deleción		Heterocigosis (CNV=1)	DFNB16	AR
		c.5188C>T	p.Arg1730*	Heterocigosis		
P048	<i>TECTA</i>	c.3107G>A	p.Cys1036Tyr	Heterocigosis	DFNA12	AD
P050	<i>MYO15A</i>	c.3874T>C	p.Phe1292Leu	Homocigosis	DFNB3	AR
P051	<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Homocigosis	DFNB1A	AR
P052	<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Heterocigosis	DFNB1A	AR
	<i>GJB6</i>	del(<i>GJB6</i> -D13S1854)		Heterocigosis		
P053	<i>MT-RNR1</i>	m.1494C>T		Homoplasmia	HA mitocondrial	matrilineal
P054	<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Heterocigosis	DFNB1A	AR
		c.439G>A	p.Glu147Lys	Heterocigosis		
P057	<i>MT-RNR1</i>	m.1494C>T		Homoplasmia	HA mitocondrial	matrilineal
P059	<i>MYO7A</i>	c.849+5G>A	p.(?)	Homocigosis	DFNB2, Usher tipo 1B	AR
P062	<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Heterocigosis	DFNB1A	AR
		c.229T>C	p.Trp77Arg	Heterocigosis		
P064	<i>TMC1</i>	c.645C>A	p.Tyr215*	Heterocigosis	DFNB7/11	AR
		c.1679A>T	p.Asp560Val	Heterocigosis		
P065	<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Homocigosis	DFNB1A	AR
P068	<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Homocigosis	DFNB1A	AR
P069	<i>WFS1</i>	c.2051C>T	p.Ala684Val	Heterocigosis	DFNA6/14/38	AD
P072	<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Heterocigosis	DFNB1A	AR
		c.596C>T	p.Ser199Phe	Heterocigosis		
	<i>MT-RNR1</i>	m.1555A>G	-	Heteroplasmia	HA asociada o no a aminoglucósidos	matrilineal
P073	<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Heterocigosis	DFNB1A	AR
		c.439G>A	p.Glu147Lys	Heterocigosis		
P074	<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Homocigosis	DFNB1A	AR
P077	<i>TMPRSS3</i>	c.208delC	p.His70Thrfs*19	Homocigosis	DFNB8/10	AR
P080	<i>MT-RNR1</i>	m.1555A>G	-	Homoplasmia	HA asociada o no a aminoglucósidos	matrilineal
P082	<i>MYO7A</i>	c.479C>G	p.Ser160Cys	Heterocigosis	DFNA11, Usher1	AD/AR
		c.5722T>A	p.Phe1908Ile	Heterocigosis		
P086	<i>OTOF</i>	c.2649C>A	p.Cys883*	Heterocigosis	DFNB9	AR

Resultados

		c.4809C>G	p.Tyr1603*	Heterocigosis		
P087	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Heterocigosis	DFNB1A	AR
		c.101T>C	p.Met34Thr	Heterocigosis		
P088	TECTA	c.5668C>T	p.Arg1890Cys	Heterocigosis	DFNA12	AD
P089	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Homocigosis	DFNB1A	AR
P091	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Homocigosis	DFNB1A	AR
P092	MYO15A	c.4596+4A>G	-	Heterocigosis	DFNB3	AR
		c.6004delG	p.Glu2002Argfs*27	Heterocigosis		
P093	TECTA	c.714C>G	p.Asn238Lys	Heterocigosis	DFNA12	AD
P095	GJB2	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	Heterocigosis	DFNB1A	AR
	GJB6	del(GJB6-D13S1830)		Heterocigosis		
P096	ESPN	c.2230G>A	p.Asp744Asn	Heterocigosis	HA neurosensorial sin alteración vestibular	AD
P097	GJB2	c.551G>A	p.Arg184Gln	Heterocigosis	DFNA3A	AD
P098	OTOF	c.2485C>T	p.Gln829*	Homocigosis	DFNB9	AR
P099	GJB2	c.283G>A	p.Val95Met	Heterocigosis	DFNB1A	AR
		c.427C>T	p.Arg143Trp	Heterocigosis		
P100	GJB2	c.439G>A	p.Glu147Lys	Heterocigosis	DFNB1A	AR
	GJB6	del(GJB6-D13S1854)		Heterocigosis		
P101	MYO6	c.1976G>A	p.Arg659Gln	Heterocigosis	DFNA22	AR
P103	OTOF	c.2485C>T	p.Gln829*	Heterocigosis	DFNB9	AR
		c.1469delC	p.Pro490Hisfs*6	Heterocigosis		
P104	STRC	delección		Heterocigosis (CNV=1)	DFNB16	AR
		c.4917_4918delCAinsCT	p.Leu1640Phe	Heterocigosis		

En particular, 16 genes diferentes estuvieron implicados en los casos positivos. Los más frecuentes fueron, por orden de frecuencia: variantes patogénicas en los genes *GJB2* (39% de los pacientes diagnosticados), *STRC* (11%), *OTOF* (10%), los genes *MYO15A* y *MT-RNR1* (6% de los casos positivos cada uno) y el gen *TECTA* (5%). Estos 6 genes suponen el 77% de los casos positivos. Los 10 genes restantes representaron cada uno como máximo un 3% de los casos diagnosticados (Figura 53).

El 76% (47/62) de las patologías asociadas en los pacientes positivos fue de herencia AR, el 18% (11/62) de herencia AD, y el 6% (4/62) fueron hipoacusias mitocondriales de herencia matrilineal (Figura 53).

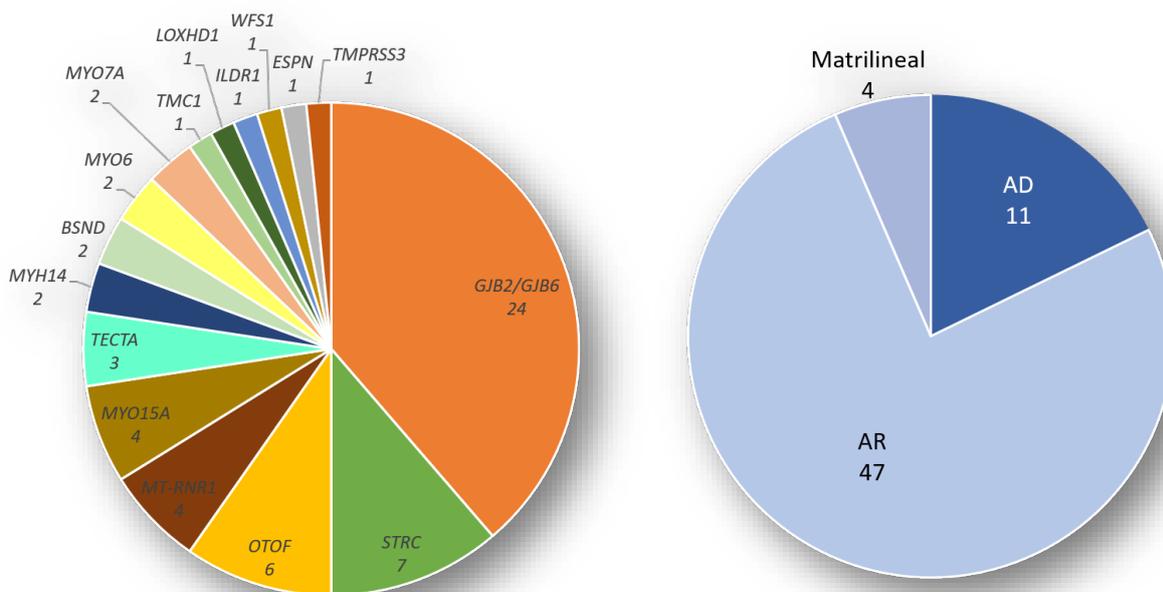


Figura 53. Genes implicados en los casos diagnosticados (n=62) y herencias de las patologías asociadas a los mismos.

Los 16 genes implicados se presentaron en 17 fenotipos distintos (Figura 54), ya que el gen *GJB2* se manifestó como DFNB1 y DFNA3. Además, en cinco pacientes se detectaron alteraciones en genes potencialmente relacionados con HA sindrómicas: dos casos presentaron variantes en el gen *BSND*, asociado a Síndrome de Bartter tipo 4; en dos pacientes se detectaron variantes en el gen *MYO7A* potencialmente causantes de síndrome de Usher tipo 1; y un paciente presentó una variante en heterocigosis en el gen *WFS1* asociada al síndrome *Wolfram-like AD* (hipoacusia y atrofia óptica).

Resultados

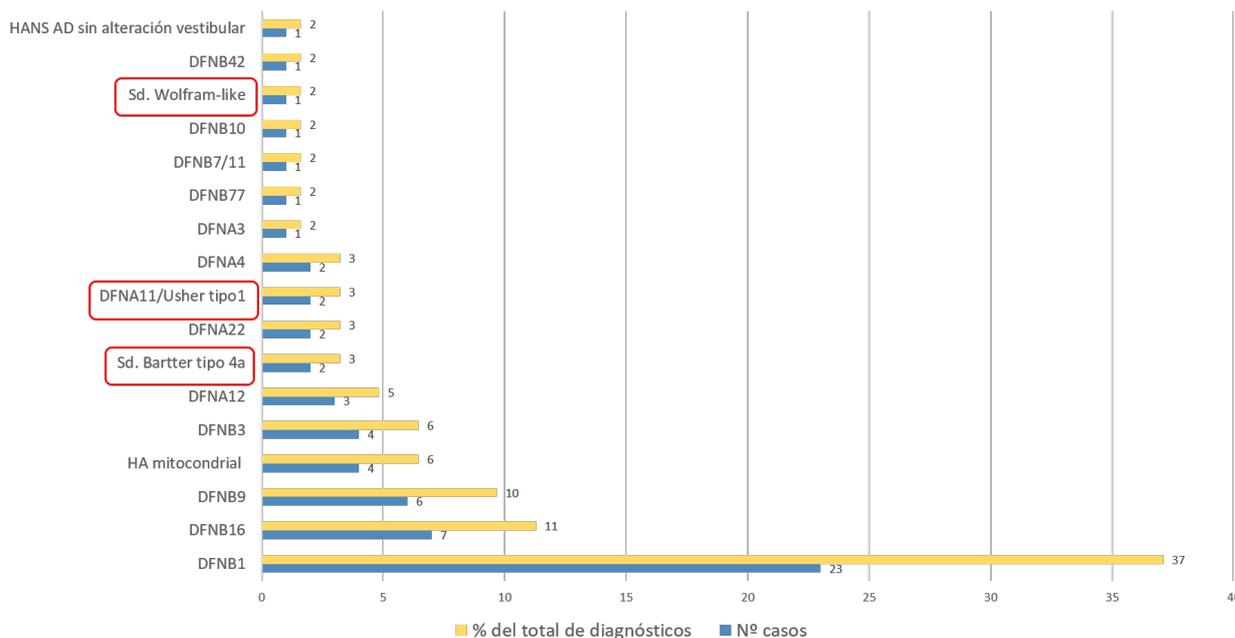


Figura 54: Fenotipos de hipoacusia en los individuos con resultado positivo. Las barras azules representan el número de casos de cada categoría y las barras amarillas el porcentaje correspondiente. Los casos potencialmente sindrómicos se resaltan enmarcados con un recuadro rojo.

Si calculamos la tasa diagnóstica en función de las características de la hipoacusia del paciente (edad de inicio, grado de HA y antecedentes familiares de HA), los grupos con mayor rendimiento diagnóstico fueron el de HA congénita (tasa diagnóstica = 68%) y el de HA profunda (68%) (Figura 55). La presencia de antecedentes familiares de HA aumentó ligeramente el rendimiento diagnóstico respecto a la HA esporádica (62% vs 59%) (Figura 55).

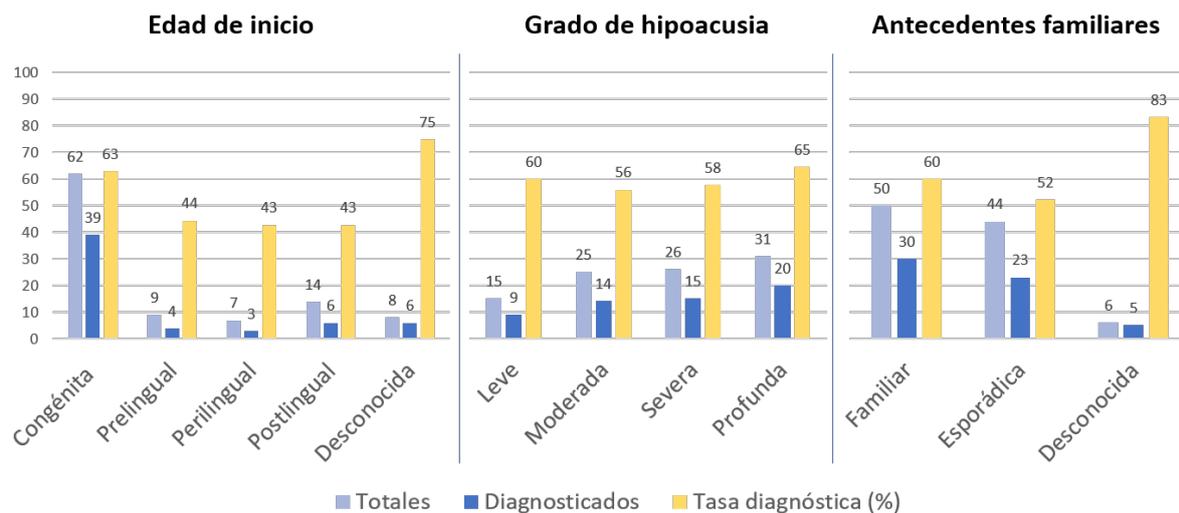


Figura 55. Tasa diagnóstica (%) obtenida en función de las características de la HA (edad de inicio, grado y antecedentes familiares de hipoacusia). Las columnas en color azul claro representan los casos totales de cada categoría; las columnas en color azul oscuro representan los casos diagnosticados dentro de esa categoría; las columnas en color amarillo representan el porcentaje de tasa diagnóstica de la categoría.

Los genes implicados en la etiología de la HA varían en función de la edad de inicio de ésta (Figura 56).

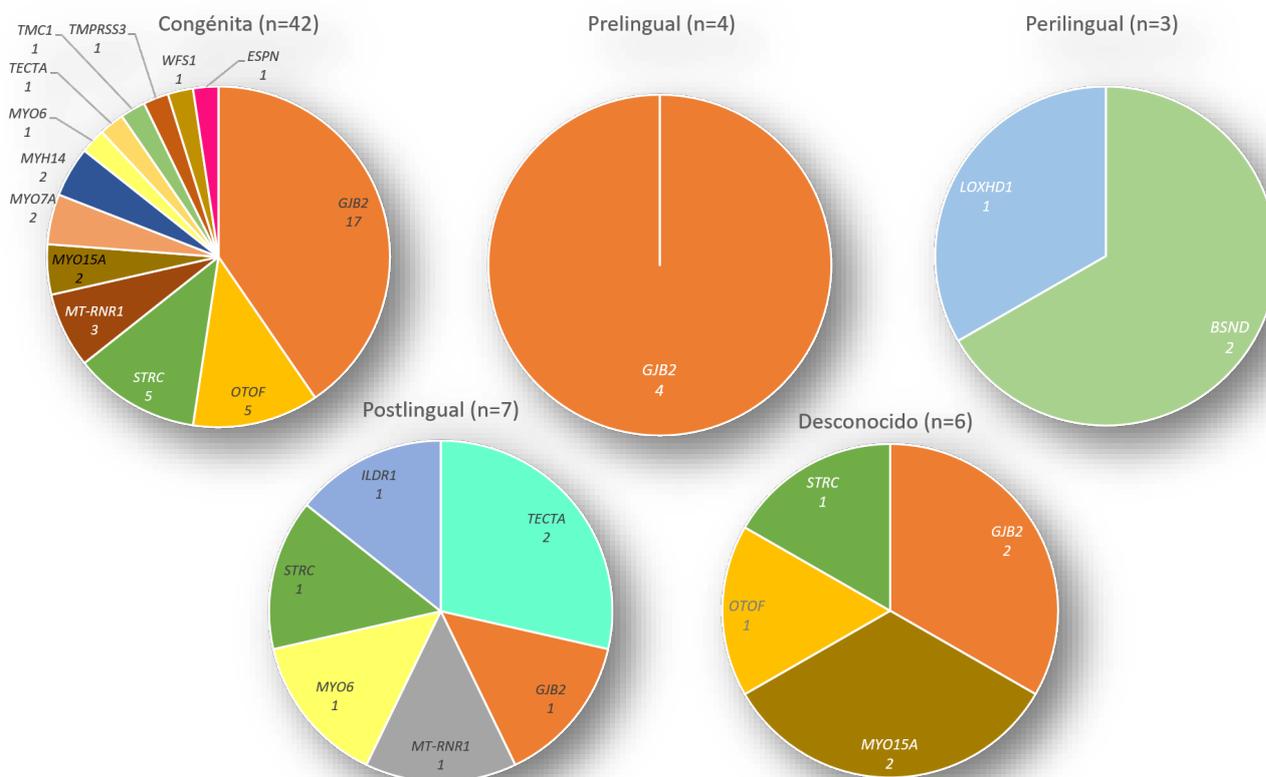


Figura 56. Genes implicados en función del momento de inicio de la hipoacusia.

La HA de inicio congénito presenta la mayor heterogeneidad genética, con 13 genes implicados, de los cuales el más frecuente fue el gen *GJB2* (40% de los casos, 17/42), seguido de *STRC* y *OTOF* (12% cada uno). El resto de genes representaban una menor proporción. Además, el 74% de las causas genéticas de HA congénita fueron de herencia AR (31/42), mientras que el 19% fueron de herencia AD (8/42) y el 7% de herencia mitocondrial (3/42) (Figura 56). En HA de inicio prelingual, el gen *GJB2* fue el único identificado como causal (Figura 56).

Sin embargo, conforme la edad de inicio va aumentando, la prevalencia del *GJB2* decrece: en los tres pacientes con HA de inicio perilingual, los genes implicados fueron *BSND* (2/3) y *LOXHD1* (1/3), suponiendo el 67% y el 33%, respectivamente, mientras que en el caso de los pacientes con HA postlingual las causas identificadas fueron variantes patogénicas en los genes *TECTA* (2/7, 29%), *GJB2*, *MT-RNR1*, *MYO6* y *STRC* (1/7 ó 14% cada uno) (Figura 56). En cuanto al modo de herencia, entre las HA de inicio postlingual se observa que la proporción de HA causada por variantes de herencia AD

Resultados

aumenta hasta el 43% (3/7) (Figura 57), estando implicado el gen *TECTA* en dos de los casos y el gen *MYO6* en otro caso (Figura 56). De hecho, el gen *TECTA* sólo se identificó en pacientes con HA de inicio postlingual, y los genes *BSND* y *LOXHD1* sólo en pacientes con HA perilingual (Figura 56).

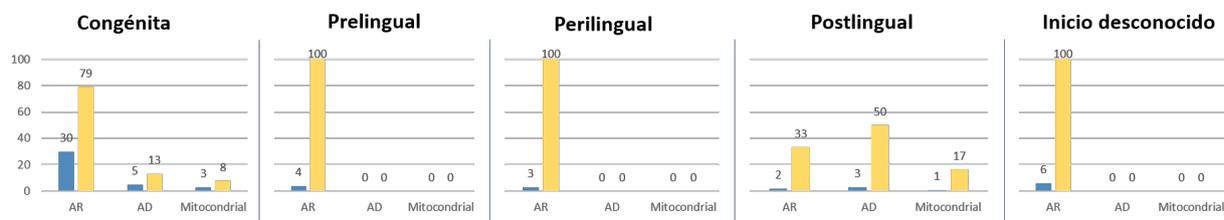


Figura 57. Herencias de las patologías diagnosticadas en los casos positivos, en función del momento de inicio de la HA.

Si analizamos los genes causales en función del grado de HA, también se observan ciertas diferencias en los genes implicados (Figura 58). El gen *GJB2* aparece en todos los rangos de gravedad de hipoacusia, aunque se puede observar que, a menor grado de HA, menor es la relevancia del gen *GJB2* como causa de la misma. Este gen es la causa principal de las HA moderada, severa y profunda, aunque su mayor representación (55%) está en la profunda. Los demás genes se restringen en mayor medida ciertos grados de HA: el gen *OTOF* sólo se identificó en pacientes con HA severa o profunda; el gen *MT-RNR1* mitocondrial sólo en la HA moderada y severa; y los genes *TECTA* y *STRC* sólo aparecen en HA leve y moderada (Figura 58). La causa mayoritaria de HA leve es el gen *STRC* (4/10, 40%).

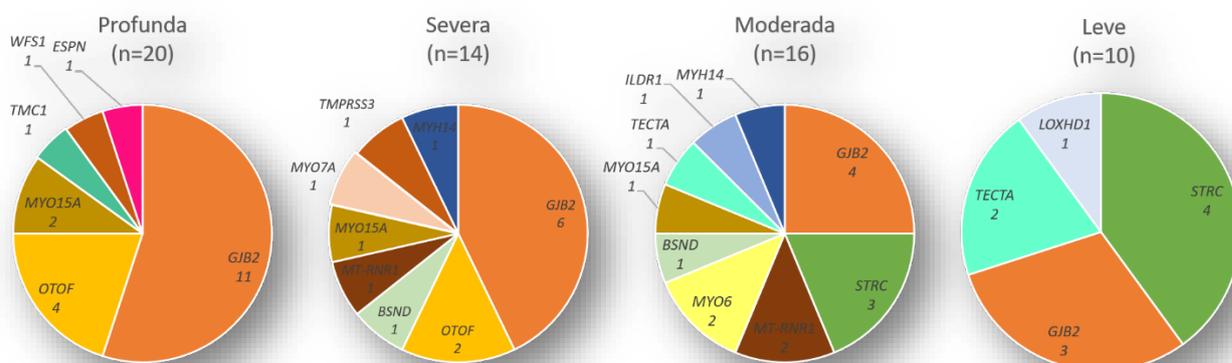


Figura 58. Genes implicados en función del grado de hipoacusia.

3.2. Pacientes no diagnosticados

En 38 de los 100 pacientes iniciales (38%) no se pudo llegar al diagnóstico genético de la HA.

Tras el estudio de primera línea y el Panel 1 de la segunda línea (genes de alta evidencia), se obtuvo un resultado no concluyente en 20 de estos 38 pacientes (53%). Es decir, presentaban una o más variantes de significado incierto (VSI) que, cumpliendo el modo de herencia de la patología asociada al gen, no reunían los criterios necesarios para clasificarlos como patogénicos ni como benignos (según la clasificación de la ACMG) (Tabla 14).

Entre estos los pacientes con resultado no concluyente, 8 individuos presentaban en el Panel 1 (genes de alta evidencia) alguna VSI con una mayor probabilidad de ser causantes de la HA del paciente. Estas variantes las denominamos como “variantes candidatas” y se resaltan en la Tabla 14 en color amarillo.

Tabla 14. Variantes genéticas identificadas en pacientes con resultado no concluyente, con las patologías y modos de herencia asociadas al gen. Las variantes candidatas se resaltan en color amarillo.

ID	Gen	Variante		Estado	Clasificación ACMG	Patología	Herencia
P003	USH2A	c.14174G>A	p.(Trp4725*)	Het	P	S. Usher tipo 2, RP	AR
	GJB2	c.35delG	p.(Gly12Valfs*2)	Het	P	DFNB1A	AR
	TMPRSS3	c.1276G>A	p.(Ala426Thr)	Het	PP	DFNB8/10	AR
	KCNQ1	c.898G>A	p.(Ala300Thr)	Het	VSI	S. QT largo 1, S. QT corto 2, S. Jervell y Lange-Nielsen, Fibrilación atrial familiar 3	AD/AR
	MYO7A	c.2427G>T	p.(Gln809His)	Het	VSI	DFNA11, DFNB2, S. Usher 1B	AD/AR
P007	KIT	c.2663G>A	p.Arg888Gln	Het	VSI	Piebaldismo, otros	AD/AR
P009	OTOF	c.4463A>T	p.Asp1488Val	Het	VSI	DFNB9	AR
	USH2A	c.15364T>C	p.Cys5122Arg	Het	VSI	S. Usher tipo 2, Retinosis pigmentaria	AR
P021	EDN3	c.568_569delGA	p.Asp190Glnfs*61	Het	VSI	S. Waardenburg tipo 4	AD/AR
	MYH14	c.4582G>A	p.Glu1528Lys	Het	VSI	DFNA4A	AD
	MYH9	c.4697A>T	p.Lys1566Met	Het	VSI	DFNA17, Macrotrombocitopenia con/sin nefritis o HANS	AD
P022	EYA1	c.1140+10A>G	p.(?)	Het	VSI	S. BOR	AD
P037	MYH14	c.5987G>A	p.Arg1996His	Het	VSI	DFNA4A	AD
	GSDME	c.1270_1273delTCTG	p.Ser424Metfs*12	Homo	VSI	DFNA5	AD
P039	WFS1	c.1106A>C	p.Lys369Thr	Het	VSI	DFNA6/14/38, S. Wolfram	AD/AR
	ALMS1	c.743G>C	p.Ser248Thr	Het	VSI	S. Alstrom	AR
	LOXHD1	c.6156G>C	p.Val2052=	Het	VSI	DFNB77	AR
P040	SLC4A11	c.1364C>A	p.Pro455Gln	Het	VSI	Distrofia de córnea e HA	AR

Resultados

	<i>USH2A</i>	c.12343C>T	p.Arg4115Cys	Het	VSI	S. Usher tipo 2, Retinosis pigmentaria	AR
	<i>WHRN</i>	c.33C>G	p.Ser11Arg	Het	VSI	DFNB31, S. Usher 2D	AR
c.2308G>A		p.Glu770Lys	Het	VSI			
P041	<i>COL4A5</i>	c.2558T>G	p.Leu853Arg	Hemi	VSI	S. Alport	LX
	<i>KARS</i>	c.1825A>C	p.Asn609His	Het	VSI	DFNB89, S. Charcot-Marie-Tooth	AR
	<i>TECTA</i>	c.4163G>A	p.Arg1388His	Het	VSI	DFNA8/12, DFNB21	AD/AR
c.5131C>T		p.Leu1711Phe	Het	VSI			
P049	<i>CDH23</i>	c.6108C>G	p.Ile2036Met	Het	VSI	DFNB12, S. Usher 1D	AR
	<i>COL11A2</i>	c.142C>T	p.Arg48Trp	Het	VSI	DFNA13 (601868); DFNB53 (609706); S. Sicklert tipo III (184840); Fibrocondrogénesis AD/AR (614524); Displasia otospondilomegaepifisaria AD/AR (184840; 215150)	AD/AR
	<i>PCDH15</i>	c.2209G>A	p.Ala737Thr	Het	VSI	DFNB23, S. Usher tipo 1D	AR
	<i>STRC</i>	c.5179G>C	p.Glu1727Gln	Het	VSI	DFNB16	AR
	<i>TMC1</i>	c.341A>G	p.Glu114Gly	Het	VSI	DFNA36, DFNB7	AD/AR
	<i>TMPRSS3</i>	c.1000G>A	p.Asp334Asn	Het	VSI	DFNB8/10	AR
	P056	<i>OPA1</i>	c.2506C>T	p.Arg836Trp	Het	VSI	S. Atrofia óptica <i>plus</i>
P058	<i>ESRRB</i>	c.448C>T	p.Arg150Trp	Het	VSI	DFNB35	AR
P061	-	-	-	-	-	-	-
P075	<i>PCDH15</i>	c.1642G>A	p.Glu548Lys	Het	VSI	DFNB23, S. Usher tipo 1F	AR
	<i>TMC1</i>	c.46G>A	p.Glu16Lys	Het	VSI	DFNA36, DFNB7	AD/AR
	<i>WHRN</i>	c.209A>G	p.Asn70Ser	Het	VSI	DFNB31, S. Usher tipo 2D	AR
P076	<i>COL11A2</i>	c.1615C>T	p.Arg539Trp	Het	VSI	DFNA13 (601868); DFNB53 (609706); S. Sicklert tipo III (184840); Fibrocondrogénesis AD/AR (614524); Displasia otospondilomegaepifisaria AD/AR (184840; 215150)	AD/AR
	<i>PCDH15</i>	c.1120C>A	p.Gln374Lys	Het	VSI	DFNB23,	AR
		c.4673_4676delTTAG	p.Val1558Glufs*3	Het	VSI	S. Usher tipo 1F	
<i>UHS1C</i>	c.851T>A	p.Leu284Gln	Het	VSI	DFNB18A, S. Usher tipo 1C	AR	
P079	<i>MYH9</i>	c.3838G>A	p.Val1280Met	Het	VSI	DFNA17, Macrotrombocitopenia con/sin nefritis o HANS	AD
	<i>SLC4A11</i>	c.19C>T	p.Arg7Trp	Het	VSI	Distrofia corneal endotelial Fuchs-4, Distrofea corneal endotelial e HA perceptiva, Distrofia corneal endotelial	AR
P081	<i>SOX10</i>	c.416G>A	p.Gly139Asp	Het	VSI	S. PCWH, S. Waardenburg 2E o 4C	AD
	<i>TRIOBP</i>	c.4736G>C	p.Ser1579Thr	Het	VSI	DFNB28	AR

	<i>USH1G</i>	c.1012G>A	p.Gly338Arg	Het	VSI	S. Usher 1G	AR
P083	<i>CDH23</i>	c.40G>A		Het	VSI	DFNB12; S. Usher 1D/F(AR/DR)	AR/DR
	<i>PCDH15</i>	c.2596G>A	p.Val866Met	Het	VSI	DFNB23; S. Usher 1D/F(AR/DR)	AR/DR
P084	<i>PAX3</i>	c.721A>T	p.Thr241Ser	Het	VSI	S. Craniofacial-HA-mano, S. Waardenburg tipo 1 y tipo 3	AD/AR
	<i>MYO15A</i>	c.9665G>A	p.Arg3222His	Het	VSI	DFNB3	AR
P085	<i>MYO15A</i>	c.6530G>A	p.Arg2177Gln	Het	VSI	DFNB3	AR
	<i>WFS1</i>	c.976G>A	p.Ala326Thr	Het	VSI	DFNA6/14/38, S. Wolfram 1, S. Wolfram-like AD	AD/AR
P090	-	-	-	-	-	-	-
P094	<i>CLRN1</i>	c.401C>T	p.Pro134Leu	Het	VSI	S. Usher tipo 3A, Retinitis pigmentosa 61	AR
	<i>ESPN</i>	c.1426A>C	p.Lys476Gln	Het	VSI	DFNB36, S. Usher tipo 1M, HANS sin afectación vestibular AD	AD/AR
P105	<i>CDH23</i>	c.5050C>T	p.Arg1684Cys	Homo	VSI	DFNB12, S. Usher 1D	AR
	<i>MYO3A</i>	c.1193C>A	p.Ser398*	Het	P	DFNB30	AR

Cada variante candidata, en el contexto de la patología del paciente, se describe en el apartado de resultados en el gen correspondiente, incluida con las demás variantes P/PP.

3.3. Resultados del Panel 2 (genes de evidencia moderada), Panel 3 (genes de baja evidencia) y Panel 4 (*deafness+mouse*)

Una vez establecido el diagnóstico en el 62% (62/100) de los pacientes gracias a la combinación del estudio de primera línea y el Panel 1 del estudio de segunda línea, hemos querido aportar nuevas evidencias sobre otros genes relacionados con la HA. Para ello, en los 38 pacientes no diagnosticados con dicha estrategia hemos ampliado el análisis a los Paneles 2 (genes de evidencia moderada) y 3 (genes de evidencia limitada o discordante). Muchos de estos genes se encuentran incluidos en los paneles rutinarios de HA de diferentes laboratorios de diagnóstico genético a nivel mundial. Para algunos existen evidencias a favor de su asociación con HA no sindrómica pero con un número escaso de pacientes reportados. En otros casos, las evidencias halladas hasta la fecha son discordantes. Y otros muchos son genes asociados a HA pero de manera sindrómica, de forma que además de HA, el paciente con alteraciones en esos genes debería presentar otras patologías no relacionadas con el oído.

Resultados

Los 38 pacientes con resultado negativo o no concluyente tras el estudio de primera línea y el Panel 1 de la segunda línea (genes de alta evidencia) fueron analizados a continuación con los Paneles 2 y 3. Las variantes identificadas con estos paneles se muestran en la Tabla 15.

El Panel 2 incluye 10 genes de evidencia moderada respecto a su asociación con HA no sindrómica (*ATP2B2*, *DIABLO*, *DIAPH3*, *GJB6*, *HARS2*, *HGF*, *KITLG*, *MIR96*, *SIX5* Y *TNC*) y nos ha permitido encontrar variantes de interés que podrían aportar nuevas evidencias respecto a la patogenicidad de los genes *ATP2B2*, *SIX5* y *HGF*:

- El paciente P061 presenta la variante c.1067-2A>G en heterocigosis en el gen *ATP2B2*, que afecta un sitio canónico aceptor del *splicing*, por lo que probablemente dé lugar a una proteína truncada. Esta variante no se encuentra descrita previamente en las bases de datos de HA ni tampoco se ha encontrado en población general.
- El paciente P009 presenta en heterocigosis la variante c.2098G>A (p.Asp700Asn) en el gen *SIX5*. Esta variante ha sido descrita por la base de datos DVD como VSI y está presente en baja frecuencia en población general (GnomAD: 0.014%), aunque los predictores bioinformáticos sugieren un efecto patogénico.
- En el paciente P055 se ha identificado la variante c.2168A>G (p.Tys723Cys) en heterocigosis en el gen *HGF*. Se trata de una variante nueva de cambio de sentido que afecta a un residuo conservado. Además, dicha variante está ausente en las bases de datos de HA y en población general, y los predictores bioinformáticos describen su efecto como deletéreo.

El análisis con el Panel 3 (genes de evidencia limitada o discordante) de los 38 pacientes no diagnosticados dio como resultado el hallazgo de 101 variantes en total (excluyendo las benignas o probablemente benignas), lo que supone una media de aproximadamente 3 variantes por paciente. De estas 101 variantes, 5 son patogénicas heterocigotas en genes asociados a HA AR y se discuten a continuación:

- El paciente P007 presenta en el gen *TJP2* la variante patogénica en heterocigosis c.1894C>T (p.Arg632*).
- El paciente P037 presenta la variante patogénica c.342+1G>C en heterocigosis en el gen *TJP2*.
- El paciente P022 presenta en heterocigosis la variante patogénica c.362dupC (p.Glu122Argfs*7) en el gen *FKBP14*.

- El paciente P055 presenta la variante patogénica c.2073T>G (p.Tyr691*) en heterocigosis en el gen *ATP8B1*, que no ha sido descrita previamente y no se encuentra en población general. Además, este paciente presenta la variante c.1637G>A (p.Arg546Gln) en el gen *COL9A2*.

Las 96 variantes restantes obtenidas tras el análisis con el Panel 3 son VSI en heterocigosis. Con el fin de seleccionar las de mayor probabilidad de ser patogénicas, hemos utilizado como criterio el predictor CADD (*Combined Annotation Dependent Depletion*) (141), que proporciona un *Phred-like score* que nos permite priorizar cuantitativamente las variantes en base a sus características. Siguiendo las recomendaciones de *Ensembl Variation Pathogenicity Prediction* para la priorización de variantes (142), hemos utilizado como punto de corte un CADD *score* ≥ 30 . Aunque este límite es arbitrario, en base a él esperamos seleccionar las variantes que se encuentran entre el 0,1% de las variantes más patogénicas de todas las posibles en el genoma humano (141). Diez de las variantes presentan un CADD *score* ≥ 30 :

- El paciente P044 presenta en heterocigosis la variante *ERCC3*:c.1552G>A (p.Gly518Arg).
- El paciente P047 presenta en heterocigosis la variante *THRA*:c.54-1G>A.
- El paciente P049 presenta en heterocigosis la variante *NAV2*:c.3185G>A (p.Arg1062Gln).
- El paciente P055 presenta en heterocigosis la variante *NOTCH1*:c.5837G>A (p.Arg1946His).
- El paciente P056 presenta en heterocigosis la variante *LAMA2*:c.725G>A (p.Arg242His).
- El paciente P060 presenta en heterocigosis la variante *FGFR1*:c.2434C>T (p.Arg812Cys).
- El paciente P066 presenta en heterocigosis la variante *CACNA1D*:c.2789G>A (p.Arg930His).
- El paciente P075 presenta en heterocigosis la variante *TRMU*:c.650A>G (p.Glu217Gly).
- El paciente P076 presenta en heterocigosis la variante *ATP8B1*:c.3683G>A (p.Arg1228Pro).
- El paciente P084 presenta en heterocigosis la variante *APAF1*:c.1327G>A (p.Asp443Asn).

Por último, los 38 pacientes negativos fueron analizados mediante el Panel 4, que incluye genes que hayan mostrado HA como efecto colateral en ratones modificados genéticamente. Esto dio como resultado el hallazgo de únicamente dos variantes inciertas en heterocigosis:

- *TULP3*:c.779G>A (p.Arg260His) en el paciente P040.
- *PEX6*:c.1802G>A (p.Arg601Gln) en el paciente P075.

A continuación se muestran todas las variantes identificadas mediante los paneles 2, 3 y 4 en los 38 pacientes (Tabla 15).

Tabla 15. Variantes identificadas en los 38 pacientes negativos o no concluyentes, tras el análisis mediante los Paneles 2, 3 y 4. Sólo se muestran las variantes de MAF<1% no clasificadas como benignas o probablemente benignas según los criterios de la ACMG. Het: heterocigosis; Homo: homocigosis; Hemi: hemicigosis; AD: autosómico dominante; AR: autosómico recesivo; LX: ligada al cromosoma X; DR: digénico recesivo; D: Desconocido; B: Benigno; PB: probablemente benigno; VSI: variante de significado incierto; PP: probablemente patogénico; P: Patogénico; NA: no aplicable.

ID	Panel	Gen	Transcrito	Variante	Estado	Modo de Herencia	dbSNP	ClinVar	DVD	HGMD	GnomAD MAF máx. (%)	GnomAD Homo/hemi (n)	SIFT	Polyphen	CADD	GERP	Patología asociada al gen (OMIM#)	Conclusión referente a HA no sindrómica
P003	3	NAI2	NM_001244963	c.6093+3T>C	Het	D	rs937719531	Ausente	Ausente	Ausente	0.003	0	NA	NA	15.9	Conservado	-	VSI het en gen de baja evidencia
P004	3	ECAP31	NM_001139457	c.584C>T p.Thr195Met	Hemi	LX	rs111450526	Conflictiva (1B/1PB/VSI)	Ausente	Ausente	0.14	92	Deletéreo	Probablemente deletéreo	25.7	Conservado	HA distonía e hipomielinización cerebral (300475)	VSI hemi en de baja evidencia
		FOX1	NM_012188	c.944A>G p.Asn315Ser	Het	AR	rs749136856	Ausente	VSI	Ausente	0.002	0	Tolerado	Probablemente deletéreo	4.5	Conservado	Acueducto Vestibular Alargado (600791)	VSI, portador en gen de baja evidencia
		HARS	NM_002109	c.679T>G p.Ser227Ala	Het	AD/AR	rs768076848	Conflictiva (1PB/1VSI)	Ausente	P	0.12	0	Deletéreo	Benigno	22.2	Conservado	Charcot-Marie-Tooth tipo 2W(AD); S Usher tipo 3B (AR)	VSI, portador en gen de baja evidencia
P007	3	COL2A1	NM_001844	c.2714T>C p.Val905Ala	Het	AD	rs1271505111	Ausente	Ausente	Ausente	0.0009	0	Tolerado	Posiblemente deletéreo	27.7	Conservado	S Stickler tipo 1 (AD); displasias esqueléticas	VSI en gen de baja evidencia
		FGFR2	NM_022970.3	c.2296A>G p.Thr766Ala	Het	AD	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	Tolerado	Benigno	20.3	Conservado	S Apert (AD); S Crouzon (AD); otras displasias	VSI en gen de baja evidencia
		KCNMA1	NM_001322830	c.2214C>A p.Asp738Glu	Het	AD/AR	rs587780363	VSI	Ausente	Ausente	0.007	0	Tolerado		18.4	Conservado	Atrofia cerebelosa, retraso del desarrollo y convulsiones (617643)(AR); S Liang-Wang (618729)(AD); otros	VSI en gen de baja evidencia
		MOC1	NM_001080779	c.808-4C>T	Het	D	rs748712532	PB	Ausente	Ausente	0.05	0	NA	NA	5.3	No conservado	-	VSI het en gen con evidencia disputada de asociación a HAAD
		SLC9A2	NM_006996	c.967G>A p.Val323Met	Het	AR	rs780140526	Ausente	Ausente	Ausente	0.0009	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	26.6	Conservado	Anemia megaloblástica respondedora a tiamina con diabetes e HA(249270)	VSI, portador en gen de baja evidencia
		TJP2	NM_004817	c.1894C>T p.Arg632*	Het	AD/AR	rs928915940	P (colestasis familiar intrahepática)	P (colestasis familiar intrahepática)	P (colestasis familiar intrahepática)	Ausente	-	NA	NA	41	Conservado	Colestasis progresiva intrahepática familiar tipo 4 (AR) (615878)	P en gen de baja evidencia

ID	Panel	Gen	Transcrito	Variante	Estado	Modo de Herencia	dbSNP	ClinVar	DVD	HGMD	GnomAD MAF máx. (%)	GnomAD Homo/hemi (n)	SIFT	Polyphen	CADD	GERP	Patología asociada al gen (OMIM#)	Conclusión referente a HA no síndromica
P008	3	<i>SOBP</i>	NM_018013	c.1268A>G p.Asn423Ser	Het	AR	rs534621562	Ausente	Ausente	Ausente	0.002	0	Tolerado	Probablemente deletéreo	23.8	Conservado	Retraso mental, protrusión maxilar y estrabismo (AR) (61367)	VSI, portador en gen de baja evidencia
P009	2	<i>SIX5</i>	NM_175875	c.2098G>A p.Asp700Asn	Het	AD	rs374469828	Ausente	VSI	Ausente	0.014	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	24.1	Conservado	S. Branchi-oto-renal (BOR) (AD) (610896)	VSI en gen de evidencia disputada
	3	<i>MMK5</i>	NM_018848	c.1278C>A p.His426Gln	Het	AR	rs145781686	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	Tolerado	Benigno	7.5	Nb conservado	S. Bardet-Biedl (AR) (605231); S. McKusick-Kaufman (AR) (236700)	VSI, portador en gen de baja evidencia
		<i>POLD1</i>	NM_001308632	c.2095G>A p.Glu699Lys	Het	AD	rs61751955	Conflicta (1PB/1VSI)	Ausente	Ausente	Ausente	0.03	0	Deletéreo	Posiblemente deletéreo	25.9	Conservado	Susceptibilidad al Cáncer Colorrectal AD (612591); S. de hipoplasia mandibular; HA y lipodistrofia AD (615381)
P021	2, 3, 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P022	3	<i>CAQNAID</i>	NM_000720	c.5356G>C p.Ala1786Pro	Het	AD/AR	rs199874790	VSI	PB	Ausente	0.04	0	Tolerado	Benigno	21	Conservado	Disfunción nodo sinatrial e HAAR (614896); Adioserionismo primario, convulsiones y alteraciones neurológicas AD (615474)	VSI, portador en gen de baja evidencia
		<i>FKBP4</i>	NM_017946.3	c.362dupC p.Glu22Argfs*7	Het	AR	rs542489955	P/LP	Ausente	P	0.11	0	NA	NA	NA	Conservado	S. Ehlers-Danlos citoscoliótico con HA, AR (614557)	P, portador en gen de baja evidencia
P024	2, 3, 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P026	3	<i>COL11A1</i>	NM_080629	c.4597G>A p.Ala1533Thr	Het	AD/AR	rs769920499	Ausente	PB	Ausente	0.012	0	Tolerado	Benigno	21	Conservado	DRN377; AD 618533; Fibrocondrogénesis 1 AR (228520), S. Marshall, AD (154780), S. Stickler tipo 2 (60484)	VSI en gen de evidencia baja/moderada
		<i>SLC246</i>	NM_005135	c.94C>T p.Arg32Trp	Het	AR	rs150751809	VSI	Ausente	Ausente	Ausente	0.51	1	Deletéreo	Posiblemente deletéreo	16.6	Débilmente conservado	Agnesia de cuerpo calloso con neuropatía periférica AR (218000)
P031	3	<i>APAF1</i>	NM_181861	c.3724T>C p.Tyr1242His	Het	D	rs763208735	Ausente	Ausente	Ausente	0.0004	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	29.3	Conservado	-	VSI het en gen de baja evidencia
		<i>FGFR3</i>	NM_001163213	c.2300C>T p.Ala767Val	Het	AD/AR	rs140211846	VSI	Ausente	Ausente	Ausente	0.06	0	Tolerado	Benigno	16.5	Débilmente conservado	Acondroplasia (100800); S. CATSHL AD/AR (610747); otros síndromes

ID	Panel	Gen	Transcrito	Variante	Estado	Modo de Herencia	dbSNP	ClinVar	DVD	HGMD	GnomAD MAF máx. (%)	GnomAD Homo/hemi (n)	SIFT	Polyphen	CADD	GERP	Patología asociada al gen (OMIM#)	Conclusión referente a HA no síndromica	
		<i>LAMA2</i>	NM_000426	c.466C>T p.Arg156Cys	Het	AR	rs890766655	Ausente	Ausente	Ausente	0.02	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	31	Conservado	Distrofia muscular congénita deficiente en merosina AR (607588); Distrofia muscular de extremidades y caderas AR23 (618138)	VSI, portador en gen de baja evidencia	
		<i>NOTCH1</i>	NM_017617	c.4238G>A p.Arg1413His	Het	AD	rs371068504	VSI	Ausente	Ausente	0.015	0	Tolerado	Benigno	19.3	Débilmente conservado	S. Adams-Oliver 5 AD (616028); Enfermedad de válvula aórtica 1 AD (109730)	VSI en gen de baja evidencia	
P034	3	<i>CDKNB</i>	NM_004064	c.38T>A p.Leu13Gln	Het	AD	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	Deletéreo	Posiblemente deletéreo	27.8	Conservado	Neoplasia Endocrina Múltiple tipo IV, AD (610755)	VSI en gen de baja evidencia	
P037	3	<i>COL9A3</i>	NM_001853	c.419C>G p.Pro140Arg	Het	AD/AR	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	Tolerado	Benigno	22.4	Conservado	Displasia epifisaria múltiple AD (600969); S. Stickler AR	VSI en gen de evidencia baja/moderada	
		<i>EPHE2</i>	NM_004442	c.584G>A p.Arg195His	Het	AR	rs370909083	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	Deletéreo	Probablemente deletéreo	28.1	Conservado	Alteración plaquetaria de la coagulación tipo 22 AR (618462)	VSI en gen de baja evidencia	
		<i>SCRIB</i>	NM_182706	c.433G>A p.Gly145Arg	Het	D	rs144081360	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	0.13	0	Tolerado	Probablemente deletéreo	23.2	Conservado	-	VSI en gen de baja evidencia
		<i>TJP2</i>	NM_004817	c.342+1G>C	Het	AR	rs368013582	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	0.006	0	NA	NA	35	Conservado	Colestasis progresiva intrahepática familiar tipo 4 (AR) (615878)	P en gen de baja evidencia
P039	2, 3, 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
P040	3	<i>SLC19A2</i>		c.1399G>A p.Ala467Thr	Het	AR	rs147884156	Ausente	Ausente	Ausente	0.019	0	Deletéreo	Posiblemente deletéreo	23.8	Conservado	Anemia megaloblástica respondedora a tiamina con diabetes e HA (249270)	VSI, portador en gen de baja evidencia	
	4	<i>TULP3</i>	NM_003324	c.779G>A p.Arg260His	Het	D	rs193281338	Ausente	Ausente	Ausente	0.06	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	25.9	Conservado	-	VSI en gen mouse/deafness	
P041	3	<i>COL9A1</i>	NM_001851	c.460G>C p.Val154Leu	Het	AD	rs138583508	PB	PB	Ausente	0.07	0	Deletéreo	Benigno	21.5	Débilmente conservado	S. Stickler	VSI, portador en gen de evidencia limitada	
		<i>FGFR3</i>	NM_001163213	c.685G>A p.Val229Ile	Het	AD/AR	rs368831528	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	-	Tolerado	Posiblemente deletéreo	15.5	Conservado	Acondroplasia (100800); S. CATSHL AD/AR (610747); otros síndromes	VSI het en gen de baja evidencia
		<i>NAV2</i>	NM_001244963	c.7431T>A p.Asp2477Glu	Homo	D	rs144927008	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	0.25	0	Deletéreo	Benigno	13.3	No conservado	-	VSI homo en gen de baja evidencia
P044	3	<i>ERCC3</i>	NM_001303418	c.1552G>A p.Gly518Arg	Het	AR	rs1172169844	Ausente	Ausente	Ausente	0.002	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	32	Conservado	Xeroderma pigmentoso AR (610651)	VSI en gen de baja evidencia	

ID	Panel	Gen	Transcrito	Variante	Estado	Modo de Herencia	dbSNP	ClinVar	DVD	HGMD	GnomAD MAF máx. (%)	GnomAD Homo/hemi (n)	SIFT	Polyphen	CADD	GERP	Patología asociada al gen (OMIM#)	Conclusión referente a HA no sindrómica	
		<i>TJP2</i>	NM_004817	c.1453+8A>G p.?	Het	AR	-	Ausente	Ausente	Ausente	0.003	0	NA	NA	0.2	Nb conservado	Colestasis progresiva intrahepática familiar tipo 4 (AR) (615878)	VSI en gen de baja evidencia	
P047	3	<i>COL4A3</i>	NM_000091	c.3829G>A p.Gly1277Ser	Het	AD/AR	rs190598500	Conflictiva (1PP/2VSI)	P	P	0.09	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	24.8	Conservado	S. Alport AR (203780), AD (104200); Hematuria benigna familiar AD (141200)	VSI en gen de baja evidencia	
		<i>NOTCH1</i>	NM_017617	c.2922C>T p.Gly974=	Het	AD	rs1380594425	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	0	NA	NA	13.71	Conservado	S. Adams-Oliver 5, AD (616028); enfermedad de válvula aórtica 1, AD (109730)	VSI en gen de baja evidencia	
		<i>TCOF1</i>	NM_001135243	c.187C>T p.Arg63Trp	Het	AD	rs367964727	VSI	VSI	Ausente	Ausente	0.08	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	26.5	Conservado	S. Treacher-Collins AD (154500)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>THRA</i>	NM_003250	c.54-1G>A p.?	Het	AD	rs199530759	Conflictiva (1P/1B)	Ausente	Ausente	Ausente	0.02	0	NA	NA	34	Conservado	Hipotiroidismo congénito 6 AD (614450)	VSI en gen de baja evidencia
P049	3	<i>ALDH1A2</i>	NM_001206897	c.388G>T p.Ala130Ser	Het	AR	rs115875978	Ausente	Ausente	Ausente	0.7	2	Deletéreo	Probablemente deletéreo	26.3	Conservado	-	VSI en gen de baja evidencia	
		<i>NARS2</i>	NM_024678	c.1031G>T p.Gly344Val	Het	AR	rs915521643	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	-	Deletéreo	Probablemente deletéreo	26.7	Conservado	DRB94 (618/34); Deficiencia de fosforilación oxidativa combinada 24 (616239)	VSI het en gen de evidencia limitada
		<i>NAV2</i>	NM_001244963	c.3185G>A p.Arg1062Gln	Het	D	rs140706274	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	0.012	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	31	Conservado	-	VSI het en gen de baja evidencia
				c.4139G>A p.Ser1380Asn	Het	D	rs148735649	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	0.74	1	Tolerado	Benigno	17.7	Conservado	-	VSI het en gen de baja evidencia
		<i>TNFRSF1B</i>	NM_002546	c.59C>T p.Thr20Ile	Het	AR	rs140846266	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	0.03	0	Tolerado	Benigno	16.3	Débilmente conservado	Enfermedad de Paget juvenil 5 AR (239000)	VSI het en gen de baja evidencia
<i>TRMU</i>	NM_018006	c.9_10delCTinsG p.Leu4Val	Het	AR	rs75417986	B	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	-	Tolerado	Benigno	-	Débilmente conservado	Fallo hepático infantil transitorio AR (61070); Modificador de HA mitocondrial (613070)	VSI portador en gen de baja evidencia	
P055	2	<i>HCF</i>	NM_000601	c.2168A>G p.Tyr723Cys	Het	AR	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	Deletéreo	Probablemente deletéreo	27.5	Conservado	DRB89 (608265)	VSI portador en gen de evidencia moderada	
	3	<i>ATP8B1</i>	NM_005603	c.2073T>G p.Tyr691*	Het	AR	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	NA	NA	35	Conservado	Colestasis intrahepática familiar tipo 1 (AF) (211600)	P portador, gen de baja evidencia	
		<i>COL9A2</i>	NM_001852	c.1637G>A p.Arg546Gln	Het	AR	rs754945201	Ausente	VSI	Ausente	Ausente	0.005	0	Tolerado	Probablemente deletéreo	31	Conservado	S. Stickler tipo V, AR (614284);	P het en gen de evidencia limitada

ID	Panel	Gen	Transcrito	Variante	Estado	Modo de Herencia	dbSNP	ClinVar	DVD	HGMD	GnomAD MAF máx. (%)	GnomAD Homo/hemi (n)	SIFT	Polyphen	CADD	GERP	Patología asociada al gen (OMIM#)	Conclusión referente a HA no síndromica
																	Displasia epifisaria múltiple 2, AD (600204)	
		<i>HGF</i>	NM_000601	c.2168A>G p.Tyr723Cys	Het	AR	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	Deletéreo	Probablemente deletéreo	27.5	Conservado	DRN89 (608265)	VSI portador en gen de evidencia moderada
		<i>LAMA2</i>	NM_000426	c.5530C>T p.Arg1844Cys	Het	AR	rs56173620	Conflictiva (2LB/2VSI)	Ausente	Ausente	0.176	0	Tolerado	Probablemente deletéreo	26.1	Conservado	Distrofia muscular congénita deficiente en merosina AR (607588); Distrofia muscular de extremidades y caderas AR23 (618138)	VSI, portador en gen de baja evidencia
		<i>NOTCH1</i>	NM_017617	c.5837G>A p.Arg1946His	Het	AD	rs777423973	Ausente	Ausente	Ausente	0.033	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	31	Conservado	S. de Adams-Oliver 5, AD (616028); enfermedad de válvula aórtica 1, AD (109730)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>FOLD1</i>	NM_001308632	c.17G>A p.Arg6Gln	Het	AD	rs778275831	Conflictiva (1PB/5VSI)	Ausente	Ausente	0.005	0	Tolerado	Benigno	21.4	Conservado	Susceptibilidad al Cáncer Colorrectal AD (612591); S. de hipoplasia mandibular, HA y lipodistrofia AD (615381)	VSI en gen de baja evidencia
P056	3	<i>LAMA2</i>	NM_000426	c.725G>A p.Arg242His	Het	AR	rs373570586	VSI	Ausente	Ausente	0.064	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	31	Conservado	Distrofia muscular congénita deficiente en merosina AR (607588); Distrofia muscular de extremidades y caderas AR23 (618138)	VSI, portador en gen de baja evidencia
P058	3	<i>SCARB2</i>	NM_005506	c.1262C>T p.Thr421Met	Het	AR	rs149474488	VSI	Ausente	Ausente	0.067		Deletéreo	Probablemente deletéreo	23.5	Débilmente conservado	Epilepsia mioclónica progresiva con/sin insuficiencia renal AR (254900)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>TGDF1</i>	NM_001135243	c.939A>G p.Lys313=	Het	AR	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	NA	NA	6.9	Débilmente conservado	S. Treacher-Collins AD (154500)	VSI en gen de baja evidencia
P060	3	<i>AQP4</i>	NM_004028	c.605T>C p.Met202Thr	Het	D	rs72557975	Ausente	Ausente	Ausente	0.002	1	Tolerado	Benigno	18.4	Conservado	-	VSI en gen de baja evidencia
		<i>FGFR1</i>	NM_001174064	c.2434C>T p.Arg812Cys	Het	AD	rs17182463	B/PB	P			0.09	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	32	Conservado	S. Hartsfield AD (615465); Hipogonadismo hipogonadotrópico con o sin anosmia AD (147950); S. Jackson-Wäiss AD (123150), otros síndromes AD

ID	Panel	Gen	Transcrito	Variante	Estado	Modo de Herencia	dbSNP	ClinVar	DVD	HGMD	GnomAD MAF máx. (%)	GnomAD Homo/hemi (n)	SIFT	Polyphen	CADD	GERP	Patología asociada al gen (OMIM#)	Conclusión referente a HA no síndromica
		<i>LRP2</i>	NM_004525	c.5551C>G p.His1851Asp	Het	AR	rs1177647614	Ausente	Ausente	Ausente	0.003	0	Tolerado	Benigno	6.7	Débilmente conservado	S de Donnai-Barrow AR (222448)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>MOC1</i>	NM_001080779	c.518G>A p.Arg173Gln	Het	D	rs148694544	PB	Ausente	Ausente	0.17	0	Tolerado	Probablemente deletéreo	23.4	Moderadamente conservado	-	VSI en gen con evidencia disputada de asociación a HAAD
		<i>FOLD1</i>	NM_001308632	c.2881G>A p.Ala961Thr	Het	AD	rs555452657	VSI	Ausente	Ausente	0.019	0	Tolerado	Posiblemente deletéreo	27.2	Moderadamente conservado	Susceptibilidad al Cáncer Colorrectal AD (612591); S de hipoplasia mandibular; HA y lipodistrofia AD (615381)	VSI en gen de baja evidencia
P061	2	<i>ATP2B2</i>	NM_001330611	c.1067-2A>G p.?	Het	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	NA	NA	34	NA	Modificador de DFNB2 AR (601386)	VSI en gen de baja evidencia
	3	<i>ALDH2</i>	NM_001206897	c.1172G>A p.Arg391Gln	Het	D	rs200804968	Lb	Ausente	Ausente	0.3	0	Tolerado	Probablemente deletéreo	28.9	Conservado	-	VSI en gen de baja evidencia
		<i>COL2A1</i>	NM_001844	c.2819G>A p.Arg940Gln	Het	AD	rs533540496	Conflictiva (1B/1VSI)	VSI	P	0.17	0	Tolerado	Probablemente deletéreo	29.2	Conservado	S Stickler tipo I (AD); displasias esqueléticas	VSI en gen de baja evidencia
		<i>ERCC2</i>	NM_000400	c.1679A>C p.Asn560Thr	Het	AR	rs1481081794	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	Tolerado	Benigno	22.3	Conservado	Tricotrodistrofia 1, AR (601675); Xeroderma pigmentoso D, AR (278730)	VSI en gen de baja evidencia
P063	3	<i>CD151</i>	NM_004357	c.456+9G>A	Het	AR	rs375059668	Ausente	Ausente	Ausente	0.05	0	NA	NA	13.3	Nb conservado	Nefropatía con epidermolísis bullosa pretibial e HA (609057)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>ERCC3</i>	NM_000122	c.144G>C	Het	AR	rs149309991	VSI	Ausente	Ausente	0.08	0	Tolerado	Benigno	17.5	Débilmente conservado	Tricotrodistrofia 2 fotosensible, AR (616390); Xeroderma pigmentoso AR (610651)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>MOL1</i>	NM_001256041	c.2055_2055+1delTGinsCT p.Leu686Serfs*167	Het	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	NA	NA	NA	Conservado	D	VSI en gen de baja evidencia
		<i>PTX2</i>	NM_001204397	c.464delCinsG TT p.?	Het	AD	rs199896960	B	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	NA	NA	NA	Nb conservado	Disgenesia de segmento anterior 4, AD (137600); S Axenfeld-Rieger tipo I, AD (180500)
P066	3	<i>CAQNA1D</i>	NM_000720	c.2789G>A p.Arg930His	Het	AD/AR	rs115066564	VSI	VSI	Ausente	0.13	1	Deletéreo	Posiblemente deletéreo	31	Conservado	Alosteronismo primario, convulsiones y anomalías neurológicas, AD (615474); Disfunción de nodo senoatrial e HA, AR (614896)	VSI en gen de baja evidencia

ID	Panel	Gen	Transcrito	Variante	Estado	Modo de Herencia	dbSNP	ClinVar	DVD	HGMD	GnomAD MAF máx. (%)	GnomAD Homo/hemi (n)	SIFT	Polyphen	CADD	GERP	Patología asociada al gen (OMIM#)	Conclusión referente a HA no sindrómica
		<i>CASP3</i>	NM_004346	c.65A>G p.His22Arg	Het	D	rs35578277	Ausente	Ausente	VSI	0.19	4	Tolerado	Probablemente deletéreo	15.8	Conservado	-	VSI en gen de baja evidencia
		<i>ERCC3</i>	NM_000122	c.144G>C p.Glu48Asp	Het	AR	rs149309991	VSI	Ausente	Ausente	0.081	0	Tolerado	Benigno	17.5	Débilmente conservado	Tricotodistrofia 2 fotosensible, AR (616390); Xeroderma pigmentoso AR (610651)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>SLC1A3</i>	NM_004172	c.1154G>A p.Arg385His	Het	AD	rs115702388	B	Ausente	Ausente	0.014	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	29.7	Conservado	Ataxia episódica tipo 6, AD (612656)	VSI en gen de baja evidencia
P070	2, 3, 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P071	3	<i>HTRA2</i>	NM_013247	c.215T>C p.Leu72Pro	Het	AR	rs150047108	Conflictiva (2B/1VSI)	Ausente	Ausente	0.38	5	Deletéreo	Benigno	14.3	Nb conservado	Aciduria 3-metilglutaconica tipo VIII, AR (617248)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>JAG2</i>	NM_002226	c.3424G>A p.Gly1142Arg	Het	D	rs146037139	Ausente	Ausente	Ausente	0.52	4	Deletéreo	Probablemente deletéreo	14.5	Débilmente conservado	-	VSI en gen de alta evidencia
P075	3	<i>SCRIB</i>	NM_182706	c.4823-5T>C p.?	Het	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	NA	NA	0.02	Nb conservado	-	VSI en gen de baja evidencia
		<i>TRMU</i>	NM_018006	c.650A>G p.Glu217Gly	Het	AR	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	Deletéreo	Probablemente deletéreo	33	Conservado	Fallo hepático infantil transitorio AR (61070); Modificador de HA mitocondrial (613070)	VSI portador en gen de baja evidencia
	c.874-9A>G p.?			Het	AR	rs755021903	Ausente	Ausente	Ausente	0.006	0	NA	NA	4.2	Nb conservado	-	VSI portador en gen de baja evidencia	
	4	<i>FEV6</i>	NM_000287	c.1802G>A p.Arg601Gln	Het	AD/AR	rs34324426	Conflictiva (2B/1PB/3VSI/4FP/2P)	P	P	0.4	7	Deletéreo	Probablemente deletéreo	28.5	Conservado	S. Heimler 2, AR (61617); Enf. Peroxisomales (614862, 614863)	FP en gen mouse-deafness
P076	3	<i>ATP8B1</i>	NM_005603	c.3683G>C p.Arg1228Pro	Het	AR	rs147060096	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	Deletéreo	Posiblemente deletéreo	31	Conservado	Colestasis intrahepática familiar tipo 1 (AF) (211600)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>ERCC2</i>	NM_000400	c.1887G>C p.Gln629His	Het	AR	rs200665173	VSI	Ausente	Ausente	0.017	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	26	Débilmente conservado	Tricotodistrofia 1, AR (601675); Xeroderma pigmentoso D, AR (278730)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>NARS2</i>	NM_024678	c.25C>T p.Arg9Trp	Het	AR	rs141907023	PB	B	Ausente	0.51	0	Deletéreo	Benigno	17.9	Débilmente conservado	DFNB4 (618434); Deficiencia de fosforilación oxidativa combinada 24 (616239)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>RFR3</i>	NM_001034853	c.3189_3191del p.Glu1066del	Hemi	LX	rs746535151	Ausente	Ausente	Ausente	0.11	38	NA	NA	NA	NA	NA	Distrofia de conos y bastones LX1 (304020); Degeneración macular atrófica LX (300834); Retinitis pigmentosa 3 (300029); Retinitis pigmentosa e

ID	Panel	Gen	Transcrito	Variante	Estado	Modo de Herencia	dbSNP	ClinVar	DVD	HGMD	GnomAD MAF máx. (%)	GnomAD Homo/hemi (n)	SIFT	Polyphen	CADD	GERP	Patología asociada al gen (OMIM#)	Conclusión referente a HA no síndromica	
																	infecciones senos respiratorias, con/sin HA LX (300455)		
P078	3	<i>AQP4</i>	NM_004028	c.648C>G p.Ile216Met	Het	D	rs372829102	Ausente	Ausente	Ausente	0.03	0	Tolerado	Benigno	12.6	Débilmente conservado	-	VSI en gen de baja evidencia	
		<i>GRDI</i>	NM_017551	c.1287_1288delC AinsGG p.Met430Val	Het	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	-	NA	NA	NA	NA	-	VSI en gen de baja evidencia
P079	3	<i>ATP8V0A4</i>	NM_020632	c.2011-8G>A p.?	Het	AR	rs183571925	B	Ausente	Ausente	0.4	D	NA	NA	4.2	Débilmente conservado	Acidosis tubular renal distal, AR (602722)	VSI en gen portador de baja evidencia	
		<i>COL9A3</i>	NM_001853	c.755G>A p.Arg252Gln	Het	AD/AR	rs139573483	B/PB	Ausente	Ausente	0.3	D	Deletéreo	Benigno	8.1	Débilmente conservado	Displasia epifisaria múltiple AD (600969); S Stickler AR	VSI en gen de evidencia baja/moderada	
		<i>JAG2</i>	NM_002226	c.2549G>A p.Arg850His	Het	D	rs191336412	Ausente	Ausente	Ausente	0.06	D	Deletéreo	Benigno	23.2	Moderadamente conservado	-	VSI en gen de baja evidencia	
		<i>FOLD1</i>	NM_001308632	c.355C>T p.Arg119Cys	Het	AD	rs747614571	VSI	Ausente	Ausente	0.01	D	Tolerado	Benigno	15.2	Moderadamente conservado	Susceptibilidad al cáncer colorectal AD (612591); S de hipoplasia mandibular; HA y lipodistrofia AD (615381)	VSI en gen de baja evidencia	
P081	3	<i>COL9A3</i>	NM_001853	c.1178A>G p.Gln393Arg	Het	AD/AR	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	Tolerado	Posiblemente deletéreo	23.3	Conservado	Displasia epifisaria múltiple AD (600969); S Stickler AR	VSI en gen de evidencia baja/moderada	
		<i>FGFR2</i>	NM_022970	c.419C>T p.Ala140Val	Het	AD	rs752501698	Ausente	VSI	Ausente	0.001	0	Tolerado	Benigno	21.3	Conservado	S Apert (AD); S Crouzon (AD); otras displasias	VSI en gen de baja evidencia	
P083	3	<i>EBS1</i>	NM_024649	c.951+7C>A p.?	Het	AR/DR	rs780784789	PB	Ausente	Ausente	0.03	0	NA	NA	2.6	NA	S Bardet-Biedl, AR/DR (209900)	VSI portador en gen de baja evidencia	
P084	3	<i>APAF1</i>	NM_181861	c.1327G>A p.Asp443Asn	Het	D	rs144721573	Ausente	Ausente	Ausente	0.2	D	Deletéreo	Probablemente deletéreo	31	Conservado	-	VSI en gen de baja evidencia	
		<i>GLI3</i>	NM_000168	c.263A>G p.Lys88Arg	Het	AD	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	-	Deletéreo	Probablemente deletéreo	26.8	Conservado	S Greig, S Pallister-Hill, Polidactilia pre/postaxial	VSI en gen de baja evidencia
		<i>LAMA2</i>	NM_000426	c.5530C>T p.Arg1844Cys	Het	AR	rs56173620	Conflicting (2B/2VSI)	Ausente	Ausente	Ausente	0.18	0	Tolerado	Probablemente deletéreo	26.1	Conservado	Distrofia muscular congénita deficiente en merosina AR (607588); Distrofia muscular de extremidades y caderas AR23 (618138)	VSI, portador en gen de baja evidencia
		<i>SCN9A</i>	NM_000346	c.724A>C p.Lys242Gln	Het	AD	rs1481515653	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	0.1	0	Deletéreo	Probablemente deletéreo	25.1	Conservado	Displasia camponémica, AD (114290)	VSI, portador en gen de baja evidencia

ID	Panel	Gen	Transcrito	Variante	Estado	Modo de Herencia	dbSNP	ClinVar	DVD	HGMD	GnomAD MAF máx. (%)	GnomAD Homo/hemi (n)	SIFT	Polyphen	CADD	GERP	Patología asociada al gen (OMIM#)	Conclusión referente a HA no síndromica
P085	3	<i>MTOR</i>	NM_001080779	c.1043C>T p.Thr348Met	Het	D	rs565274883	Ausente	Ausente	Ausente	0.18	0	Tolerado	Benigno	16	Débilmente conservado	-	VSI het en gen con evidencia disputada de asociación a HAAD
		<i>TSHR</i>	NM_001142626	c.713C>T p.Ser238Leu	Het	AD/AR	rs7566568153	Ausente	Ausente	Ausente	0.02	0	Tolerado	Benigno	5.5	Débilmente conservado	Hipertiroidismo no autoinmune AD (607152); Hipotiroidismo congénito 1, AR (275200)	VSI en gen de baja evidencia
P090	3	<i>CELSR1</i>	NM_014246	c.8144T>A p.Val2715Glu	Het	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	Deletéreo	Posiblemente deletéreo	15.1	Nb conservado	-	VSI en gen de baja evidencia
		<i>LAMA2</i>	NM_000426	c.5530C>T p.Arg1844Cys	Het	AR	rs56173620	Conflictiva (2PB/2VSI)	Ausente	Ausente	0.12	0	Tolerado	Posiblemente deletéreo	26.1	Moderadamente conservado	Distrofia muscular congénita deficiente en merosina AR (607588); Distrofia muscular de extremidades y caderas AR23 (618138C)	VSI, portador en gen de baja evidencia
		<i>MTOR</i>	NM_001080779	c.518G>A p.Arg173Gln	Het	D	rs148694544	PB	Ausente	Ausente	0.17	0	Tolerado	Probablemente deletéreo	23.4	Conservado	-	VSI het en gen con evidencia disputada de asociación a HAAD
		<i>NOTCH1</i>	NM_017617	c.1862G>A p.Arg621His	Het	AD	rs138504021	PB	Ausente	P	0.19	0	Tolerado	Probablemente deletéreo	24.8	Conservado	S. Adams-Oliver 5, AD (616028); enfermedad de válvula aórtica 1, AD (109730)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>FOLD1</i>	NM_001308632	c.521G>A p.Arg174Gln	Het	AD	rs141976385	VSI	Ausente	Ausente	0.016	0	Tolerado	Benigno	16.06	Conservado	Susceptibilidad al Cáncer Colorrectal AD (612591); S. de hipoplasia mandibular, HA y lipodistrofia AD (615381)	VSI en gen de baja evidencia
P094	3	<i>ACPA1</i>	NM_004028	c.648C>G p.Ile216Met	Het	D	rs372829102	Ausente	Ausente	Ausente	0.03	0	Tolerado	Benigno	12.6	Débilmente conservado	-	VSI en gen de baja evidencia
		<i>CAQNAID</i>	NM_000720	c.5660A>G p.Tyr1887Cys	Het	AD/AR	rs1433849089	Ausente	Ausente	Ausente	0.003	0	Deletéreo	Benigno	22.4	Conservado	Alosteronismo primario, convulsiones y anomalías neurológicas, AD (615474); Disfunción de nodo senoatrial e HA, AR (614896)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>HAL</i>	NM_002108	c.470T>C p.Ile157Thr	Het	AD/AR	rs150136984	Ausente	Ausente	Ausente	0.065	0	Deletéreo	Benigno	21.7	Conservado	Histidinemia (235800)	VSI en gen de baja evidencia
		<i>NOTCH1</i>	NM_017617	c.4891A>G p.Ile1631Val	Het	AD	rs990403823	Ausente	Ausente	Ausente	0.002	0	Tolerado	Benigno	11.5	Conservado	S. Adams-Oliver 5, AD (616028); enfermedad de válvula aórtica 1, AD (109730)	VSI en gen de baja evidencia

ID	Panel	Gen	Transcrito	Variante	Estado	Modo de Herencia	dbSNP	ClinVar	DVD	HGMD	GnomAD MAF máx. (%)	GnomAD Homo/hemi (n)	SIFT	Polyphen	CADD	GERP	Patología asociada al gen (OMIM#)	Conclusión referente a HA no sintromica
		<i>ST3GAL5</i>	NM_003896	c.1163T>C p.Met388Thr	Het	AR	rs755800174	VSI	Ausente	Ausente	0.031	0	Tolerado	Benigno	21.5	Conservado	S. Regresión del desarrollo salt and pepper, ar (609056)	VSI en gen de baja evidencia
P105	2, 3, 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4. Resultados por genes

A continuación, se describen las variantes identificadas en los individuos diagnosticados y las variantes candidatas de los pacientes no concluyentes.

Los resultados de los pacientes han sido agrupados en función del gen implicado, con el fin de poder facilitar la comparación de los tipos de variante, los dominios afectados y los fenotipos de hipoacusia, entre ellos y con la bibliografía publicada.

4.1. Gen *GJB2*

El 24% (24/100) de los pacientes estudiados en este trabajo presentaron hipoacusia asociada a *GJB2*. Las variantes identificadas en cada individuo y las características clínicas de cada paciente se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16: Pacientes con hipoacusia por alteraciones en el gen *GJB2* diagnosticados en este trabajo. BL: bilateral; BLS: bilateral simétrica; mat: materno; pat: paterno.

ID Paciente	Variantes		Estado	Origen	Patología	Inicio	Grado (GENDEAF)	Simetría	Progresión
P002	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	homocigosis	mat/pat	DFNB1A	Congénita	Moderada	BLS	Estable
P005	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	homocigosis	mat/pat	DFNB1A	Congénita	Severa	BL	Desconocida
P013	c.71G>A	p.Trp24*	heterocigosis	mat/pat	DFNB1A	Congénita	Profunda	BL	Estable
	c.250G>C	p.Val84Leu	heterocigosis						
P017	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	heterocigosis	mat/pat	DFNB1A	Congénita	Profunda	BLS	Estable
	del(<i>GJB6</i> -D13S1830)		heterocigosis						
P018	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	homocigosis	desconocido	DFNB1A	Congénita	Moderada	BLS	Estable
P032	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	heterocigosis	mat/pat	DFNB1A	Congénita	Moderada	BLS	Progresiva
	c.617A>G	p.Asn206Ser	heterocigosis						
P036	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	homocigosis	desconocido	DFNB1A	Congénita	Profunda	BLS	Estable
P038	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	homocigosis	mat/pat	DFNB1A	Congénita	Profunda	BLS	Estable
P051	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	homocigosis	desconocido	DFNB1A	Congénita	Severa	BLas	Estable
P052	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	heterocigosis	mat/pat	DFNB1A	Prelingual	Severa	BLS	Progresiva
	del(<i>GJB6</i> -D13S1854)		heterocigosis						
P054	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	heterocigosis	mat/pat	DFNB1A	Congénita	Severa	BL	Estable
	c.439G>A	p.Glu147Lys	heterocigosis						
P062	c.35delG;	p.Gly12Valfs*2	heterocigosis	desconocido	DFNB1A	Prelingual	Severa	BLS	Estable
	c.229T>C	p.Trp77Arg	heterocigosis						
P065	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	homocigosis	desconocido	DFNB1A	Desconocido	Profunda	BL	Estable
P068	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	homocigosis	desconocido	DFNB1A	Congénita	Profunda	BL	Estable
P072	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	heterocigosis	mat/pat	DFNB1A	Congénita	Profunda	BL	Estable

	c.596C>T	p.Ser199Phe	heterocigosis						
P073	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	heterocigosis	desconocido/pat	DFNB1A	Congénita	Profunda	BL	Estable
	c.439G>A	p.Glu147Lys	heterocigosis						
P074	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	homocigosis	desconocido	DFNB1A	Prelingual	Profunda	BL	Estable
P087	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	heterocigosis	mat/pat	DFNB1A	Postlingual	Leve	BLs	Estable
	c.101T>C	p.Met34Thr	heterocigosis						
P089	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	homocigosis	mat/pat	DFNB1A	Prelingual	Severa	BLs	Desconocido
P091	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	homocigosis	mat/pat	DFNB1A	Congénita	Leve	BL	Progresiva
P095	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	heterocigosis	desconocido	DFNB1A	Desconocido	Profunda	BL	Estable
	del(<i>GJB6</i> -D13S1830)		heterocigosis						
P097	c.551G>A	p.Arg184Gln	heterocigosis	desconocido	DFNA3A	Congénita	Profunda	BL	Estable
P099	c.283G>A	p.Val95Met	heterocigosis	mat/desconocido	DFNB1A	Congénita	Profunda	BL	Estable
	c.427C>T	p.Arg143Trp	heterocigosis						
P100	c.439G>A	p.Glu147Lys	heterocigosis	mat/pat	DFNB1A	Congénita	Severa	BLs	Estable
	del(<i>GJB6</i> -D13S1854)		heterocigosis						

Se encontraron 13 variantes patogénicas diferentes, 12 de ellas de herencia AR, causantes de DFNB1, y una de herencia AD, causante de DFNA3. Por otro lado, 11 de las variantes eran variantes patogénicas puntuales en el exón 2 y dos fueron grandes deleciones del gen *GJB6*.

La variante c.35delG (p.Gly12Valfs*2) representa el 66% de los alelos patogénicos identificados (31 de los 47 alelos patogénicos totales en *GJB2*). La segunda variante patogénica más frecuente fue c.439G>A (p.Glu147Lys), que se identificó en 3 casos (6%), seguida de las deleciones del(*GJB6*-D13S1830) y del(*GJB6*-D13S1854), identificadas 2 veces cada una de ellas (4% cada deleción). El resto de las variantes patogénicas fueron únicas (Figura 59).

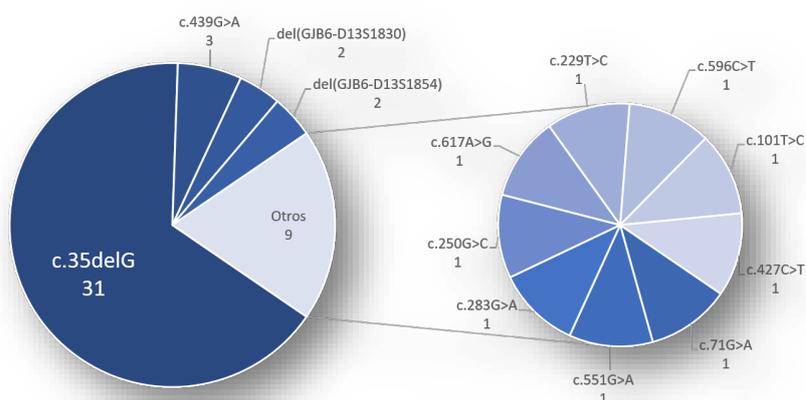


Figura 59. Frecuencia de alelos patogénicos en el gen *GJB2* identificados en este estudio.

Resultados

El fenotipo de las hipoacusias causadas por el gen *GJB2* en nuestra cohorte fue mayoritariamente de inicio congénito, profundo y estable (Figura 60).

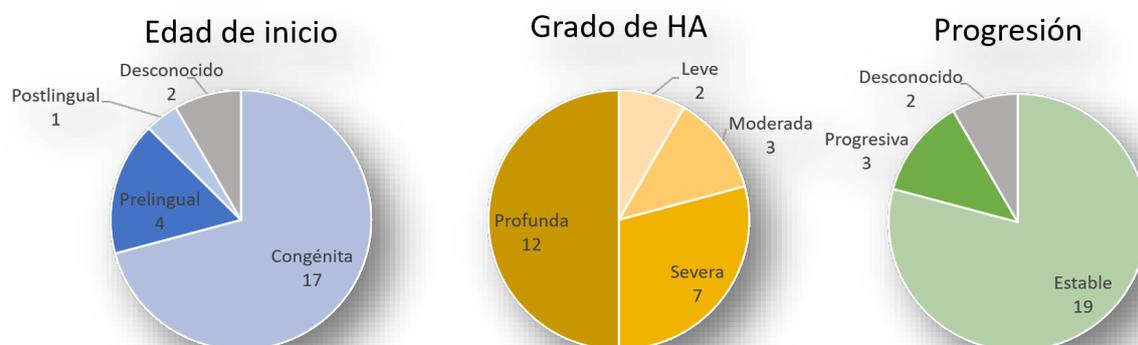


Figura 60. Características clínicas generales de los pacientes con HA debida a variantes patogénicas en *GJB2*.

Catorce de los 23 pacientes con DFNB1 (14/23, 61%) presentaban dos variantes de truncamiento (variantes que generan un codón de parada prematuro) o deleción de la región reguladora del gen *GJB2*, mientras que en 6 pacientes (6/23, 26%) un alelo era de truncamiento y el otro una variante de cambio de sentido. En 1 caso (4%), ambas variantes patogénicas eran de cambio de sentido.

Si agrupamos los pacientes en función de la combinación de tipo de las variantes, no se observan grandes diferencias en el fenotipo de hipoacusia, aunque el porcentaje de HA profunda en el grupo de dos variantes de truncamiento es casi el doble que en el grupo de truncamiento con variante de cambio de sentido (50% vs 28%) (Figura 61). El único caso postlingual fue en un individuo con una variante de truncamiento y la variante hipomórfica de cambio de sentido c.101T>C (p.Met34Thr) (Figura 61). Sólo un caso de DFNB1 fue causado por dos variantes patogénicas de cambio de sentido y presentaba HA profunda, estable y de inicio congénito (datos no mostrados en esta figura).

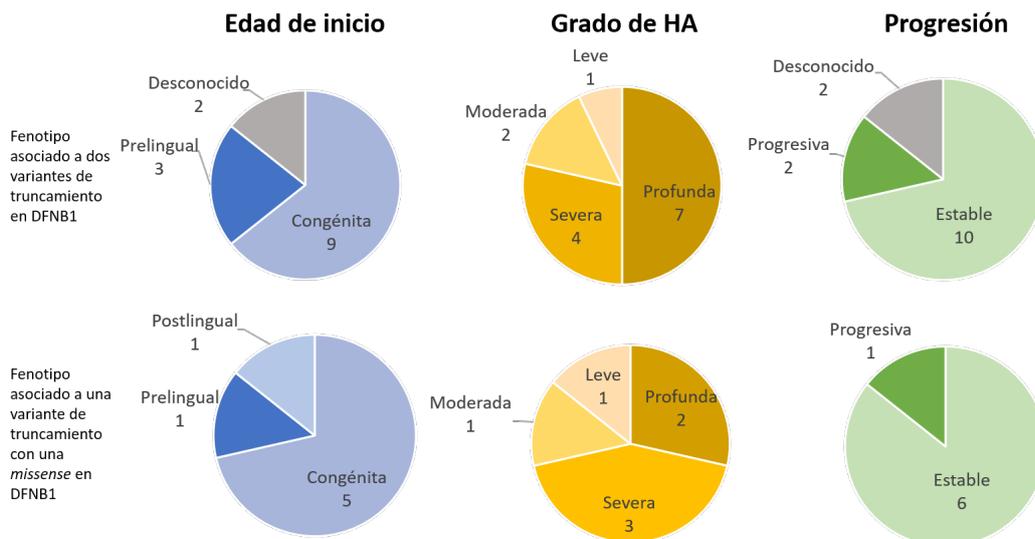


Figura 61. Fenotipo de hipoacusia en función de si el paciente presenta dos variantes de truncamiento o una de truncamiento con una de cambio de sentido.

A continuación, se muestran los audiogramas de seis pacientes con hipoacusia causada por la variante patogénica frecuente c.35delG en homocigosis (Figura 62). Como se puede observar, tanto el grado de hipoacusia como la configuración audiométrica (forma de la curva) presentan gran variabilidad entre pacientes con la misma causa de HA.

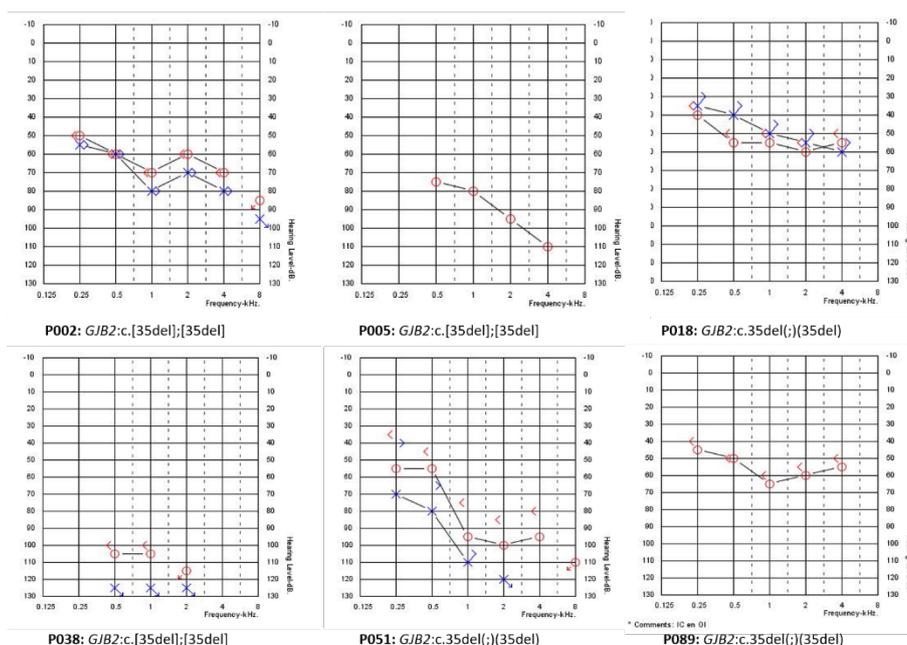


Figura 62. Audiogramas de varios pacientes diagnosticados de HA por la variante c.35delG en homocigosis en el gen GJB2.

Resultados

Los audiogramas de los pacientes con deleciones del gen *GJB6* se muestran a continuación (Figura 63). Aunque no se pudo obtener el audiograma del paciente P095, su historia clínica indicaba HA profunda. Si comparamos la Figura 63 con los audiogramas de la Figura 62, se observa que los pacientes con deleciones de *GJB6* parecen presentar HA más profundas que los pacientes con variantes de truncamiento en *GJB2* en homocigosis.

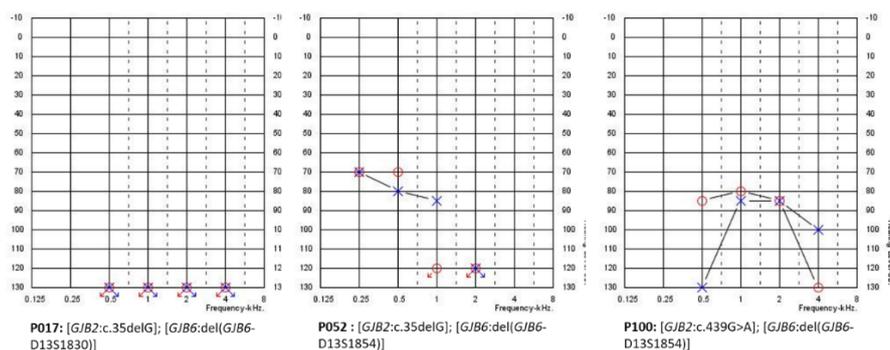


Figura 63. Audiogramas de pacientes con una variante en *GJB2* en heterocigosis compuesta con las deleciones del(*GJB6-D13S1830*) o del(*GJB6-D13S1854*) en el gen *GJB6*.

Dos HA relacionadas con el gen *GJB2* fueron leves (pacientes P087 y P091). En el individuo P087 la HA fue causado por dos variantes patogénicas en heterocigosis compuesta: c.35del (p.Gly12Valfs*2) y c.101T>C (p.Met34Thr), variante de cambio de sentido hipomorfa causante de HA leve cuando está en *trans* con otra variante patogénica en el mismo gen (143). El audiograma del paciente P087 y el árbol genealógico de la familia se muestran en la Figura 64. Al estudiar a la familia de P087, se detectaron ambas variantes en *trans* también en el padre, considerado *a priori* no afecto pero que refería cierto grado de alteración en una audiometría realizada en una revisión laboral, por lo que en el árbol genealógico de la Figura 64 se ha representado como afecto. La madre (normoyente) resultó ser portadora de la variante c.101T>C en heterocigosis, y la hermana, portadora de la variante c.35delG en heterocigosis (Figura 64).

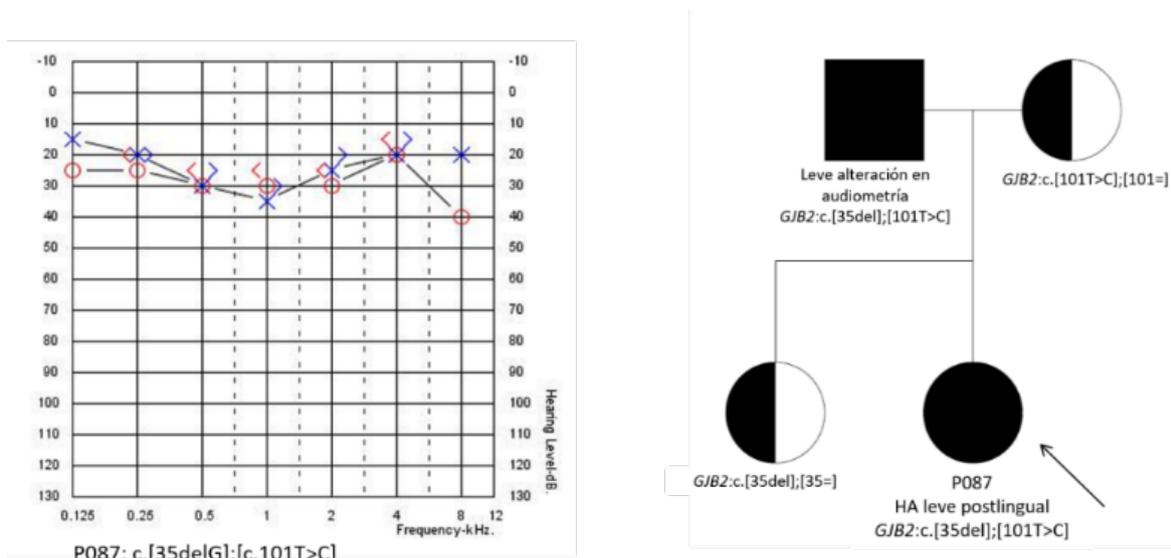


Figura 64. Audiograma del paciente P087 y árbol genealógico familiar con la segregación de las variantes patogénicas en la familia.

En el caso P091, la variante causal fue la c.35del en homocigosis. Sin embargo, esta familia también segregaba la variante c.101T>C, como se puede observar en la Figura 56. El padre de este caso presentaba HA leve postlingual de inicio alrededor de los 8 años de edad, causada por las variantes c.35delG y c.101T>C, heredadas de sus padres. La madre era normoyente y portadora de la variante c.35delG en heterocigosis. El caso P091 heredó un alelo c.35delG de cada uno de sus progenitores, presentando HA leve, congénita y progresiva (Figura 65).

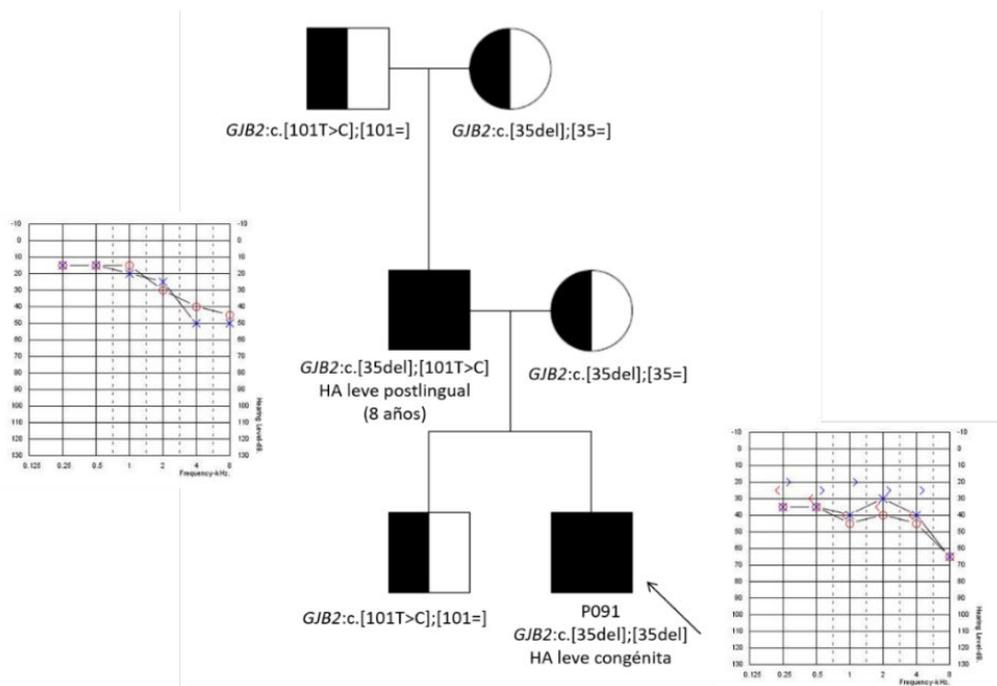


Figura 65. Árbol familiar del caso P091, audiogramas de los afectados y segregación de variantes patogénicas en la familia.

Resultados

Los casos P087 y P091 son un ejemplo de herencia pseudo-dominante, que se pueden explicar debido a la alta frecuencia de las variantes patogénicas en heterocigosis del gen *GJB2* en población general, que hace que una enfermedad AR pueda manifestarse en generaciones consecutivas aparentando transmisión AD.

En el paciente P097 se identificó la variante patogénica c.551G>A (p.Arg184Gln) en heterocigosis, que genera un cambio de aminoácido en el segundo *loop* extracelular de la proteína (E2). Aunque otras sustituciones de aminoácido en esta misma posición causan HA AR DFNB1, esta variante produce DFNA3, AD. Se han publicado estudios funcionales que demuestran que esta variante afecta al transporte de la proteína Cx26 a la membrana citoplasmática, provocando una acumulación de la proteína Cx26 en el aparato de Golgi, y que tiene un efecto dominante-negativo en la función tanto de la Cx26 y como de la Cx30 silvestres, aunque el mecanismo exacto es aún desconocido (144). Este paciente presenta HA congénita profunda bilateral esporádica. No disponemos de audiograma de este paciente.

El paciente P072, además de las variantes patogénicas c.35delG y c.596C>T (p.Ser199Phe) en heterocigosis compuesta en el gen *GJB2*, presentaba la variante mitocondrial *de novo* m.1555A>G en heteroplasmia en el gen *MT-RNR1*. Aunque esta variante mitocondrial es también causa conocida de hipoacusia, debido a que se encontraba en heteroplasmia, a la presencia en fase *trans* de las dos variantes patogénicas en *GJB2* y al fenotipo de HA del paciente se atribuyó la etiología de la HA al gen *GJB2*.

4.2. Gen *STRC*

El 7% de los pacientes del estudio (7/100) fueron diagnosticados de hipoacusia causada por alteraciones en el gen *STRC* (Tabla 17).

Tabla 17: Pacientes con hipoacusia por alteraciones en el gen *STRC* identificados en este estudio. Las variantes nuevas se resaltan en color rosa.

ID Paciente	Variantes	Estado	Origen	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P001	Deleción del gen <i>STRC</i>	Homocigosis	Mat/pat	Congénita	Leve	Estable
P006	Deleción del gen <i>STRC</i>	Heterocigosis	Mat/pat	Congénita	Moderada	Estable
	c.4403G>C	p.Arg1468Pro	Hemicigosis			
P011	Deleción del gen <i>STRC</i>	Homocigosis	Desconocido	Desconocido	Leve	Estable
P012	Deleción del gen <i>STRC</i>	Homocigosis	Desconocido	Congénita	Leve	Estable
P019	Deleción del gen <i>STRC</i>	Homocigosis	Desconocido	Congénita	Leve	Estable

P046	Delección del gen <i>STRC</i>		Heterocigosis	Desconocido	Congénita	Moderada	Progresiva
	c.5188C>T	p.Arg1730*	Hemicigosis	Desconocido			
P104	Delección del gen <i>STRC</i>		Heterocigosis	Desconocido	Prelingual	Moderada	Desconocido
	c.4917_4918delinsCT	p.Leu1640Phe	Hemicigosis	Desconocido			

Cuatro de los pacientes presentaban delección del gen en homocigosis (CNV=0). Los tres casos restantes presentaban una delección en heterocigosis del gen (CNV=1) y una variante puntual en el otro alelo. De las 3 variantes patogénicas puntuales identificadas, una genera un codón de parada prematuro (P046) y las otras dos dan lugar a un cambio de aminoácido en la proteína (P006 y P104).

La HA que presentaban los pacientes fue leve en el 57% de los casos (4/7) y moderada en el 43% (3/7). En cuanto al inicio, la HA fue congénita en 5/6 pacientes de los que se dispone información (83%) y postlingual en el paciente P104, con inicio a los 11 años. Cinco de los seis casos con información sobre su progresión presentaban HA estable (Figura 66). Todos los pacientes presentaban HA bilateral simétrica.

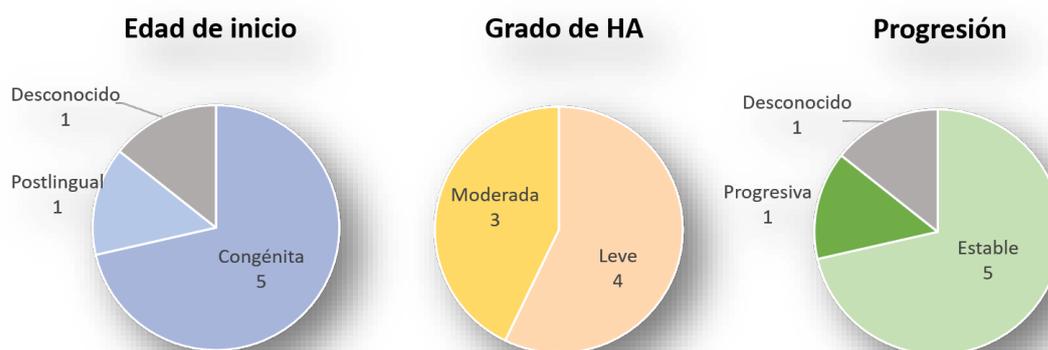


Figura 66. Características de la HA de los pacientes con hipoacusia relacionada con el gen *STRC*.

Los audiogramas de los pacientes con DFNB16 diagnosticados se muestran en la Figura 67. El perfil del audiograma es similar en todos los pacientes, con una HA leve o moderada con caída ligera en frecuencias altas (Figura 67).

Según lo publicado en una revisión reciente, en los pacientes con DFNB16 por pérdida de una copia del gen junto con variantes de cambio de sentido, la hipoacusia es más leve que en aquellos en los que la segunda variante es de truncamiento (90). En nuestro caso, de los tres casos que presentaban delección y variante puntual, en el paciente P006 y su hermana P006-H (con variante puntual de cambio de sentido) se observa una HA más leve que en P046 (con variante puntual de truncamiento). Sin embargo, de todos los pacientes diagnosticados de DFNB1, el audiograma que más cae es el del

Resultados

paciente P104, que junto con la deleción presenta una variante *indel* que produce un cambio de aminoácido en la proteína (Figura 67).

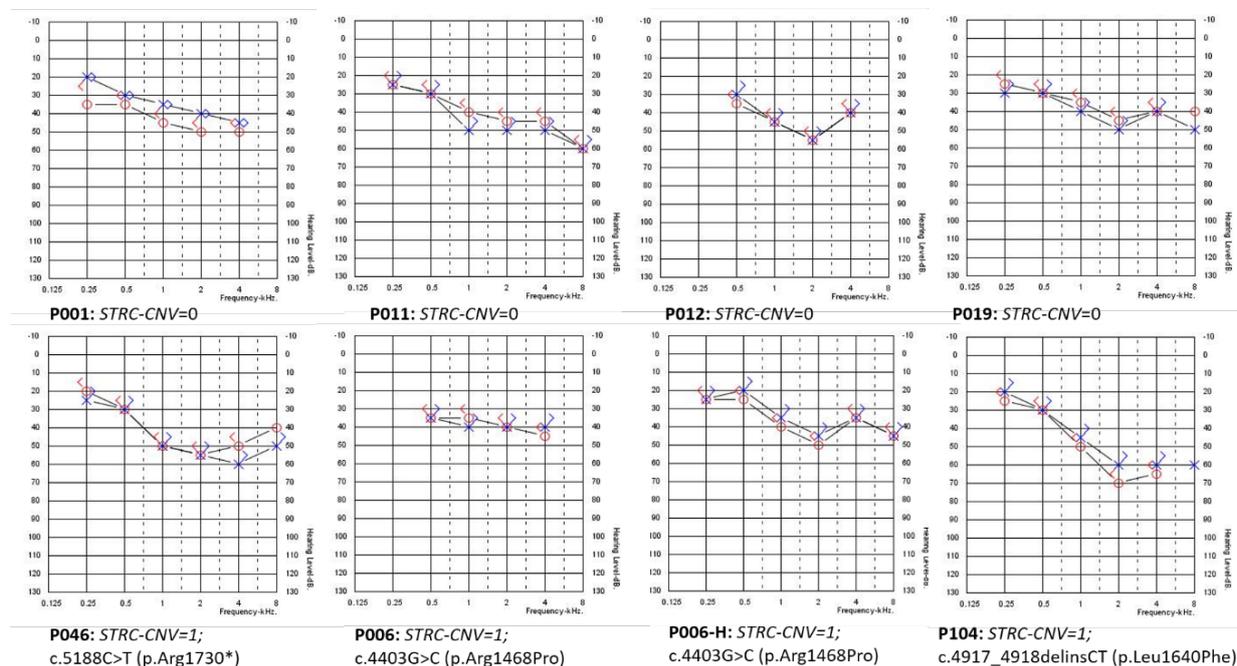


Figura 67. Audiogramas de los pacientes con hipoacusia por alteraciones en *STRC* y variantes identificadas. Arriba, audiogramas de los pacientes con deleciones en homocigosis del gen *STRC*. Abajo, audiogramas de los pacientes con deleción en heterocigosis y variante puntual en *STRC*. P006-H: hermana afecta del caso P006, que presenta las mismas variantes patogénicas.

El paciente P006 presenta la deleción del gen *STRC* en heterocigosis y la variante puntual c.4403G>C (p.Arg1468Pro) que no ha sido descrita previamente en la bibliografía (Tabla 17, celdas sombreadas en rosa). Esta variante no cumple estrictamente con los criterios de la ACMG para clasificarla como patogénica; sin embargo, no está presente en las bases de datos ClinVar, *Deafness Variant Database* (DVD) ni HGMD ni en población general (GnomAD), y según múltiples predictores bioinformáticos su efecto es deletéreo. Además, en este paciente y en su hermana también afecta, esta variante coexiste con una deleción patogénica en el mismo gen, y presentan ambos un audiograma compatible con los descritos previamente para hipoacusia debida a *STRC*. Por tanto, el resultado final del paciente P006 se consideró positivo.

Frecuencia poblacional de portadores de deleciones de *STRC*

De los 264 individuos normoyentes estudiados, 4 presentaron deleciones en heterocigosis del gen *STRC* (CNV=1), lo que da como resultado una frecuencia poblacional de portadores heterocigotos de la deleción del 1/66.

Además, 11 individuos (1/24) presentaron duplicaciones del gen *STRC* (CNV=3). En la actualidad, no se han descrito evidencias sobre la patogenicidad de las duplicaciones de este gen.

4.3. Gen *OTOF*

Seis pacientes del estudio (6%) presentaron alteraciones en el gen *OTOF* como causa de hipoacusia (Tabla 18).

Tabla 18: Pacientes con diagnóstico de HA relacionada con *OTOF*. En rosa, variantes no descritas previamente en la bibliografía. Las variantes nuevas se resaltan en color rosa.

ID Paciente	Variantes		Estado	Exón	Dominio	Origen	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P010	c.2485C>T	p.Gln829*	Homocigosis	21	-	Desconocido	Congénita	Severa	Progresiva
P025	c.1404delA	p.Val469Cysfs*27	Heterocigosis	14	C2	Mat/pat	Congénita	Profunda	Estable
	c.5125G>T	p.Asp1709Tyr	Heterocigosis	41	C2				
P029	c.2485C>T	p.Gln829*	Heterocigosis	21	-	Desconocido	Congénita	Profunda	Estable
	c.4275G>A	p.Trp1425*	Heterocigosis	35	-				
P086	c.2649C>A	p.Cys883*	Heterocigosis	22	Ferlin B	Desconocido	Congénita	Severa	Estable
	c.4809C>G	p.Tyr1603*	Heterocigosis	39	C2				
P098	c.2485C>T	p.Gln829*	Homocigosis	21	-	Desconocido	Desconocido	Profunda	Estable
P103	c.2485C>T	p.Gln829*	Heterocigosis	21	-	Desconocido	Congénita	Profunda	Estable
	c.1469delC	p.Pro490Hisfs*6	Heterocigosis	14	C2				

Se encontraron 7 variantes patogénicas diferentes en el gen *OTOF*. Seis de las siete variantes (86%) generan un codón de parada prematuro en la proteína; sólo una de las variantes patogénicas (c.5125G>T) provoca un cambio aminoácido en uno de los dominios de unión a calcio C2 de la proteína otoferlina. El 57% de las variantes (4/7) afectaban a alguno de los dominios críticos C2.

La variante más frecuente en nuestros pacientes con HA debida a *OTOF* fue la variante frecuente en España c.2485C>T, que estuvo implicada en 4 de los 6 pacientes (66%) representando el 50% de los

Resultados

alelos patogénicos (6/12) (Figura 68). El resto de las variantes sólo se encontraron en un paciente. Además, se identificaron 3 variantes patogénicas no descritas previamente en 2 pacientes: c.1404delA, c.1469delC, y c.5125G>T (Tabla 17, celdas sombreadas en gris), por lo que el porcentaje de alelos patogénicos nuevos en el gen *OTOF* en nuestra población fue del 25% (3/12) (Figura 68).

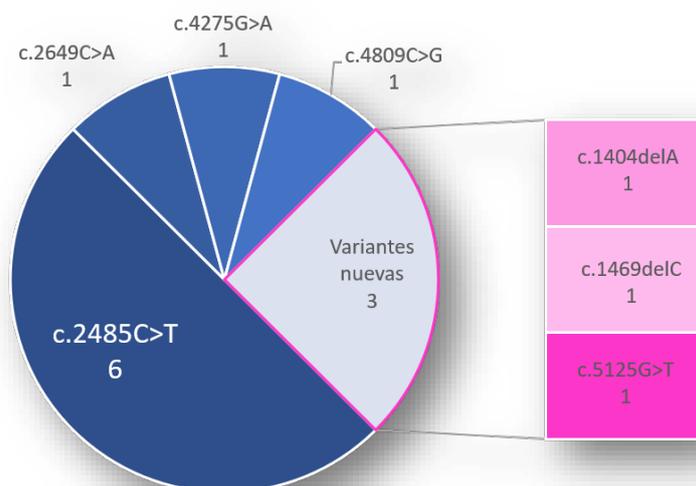


Figura 68. Alelos patogénicos identificados en el gen *OTOF* en los pacientes de este estudio. En color rosa, variantes no descritas previamente.

Dos de las tres variantes nuevas encontradas son de truncamiento, mientras que la otra es una sustitución de cambio de sentido que afecta a un aminoácido localizado entre los dominios C₂E y C₂F (Figura 69).

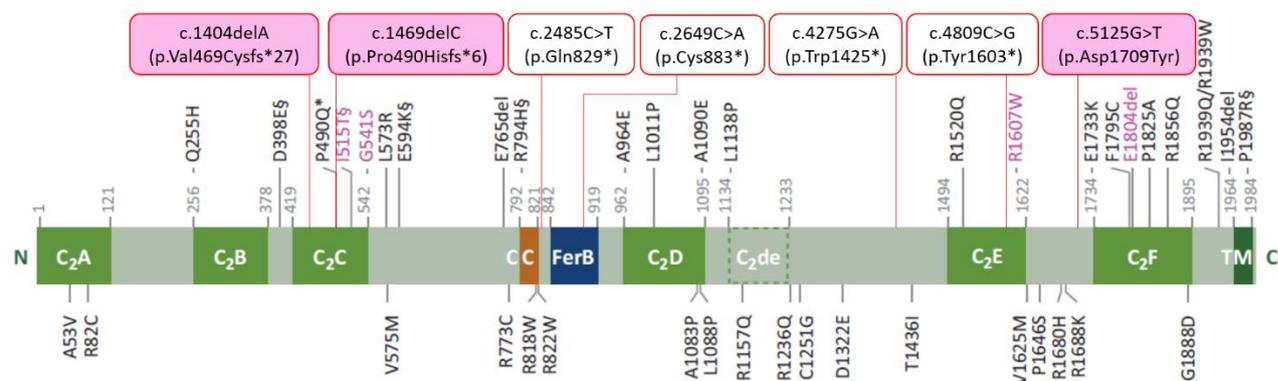


Figura 69. Dominios proteicos de la otoferlina y variantes en el gen *OTOF*. Modificado de Pangrsic et al, (145). Arriba: algunas de las variantes patogénicas descritas previamente en la bibliografía (enmarcadas en rojo, variantes patogénicas encontradas en este estudio; sombreadas en color rosa, variantes no descritas previamente). Abajo, variantes benignas en el

gen OTOF. Las variantes patogénicas en color morado han sido asociadas a casos de HA sensible a la temperatura. C2: dominios de unión a calcio; CC: dominio coiled-coil; FerB: motivo específico de ferlinas; TM: dominio transmembrana.

Las características fenotípicas de la HA en los pacientes con etiología relacionada con el gen OTOF fueron relativamente homogéneas, con HA profunda (67%) o severa y de inicio congénito, y mayoritariamente estable (83%) (Figura 70).



Figura 70. Características fenotípicas de los pacientes con HA relacionada con OTOF identificados en este estudio.

Sólo se pudo conseguir el audiograma de tres de los pacientes, y en dos de ellos sólo los umbrales correspondientes a uno de los oídos (Figura 71).

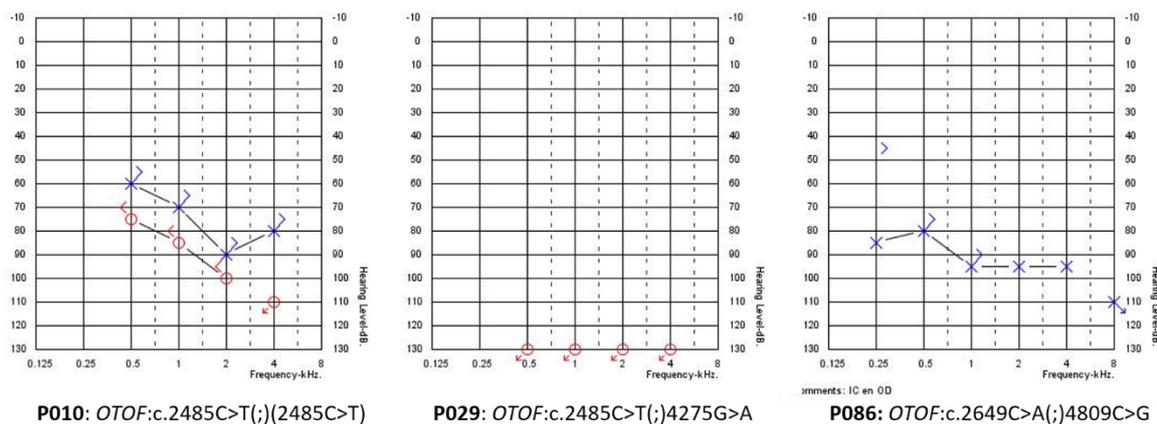


Figura 71. Audiogramas de tres de los pacientes con HA causada por variantes mutagénicas en el gen OTOF.

4.4. Genes mitocondriales MT-RNR1 y MT-TS1

Resultados

En este trabajo sólo se estudió la presencia de las variantes patogénicas m.1555A>G y m.1494C>T en el gen *MT-RNR1*, y m.7445A>C y m.7511T>C en el gen *MT-TS1*.

Cinco de los pacientes de este estudio presentaron variantes patogénicas mitocondriales causantes de hipoacusia, aunque en uno de ellos (P072) se identificó otra causa más probable en el gen *GJB2*, por lo que consideramos que la etiología de la hipoacusia fue mitocondrial en 4 de los 100 pacientes (4%).

Tabla 19: Pacientes con variantes mitocondriales patogénicas identificados en este estudio.

ID Paciente	Gen	Variante	Estado	Origen	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P042	<i>MT-RNR1</i>	m.1555A>G	Homoplasmia	Desconocido	Congénita	Severa	Progresiva
P053	<i>MT-RNR1</i>	m.1494C>T	Homoplasmia	Desconocido	Congénita	Moderada	Desconocido
P057	<i>MT-RNR1</i>	m.1494C>T	Homoplasmia	Heredado	Congénita	Moderada	Estable
P080	<i>MT-RNR1</i>	m.1555A>G	Homoplasmia	Heredado	Postlingual	Desconocido	Desconocido

Dos individuos presentaban la variante patogénica m.1555A>G en el gen *MT-RNR1* y en los otros dos casos se identificó la variante m.1494C>T en el mismo gen. Todas ellas se encontraban en homoplasmia (Tabla 19). No se encontró ninguna de las variantes en *MT-TS1* estudiadas en ninguno de los 100 pacientes estudiados.

Los cuatro pacientes referían historia familiar de HA. La HA era moderada o severa, aunque la hermana del caso P057, afecta y portadora de la misma variante en homoplasmia, presenta HA leve según la información disponible. La HA fue congénita en todos los casos excepto en el individuo P080, en el que se inició a la edad de 14 años. En ninguno de los casos se reportaron antecedentes de exposición a aminoglucósidos.

Los dos únicos audiogramas disponibles fueron los de los casos P053 y P057, ambos causados por la variante m.1494C>T. Tanto la información clínica como los audiogramas de estos dos pacientes muestran un perfil audiológico con caída brusca en frecuencias altas (Figura 70). Al no disponer de los audiogramas de los pacientes P042 y P080 (con HA por la variante m.1555A>G), ni encontrar información al respecto en la historia clínica de estos pacientes, no es posible concluir si este perfil audiológico se relaciona con ambas variantes patogénicas o si es característico de la variante m.1494C>T.

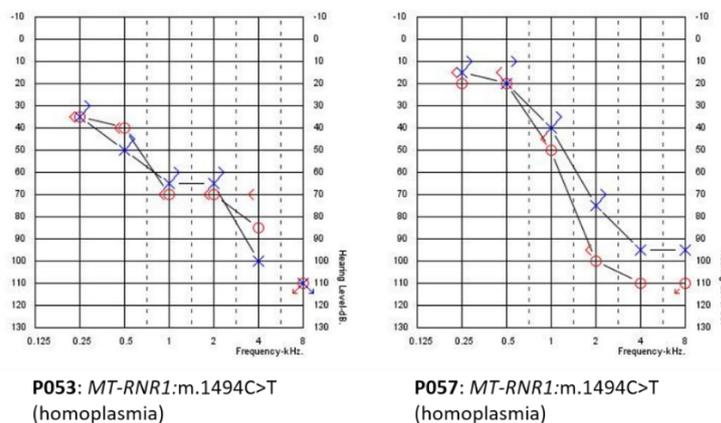


Figura 72. Audiogramas de los pacientes con la variante patogénica m.1494C>T.

4.5. Gen MYO15A

Cuatro pacientes (4%) fueron diagnosticados de HA relacionada con MYO15A de herencia AR, DFNB3 (Tabla 20).

Tabla 20: Pacientes diagnosticados de HA relacionada con el gen MYO15A. Las variantes nuevas se resaltan en color rosa.

ID Paciente	Variante		Dominio	Estado	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P028	c.2740G>A	p.Glu914Lys	N-terminal	Heterocigosis	Congénita	Moderada	Estable
	c.6004delG	p.Glu2002Argfs*27	-	Heterocigosis			
P033	c.1657delC	p.Arg553Glyfs*76	N-terminal	Homocigosis	Desconocido	Severa	Estable
P050	c.3874T>C	p.Phe1292Leu	Cabeza motora	Homocigosis	Congénita	Profunda	Estable
P092	c.4596+4A>G	-	Cabeza motora	Heterocigosis	Desconocido	Profunda	Desconocido
	c.6004delG	p.Glu2002Argfs*27	-	Heterocigosis			

Las características de la HA de estos pacientes se muestran a continuación (Figura 73).



Figura 73. Características de los pacientes con HA relacionada con el gen MYO15A en este estudio.

Se detectaron 5 variantes causales diferentes, dos de ellas en el dominio N-terminal, dos en el dominio motor y una fuera de los dominios conocidos. Varios aspectos llaman la atención: *i)* 4 de las 5 variantes identificadas son nuevas; *ii)* la variante nueva c.6004delG fue detectada en dos pacientes (P028 y P092), que en principio no están relacionados entre sí ni pertenecen a ninguna etnia específica; y *iii)* dos de las variantes nuevas (c.1657delC y c.3874T>C) se encuentran en homocigosis (pacientes P033 y P050, respectivamente). Esto último se podría explicar por la probable consanguinidad en ambas familias, hecho reportado por el paciente P050, mientras que el paciente P033 es de origen árabe, donde los matrimonios entre familiares son relativamente frecuentes.

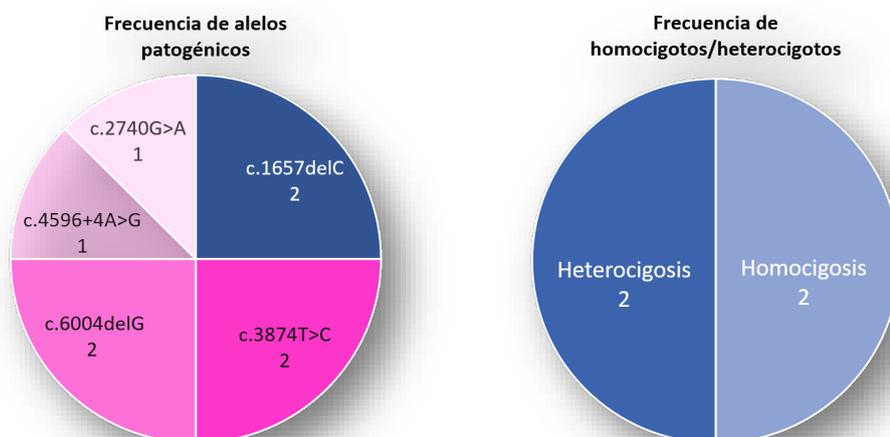


Figura 74. Frecuencia de los alelos patogénicos identificados en el gen MYO15A en este estudio (en amarillo, variantes nuevas no descritas previamente) y porcentaje de pacientes homocigotos o heterocigotos para las variantes patogénicas.

La variante c.1657delC, aunque es conocida, sólo ha sido descrita en una familia de origen paquistaní con HA severa (146). Esta variante se localiza en el exón 2, que codifica el dominio N-terminal de la proteína, al igual que la variante nueva de cambio de sentido c.2740G>A (Figura 75).

Las variantes nuevas c.3874T>C (cambio de sentido) y c.4596+4A>G se localizan en la región que codifica el dominio cabeza motora de la miosina XVa. La variante de c.6004delG se localiza en el exón 27 de los 66 que contiene el gen, y al cambiar el marco de lectura, genera un codón de parada prematuro, que probablemente lleve a pérdida de expresión de la proteína por el mecanismo de *nonsense-mediated decay* (NMD).

Según estudios recientes, el fenotipo relacionado con la HA causada por el gen *MYO15A* parece estar relacionado con la variante y la isoforma a la que afecta, de forma que se ha descrito que las variantes patogénicas en la región codificante del dominio motor (que afectarían a las isoformas 1 y 2) presentan los fenotipos más graves, mientras que las alteraciones en el dominio N-terminal, sólo presente en la isoforma 1, darían lugar a un fenotipo más leve. Sin embargo, esta correlación parece no confirmarse en todos los casos (75).

Con el fin de analizar este aspecto en nuestros cuatro pacientes con HA relacionada con *MYO15A*, a continuación se muestran la localización de las variantes identificadas y los dominios a los que afectan (Figura 75).

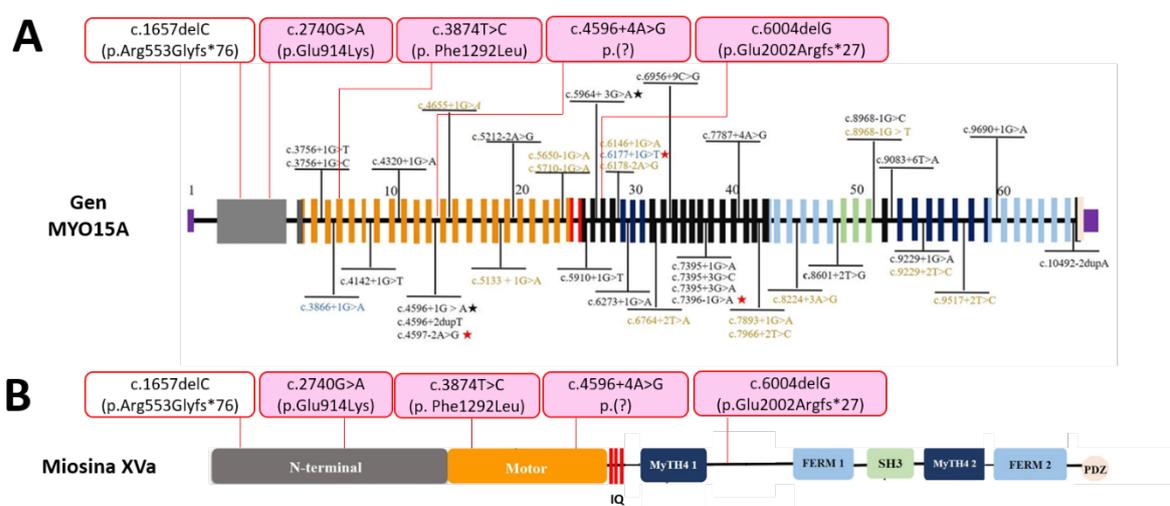


Figura 75. Representación esquemática del gen *MYO15A* y la proteína miosina XVa, y algunas de las variantes patogénicas descritas previamente en la bibliografía. A: Las barras verticales representan exones, en distinto color en función del dominio que codifican y negras si no codifican ningún dominio descrito; las líneas horizontales negras representan exones. B: dominios de la proteína miosina XVa coloreados en concordancia con los exones que los codifican. Las variantes encontradas en este trabajo se muestran en recuadros rojos; los recuadros con sombreado rosa representan las variantes nuevas encontradas en este estudio. Modificado de Zhang et al. (75).

Si analizamos los fenotipos de nuestros pacientes, parece confirmarse dicho patrón: los pacientes con variante en el dominio motor (P050 y P092) presentan HA profunda, mientras que los pacientes con

Resultados

variante en el dominio N-terminal (P028 y P033) presentan HA moderada y severa, respectivamente (Tabla 20).

Si observamos el perfil de los audiogramas (Figura 76), el paciente P050 (variante de cambio de sentido c.3874T>C en homocigosis en el dominio motor) presenta un audiograma sin respuesta a 100 dB en las tres frecuencias centrales; mientras que los pacientes P028 (variante de cambio de sentido en dominio N-terminal y variante de truncamiento fuera de dominio) y P033 (variante de truncamiento en homocigosis en dominio N-terminal) presentan una HA más leve, con audición residual en frecuencias bajas y medias (Figura 74). En el paciente P092, aunque no pudimos disponer del audiograma, se ha reportado HA profunda, lo que sería compatible con las dos variantes que presenta en el dominio motor. Además, hay que resaltar que este paciente (P092) presenta la misma variante que el paciente P050 pero en combinación con otra que afecta probablemente al *splicing*, mostrando HA profunda, mientras que en el paciente P050, cuya segunda variante es de cambio de sentido, la HA es moderada.

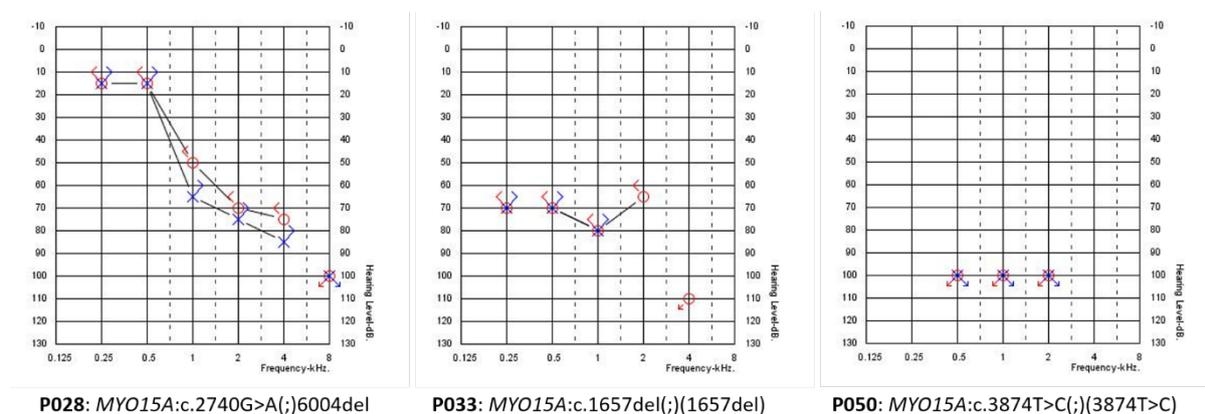


Figura 76. Audiogramas de tres de los cuatro pacientes con HA relacionada con el gen MYO15A.

4.6. Gen TECTA

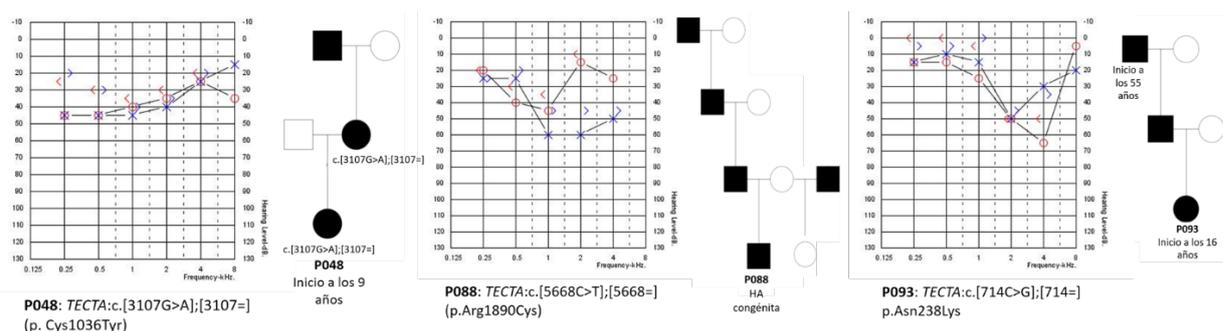
Las variantes patogénicas de cambio de aminoácido en el gen *TECTA* causan hipoacusia no sindrómica AD (DFNA8/12), mientras que las variantes patogénicas de truncamiento causan HA no sindrómica AR (DFNB21). Tres pacientes de este estudio fueron diagnosticados de HA autosómica dominante relacionada con el gen *TECTA* (Tabla 21).

Tabla 21: Pacientes diagnosticados de HA relacionada con el gen *TECTA*.

ID Paciente	Variante		Dominio	Estado	Origen	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P048	c.3107G>A	p.Cys1036Tyr	TIL2 (ZA)	Heterocigosis	Heredado	Postlingual (9 años)	Leve	Desconocido
P088	c.5668C>T	p.Arg1890Cys	ZP	Heterocigosis	Desconocido	Congénita	Moderada	Progresiva
P093	c.714C>G	p.Asn238Lys	ENT	Heterocigosis	Desconocido	Postlingual (15 años)	Leve	Progresiva

Se identificaron tres variantes de cambio de sentido diferentes en heterocigosis, todas ellas descritas previamente en la literatura. Los tres pacientes presentaban historia familiar de hipoacusia con un patrón de herencia AD.

Las variantes de cambio de sentido en el gen *TECTA* se relacionan con HA de herencia AD que afecta a frecuencias medias y bajas, dando lugar a un perfil audiológico característico en forma de U. En nuestro estudio, todos los pacientes con HA causada por el gen *TECTA* presentaban HA AD con expresión en al menos tres generaciones, con audiogramas que se asemejan al perfil típico (Figura 77).

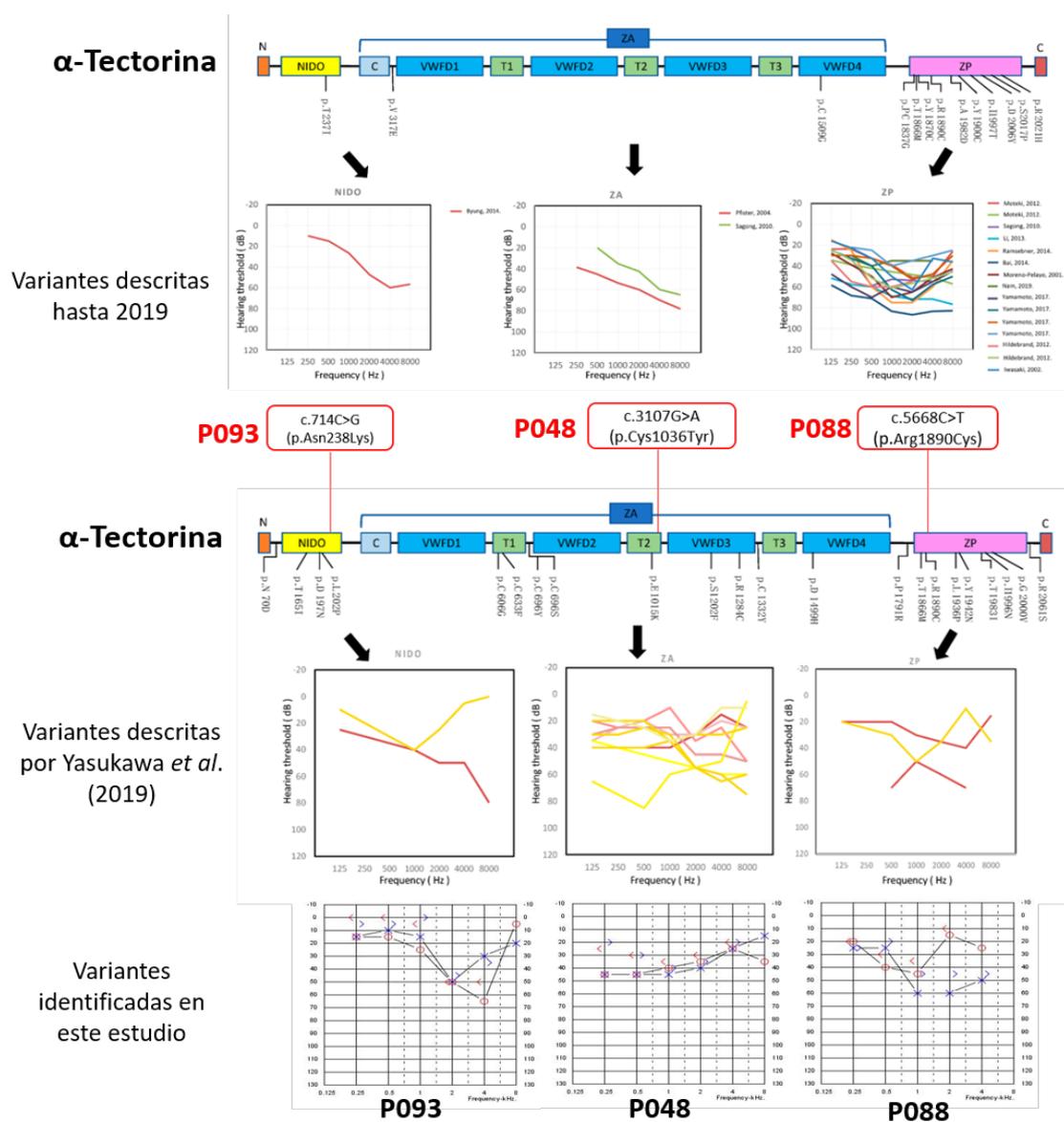
Figura 77. Audiogramas de los pacientes con variantes patogénicas en *TECTA* y árboles familiares de cada uno de ellos.

Cada variante identificada en estos pacientes afecta a un dominio diferente: ENT o NIDO (entactina), TIL2 (*trypsin-inhibitor like 2*, en la región zonadhesina (ZA)) y ZP (dominio *zona pellucida*) (Figura 78). Esto nos permite comparar los audiogramas de estos pacientes con el fenotipo descrito previamente en la bibliografía.

La relación genotipo-fenotipo descrita inicialmente en la literatura describe un patrón de HA donde las variantes en el dominio ZP causan HA de frecuencias medias, mientras que si afectan a la región ZA causan HA de frecuencias altas. Sin embargo, estudios recientes en población japonesa no han confirmado del todo dicha correlación (110), ya que dos de las tres variantes nuevas identificadas en

Resultados

el dominio ENT en dicho estudio presentaban HA en frecuencias medias. El fenotipo del paciente P093 de nuestro estudio, con una variante en el dominio ENT, concuerda con el fenotipo establecido los estudios previos de HA en frecuencias altas (Figura 78), al igual que el paciente P088, con variante en el dominio ZP y audiograma en forma de U con umbrales más altos en frecuencias medias. Sin embargo, en el paciente P048, con variante en el dominio TIL2 de la región ZA de la que se esperaría pérdida sobre todo en frecuencias altas, no cumple con dicho fenotipo, sino que la pérdida de audición es más marcada en frecuencias bajas. Los audiogramas de nuestros tres pacientes en relación al dominio en el que se localizan y a las variantes previamente descritas en la bibliografía se muestran en la Figura 78.



del dominio afectado. B: Variantes encontradas por Yasukawa et al. y audiogramas de los mismos superpuestos en función del dominio, variantes identificadas en nuestros pacientes (enmarcadas en recuadro rojo) y audiogramas que presentan (bajo el dominio al que afectan).

Por otra parte, se ha reportado que las variantes que sustituyen los residuos de cisteína del dominio ZA parecen relacionarse con HA progresiva, mientras que si se sustituyen otros residuos la HA es estable. De nuestros tres pacientes, sólo el P048 presenta una variante en el gen ZA y afecta a un residuo de cisteína, aunque no disponemos de información relativa a la progresión de este paciente. En los otros dos pacientes, la HA es progresiva.

4.7. Gen BSND

Dos pacientes fueron diagnosticados de HA de herencia AR relacionada con en el gen *BSND*, DFNB73 (Tabla 22).

Tabla 22: Pacientes con HA relacionada con el gen *BSND*.

ID Paciente	Variante		Estado	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P015	c.23G>A	p.Arg8Gln	Homocigosis	Perilingual	Severa	Progresiva
P035	c.23G>A	p.Arg8Gln	Homocigosis	Perilingual	Moderada	Progresiva

Ambos individuos presentaban la misma variante en homocigosis, que además es la misma que la encontrada en el único caso de HA por *BSND* publicado en España (34), donde se describía asociada a HA congénita bilateral.

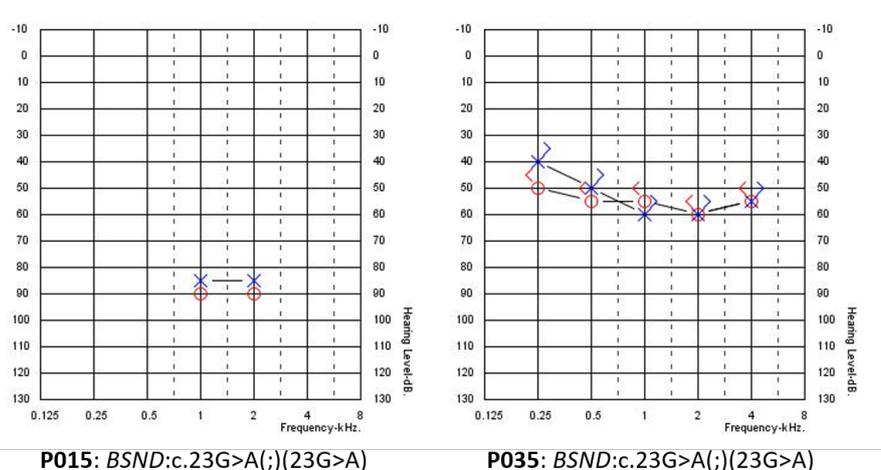


Figura 79. Audiograma de los pacientes con HA relacionada con el gen *BSND*.

Resultados

La historia familiar de HA de los dos pacientes simulaba un patrón de herencia AD con múltiples afectos en varias generaciones consecutivas. Sin embargo, en ambos casos existe consanguinidad en la familia, y aunque no refieren ser familiares entre sí, los dos pacientes son de etnia gitana.

La hipoacusia en ambos casos fue de inicio perilingual y progresiva, moderada en un caso y severa en el otro. El caso P015 refería familiares afectados con edades de inicio más tardías, con una hermana de inicio a los 8 años y el padre debutando a los 20. No se ha podido disponer de muestra de los familiares afectados para confirmar la co-segregación de la variante con la HA en estas familias.

Ninguno de los pacientes presentaba alteraciones renales características al síndrome de Bartter tipo IV asociado a este gen en el momento del diagnóstico genético.

4.8. Gen *LOXHD1*

Uno de los pacientes presentó hipoacusia AR relacionada con *LOXHD1*, DFNB77 (Tabla 23).

Tabla 23: Paciente con HA causada por variantes en el gen *LOXHD1*. Las variantes nuevas se resaltan en color rosa.

ID Paciente	Variante		Estado	Origen	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P043	c.232delC	p.Gln78Serfs*20	Heterocigosis	Materno	Perilingual	Leve	Progresiva
	c.4663G>T	p.Glu1555*	Heterocigosis	Paterno			

Se identificaron en el paciente P043 dos variantes patogénicas en heterocigosis no descritas previamente en la bibliografía. Ambas variantes provocaban truncamiento de la proteína y el estudio de los progenitores sanos demostró que eran heredadas y que se encontraban en fase de ligamiento *trans* (Figura 80).

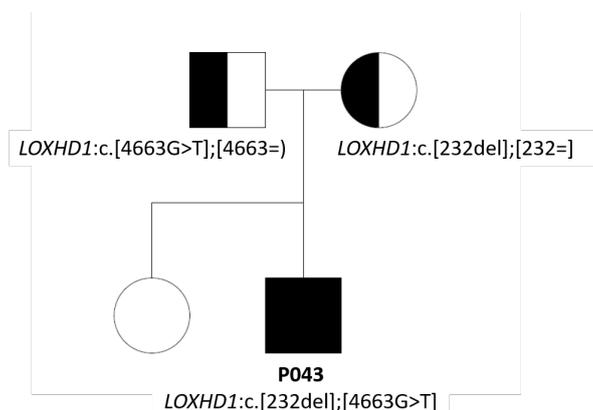


Figura 80. Árbol familiar del paciente P043 y segregación de las variantes patogénicas.

El paciente P043 presenta HA esporádica detectada por los padres a los 3 años de edad por retraso del desarrollo del lenguaje, profunda en frecuencias medias y altas, y rápidamente progresiva (Figura 81), fenotipo consistente con lo descrito en la bibliografía para la hipoacusia DFNB77 (147).

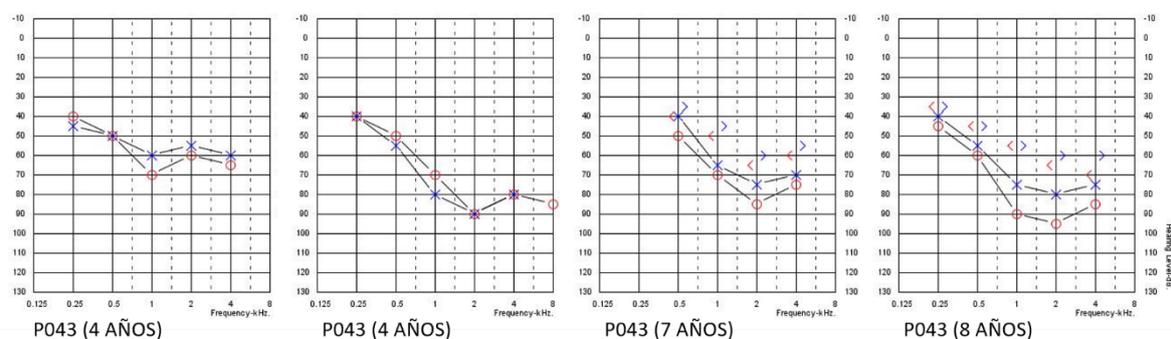


Figura 81. Audiogramas del paciente P043 a lo largo del tiempo.

4.9. Gen *MYO6*

Dos casos de este estudio fueron diagnosticados de hipoacusia AD relacionada con el gen *MYO6*, DFNA22 (Tabla 24).

Tabla 24: Paciente diagnosticado de hipoacusia relacionada con el gen *MYO6*. Las variantes nuevas se resaltan en color rosa.

ID Paciente	Variante		Exon	Dominio	Estado	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P020	c.2544delA	p.Lys848Asnfs*9	25	Cola proximal	Heterocigosis	Postlingual (6 años)	Moderada	Desconocido
P101	c.1976G>A	p.Arg659Gln	19	Cabeza motora	Heterocigosis	Congénita	Moderada	Estable

En la paciente P020 se detectó en heterocigosis la variante c.2544delA, que genera un codón prematuro en la proteína. Esta variante se localiza en la cola proximal de la miosina VI (Figura 80), y no ha sido descrita previamente en individuos con hipoacusia y tampoco en la población general. La paciente presenta HA moderada de inicio a los 6 años y un hermano afecto de HA sin más información. El audiograma de la paciente muestra un perfil en forma de U que, aunque es típico de la HA relacionada con *TECTA*, también ha sido descrito en algunos pacientes con variantes patogénicas en *MYO6* (71).

En el paciente P101, se encontró en heterocigosis la variante de cambio de sentido c.1976G>A, que ha sido descrita por la base de datos DVD como variante de significado incierto. Esta variante se ha encontrado en población general (GnomAD: 0,004%) y varios predictores bioinformáticos la clasifican

Resultados

como patogénica. La variante afecta al dominio motor (Figura 82), que se considera crítico y se asocia a fenotipos de HA más graves. Una variante sin sentido en esta posición ha sido descrita en varias familias con HA de herencia AD (71).

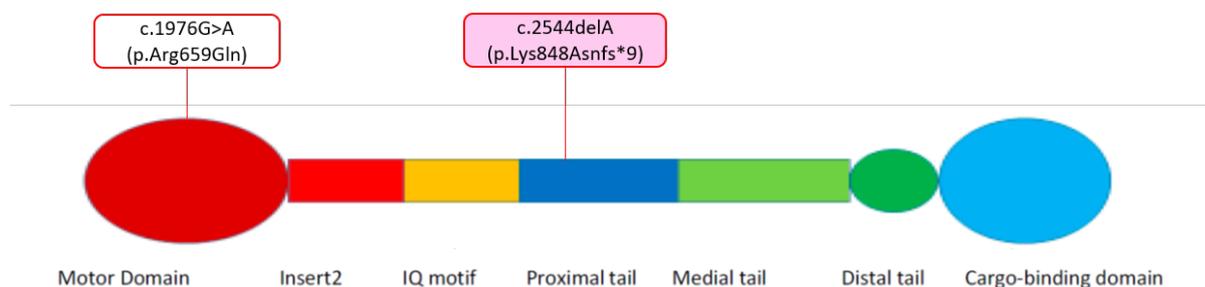


Figura 82. Dominios de la miosina VI y localización de las dos variantes identificadas en este trabajo. La variante no descrita previamente se resalta en color naranja. Modificado de Oka et al. (71).

La información publicada sobre la HA por *MYO6A* parece apuntar a que tanto el exceso como el defecto de expresión de miosina VI pueden causar HA, aunque con un fenotipo más leve que las alteraciones cualitativas en la misma, que pueden ejercer un mecanismo dominante negativo (71). En nuestros pacientes (P020 con variante de truncamiento y P101 con variante de cambio de sentido) los umbrales de audición no presentan grandes diferencias, aunque el debut de la HA en el paciente P101 fue congénito, lo que podríamos interpretar como una mayor gravedad debida a un potencial efecto dominante negativo. Sin embargo, la historia familiar de P101 presenta numerosos individuos afectados con inicio en edad adulta, lo que no confirmaría esta hipótesis.

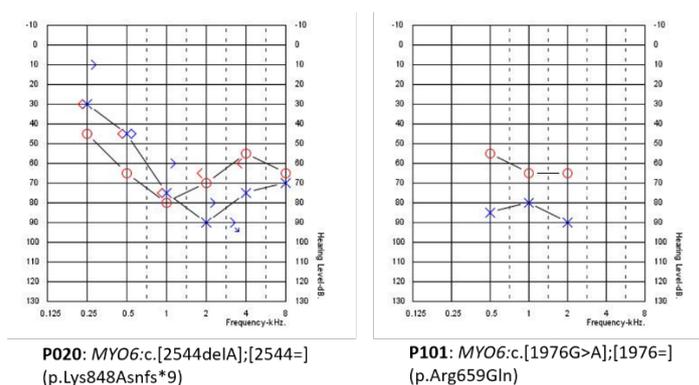


Figura 83. Audiogramas de los pacientes con HA relacionada con *MYO6* en este trabajo.

En cuanto a la progresión, el paciente P101 refería HA estable y no disponemos de información sobre la progresión en el caso P020. La HA DFNA22 suele ser progresiva, con una progresión importante a partir de los 40 años. Este puede ser el motivo de que el paciente P101 se describa en la historia clínica como estable, ya que en el momento del diagnóstico genético no había cumplido aún el año de edad.

4.10. Gen *MYO7A*

Las variantes patogénicas en el gen *MYO7A* pueden causar síndrome de Usher tipo 1B, de herencia AR, HA no sindrómica AR DFNB2 o HA no sindrómica AD DFNA11.

Dos pacientes fueron diagnosticados de patologías relacionadas con el gen *MYO7A* (Tabla 25).

Tabla 25: Pacientes con variantes en el gen *MYO7A*. Las variantes nuevas se resaltan en color rosa.

ID Paciente	Variante		Dominio	Estado	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P059	c.849+5G>A	p.(?)	Cabeza motora	Homocigosis	Congénita	Severa	Desconocido
P082	c.479C>G	p.Ser160Cys	Cabeza motora	Heterocigosis	Congénita	Severa	Estable
	c.5722T>A	p.Phe1908Ile	FERM2	Heterocigosis			

La paciente P059 presenta en homocigosis una sustitución de nucleótido en la posición c.849+5 del intrón 8. Esta variante ha sido clasificada por HGMD como patogénica por haber sido descrita en un paciente con Usher tipo 1 atípico (148). También se encuentra en ClinVar como probablemente patogénica, aunque en referencia al mismo caso, por lo que sólo ha sido descrita una vez en la bibliografía. La variante se encuentra en el dominio motor de la proteína miosina VIIa, que como en todas las miosinas, es un dominio crítico para su funcionamiento. Además, su frecuencia en la población general es extremadamente baja (GmonAD: 0.00093%) y en ningún caso se ha encontrado en homocigosis. Por otra parte, varios predictores bioinformáticos de *splicing* (MaxEnt, NNSPLICE, HSF) predicen una pérdida media del 60% de la capacidad de *splicing* del sitio dador localizado a 5pb de esta sustitución. El hermano de la paciente, también afecto de HA severa congénita, presenta también la variante en homocigosis. En base a todas estas evidencias hemos considerado esta variante como probablemente patogénica. El audiograma de la paciente P059 y su hermano, así como el árbol familiar, se muestran en la Figura 84.

Resultados

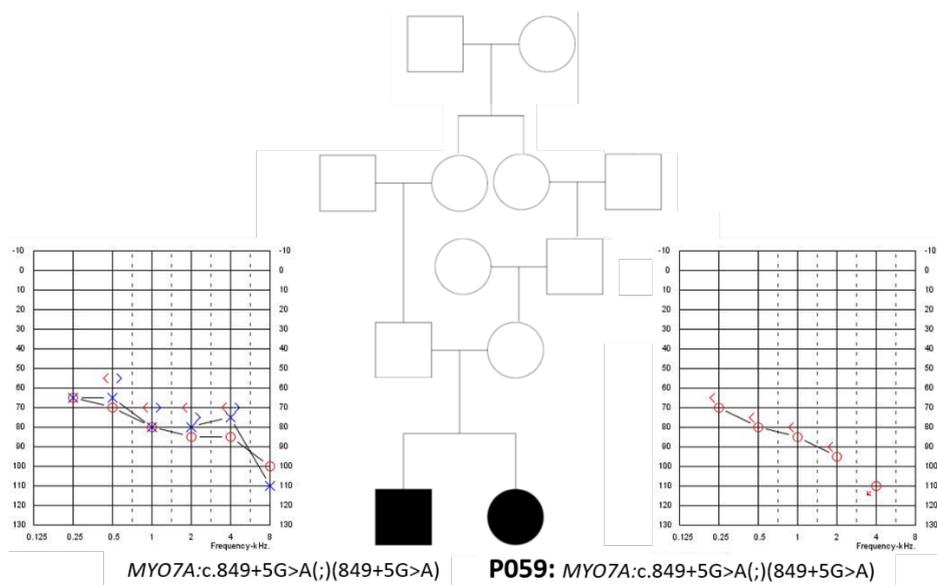


Figura 84. Árbol familiar de la paciente P059 y audiogramas de P059 (derecha) y de su hermano (izquierda). El árbol familiar muestra consanguinidad.

En el paciente P082 se encontraron dos variantes *de cambio de sentido* en heterocigosis (Tabla 20). El fenotipo de este individuo es de HA no sindrómica congénita, severa y estable, con una historia familiar de hipoacusia en múltiples familiares de la rama materna que asemejaba a un modo de herencia AD. Sin embargo, la hipoacusia referida en los familiares era de inicio en la 3ª-4ª décadas de la vida. También existían antecedentes familiares de hipoacusia en la familia paterna, aunque no eran consistentes con herencia dominante (padre no afecto).

La variante c.479C>G, que afecta al dominio motor, ha sido reportada en un paciente como probable causa de hipoacusia no sindrómica autosómica dominante DFNA11 (149). La variante c.5722T>A no ha sido descrita previamente en individuos con hipoacusia, pero está ausente en población general (GnomAD), se localiza en el dominio crítico FERM y múltiples predictores bioinformáticos la catalogan como deletérea. No se pudo conocer el origen heredado o *de novo* de estas variantes patogénicas por no disponer de muestra de los progenitores para el estudio genético.

El árbol familiar y el audiograma del paciente P082 se muestran en la Figura 85.

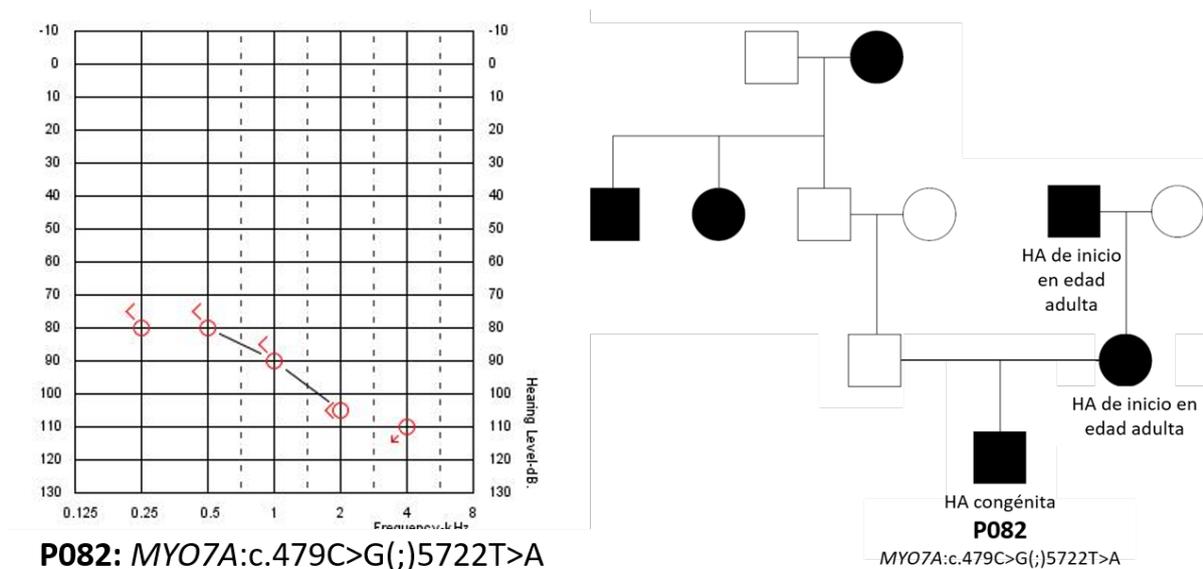


Figura 85: Audiograma del paciente P082 y su árbol familiar.

Al observar la segregación de la HA en la familia del paciente P082, llama la atención la aparente herencia AD que se observa por la rama materna, con la madre y el abuelo materno del paciente afectados de HA. Esto es compatible con la variante c.479C>G en heterocigosis detectada en el paciente. Sin embargo, tanto la madre como el abuelo refieren HA de inicio en edad adulta, en la 3ª-4ª década, mientras que el paciente P082 presenta HA de inicio congénito. Además, en la rama paterna también se observa HA, aunque se desconoce su origen. Al presentar el individuo P082 la variante c.479C>G en heterocigosis, causante de DFNA11 con herencia AD, y otra variante de cambio de sentido en heterocigosis en el mismo gen (c.5722T>A), podríamos hipotetizar que en este paciente la segunda variante agrava la HA causada por la variante c.479C>G, adelantando la edad de inicio respecto a lo observado en sus familiares de la rama materna. Sin embargo, este aspecto no ha podido ser demostrado, ya que es necesario el estudio de segregación de ambas variantes en los familiares afectados y no afectados, que no ha sido posible por no disponer de muestra de los mismos.

4.11. Gen *TMC1*

Las variantes de pérdida de función en el gen *TMC1* causan HA de herencia AR DFNB7/11, que suele ser severa o profunda, y de inicio congénito o prelingual. Las variantes patogénicas de cambio de sentido causan HA de herencia AD DFNA11, aunque son menos frecuentes, y suelen asociarse a HA progresiva de inicio tardío (46).

Resultados

Un paciente de este estudio presentaba HA de herencia AR relacionada con el gen *TMC1*, DFNB7/11. Además, dos de los casos no concluyentes presentaban variantes candidatas de DFNA36 (Tabla 26).

Tabla 26: Paciente diagnosticado de HA relacionada con el gen *TMC1* y pacientes con VSI candidatas en dicho gen. Las variantes nuevas se resaltan en color rosa.

ID Paciente	Variante		Estado	Patología	Herencia	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P064	c.645C>A	p.Tyr215*	Heterocigosis	DFNB7/11	AR	Congénita	Profunda	Estable
	c.1679A>T	p.Asp560Val	Heterocigosis					
PACIENTES CON VARIANTES CANDIDATAS								
P049	c.142C>T	p.Arg48Trp	Heterocigosis	DFNA36	AD	Postlingual	Leve	Progresiva
P075	c.46G>A	p.Glu16Lys	Heterocigosis	DFNA36	AD	Postlingual	Leve	Progresiva

El individuo P064 presenta dos variantes patogénicas en heterocigosis en este gen: la variante c.645C>A, que genera un codón de parada prematuro, presenta una frecuencia en población general extremadamente baja (GnomAD *Exomes*: 0,000398%) y no ha sido descrita previamente en las bases de datos de patología; y la variante de cambio de sentido c.1679A>T, que se clasifica en la base de datos DVD como VSI por falta de información. Sin embargo, las variantes de cambio de sentido en el gen *TMC1* son una causa conocida de patogenicidad, su frecuencia en población general es muy baja (GnomAD *Exomes*: 0,00159%) y los predictores bioinformáticos la clasifican como deletérea (CADD=32). El fenotipo del paciente P064 es el característico de la HA de herencia AR DFNB7/11: HA congénita, profunda y estable, y no tenía antecedentes familiares de HA.

En cuanto a las variantes candidatas identificadas en los pacientes P049 y P064, ambas son variantes de cambio de sentido en heterocigosis, y tanto el paciente P049 como el P064 presentan HA leve de inicio postlingual y progresiva, fenotipo consistente con DFNA36. Además, refieren antecedentes familiares de HA con patrón de herencia AD. Los audiogramas de estos dos pacientes se muestran en la Figura 86.

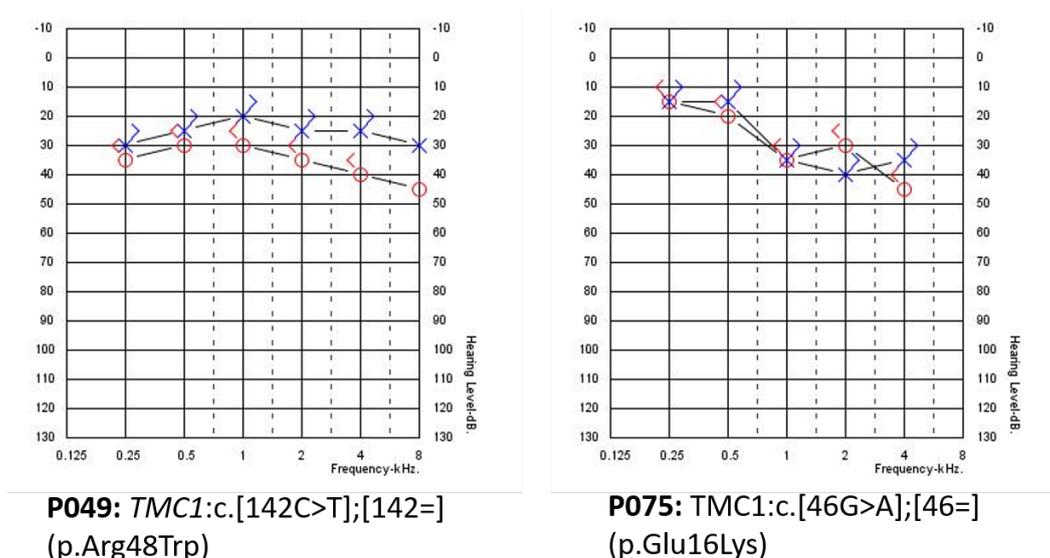


Figura 86. Audiogramas de los pacientes con variantes candidatas de DFNA36 en el gen TMC1.

Sin embargo, las evidencias disponibles sobre estas VSI no son suficientes para atribuirles la causalidad de la HA en estos pacientes. En el caso del paciente P049, la variante c.142C>T es una variante nueva no descrita previamente en ClinVar, HGMD o DVD; tampoco se ha encontrado en población general (GnomAD) y aunque las predicciones bioinformáticas son contradictorias, el CADD score es de 23,6, lo que orienta a un carácter patogénico. Pero este paciente también presenta otra VSI en heterocigosis en el *COL11A2*, que ha sido relacionado con HA AD (DFNA13). Sin embargo, las evidencias que apoyan la relación de este gen con la HA AD son aún moderadas según *ClinGen*, mientras que en el caso del gen *TMC1*, se considera definitivamente relacionado con HA AD, debido a evidencias de cosegregación con la HA en múltiples familias y la existencia de modelos animales, pruebas funcionales, estudios de expresión y rescate en modelos de ratones que la apoyan. Por tanto, consideramos que, en el paciente P049, la variante *TMC1* cumple más criterios para ser considerada variante candidata, restando importancia a la variante en el gen *COL11A2*.

Respecto al caso P075, la variante c.46G>A es una variante *de cambio de sentido* que se encuentra descrita en ClinVar como VSI, y ha sido clasificada por DVD como probablemente benigna en base a las predicciones bioinformáticas, ya que múltiples predictores la clasifican como tolerada (CADD score: 14,9) y se presenta en el 0,04% en población general europea según GnomAD. Sin embargo, estas evidencias no son suficientes para descartar su patogenicidad, es una variante de cambio de sentido y el fenotipo del paciente es consistente con DFNA36, por lo que la consideramos variante candidata se ser la causa de la HA en este paciente.

Tanto en el caso P049 como en el P075 es necesario realizar el estudio de segregación para establecer si las variantes candidatas cosegregan con la enfermedad en cada una de las familias. Esto no ha sido posible por no disponer de muestra de los familiares de estos pacientes.

4.12. Gen *TMPRSS3*

Las variantes patogénicas en el gen *TMPRSS3* son causa de HA DFNB8/10, de herencia AR, que en el caso de DFNB10 suele ser de inicio prelingual y en DFNB8 postlingual (101). La hipoacusia puede ser leve o severa, dependiendo de la naturaleza de las variantes implicadas y de los dominios a los que éstas afectan (99).

Un paciente (P077) fue diagnosticado de hipoacusia HA relacionada con el gen *TMPRSS3* (Tabla 27).

Tabla 27. Paciente con HA relacionada con el gen *TMPRSS3* diagnosticado en este estudio.

ID Paciente	Variante		Dominio	Estado	Patología	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P077	c.208delC	p.His70Thrfs*19	LDLRA	Homocigosis	DFNB10	Congénita	Severa	Desconocido

En el paciente P077 se identificó la variante c.208delC en homocigosis, que genera un codón de parada prematuro en la proteína. Esta variante es conocida y ha sido previamente descrita en varias familias, entre ellas, una familia española con hipoacusia AR severa-profunda de inicio prelingual (101(150)). El paciente P077 presentaba hipoacusia profunda congénita y esporádica, que cuadra con el fenotipo esperado de las variantes severas causantes de DFNB10, que generalmente son de truncamiento.

4.13. Gen *WFS1*

Las alteraciones en el gen *WFS1* se asocian a un espectro de patologías que incluye: 1) el síndrome de Wolfram 1, AR, que se caracteriza por diabetes tipo 1, diabetes insípida, HA, atrofia óptica bilateral y signos neurológicos; 2) el síndrome Wolfram-like, AD y que consiste en la tríada de diabetes mellitus de inicio en adulto, HA progresiva de frecuencias bajas y moderadas de inicio en la primera década de la vida y atrofia óptica de inicio juvenil; y 3) la hipoacusia DFNA6/14/38, de herencia AD.

Una paciente (P069) fue diagnosticada de hipoacusia relacionada con *WFS1*. Además, dos de los casos no concluyentes presentaban variantes candidatas en el gen *WFS1* (Tabla 28).

Tabla 28. Paciente diagnosticado de HA relacionada con el gen *WFS1* y pacientes con VSI candidatas en dicho gen.

ID Paciente	Variante		Estado	Patología	Herencia	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P069	c.2051C>T	p.Ala684Val	Heterocigosis	Sd. Wolfram-like	AD	Congénita	Profunda	Estable
PACIENTES CON VARIANTES CANDIDATAS								
P039	c.1106A>C	p.Lys369Thr	Heterocigosis	Sd. Wolfram-like/ DFNA6/14/38	AD	Prelingual	Profunda	Progresiva
P085	c.976G>A	p.Ala326Thr	Heterocigosis	Sd. Wolfram-like/ DFNA6/14/38	AD	Postlingual	Profunda	Progresiva

La paciente P069 presentaba hipoacusia congénita profunda esporádica. En el momento de la consulta de la historia clínica la paciente tenía 10 años de edad y no se evidenciaban alteraciones oftalmológicas exceptuando una ligera hipermetropía. La variante de cambio de sentido identificada en este paciente, c.2051C>T (p.Ala684Val), ha sido descrita por múltiples autores como patogénica y causante de hipoacusia AD DFNA6/14/38 con atrofia óptica y síndrome *Wolfram-like* AD, y de síndrome de Wolfram cuando se encuentra en *trans* con otra variante patogénica en el gen *WFS1*. Al no haberse identificado en esta paciente otra variante patogénica en este gen, el diagnóstico más probable es el de síndrome *Wolfram-like*. La ausencia de otras alteraciones como atrofia óptica puede deberse a que ésta generalmente es de aparición más tardía (151).

En cuanto a las dos variantes candidatas identificadas en los pacientes P039 y P085, ambas son variantes de cambio de sentido en heterocigosis. En el paciente P039 se identificó la variante c.1106A>C (p.Lys369Thr), que ha sido registrada en ClinVar y DVD como VSI. Sin embargo, su frecuencia en población general es muy baja (GnomAD *Exomes*: 0,0087%; ausente en GnomAD *Genomes*), múltiples predictores bioinformáticos predicen su efecto como deletéreo (entre ellos el CADD score: 24,2) y las variantes de cambio de sentido son una causa conocida de HA relacionada con el gen *WFS1*, por lo que consideramos esta variante como candidata. Algo similar ocurre con la variante encontrada en P085, c.976G>A (p.Ala326Thr), que afecta a un aminoácido altamente conservado del dominio hélice transmembrana, clasificada como VOUS por DVD, con un CADD score de 22,7 y presente en población general (GnomAD: 0,011%). Además, la HA se detectó a los 7 años en este paciente. Sin embargo, la historia familiar refiere consanguinidad (padres primos) y los casos de HA en esta familia parecen mostrar un patrón de herencia AR.

Las tres variantes que hemos identificado en el gen *WFS1* se localizan en el exón 8, que es el de mayor tamaño del gen y donde se localizan la mayoría de las variantes patogénicas (152). Sin embargo, se han descrito también múltiples variantes de cambio de sentido benignas en este exón (153). La variante c.2051C>T (p.Ala684Val) se localiza en el dominio C-terminal del interior del retículo

Resultados

endoplásmico, región con más variantes patogénicas descritas hasta la fecha (Figura 87). Las variantes candidatas c.976G>A (p.Ala326Thr) y c.1106A>C (p.Lys369Thr) se encuentran en la región transmembrana y en una de las asas citosólicas de la hélice, respectivamente, donde han sido identificadas otras variantes de cambio de sentido patogénicas.

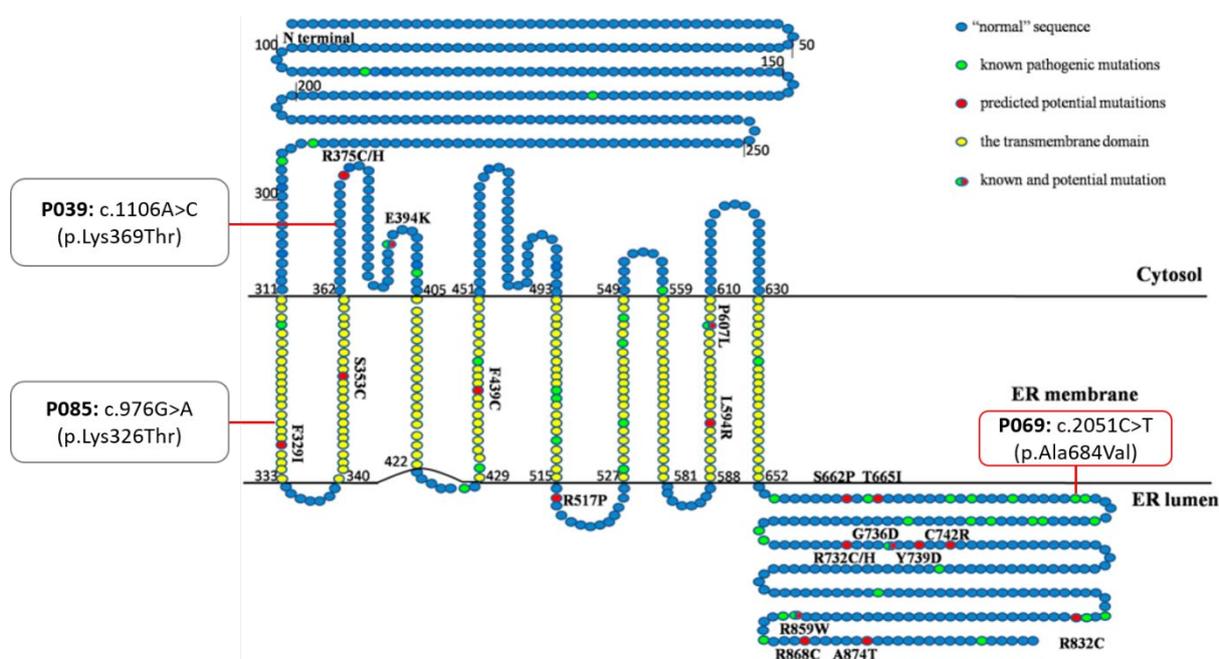


Figura 87. Estructura de los dominios transmembrana de la proteína wolframina y distribución de variantes patogénicas. Los círculos azules representan la secuencia normal de aminoácidos. Los círculos verdes representan la posición de algunas de las variantes patogénicas conocidas. Los círculos rojos representan variantes con predicción potencialmente patogénica según el estudio de Qian et al. (152). Los círculos amarillos representan los aminoácidos que forman los dominios transmembrana. Las variantes encontradas en nuestro trabajo y su localización se muestran enmarcadas (en recuadro rojo la variante patogénica y en recuadro gris las variantes candidatas). Modificado de Qian et al. (152).

Otro aspecto a tener en cuenta es el fenotipo de la HA, que en el caso del gen *WFS1* suele mostrar un audiograma característico con HA de predominio en frecuencias bajas y moderadas. Sin embargo, aunque no se pudo conseguir el audiograma del paciente P039, según la información disponible en la historia clínica y los audiogramas de los pacientes P069 y P085, ninguno presenta ese perfil audiológico característico (Figura 88). Este hecho parece ir en contra de la patogenicidad de las variantes candidatas encontradas, y podría explicarse de distintas maneras: 1) las variantes candidatas no son realmente la causa de la HA de estos pacientes; 2) la HA de los pacientes, al ser progresiva, ha evolucionado a un audiograma más plano; ó 3) dicho perfil audiológico no se cumple en todas las variantes que afectan al gen *WFS1*. Serán necesarios estudios de segregación para ver si las variantes

cosegregan con la HA en estas familias con el fin de obtener mayor información que ayude a dilucidar la relevancia clínica de estas variantes candidatas.

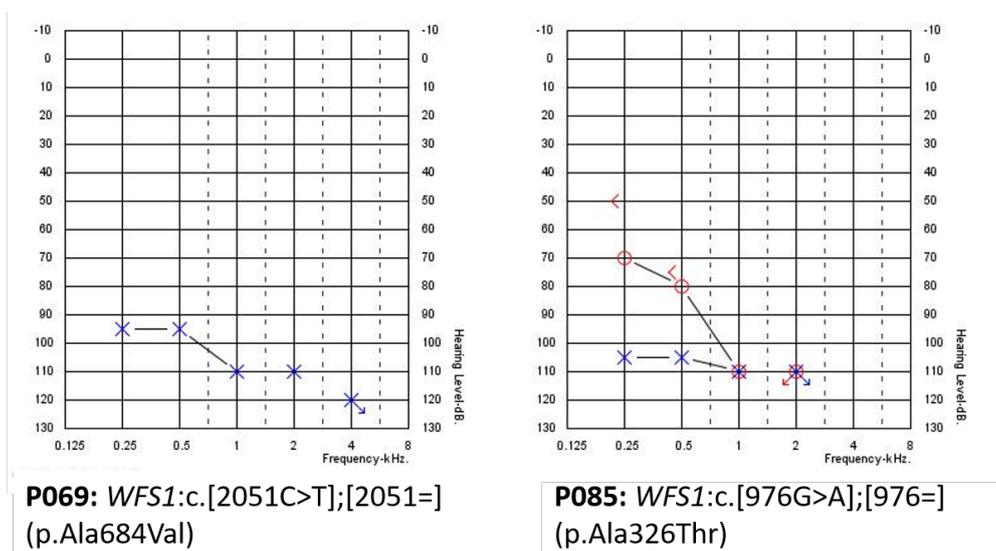


Figura 88. Audiogramas de los pacientes P069 y P085. El audiograma del paciente P039 no pudo obtenerse.

4.14. Gen *ILDR1*

Un paciente fue identificado de HA relacionada con el gen *ILDR1* DFNB42 (Tabla 29).

Tabla 29. Variantes identificadas en el gen *ILDR1* en este estudio.

ID Paciente	Variantes		Dominio	Estado	Origen	Inicio	Grado	Progresión
P023	c.280G>A	p.Asp94Asn	Ig-like	Heterocigosis	Paterno	Postlingual	Moderada	Estable
	c.434G>A	p.Cys145Tyr	Ig-like	Heterocigosis	Materno			

El paciente P023 presentaba dos variantes de cambio de sentido en el dominio *Ig-like* de la proteína, que tras el estudio de los progenitores se demostró que se encontraban en fase de acoplamiento *trans*. La HA del paciente era de inicio postlingual, estable y moderada, con una pérdida predominante en frecuencias altas.

Ambas variantes se describen en DVD como VSI por falta de información, y no se encuentran en ClinVar ni HGMD.

Resultados

El audiograma del paciente P023 se muestra a continuación (Figura 89).

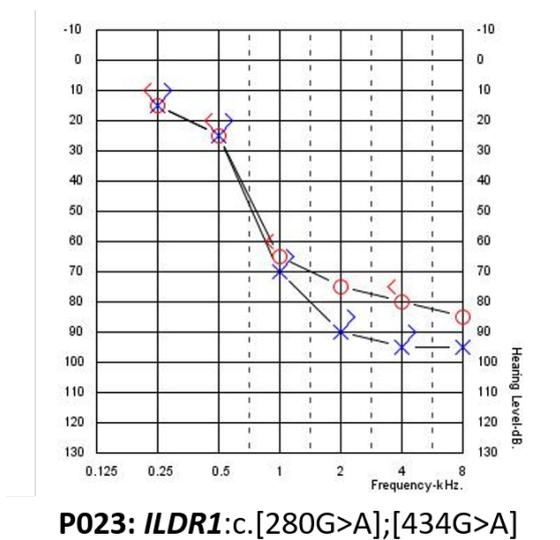


Figura 89. Audiograma del paciente P023, con dos variantes de cambio de sentido en el dominio Ig-like del gen ILDR1.

Aunque el fenotipo de las variantes en *ILDR1* causantes de DFNB42 ha sido descrito en general como HA severa en todas las frecuencias, se ha postulado que las variantes que afectan al dominio Ig-like de la proteína presentan un fenotipo auditivo diferente, con una caída brusca en frecuencias altas conocido como “perfil en pista de esquí” (61). Sin embargo, el número de variantes identificadas en dicho dominio es bajo, por lo que son necesarios más estudios. Nuestro trabajo apoya dicha hipótesis, ya que el paciente P023, con dos variantes de cambio de sentido en el dominio Ig-like, presenta un audiograma compatible con esa descripción (Figura 89).

4.15. Gen *MYH14*

El gen *MYH14* causa HA no sindrómica AD DFNA4 (OMIM#600652), que suele ser de inicio postlingual y progresiva; o síndrome de neuropatía periférica, miopatía distal, disfonía e HA AD (OMIM#614369), el cual ha sido reportado en una única familia (154).

Dos pacientes de este trabajo fueron diagnosticados de HA relacionada con *MYH14* DFNA4 (Tabla 30).

Tabla 30. Pacientes con variantes en *MYH14* identificados en este estudio. La variante nueva se resalta en color rosa.

ID Paciente	Variante		Dominio	Patología	Herencia	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P016	c.3439G>A	p.(Glu1147Lys)	Cola	DFNA4	AD	Congénita	Moderada	Estable

P030	c.1656G>A	p.(Pro552=)	Cabeza motora	DFNA4	AD	Congénita	Severa	Estable
------	-----------	-------------	---------------	-------	----	-----------	--------	---------

La paciente P016 presenta la variante de cambio de sentido c.3439G>A en heterocigosis. Esta variante no ha sido descrita previamente en ClinVar, HGMD o DVD, y tampoco se ha encontrado en población general (GnomAD: ausente). Múltiples predictores bioinformáticos la describen como patogénica (entre ellos, CADD: 26,8) y afecta a un residuo muy conservado de la cola de miosina, dominio en el que reside la especificidad de función de la proteína.

El fenotipo de la paciente P016 era de HA moderada, congénita y estable, y no existían antecedentes de HA en la familia. Este fenotipo no concuerda con las características típicas de la HA DFNA4 descritas en la literatura, que muestran una HA de inicio postlingual y progresiva (155). Sin embargo, un estudio más reciente ha identificado en dos familias con HA de herencia AD dos variantes nuevas en *MYH14* asociadas a HA congénita y prelingual respectivamente (156). Una de ellas es una variante de cambio de sentido localizada en la cabeza motora, y la otra una variante de truncamiento en el exón 2; ambas segregaban en múltiples individuos en las respectivas familias.

La paciente P030 presentaba una sustitución en el último nucleótido del exón 14 del gen *MYH14*, descrita en DVD como VSI. Esta sustitución, aunque sea un cambio sinónimo, según múltiples predictores bioinformáticos elimina el sitio dador del *splicing*. Además, afectaría a la cabeza motora, dominio crítico de la proteína. El fenotipo de HA de este paciente también era de inicio congénito, estable y esporádica, pero de grado severo, a diferencia del caso P016. No se pudo realizar el estudio de segregación en la familia por no disponer de muestra de los progenitores.

Los audiogramas de ambos pacientes se muestran a continuación (Figura 90).

Resultados

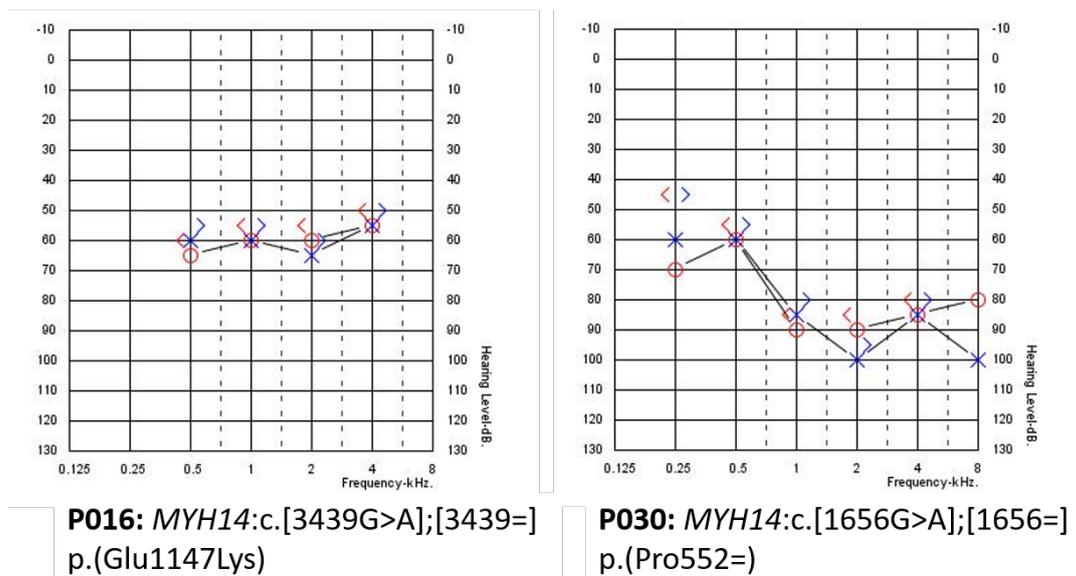


Figura 90. Audiogramas de los pacientes diagnosticados de DFNA4 relacionada con MYH14.

4.16. Gen *ESPN*

Las variantes patogénicas en el gen *ESPN* son causa de Síndrome de Usher tipo 1M (OMIM# 618632), HA AR DFNB36 e HA AD sin alteración vestibular (OMIM#609006).

Un paciente de este trabajo presentó HA asociada al gen *ESPN*. Además, otro paciente presentó una variante candidata en este gen (Tabla 31).

Tabla 31. Pacientes con variantes en el gen *ESPN* identificados en este estudio.

ID Paciente	Variante		Estado	Patología	Herencia	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P096	c.2230G>A	p.Asp744Asn	Heterocigosis	HA neurosensorial sin alteración vestibular	AD	Congénita	Profunda	Estable
PACIENTES CON VARIANTES CANDIDATAS								
P094	c.1426A>C	p.Lys476Gln	Heterocigosis	HA neurosensorial sin alteración vestibular	AD	Congénita	Moderada	Progresiva

El paciente P096 presentó en heterocigosis una variante de cambio de sentido descrita previamente como patogénica en DVD y HGMD. Un estudio funcional de esta variante demostró que afecta a la organización de los estereocilios (157), causando HA de herencia AD.

En el paciente P094 se identificó una variante de cambio de sentido en heterocigosis, clasificada por DVD como variante de significado incierto. La frecuencia poblacional de esta variante es relativamente baja (GnomAD: 0,0043%) y múltiples predictores bioinformáticos la describen como deletérea (entre ellos, CADD: 25,4).

El gen *ESPN* se asoció por primera vez a HA de herencia AD en 2006 (157), aunque es la única publicación que relaciona este gen con HA de herencia AD, donde reporta dos casos y una prueba funcional que demuestra el efecto de estas variantes sobre la organización y elongación de los estereocilios. Aunque no se han descrito evidencias que contradigan esta asociación, tampoco se han publicado más evidencias a favor de ella, por lo que la asociación de este gen con HA de herencia AD se considera aún limitada (61).

Las variantes que presentamos en este trabajo pueden reforzar esta asociación, aunque es necesario realizar el estudio de segregación en los familiares de ambos casos.

4.17. Gen *PCDH15*

Las variantes patogénicas de truncamiento en el gen *PCDH15* son causa de síndrome de Usher tipo 1 AR, mientras que las variantes de cambio de sentido se asocian a HA AR DFNB23, aunque las evidencias disponibles aún son limitadas.

Una paciente de este estudio presentaba HA asociada al gen *PCDH15* (Tabla 32).

Tabla 32. Variantes identificadas en *PCDH15* en este estudio.

ID Paciente	Variante		Dominio	Origen	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P076	c.1120C>A	p.Gln374Lys	Cadherina	Desconocido	Prelingual	Profunda	Estable
	c.4673_4676delTTAG	p.Val1558Glufs*3	-				

En la paciente P076 se identificaron dos variantes en el gen *PCDH15*. La primera (c.1120C>A, p.Gln374Lys) es una variante de cambio de sentido en uno de los dominios cadherina de la proteína, donde otras variantes de cambio de sentido han sido reportadas como causantes de DFNB23. Esta variante ha sido descrita en DVD como de significado incierto, pero no se ha encontrado en población general (GnomAD: ausente) y múltiples predictores bioinformáticos la describen como deletérea.

Resultados

La otra variante, c.4673_4676delTTAG (p.Val1558Glufs*3) es una delección de 4 nucleótidos en el último exón del gen, que cambia el marco de lectura generando un codón de parada prematuro. Esta delección ha sido descrita en un artículo asociada a síndrome de Usher, aunque los autores no encontraron una segunda variante en el gen *PCDH15* y no presentan más evidencias (94). La variante está presente en población general, aunque su frecuencia no permite descartar su patogenicidad (GnomAD: 0,011% en europeos no finlandeses). Aunque las variantes de truncamiento en el gen *PCDH15* son un mecanismo conocido de síndrome de Usher tipo 1, al estar localizada esta delección en el último exón el ARNm resultante escaparía del mecanismo de NMD, por lo que presumiblemente la proteína será sintetizada, aunque de forma truncada, viendo reducida la longitud de su región citoplasmática C-terminal. Otra variante de truncamiento en el último exón ha sido reportada recientemente en una familia paquistaní asociada a DFNB23 (158), donde los autores postulan que la variante de truncamiento no produce síndrome de Usher en dicha familia porque el efecto de la pérdida de parte de la región C-terminal en la función de la proteína es leve, dando lugar a HA no sindrómica DFNB23. Nuestro paciente apoyaría esta teoría, siempre que se demuestre que ambas variantes están en *trans* y que no presenta alteraciones oculares, lo que requiere un seguimiento clínico a largo plazo. Además, la paciente presenta una hermana con HA, aunque no ha sido posible realizar un estudio de segregación por falta no disponer de muestra de la misma.

4.18. Gen *SIX5*

El gen *SIX5* ha sido asociado previamente síndrome a branquio-oto-renal (BOR), de herencia AD (159). Sin embargo, actualmente existen datos convincentes en contra de esta asociación (160-162), por lo que son necesarias más evidencias para apoyar o refutar el papel de este gen en esta enfermedad (61).

Un paciente de este trabajo (P009) presentaba una variante en el gen *SIX5* (Tabla 33).

Tabla 33. Variantes identificadas en el gen *SIX5*.

ID Paciente	Variante		Estado	Origen	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
P009	c.2098G>A	p.Asp700Asn	Heterocigosis	Paterno	Congénito	Severa	Estable

La variante identificada es una sustitución de cambio de sentido en heterocigosis que no ha sido descrita en DVD, HGMD o Clinvar, pero sí se ha encontrado en población general (GnomAD: 0,013% en europeos no finlandeses). Aunque las predicciones de los distintos predictores bioinformáticos son discordantes, el CADD score es de 24,1, lo que orientaría a su patogenicidad.

El paciente P009 presentaba HA esporádica de inicio congénito, aparentemente no sindrómica. Sin embargo, tras el estudio genético se observó que presentaba dilatación vestibular en ambos oídos, signo compatible con el síndrome BOR.

Al realizar el estudio de segregación de los progenitores no afectados del paciente se observó que la variante es de origen paterno.

4.19. Gen *SOX10*

Las variantes patogénicas en el gen *SOX10* causan síndrome de Waardenburg tipo 4 AD, también conocido como síndrome de Waardenburg-Sha (OMIM#613266). Este síndrome se caracteriza por la asociación de síndrome de Waardenburg (HA neurosensorial y anomalías pigmentarias) y enfermedad de Hirschprung (megacolon agangliónico) (163).

Un paciente de este trabajo presentaba una variante candidata en el gen *SOX10* (Tabla 33).

Tabla 34. Variante candidata identificada en el gen *SOX10*. Al ser nueva, se resalta en color rosa.

ID Paciente	Variante		Estado	Origen	Inicio	Grado (GENDEAF)	Progresión
PACIENTE CON VARIANTE CANDIDATA							
P081	c.416G>A	p.Gly139Asp	Heterocigosis	Desconocido	Congénito	Severa	Estable

La variante encontrada es una sustitución de cambio de sentido en heterocigosis que no ha sido descrita previamente en DVD, HGMD, ó ClinVar, tampoco se ha encontrado en población general (GnomAD: ausente) y múltiples predictores bioinformáticos la catalogan como deletérea (entre ellos: CADD: 29). Sin embargo, siguiendo las guías clínicas, estas evidencias sólo permiten atribuirle la clasificación de VSI.

Al analizar las características clínicas que presenta el paciente, se observa una HA congénita severa que parece presentar un modo de herencia AD, con la madre y la abuela del paciente afectas de HA. Además, el paciente presenta alteraciones morfológicas en los conductos semicirculares, que suelen estar presentes en algunos pacientes con síndrome de Waardenburg. La historia clínica no refiere alteraciones digestivas que sugieran enfermedad de Hirschprung. En base a estas evidencias la consideramos como variante candidata.

No ha sido posible realizar en estudio de segregación en la familia por no disponer de muestra de los familiares.

5. Variantes nuevas

Se han considerado variantes nuevas aquellas que no se encuentran descritas en las bases de datos de patología o en la literatura científica. La ausencia de la variante en población general (GnomAD) se ha considerado una evidencia a favor de su patogenicidad, pero no como un criterio necesario para considerar la variante como nueva.

Se identificaron en total 18 variantes en 15 pacientes de nuestra cohorte. El gen con un mayor número de variantes nuevas fue *MYO15A* (4/18, 22% del total de variantes nuevas identificadas), seguido del gen *OTOF* (3/18, 17% de todas las variantes nuevas identificadas).

Las variantes nuevas identificadas en esta tesis se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35. Variantes nuevas asociadas a HA detectadas en nuestra cohorte.

Gen	Variante		Estado	Pacientes
<i>STRC</i>	c.4403G>C	p.Arg1468Pro	Hemicigosis	P006
<i>OTOF</i>	c.1404delA	p.Val469Cysfs*27	Heterocigosis	P025
	c.5125G>T	p.Asp1709Tyr	Heterocigosis	
	c.1469delC	p.Pro490Hisfs*6	Heterocigosis	P103
<i>MYO15A</i>	c.2740G>A	p.Glu914Lys	Heterocigosis	P028
	c.6004delG	p.Glu2002Argfs*27	Heterocigosis	P028, P092
	c.3874T>C	p.Phe1292Leu	Homocigosis	P050
	c.4596+4A>G	-	Heterocigosis	P092
<i>LOXHD1</i>	c.232delC	p.Gln78Serfs*20	Heterocigosis	P043
	c.4663G>T	p.Glu1555*	Heterocigosis	
<i>MYO6</i>	c.2544delA	p.Lys848Asnfs*9	Heterocigosis	P020
<i>MYO7A</i>	c.5722T>A	p.Phe1908Ile	Heterocigosis	P082
<i>TMC1</i>	c.645C>A	p.Tyr215*	Heterocigosis	P064
	c.142C>T	p.Arg48Trp	Heterocigosis	P049
<i>MYH14</i>	c.3439G>A	p.(Glu1147Lys)	Heterocigosis	P016
<i>ATP2B2</i>	c.1067-2A>G	p.?	Heterocigosis	P061
<i>HGF</i>	c.2168A>G	p.Tyr723Cys	Heterocigosis	P055
<i>SOX10</i>	c.416G>A	p.Gly139Asp	Heterocigosis	P081

IV. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Muchos estudios han descrito la importante etiología genética de la HA no sindrómica y su gran heterogeneidad, con más de 100 genes asociados descritos hasta la fecha (Hereditary Hearing Loss Homepage, 2020). Sin embargo, la prevalencia de estos genes varía ampliamente en función de la población estudiada. La información a este respecto en población europea y en concreto en la española es escasa, y la mayoría de los artículos publicados son referentes a los genes *GJB2*, *OTOF* y variantes patogénicas mitocondriales (31, 43, 54, 117, 164). En el caso de la población del País Vasco no hay publicaciones al respecto. Por tanto, el objetivo de este estudio ha sido identificar las causas de origen genético de la HA en el País Vasco.

Se han estudiado 100 pacientes residentes en el País Vasco siguiendo una aproximación secuencial que ha permitido el diagnóstico de 62 de ellos (62%). Esta tasa diagnóstica es alta si la comparamos con estudios publicados previamente en otras poblaciones, en los que el rendimiento diagnóstico ronda el 40%: 42% en España (34), 40% en Japón (165), 39% en Estados Unidos (94), 48% en Francia (92), 33% en Holanda (69). Aunque los datos son difíciles de comparar por los distintos criterios de selección de pacientes y las diferencias en los genes estudiados, el rendimiento diagnóstico obtenido en este estudio es claramente mayor. Esto puede deberse a varios motivos: por un lado, a la aproximación diagnóstica secuencial utilizada, que empieza por las causas más comunes de HA y se complementa con un panel ampliado de unos 90 genes individualmente menos frecuentes pero que en conjunto suponen un porcentaje semejante al de los genes del estudio básico (32% de rendimiento con el estudio básico vs 30% de rendimiento con el panel de 90 genes). Por otro lado, se ha utilizado una combinación de metodologías que permite detectar diferentes alteraciones génicas que incluyen desde mutaciones puntuales, deleciones exónicas o alteraciones en el número de copias (CNV) para algunos de los genes estudiados. Además, la selección de pacientes también ha jugado un papel fundamental, ya que está demostrado que, en los casos esporádicos de HA, la inclusión de casos únicamente bilaterales aumenta el rendimiento diagnóstico (98, 166). Por último, también puede favorecer este aspecto la selección de pacientes con inicio de HA en edad pediátrica, ya que de esta manera se evita el factor distorsionante de la presbiacusia (pérdida auditiva gradual debida al envejecimiento) u otras causas no genéticas de HA adquirida en etapas más tardías de la vida.

Por otra parte, los datos obtenidos en esta tesis muestran que la tasa diagnóstica varía en función de las características de la HA. Este hecho es especialmente llamativo si tenemos en cuenta el momento de inicio de la misma, ya que el rendimiento diagnóstico en el grupo de HA congénitas es del 68% frente al 40-50% obtenido en las HA de inicio más tardío. Lo mismo ocurre con la HA profunda, con un

68% de tasa diagnóstica, aunque la diferencia respecto al resto de grados de HA es menor. Estos datos confirman los hallazgos de estudios previos: la etiología genética es mayor en la HA congénita profunda (94). La presencia de antecedentes familiares de HA en nuestro caso no aumenta la tasa diagnóstica global y su ausencia la disminuye ligeramente al 58%, en menor medida respecto a lo descrito en la bibliografía publicada (94). Esto se debe probablemente a los criterios de selección de nuestra cohorte previamente mencionados (166).

Prevalencia de los genes implicados en HA no sindrómica de origen genético en el País Vasco

Los genes más frecuentemente implicados en los pacientes diagnosticados en este estudio son, de mayor a menor frecuencia, el gen *GJB2* (24 de los 62 pacientes diagnosticados, 39%), *STRC* (7/62, 11%), *OTOF* (6/62, 10%), *MT-RNR1* (4/62, 6%), *MYO15A* (4/62, 6%) y *TECTA* (3/62, 5%). Las herencias de las HA de los pacientes diagnosticados fueron AR (76%), AD (18%) y mitocondrial (6%). La distribución por tipo de herencia en nuestra cohorte concuerda en gran medida con lo publicado por otros autores, según los cuales el 70-80% de las HA no sindrómicas son de herencia AR y aproximadamente el 20% de herencia AD (28). La HA ligada al cromosoma X se considera mucho menos frecuente a nivel mundial, representando aproximadamente el 1% de las HA genéticas en países de occidente (29). En este trabajo no se ha identificado ningún caso de HA ligada a X.

La HA mitocondrial merece una mención aparte, ya que se han descrito grandes diferencias de prevalencia en diferentes poblaciones. En este estudio, 4 de los 100 pacientes presentan una variante patogénica mitocondrial, lo que supone una prevalencia del 4%. Las variantes m.1555A>G y m.1494C>T están representadas en la misma proporción, suponiendo el 2% (2/100) cada una de ellas. La mayoría de la bibliografía publicada sobre HA mitocondrial se refiere a la variante patogénica m.1555A>G. Los estudios en población no española describen un 0.6-2.5% de prevalencia en pacientes caucásicos con HA no sindrómica en general (167), similar a la obtenida en nuestra cohorte para esta variante. Sin embargo, su prevalencia en población española es llamativamente elevada, con frecuencias que van desde el 17 al 27% en varios estudios publicados por distintos autores (31, 117, 168). Las altas cifras obtenidas en dichos estudios son probablemente debidas a las cohortes estudiadas, que incluyen mayoritariamente pacientes con HA familiar, de inicio postlingual y tratados con aminoglucósidos, características que generan un sesgo a favor de la HA mitocondrial. Nuestra cohorte es más heterogénea que la de los estudios españoles citados, ya que los casos hereditarios suponen el 50% (50/100) y los postlinguales solamente el 14% (14/100). Por tanto, la prevalencia del 2% observada para la variante m.1555A>G refleja mejor la verdadera presencia de dicha variante en nuestra población. Además, concuerda con la descrita en población caucásica, por lo que es probable

Discusión

que un estudio en población española sin sesgos de herencia, edad de inicio de HA ni antecedentes de tratamiento con aminoglucósidos proporcione prevalencias similares a las descritas en nuestra cohorte. Respecto a la variante mitocondrial m.1494C>T, identificada en 2/100 de pacientes en este estudio (2%), el número de estudios publicados es mucho menor. Tras haber sido reportada por primera vez en 2004 (169), el único estudio realizado en población española describe una prevalencia del 0,3% en una cohorte de más de 1300 pacientes españoles con HA no sindrómica (30). En nuestra cohorte, sin embargo, la prevalencia de esta variante es mayor (2%, 2/100) e igual a la de la variante m.1555A>G, hecho que no ha sido observado en la bibliografía publicada, por lo que podría reflejar una característica diferencial de la población del País Vasco.

Si nos centramos en cuáles son las principales causas genéticas de HA en nuestra población, los resultados de nuestro estudio muestran que la causa más frecuente son las alteraciones en el gen *GJB2* (24/100, 24% de los pacientes estudiados; 24/62, 39% de los pacientes diagnosticados), igual que ocurre en otras poblaciones caucásicas y en especial del sur de Europa. Un estudio previo describe una prevalencia del gen *GJB2* del 46% en familias de España e Italia con HA AR (170). En nuestra cohorte este gen está implicado en el 49% (23/47) de los pacientes diagnosticados con HA AR, porcentaje similar al de dicha publicación. Además, la variante patogénica más frecuente en nuestra cohorte (c.35delG) es también la más frecuente en Europa, Oriente Medio, norte de África y en áreas pobladas por inmigrantes originarios de estas regiones (171). En concreto, en este trabajo supone un 66% (31/47) de los alelos patogénicos identificados en *GJB2*, porcentaje mayor que el descrito previamente en pacientes españoles, que era del 55% (170). Por tanto, podemos decir que la implicación del gen *GJB2* en la población del País Vasco y en concreto de la variante c.35delG, es equivalente y confirma lo observado en población española, por lo que no existen diferencias en cuanto a la principal causa de HA entre estas dos poblaciones.

Las grandes deleciones en *GJB6* (del(*GJB6*-D13S1830) y del(*GJB6*-D13S1854)) han sido identificadas en 2 de 100 pacientes de este estudio respectivamente. Así, cada deleción supone un 4% de todos los alelos patogénicos en *GJB2* (2/47). Estas cifras difieren de lo publicado en población española, donde la deleción del(*GJB6*-D13S1830) representa aproximadamente un 8% de los alelos patogénicos en *GJB2* en pacientes de Madrid y Barcelona, mientras que la deleción del(*GJB6*-D13S1854) supone un 2.2% de los alelos patogénicos en España (54). Según nuestros resultados, la prevalencia de la deleción del(*GJB6*-D13S1830) en el País Vasco es la mitad de la descrita en población española y equivalente a la de la deleción del(*GJB6*-D13S1854), aunque estos resultados pueden deberse al bajo número de casos encontrados en nuestra cohorte y al tamaño muestral.

La segunda causa de HA en nuestra cohorte son las alteraciones en el gen *STRC* (7/100, 7% de los pacientes estudiados; 7/62, 11% de los pacientes diagnosticados), por delante de los genes *OTOF* y *MT-RNR1*, considerados causas frecuentes de HA en población española (172). Hay que destacar que estos 7 pacientes presentan la delección de al menos una de las copias de este gen, lo que refleja la relevancia de esta alteración como causa de HA y la necesidad de incluir su estudio en el diagnóstico genético rutinario de la HA. Esta necesidad ha sido resaltada previamente por varios autores (92, 99, 173, 174) y en los últimos años se han publicado varios trabajos que describen las alteraciones en el gen *STRC* como segunda causa de HA tras el gen *GJB2* en población europea (90-92). Sin embargo, la información disponible en población española es muy limitada: hasta la fecha, sólo existe una publicación que incluya el gen *STRC* y describe una frecuencia del 4% (2/50) en una cohorte de pacientes con HA con resultado negativo para *GJB2*, *OTOF* y *MT-RNR1* (34). En los resultados obtenidos en dicho estudio, el gen *STRC* se encuentra en sexto lugar en cuanto a frecuencia, por detrás de los genes *GJB2*, *OTOF*, *MT-RNR1*, *ACTG1* y *USH2A*. Si excluimos de nuestros resultados los pacientes con HA relacionada con alguno de estos genes para poder comparar nuestros resultados con los de Cabanillas *et al.*, la HA causada por el gen *STRC* supone un 11% (7/66), más del doble de lo observado por dichos autores. Esto puede ser debido a la metodología utilizada para la detección de las delecciones en *STRC*, ya que en nuestra aproximación utilizamos un cribado de delecciones por *ddPCR* que excluye específicamente el pseudogén, mientras que Cabanillas *et al.* utilizan un algoritmo bioinformático a partir de los datos de la NGS que probablemente tenga una menor sensibilidad. Algo similar ocurre en los estudios publicados en distintas poblaciones europeas, que reportan prevalencias que varían desde el 0,8% hasta el 14% (69, 88, 90-92); y en un estudio multiétnico realizado en Estados Unidos se describe una frecuencia global de HA relacionada con *STRC* del 16%, que aumenta hasta el 20% si se restringe el análisis a la etnia caucásica (94). Si nos centramos en la metodología utilizada para la detección de CNV en *STRC* en estos estudios, las cifras más bajas de prevalencia coinciden con los estudios que utilizan algoritmos bioinformáticos basados en los resultados de la NGS (34, 69, 92, (175), mientras que las cifras más altas y que se asemejan más a la nuestra corresponden a los que utilizan un método de cribado específico para detección de CNV en *STRC* (88, 90, 91) o paneles de NGS enriquecidos en esa región para mejorar su detección (94). Por tanto, nuestros resultados demuestran que las alteraciones en el gen *STRC* son la segunda causa de HA en nuestra población, con una prevalencia menor al gen *GJB2* y similar a lo encontrado en población europea, y que su estudio requiere una aproximación específica para detección de las CNV que permita discriminar entre el gen y el pseudogén para aumentar la sensibilidad. Probablemente, un estudio de población española mediante este tipo de tecnologías muestre una prevalencia mayor a la observada por Cabanillas *et al.* y similar a la que hemos obtenido en nuestra cohorte.

Discusión

Dada la relevancia de las deleciones en *STRC* como causa de HA y basándonos en las publicaciones al respecto que destacan la alta frecuencia de portadores heterocigotos sanos de deleciones del gen *STRC* en población general (69, 92, 95, 167), hemos querido determinar en este estudio la frecuencia de portadores en el País Vasco. El resultado obtenido es una frecuencia de portadores de 1/66 individuos (4 de 264 individuos normoyentes estudiados), cifra que cumpliría criterios de variante polimórfica en población general (>1%) y que, además, concuerda con las cifras reportadas previamente (1.6% Knijnenburg *et al.*; 1.09% Hoppman *et al.*) (89, 95). Sin embargo, no se disponen de datos referentes a población española para poder realizar una comparación.

La prevalencia de HA relacionada con el gen *OTOF* en nuestra cohorte es del 6% (6/100 pacientes estudiados) y supone el tercer gen más frecuentemente implicado siguiendo estrechamente al *STRC*. Aunque la variante más prevalente en nuestra cohorte es la recurrente en población española c.2485C>T (p.Gln829*), representando la mitad de los alelos patogénicos en *OTOF*, en nuestro estudio se han encontrado tres variantes no descritas previamente. Un estudio realizado en población española describe que al menos un 8% de las HA AR prelinguales profundas están causadas por variantes patogénicas bialélicas en *OTOF* (172). En dicho estudio se realizó un cribado inicial de la variante c.2485C>T seguido de la búsqueda de una segunda variante patogénica en aquellos pacientes con resultado heterocigoto. Con el fin de poder realizar una comparación, si seleccionamos en nuestra cohorte aquellos pacientes en los que al menos una de las variantes sea c.2485C>T y que presentan HA profunda prelingual (incluyendo la congénita), la prevalencia que obtendríamos sería del 8,3%, equivalente a la descrita en dicho estudio. Aunque estas cifras muestran que la representación de la variante c.2485C>T en el País Vasco es la misma que en población española, nuestros resultados reflejan la relevancia de otras variantes en el gen *OTOF*. Mediante el cribado inicial de la variante recurrente c.2485C>T habríamos diagnosticado sólo el 67% (4/6) de los pacientes con HA relacionada con el gen *OTOF* de nuestra cohorte. Dicha aproximación suponía antiguamente una ventaja a nivel técnico, pero actualmente, con la implantación de la NGS, ha dejado de tener sentido. Por otro lado, al seleccionar sólo los pacientes con HA profunda también se infradiagnostica la HA relacionada con *OTOF* ya que, en nuestro estudio, 2 de los 6 pacientes con HA por *OTOF* presentan HA severa. Es decir, la aproximación utilizada en nuestro estudio, que es independiente del fenotipo de HA del paciente y que no se centra en *hotspots* o variantes recurrentes en la población estudiada, se traduce en un mayor rendimiento diagnóstico. Por otra parte, nuestros resultados muestran que la prevalencia de HA relacionada con *OTOF* en el País Vasco es muy superior a la observada en otras poblaciones a nivel mundial, al igual que ocurre en población española. En un estudio de 200 pacientes de origen holandés no se encontró ningún caso relacionado con el gen *OTOF* (69); en población belga con HA se ha

encontrado una prevalencia menor del 1% (1/131) (175), similar a la reportada en Estados Unidos (9/1119) (94); y la prevalencia en Japón es del 2% (31/2265) (176). Por tanto, el gen *OTOF* es de gran relevancia como causa de HA en el País Vasco y no parece diferenciarse de la población española en este aspecto.

El gen *MYO15A* representa junto con el gen mitocondrial *MT-RNR1* (al cual nos hemos referido al inicio de este apartado) la cuarta causa de HA en nuestra cohorte (4/100, 4% de prevalencia para cada uno de estos genes; 4/62, 6% de los pacientes diagnosticados en cada caso). Esta cifra resulta difícil de comparar con la de otras poblaciones por los motivos previamente descritos de diferencias en los pacientes y genes incluidos en cada estudio. Un meta-análisis publicado recientemente sobre la prevalencia de HA por el gen *MYO15A* (177) describe una frecuencia global mundial de HA por *MYO15A* del 6% en pacientes con resultado negativo para *GJB2*, aunque varía ampliamente en función del país: desde una prevalencia del 2% en Japón o Guatemala por ejemplo, hasta un 10% en Argelia o Corea; y la población española, con una prevalencia del 2% en pacientes negativos para *GJB2*, *MT-RNR1* y *OTOF* (34), se encuentra entre las más bajas a nivel mundial (177). Sin embargo, si calculamos la frecuencia de HA por *MYO15A* en pacientes negativos para *GJB2*, *MT-RNR1* y *OTOF* en nuestra cohorte, obtenemos una frecuencia del 6% (4/66), el triple de lo observado en población española por Cabanillas *et al.* En un estudio multiétnico de 160 familias con HA familiar AR (≥ 2 individuos con HA en la misma familia) y resultado negativo para variantes patogénicas en *GJB2*, el gen *MYO15A* estuvo implicado en el 13% (12/90) de los pacientes diagnosticados (178). Seleccionando en nuestra cohorte los pacientes con dichas características para poder comparar las cifras, el gen *MYO15A* está implicado en el 9% de los casos diagnosticados (2/22), cifra ligeramente menor al estudio de Bademci *et al.* Sin embargo, las prevalencias descritas en población Europea y de Estados Unidos por otros autores están entre el 2-3% (179) (94) (69) (92) (180). De todo lo anterior lo que podemos concluir es que la prevalencia de HA por este gen en nuestra cohorte (4/100, 4%) es mayor a lo publicado en población española y europea, pero que es necesario realizar más estudios con un número mayor de pacientes y con homogeneidad de criterios de selección de los mismos para establecer la verdadera prevalencia de las mutaciones en este gen en las distintas poblaciones. Hay que destacar que en tres de los cuatro pacientes (75%) con HA por alteración del gen *MYO15A* las variantes encontradas son nuevas. Además, una de ellas (c.6004delG) ha sido identificada en dos de esos pacientes sin relación familiar conocida entre ellos, por lo que podríamos especular que se trata de una variante fundadora en nuestra población. Por otro lado, otra de las variantes nuevas (c.1657delC) se encuentra en homocigosis en uno de los pacientes, que es de etnia gitana y con consanguinidad conocida en la familia. Este alto porcentaje de variantes nuevas podría deberse al gran tamaño del gen *MYO15A*, que

Discusión

contiene 66 exones, lo que aumenta la probabilidad de error de la polimerasa y la aparición de variantes nuevas. Sin embargo, Bademci *et al.* en su estudio de 160 familias con HA AR negativas para alteraciones en el gen *GJB2*, no observan correlación entre el tamaño de transcrito de los genes y el número de alelos mutados (178). Al contrario, describen que genes pequeños como el *TMC1* están entre los más propensos a variantes nuevas. Por tanto, es más probable que el alto porcentaje de variantes nuevas sea debido a que el gen *MYO15A* no ha sido estudiado en su totalidad de forma rutinaria hasta la aparición de la tecnología de NGS, precisamente debido a su gran tamaño.

El gen *TECTA*, que puede causar HA tanto AR como AD, se encuentra en nuestra cohorte en quinto lugar como causante de HA, con una prevalencia del 3% (3/100 pacientes estudiados, 3%; 3/62 pacientes diagnosticados, 5%), causando HA AD en los 3 casos identificados. Los datos referentes a otras poblaciones muestran frecuencias menores a la nuestra, con una prevalencia global del 1.5% en Europa (175) (69), y en Estados Unidos se han descrito prevalencias que van desde el 0,6% (178, 181) hasta el 2% (94). Nuestra prevalencia es muy similar a la observada en Estados Unidos por Sloan-Heggen *et al.* (23/1119 pacientes estudiados, 2%; 23/436 pacientes diagnosticados, 5%) (94). Si analizamos sólo los casos diagnosticados con HA AD, el gen *TECTA* es la principal causa de HA AD en nuestra cohorte (3/11 pacientes con HA AD, 27%) con valores equiparables a los del estudio de Sloan-Heggen *et al.*, (15/63, 24%). Sin embargo, en población española se ha reportado una frecuencia del 4% de las HA (17/374 casos familiares) (109) y en población europea está implicado solamente en el 4,5% de las HA AD (69), muy por debajo de lo observado en nuestra cohorte. El resto de publicaciones no diferencian la frecuencia de los genes implicados en función del tipo de herencia, por lo que no es posible realizar una comparación. Sería interesante conocer los datos específicos por etnia del estudio de Sloan-Heggen *et al.* para conocer el porcentaje de *TECTA* correspondiente a población caucásica y compararla con la española y europea, pero estos datos no están disponibles. Por tanto, con la evidencia actual sólo podemos concluir que la relevancia del gen *TECTA* en la población del País Vasco parece muy superior a la observada en población española y europea pero similar a la descrita en población multiétnica de Estados Unidos. Serán necesarios más estudios en cohortes de mayor tamaño en población española para determinar si la prevalencia del gen *TECTA* en nuestra cohorte es una característica diferencial de País Vasco.

Además de estos 6 genes, que representan en total el 77% de los casos diagnosticados, están implicados 10 genes más en el resto de los pacientes (*MYH14*, *MYO6*, *MYO7A*, *BSND*, *TMC1*, *LOXHD1*, *ILDRI1*, *WFS1*, *ESPN*, *TMPRSS3*), lo que vuelve a reflejar la gran heterogeneidad genética de esta patología. La relevancia de estos genes es menor, con un máximo de prevalencia del 2% (2/100) cada

uno de ellos. Hay que destacar que genes considerados causa frecuente de hipoacusia como *SLC26A4*, *COCH* o *POU3F4* no han sido identificados en ninguno de los pacientes de este estudio. El gen *SLC26A4* se asocia a síndrome de Pendred (HA neurosensorial con bocio eutiroideo frecuentemente subclínico hasta la segunda década de la vida) y a HA no sindrómica con acueducto vestibular alargado (DFNB4). Aunque este gen ha sido descrito como segunda causa de HA hereditaria por muchos autores (182, 183) (33), no se encuentra entre las causas de HA diagnosticadas en nuestra cohorte. Una explicación podría ser la exclusión de pacientes sindrómicos de nuestro estudio. Si revisamos estudios más recientes, las prevalencias descritas son menores al 1% en cohortes de HA no sindrómica del norte de Europa (175)(69). En España, Cabanillas *et al.* reportaron un único paciente (1/50, 2%) (34), mientras que no se encontró ningún caso en 207 pacientes franceses con HA (92). Otros autores describen prevalencias del 3-6%, aunque las cohortes incluyen pacientes sindrómicos y la mayoría de los pacientes diagnosticados de HA relacionada con *SLC26A4* son originarios de Asia u Oriente Medio (178) (94). Por tanto, es muy probable que el aumento del número de genes incluidos en el diagnóstico genético de la HA en los últimos años retire el segundo puesto al gen *SLC26A4* en favor de otros como *STRC*, *OTOF* o *MYO15A*, al menos en población caucásica.

Respecto al gen *COCH*, es bien conocido que las variantes de ganancia de función o dominantes negativas en heterocigosis causan HA AD de inicio a partir de la 2ª década de la vida, por lo que probablemente la selección de pacientes pediátricos (<19 años) en esta tesis sea la causa de que no haya sido identificado en ningún paciente de nuestra cohorte. Dos publicaciones recientes han demostrado que alteraciones bialélicas que provocan pérdida de función del gen *COCH* causan HA congénita AR, aunque hasta la fecha sólo se han descrito cuatro familias (96)(184). En cuanto al gen *POU3F4*, no hemos identificado ningún paciente con HA relacionada con este gen a pesar de estar descrita su implicación en la mitad de las HA ligadas al cromosoma X (113). La representación de este modo de herencia en el conjunto de las HA hereditarias es tan baja (1%) (28) que hace necesario un mayor tamaño muestral para determinar su relevancia real. Tampoco se han encontrado mujeres portadoras de variantes patogénicas en *POU3F4* en nuestra cohorte, por lo que no es posible confirmar ni descartar lo reportado por algunos autores sobre la presencia de HA en algunas mujeres portadoras de variantes patogénicas en este gen (113).

En resumen, según nuestros resultados, las causas de HA en el País Vasco son en general similares a las descritas en población española, con el gen *GJB2* como causa principal y el gen *OTOF* entre los más frecuentes. Sin embargo, existen diferencias entre ambas poblaciones en cuanto a la implicación de las variantes mitocondriales, que en nuestra población son mucho menos frecuentes que lo descrito

en población española, y en cuanto al gen *TECTA*, más prevalente entre nuestros pacientes con HA AD que en los españoles. Además, se han encontrado alteraciones en genes de gran relevancia como causa de HA que no están descritos hasta la fecha en población española pero que es probable que estén también implicados en gran medida, como es el caso de los genes *STRC* (segunda causa en el País Vasco) y *MYO15A*. Serán necesarios más estudios para confirmar estos supuestos.

Evidencias adicionales en relación a asociaciones gen-hipoacusia no definitivas

Ante el gran número de genes con asociación moderada o insuficiente a HA, uno de los objetivos de este estudio ha sido aportar evidencias que ayuden a esclarecer dichas asociaciones. Para ello, hemos analizado los 38 pacientes no diagnosticados utilizando los Paneles 2 y 3, y los resultados obtenidos se discuten a continuación.

1. Panel 2 (genes de evidencia moderada)

Los 10 genes incluidos en este panel (*ATP2B2*, *DIABLO*, *DIAPH3*, *GJB6*, *HARS2*, *HGF*, *KITLG*, *MIR96*, *SIX5* Y *TNC*) se consideran de evidencia moderada respecto a su asociación con HA no sindrómica (62). El filtrado mediante este panel nos ha permitido encontrar variantes de interés que podrían aportar nuevas evidencias respecto a la patogenicidad de los genes *ATP2B2*, *SIX5* y *HGF*:

El paciente P061 presenta HA moderada progresiva de inicio a los 5 años, que afecta principalmente a altas frecuencias. La historia familiar refiere una HA severa de inicio a los 6 años de edad en su madre. Se ha identificado la variante c.1067-2A>G en heterocigosis en el gen *ATP2B2*, que afecta un sitio canónico aceptor del *splicing*, por lo que probablemente dé lugar a una proteína truncada. Esta variante no se encuentra descrita previamente en las bases de datos de HA ni tampoco se ha encontrado en población general. El gen *ATP2B2* codifica la bomba de calcio PMCA2 de la membrana plasmática, que juega un papel fundamental en la excreción de ion calcio desde los estereocilios a la endolinfa y en el mantenimiento de la homeostasis en las células ciliadas del OI. Sin embargo, la evidencia actual respecto a la asociación este gen con HA se considera aún moderada (62). Existen varios modelos de ratón para el gen *ATP2B2* (185, 186) y se ha observado que los ratones heterocigotos para variantes de pérdida de función en *ATP2B2* desarrollan una HA rápidamente progresiva que afecta a altas frecuencias (187). Hasta el año 2018, el gen *ATP2B2* sólo se había asociado a HA en humanos como modificador de la HA AR causada por el gen *CDH23* (188) o como causante de HA de herencia digénica con dicho gen (189). Sin embargo, un estudio reciente ha descrito cinco pacientes con variantes de truncamiento heterocigotas en *ATP2B2* con HA postlingual progresiva AD, que no presentaban alteraciones en el gen *CDH23* (190). Nuestro paciente no presenta variantes

en el gen *CDH23*, y el fenotipo de su HA es compatible con lo descrito por Smits *et al* y lo observado en ratones modificados. Por tanto, existe una alta evidencia de que la variante c.1067-2A>G en el paciente P061 sea la causa de su HA. Estos resultados nos permiten aportar evidencia adicional a favor de la HA AD asociada a *ATP2B2*.

El paciente P009 presenta en heterocigosis la VSI c.2098G>A (p.Asp700Asn) en el gen *SIX5*. Este gen ha sido asociado con el síndrome branquio-oto-renal (BOR) aunque esta asociación está actualmente en entredicho. La variante es heredada de su padre sano, lo que no nos permite atribuirle claramente la causalidad de la HA del paciente P009. Esta variante ha sido descrita por la base de datos DVD como VSI y está presente en baja frecuencia en población general (GnomAD: 0.014%), aunque los predictores bioinformáticos sugieren un efecto patogénico. La relación causal del gen *SIX5* con la HA ha sido motivo de controversia durante años y lo sigue siendo en la actualidad. Este gen se asoció a HA en humanos por primera vez en 2007 (159) como causante de síndrome branquio-oto-renal (BOR) AD, que se caracteriza por defectos del arco branquial, HA y anomalías renales. Dicha asociación se fundamentaba en la interacción de este gen con el gen *EYA1* (principal causante de BOR) (191) y al hallazgo de variantes patogénicas en *SIX5* en pacientes con BOR (159). Sin embargo, el gen *SIX5* ha pasado de ser considerado en *PanelApp* gen de baja evidencia en 2016, a evidencia moderada en 2019 (momento en el que se incluyó en el Panel 2 de esta tesis), para volver a ser relegado en *PanelApp* a gen de baja evidencia en 2020 en base a la clasificación de “evidencia disputada” emitida por el panel de expertos de *ClinGen*. Los criterios esgrimidos para dicha clasificación son los siguientes: las variantes reportadas están presentes en relativa alta frecuencia en bases de datos poblacionales, no existen evidencias de patogenicidad, algunos de los pacientes reportados presentaban otras causas alternativas de HA y existen dos modelos independientes de ratón deficientes en *SIX5* que presentan cataratas, pero no alteraciones renales ni del oído (153, 154). A esta información debemos añadir el hecho de que, a pesar de que el gen *SIX5* se incluye en la mayoría de los estudios publicados en pacientes con BOR, no se han encontrado en la bibliografía revisada más casos relacionados con este gen desde los reportados en 2007 por Hoskins *et al.* (159). Por tanto, la variante identificada en esta tesis puede ser de ayuda para intentar esclarecer la relevancia de este gen en dicha patología. Sin embargo, nuestro caso parece complicar aún más las cosas. En el paciente P009, cuyo diagnóstico inicial era de HA no sindrómica, se detectó posteriormente dilatación bilateral del acueducto vestibular y del saco endolinfático. Este hallazgo es compatible con el síndrome BOR, aunque también es muy frecuente en el síndrome de Pendred y puede aparecer de forma aislada en HA no sindrómica. Por tanto, no es posible atribuirle una causalidad a esta variante (y por tanto, al gen *SIX5*) en base a este hallazgo clínico. Por otra parte, el padre del paciente es también portador de esta variante en

heterocigosis y es sano. Sin embargo, se ha descrito una gran variabilidad fenotípica inter e intrafamiliar en el síndrome BOR causado por el gen *EYA1* (192), por lo que podría ocurrir algo similar con el gen *SIX5* y que el padre presentase signos clínicos leves que hubiesen pasado desapercibidos. En conclusión, no podemos aportar evidencias claras que apoyen la implicación del gen *SIX5* en el síndrome BOR, aunque debido al escaso número de pacientes descritos en la bibliografía con variantes en este gen, una valoración clínica en profundidad de nuestro paciente y de su padre aportaría información de gran interés que podría contribuir a dilucidar su papel en este síndrome.

Por último, en el paciente P055, con HA moderada progresiva postlingual, se ha encontrado la variante c.2168A>G (p.Tys723Cys) en heterocigosis en el gen *HGF*. Este gen se ha asociado a HA AR DFNB39, aunque las evidencias disponibles hasta la fecha son escasas. La relación de este gen con DFNB39 se reportó por primera vez en 2009 (193) y está apoyada por varios modelos de ratón (193, 194). Según Shibata *et al.*, la inactivación del gen *HGF* afecta al desarrollo de la *stria vascularis* del oído interno, estructura no sensorial esencial para la función de las células ciliadas ya que mantiene la concentración de potasio en la endolinfa (157). Sin embargo, hasta la fecha sólo se han descrito tres variantes asociadas a HA en *HGF*, dos deleciones intrónicas y una variante sinónima que afecta al *splicing*, todas en homocigosis o heterocigosis compuesta (193, 195, 196). La variante c.2168A>G (p.Tys723Cys) identificada en nuestro paciente P055 está en heterocigosis y se trata de una variante nueva de cambio de sentido que afecta a un residuo conservado; está ausente en las bases de datos de HA y en población general, y los predictores bioinformáticos describen su efecto como deletéreo. Aunque esta variante no puede explicar por sí misma la HA del paciente por estar en heterocigosis, es posible que nuestro paciente presente otra alteración en alguna región intrónica que no hayamos encontrado por limitaciones técnicas, causando así HA AR. Será necesario el estudio de regiones intrónicas para confirmar esta teoría.

Por tanto, el análisis de los pacientes con el Panel 2 nos ha permitido identificar un caso de HA relacionada con *ATP2B2*, que aportaría evidencias adicionales que pueden apoyar su asociación con la HA si se confirma la segregación de la variante con la HA en su familia. En cuanto a los genes *SIX5* y *HGF*, aunque no hemos encontrado evidencias claras, hemos podido orientar los hallazgos hacia estudios clínicos o genéticos ampliados que podrían aportar algo de luz a su asociación con la HA.

2. Panel 3 (genes de evidencia limitada o discordante)

El análisis de los 38 pacientes con el Panel 3 dio como resultado el hallazgo de 101 variantes en total (excluyendo las benignas o probablemente benignas), lo que supone una media de aproximadamente

3 variantes por paciente (Tabla 15). De estas 101 variantes, 5 son variantes patogénicas heterocigotas en genes asociados a patologías AR y se discuten a continuación:

Los pacientes P007 y P037 presentan en el gen *TJP2* las variantes patogénicas en heterocigosis c.1894C>T (p.Arg632*) y c.342+1G>C, respectivamente. Ambas variantes causan presumiblemente pérdida de función de la proteína, mecanismo implicado en la colestasis progresiva intrahepática familiar 4 AR asociada al gen *TJP2*. Frente al hallazgo de estas variantes en nuestros dos pacientes, nos planteamos la posibilidad de que una variante en heterocigosis en el gen *TJP2* pueda causar HA AD. De hecho, este gen se consideró hace unos años un buen candidato de HA AD debido a su función en las uniones estrechas intercelulares y a su expresión en la cóclea, y se asoció a HA por primera vez en una familia con HA AD (197). Sin embargo, su implicación en la HA se considera aún no probada debido a que las evidencias posteriores han sido escasas (61, 62). Para la HA AD relacionada con este gen algunos autores han postulado un mecanismo causante de HA basado en la sobreexpresión del mismo, que alteraría su interacción con otros genes implicados en muerte celular provocando apoptosis de las células ciliadas (198). Ninguna de nuestras variantes es compatible con este mecanismo patogénico, ya que causan pérdida de función de la proteína. Por otra parte, el resto de las variantes de HA AD descritas hasta la fecha han sido de cambio de sentido (197, 199) y en algún caso estaban en homocigosis (200), lo que no parece apoyar el mecanismo propuesto por Walsh *et al.* (161). Además, no existen evidencias de que los pacientes con colestasis intrahepática familiar asociada a *TJP2*, causada por variantes patogénicas bialélicas de pérdida de función, presenten HA. Por tanto, consideramos que no es posible relacionar la HA de nuestros dos pacientes con las variantes en el gen *TJP2* identificadas en los mismos, debido principalmente a la naturaleza de nuestras variantes.

La variante c.362dupC (p.Glu122Argfs*7) en el gen *FKBP14*, se encuentra en heterocigosis en el paciente P022. Esta variante es la más frecuente de las variantes patogénicas causantes del síndrome de Ehlers-Danlos *FKBP4*-cifoescoliótico AR, que se caracteriza por hipotonía congénita, debilidad muscular, escoliosis progresiva, hipermovilidad articular e HA (201, 202). Este gen se encuentra incluido en el Panel 3 debido a que los pacientes con el síndrome Ehlers-Danlos cifoescoliótico pueden presentar HA, aunque siempre en un contexto sindrómico. Podríamos sospechar la presencia de otra variante que no hayamos podido detectar; sin embargo, el paciente no presenta signos que orienten a dicho síndrome, por lo que este hecho es poco probable. Actualmente no existen evidencias de que una variante en heterocigosis en este gen pueda causar HA, por lo que probablemente el paciente P022 es un portador sano de la variante patogénica y su HA será debida a alteraciones en otro gen.

Discusión

Por último, el paciente P055 presenta dos variantes patogénicas en distintos genes del Panel 3. La variante c.2073T>G (p.Tyr691*) en el gen *ATP8B1* se encuentra en heterocigosis. Aunque no ha sido descrita previamente, no se encuentra en población general y las variantes de truncamiento en este gen se consideran patogénicas y causantes de colestasis intrahepática familiar AR. El gen *ATP8B1* fue asociado a HA debido a que la pérdida de audición era uno de los signos presentes en muchos de estos pacientes. Un estudio en ratones demostró que la alteración bialélica de este gen afectaba a la función y el mantenimiento de los estereocilios (203), pero no se han encontrado más evidencias hasta la fecha, por lo que se la asociación de este gen con la HA se considera limitada (62) y es por eso que se incluye en el Panel 3. Es posible que el paciente P055 presente en el mismo gen otra variante patogénica que no hayamos identificado por limitaciones técnicas, causando colestasis intrahepática familiar AR junto con HA, aunque no hay evidencias de patología hepática en este paciente. Por otra parte, el mismo paciente presenta la variante c.1637G>A (p.Arg546Gln) en el gen *COL9A2* en heterocigosis. Las alteraciones bialélicas en este gen causan síndrome de Stickler tipo IV (AR), aunque hasta la fecha sólo se ha descrito una familia que presentaba HA leve-moderada, miopía severa y vitreoretinopatía (204), y es por ello que el gen *COL9A2* está incluido en el Panel 3. Las variantes patogénicas en heterocigosis en este gen causan displasia epifisaria múltiple AD, que cursa con dolor en caderas y/o rodillas, fatiga, talla baja en adulto, extremidades cortas y osteoartritis (205). Sin embargo, no existen evidencias de HA en estos pacientes, por lo que es poco probable que este gen sea causante de HA fuera del contexto sindrómico. Nuestro paciente no presenta ninguna de los síntomas asociados a esta displasia, por lo que es probable que la variante que presenta en el gen *COL9A2* sea benigna y no esté relacionada con su hipoacusia.

Por tanto, ninguna de estas 5 variantes patogénicas aporta evidencias claras que ayuden a esclarecer su relación con la HA no sindrómica, y lo más probable es que estos pacientes sean portadores sanos de las mismas sin relación alguna con su HA.

El resto de las variantes identificadas tras el análisis con el Panel 3 son VSI en heterocigosis, de las cuales 10 presentan un CADD score ≥ 30 (Tabla 15) y se discuten a continuación:

El paciente P044 presenta la variante c.1552G>A (p.Gly518Arg) en heterocigosis en el gen *ERCC3*. Este gen se encuentra incluido en el Panel 3 debido a que causa Xeroderma Pigmentoso AR, que en el 25% de los pacientes cursa con HA progresiva. Sin embargo, no existen evidencias de la asociación de variantes en este gen a HA no sindrómica.

El paciente P047 presenta la variante c.54-1G>A en el gen *THRA*, que afecta a un sitio canónico aceptor de *splicing*. Este gen codifica un receptor de la hormona tiroidea y junto con el gen *THRB* participa en la regulación del desarrollo del oído interno (206). Las alteraciones en el gen *THRA* se asocian a hipotiroidismo congénito tipo 6 (AD); sin embargo, su papel en la HA no sindrómica no se conoce todavía. Estudios en ratones han demostrado que individualmente el gen *THRA* no es indispensable para la audición, pero colabora con el gen *THRB* en la regulación del desarrollo coclear postnatal (207). No hemos encontrado alteraciones en el gen *THRB* en este paciente.

El paciente P049 presenta la variante c.3185G>A (p.Arg1062Gln) en heterocigosis en el gen *NAV2*. Actualmente se desconoce la implicación de este gen en la patología humana, aunque estudios en ratas han demostrado que está implicado en el desarrollo neuronal (208) y los ratones homocigotos para alteraciones en este gen presentan anomalías visuales, olfativas y auditivas (209). No podemos descartar la presencia de otras variantes potencialmente patogénicas en zonas no estudiadas debido a limitaciones técnicas, por lo que no es posible aportar evidencias sobre la implicación de este gen en una HA AR en humanos.

El paciente P055 presenta la variante c.5837G>A (p.Arg1946His) en el gen *NOTCH1*. Las alteraciones en este gen se asocian al síndrome de Adams-Oliver tipo 5 (AD) y a aneurisma de aorta torácico familiar (AD). Estudios en ratón han demostrado que este gen interviene en la regulación del desarrollo coclear (210) y en la regeneración celular del mismo, regulando la proporción de CC y células de soporte del OI (211). En mamíferos las CC carecen de capacidad regenerativa, y su muerte da lugar a HA permanente y disfunción vestibular, por lo que uno de las aproximaciones al tratamiento de la HA está siendo intentar manipular la vía de señalización Notch1 para promover la regeneración de las células ciliadas (212). Sin embargo, no existen evidencias que relacionen este gen con la HA, y la variante identificada en nuestro paciente está presente en población general (GnomAD: 0.009% en latinos), por lo que no la consideramos causante de su HA.

El paciente P056 presenta la variante c.725G>A (p.Arg242His) en heterocigosis en el gen *LAMA2*, que está implicado en varias distrofias musculares congénitas AR. La mayoría de las formas hereditarias de distrofia muscular cursan con HA, y se ha demostrado que los ratones con distrofia muscular debido a defectos en la laminina alfa 2 (codificado por el gen *Lama2*) presentan disfunción coclear (213).

El paciente P060 presenta la variante c.2434C>T (p.Arg812Cys) en heterocigosis en el gen *FGFR1*. Las alteraciones de cambio de aminoácido en este gen se han asociado a varios síndromes AD, como el síndrome de Pfeiffer, síndrome de Weiss o el hipogonadismo hipogonadotrópico 2 con o sin anosmia,

Discusión

que en algún caso pueden cursar con HA. Un estudio reciente ha demostrado que el gen *FGFR1* participa en la localización y la activación de la proteína Pcdh15, que es esencial para el funcionamiento de los estereocilios en el oído. Sin embargo, su implicación directa con la HA aún no está clara. La variante presente en este paciente es de cambio de sentido, aunque se ha encontrado en población general y el paciente no presenta ninguna alteración esquelética de las esperadas cuando se encuentra alguna de estas variantes, lo que va en contra de su patogenicidad.

El paciente P066 presenta la variante c.2789G>A (p.Arg930His) en heterocigosis en el gen *CACNA1D*. Este gen ha sido asociado a la disfunción de nodo senoatrial con HA AR (*sinoatrial node dysfunction and deafness, SANDD*). Las únicas variantes descritas hasta la fecha son una inserción sin cambio en el marco de lectura y una variante de cambio de sentido (214, 215), todas segregando en homocigosis en las diferentes familias afectas.

El paciente P075 presenta la variante c.650A>G (p.Glu217Gly) en heterocigosis en el gen *TRMU*. Este gen se asocia a fallo hepático transitorio infantil AR, aunque también parece jugar un papel como modificador de la HA mitocondrial. Varios estudios sugieren que aunque la variante patogénica mitocondrial m.1555A>G es la causa subyacente de HA, por sí sola no es suficiente para producirla y el gen *TRMU* parece ser uno de los genes modificadores nucleares implicados en su aparición (Guan, 2006). Al no presentar nuestro paciente ninguna de las variantes mitocondriales patogénicas frecuentes, no podemos aportar evidencias a este respecto.

El paciente P076 presenta la variante c.3683G>A (p.Arg1228Pro) en heterocigosis en el gen *ATP8B1*. Como ya hemos descrito previamente, este gen se incluye en el panel 3 por la aparición de HA en algunos pacientes con colestasis intrahepática familiar AR asociada al mismo y porque existen estudios en ratones que demuestran que las alteraciones en homocigosis de este gen afectan para a la audición (203). Sería necesario el hallazgo de una segunda variante potencialmente patogénica en este paciente para estudiar esta relación.

Por último, el paciente P084 presenta la variante c.1327G>A (p.Asp443Asn) en heterocigosis en el gen *APAF1*. La asociación de este gen con patología en humanos es desconocida. Este gen codifica el factor activador de la proteasa pro-apoptótica 1, que interviene en el mecanismo de muerte celular que ocurre tras el daño celular por traumatismos sonoros, por lo que se postula que su inhibición puede ser una buena aproximación terapéutica para el tratamiento de HA aguda inducida por el ruido para evitar una lesión irreversible (216).

Por tanto, ninguna de estas 10 VSI identificadas en el Panel 3 nos ha permitido aportar evidencias a favor o en contra de las existentes en la actualidad.

Como conclusión, podemos decir que a pesar de que alguno de los resultados del Panel 2 pueda aportar nuevas evidencias sobre algunos genes, la inclusión de los genes de los paneles 2 y 3 en el estudio genético no aumenta el rendimiento diagnóstico y sin embargo complica el análisis debido al incremento del número de variantes a clasificar. Por tanto, en el entorno clínico, la inclusión de nuevos genes en paneles de diagnóstico de HA debe basarse en fuertes evidencias que demuestren su implicación en esta patología.

Identificación de genes candidatos asociados a HA en base a modelos de ratón

Otro de los objetivos de esta tesis ha sido el de identificar nuevos genes candidatos de HA basándonos en hallazgos casuales de estudios experimentales sobre otras patologías realizados en ratones. Para ello, los 38 pacientes negativos fueron analizados mediante el Panel 4, que incluye genes que hayan mostrado HA como efecto colateral en ratones modificados genéticamente. Esto dio como resultado el hallazgo de dos variantes en heterocigosis: una en el gen *TULP3* (c.779G>A (p.Arg260His)) en el paciente P040 y otra (c.1802G>A (p.Arg601Gln)) en el gen *PEX6* en el paciente P075, ninguna de las cuales aporta evidencias de interés. La ausencia de identificación de variantes potencialmente causales en este Panel 4 puede deberse a que ninguno de los genes incluidos esté realmente implicado en HA en humanos a pesar de haberse observado HA en modelos de ratón. Sin embargo, dado que los modelos de ratón se consideran un buen modelo experimental extrapolable a los humanos en el caso de la HA (217, 218), es posible que alguno de estos genes sí esté implicado en HA en humanos, pero que debido a la gran heterogeneidad genética de esta patología sea necesaria una cohorte mucho mayor para poder encontrar variantes patogénicas en alguno de ellos.

Correlaciones genotipo-fenotipo

Otro de los objetivos de esta tesis ha sido definir patrones fenotípicos en base a características como el tipo de variante y su localización en el gen, así como aportar nuevas evidencias a lo establecido hasta la fecha. Para ello, nos hemos centrado en los ocho genes más representativos en nuestra cohorte según los resultados de este estudio, que se discuten a continuación.

Correlación genotipo-fenotipo en el gen *GJB2*

La mayoría de variantes patogénicas en este gen causan HA AR (DFNB1), aunque unas pocas dan lugar a HA AD (DFNA3). En este estudio hemos identificado 23 pacientes con DFNB1 y uno con DFNA3. Las variantes asociadas a DFNB1 generalmente producen pérdida de función de la proteína por truncamiento prematuro, por alteraciones en el plegamiento o por problemas en la oligomerización de las subunidades de conexina. Esto da lugar a una HA generalmente profunda, congénita y estable, que es el fenotipo predominante en nuestro estudio. Sin embargo, tanto en nuestros resultados como según otras evidencias científicas, el espectro fenotípico es muy variable incluso entre pacientes con el mismo genotipo. Este es el caso, por ejemplo, de nuestros pacientes homocigotos para la variante c.35delG, en los que encontramos fenotipos tan dispares como cofosis (sordera total) hasta HA leve postlingual. Según un estudio realizado en 1500 afectados, Snoeckx *et al.* propusieron que el grado de HA DFNB1 depende de la combinación de las variantes implicadas: los pacientes con variantes de truncamiento bialélicas presentaban pérdidas auditivas significativamente más graves que los pacientes con dos variantes de cambio de sentido, y la combinación truncamiento/cambio de sentido producía un efecto intermedio (45). Otros autores han confirmado posteriormente estos hallazgos (219, 220). En nuestro estudio, la HA profunda es más frecuente en el grupo de pacientes con dos variantes de truncamiento que cuando interviene una variante de cambio de sentido (50% vs 28%), lo que concuerda con lo observado por dichos autores. Sin embargo, según esa propuesta cabría esperar que en los pacientes con dos variantes de cambio de sentido la HA fuese más leve, cosa que no se cumple en nuestro único caso de estas características, ya que presenta HA profunda, estable y de inicio congénito. Por tanto, la correlación postulada por Snoeckx *et al.* probablemente simplifica en exceso el efecto de las variantes implicadas.

Snoeckx *et al.* también propusieron fenotipos específicos para algunos genotipos concretos, como la HA leve o moderada para la combinación de la variante c.101T>C (p.Met34Thr) con una variante de truncamiento, o la HA profunda para el genotipo c.35delG/del(*GJB6*-D13S1830). Estas relaciones han sido confirmadas posteriormente (221) y se reproducen en nuestro estudio. Para estas variantes, los mecanismos de patogenicidad implicados pueden explicar la expresión clínica y el fenotipo se reproduce en los distintos pacientes. En el caso de la variante c.101T>C (p.Met34Thr), que se encuentra en nuestro paciente P091 en heterocigosis compuesta con la variante c.35delG, se ha demostrado que afecta a un residuo de la parte hidrofílica interna del canal (conexón) y altera el transporte a través del mismo. Pero el conexón mantiene cierto grado funcionalidad, lo que se traduce

en una HA leve de inicio postlingual y de penetrancia incompleta (222, 223). Por este motivo, esta variante se conoce como hipomorfa.

En nuestros resultados observamos que cuando una de las variantes implicadas en la DFNB1 es una de las deleciones en *GJB6*, los audiogramas reflejan HA más profundas que cuando sólo hay variantes patogénicas de truncamiento en *GJB2*. Aunque el número de casos que hemos encontrado es pequeño (2 casos con del(*GJB6*-D13S1830) y 2 con del(*GJB6*-D13S1854)), esto concuerda con lo descrito por Snoeckx *et al.* para la variante del(*GJB6*-D13S1830). Sin embargo, podemos observar ligeras diferencias fenotípicas entre los pacientes con las diferentes deleciones: mientras que en los dos casos con la variante del(*GJB6*-D13S1830) la HA es profunda (P017 y P095), los pacientes con la deleción del(*GJB6*-D13S1854) presentan HA severa (P052 y P100). Aunque no se ha propuesto en la bibliografía diferentes fenotipos en función del tipo de deleción de *GJB6* y los casos reportados sobre la del(*GJB6*-D13S1854) no son muy numerosos, 3 pacientes con esta deleción descritos en un estudio de expresión presentaban HA entre moderada y profunda (224). Según las evidencias actuales, se cree que estas deleciones eliminan una región *cis*-reguladora localizada entre el gen *GJB6* y el gen *CRYL*. Esta región reguladora aún no ha sido identificada, aunque se sabe que interviene en la co-regulación de los genes *GJB2* y *GJB6*. Es un hecho demostrado que la pérdida de esta región debida a la deleción del(*GJB6*-D13S1830) elimina completamente la expresión del gen *GJB2* (52), mientras que la deleción del(*GJB6*-D13S1854) no suprime completamente la expresión del gen *GJB2*, sino que permite una expresión residual débil del mismo (224). Ante este hecho los autores proponen la existencia en esa región de varios elementos reguladores, y que la deleción del(*GJB6*-D13S1854), al ser 77 kb más pequeña que la del(*GJB6*-D13S1830), no los elimina en su totalidad, permitiendo la expresión residual del gen *GJB2*. Según nuestros resultados, y yendo más allá de lo postulado por estos autores, proponemos que esa expresión residual del gen *GJB2* es la que hace que la HA en los pacientes con la deleción del(*GJB6*-D13S1854) sea severa, y no profunda como ocurre cuando la deleción es la del(*GJB6*-D13S1830).

A pesar de que estos intentos de correlación genotipo-fenotipo definen a grandes rasgos el fenotipo de gran parte de los pacientes, en la actualidad no es posible predecir con certeza la expresión clínica de la HA DFNB1, que puede ser diferente incluso entre individuos de la misma familia. Ante esta gran variabilidad fenotípica, diversos autores han propuesto a existencia de modificadores genéticos que modulan el efecto de las variantes patogénicas dando lugar a distintos fenotipos de HA (45) (36, 43, 219, 220).

Por otra parte, cuando la proteína conexina 26 mutada afecta a la función de la conexina 26 normal producida por el alelo no mutado se produce un efecto dominante negativo que da lugar a HA no

sindrómica AD (DFNA3). Si además la conexina 26 mutada afecta a la función de otras como la conexina 30 y/o la conexina 43, el fenotipo de HA se acompaña de alteraciones de la piel, dando lugar a formas sindrómicas cuya gravedad depende de si se desencadena muerte celular o no (225, 226). En este estudio hemos identificado una paciente con DFNA3. La variante patogénica c.551G>A (p.Arg184Gln) se encuentra en heterocigosis en la paciente P097 produciendo una HA no sindrómica congénita, profunda y estable. La paciente tiene 11 años de edad en la actualidad y no presenta alteraciones cutáneas hasta la fecha. Esta variante ha sido descrita previamente en más de 10 pacientes, segregando de forma AD como DFNA3 en todos excepto en un caso, que presentaba HA y queratoderma palmoplantar (227). El efecto dominante negativo de esta variante sobre la conexina 26 y conexina 30 normales ha sido demostrado en estudios celulares (144), por lo que sería de esperar un fenotipo sindrómico con alteraciones cutáneas en los pacientes. Sin embargo, tanto nuestra paciente como todos los casos publicados excepto uno, presentan HA no sindrómica. Esto podría deberse a que *in vivo*, otras conexinas pueden paliar el efecto de la variante c.551G>A (p.Arg184Gln), y que sólo cuando el individuo presenta determinadas características en otras proteínas que interactúan con estas conexinas el fenotipo se agrava dando lugar a HA sindrómica. De hecho, es plausible pensar que de forma similar a lo que se postula para las variantes recesivas de *GJB2*, existan modificadores genéticos y/o ambientales que afectan a la expresión clínica de las distintas variantes.

Correlación genotipo-fenotipo en el gen *STRC*

Respecto al gen *STRC*, los 7 pacientes identificados en nuestra cohorte presentan HA AR leve o moderada con caída ligera en frecuencias medias y/o altas, que concuerda con el fenotipo establecido para DFNB16 (Bitner-Glindzicz, 2002). Si agrupamos los pacientes en función del tipo de alteración, observamos que todos los pacientes con deleciones de *STRC* en homocigosis (P001, P011, P012 y P019) presentan HA leve, mientras que en los heterocigotos compuestos deleción/variante puntual (P046, P006 y P104) la HA es moderada. En cuanto al inicio, todos los pacientes presentan HA congénita excepto P104 (heterocigoto compuesto deleción/sustitución de aminoácido), que es de inicio prelingual, y P011 (deleción en homocigosis) de inicio desconocido. Estos resultados no concuerdan con los patrones propuestos por las dos únicas publicaciones que han tratado de definir con mayor precisión el fenotipo DFNB16 (90)(228). La primera de ellas describe 9 pacientes con DFNB16 y propone que en los pacientes con deleción del gen *STRC* y una variante puntual en heterocigosis compuesta, la variante puntual sería la que define el fenotipo: si dicha variante es de truncamiento, la HA sería más severa y de inicio más precoz que cuando la variante es de cambio de sentido, y afectaría a todas las frecuencias (90). En nuestro estudio, esta propuesta se cumple sólo en parte:

observando los audiogramas de P006 y su hermana, con la segunda variante de cambio de sentido, sí presentan HA más leve que P046 (segunda variante de truncamiento). Sin embargo, no se observa diferencia en el inicio de la HA (congénita en estos tres casos), y en P046 no están afectadas todas las frecuencias como sería de esperar según lo propuesto por Back *et al.*. Tampoco el estudio más reciente sobre DFNB16 apoya dicha teoría, ya que no observan diferencias audiológicas entre los distintos grupos de pacientes (228). Por otra parte, según lo propuesto por Back *et al.*, sería de esperar que los pacientes con delección en homocigosis, al no expresarse el gen, tuvieran las HA más graves. Sin embargo, en nuestra cohorte, todos los casos homocigotos para la delección son leves y las HA moderadas se encuentran en los pacientes con delección y variante puntual. Los pacientes con delección en homocigosis reportados en estudios previos, aunque carecen de descripciones precisas del fenotipo, sí parecen presentar HA moderada (90). Una de las razones para estas discrepancias puede ser la ausencia de consenso en los criterios utilizados para definición de los grados de HA. Aunque es probable que, igual que en otros tipos de HA, en la DFNB16 intervengan también otros factores genéticos y/o ambientales. A pesar de estas pequeñas diferencias, el fenotipo DFNB16 sigue siendo relativamente predecible y permite proporcionar información pronóstica a los pacientes y familiares.

Correlación genotipo-fenotipo en el gen *OTOF*

La mayoría de variantes patogénicas en el gen *OTOF* que hemos identificado son de truncamiento y los pacientes presentan en general una HA congénita severa-profunda y estable, que concuerda con el fenotipo establecido de DFNB9. Aunque el patrón es bastante homogéneo, se pueden observar ligeras diferencias, sobre todo en el grado de HA (severa o profunda) y en la estabilidad (progresiva o estable). Buscando el porqué de estas diferencias, podríamos pensar que en los pacientes con variantes bialélicas de truncamiento, en las que presumiblemente no se expresa proteína debido al mecanismo de *nonsense-mediated decay (NMD)*, esta ausencia completa de otoferlina daría lugar a HA profunda en todos los casos. Sin embargo, no es así. Incluso entre los dos casos homocigotos para la variante c.2485C>T (p.Gln829*), P010 presenta HA severa y progresiva, mientras que en P098 es profunda y estable. En esta línea, en las variantes de cambio de sentido, donde se espera que sí se sintetice proteína aunque modificada, se ha observado que algunas mantienen cierto grado de funcionalidad residual, por lo que aparentemente presentan una HA de menor grado (81). En nuestro estudio sólo hemos encontrado una variante de cambio de sentido, c.5125G>T (p.Asp1709Tyr), que es además una de las variantes nuevas identificadas en el gen *OTOF*. Dicha variante se encuentra en el paciente P025, en heterocigosis compuesta con otra variante nueva de truncamiento, c.1404delA

(p.Val469Cysfs*27). Esta proteína modificada podría mantener cierto grado de actividad. Sin embargo, la HA profunda del paciente parece dar a entender que no existe actividad residual de otoferlina.

Por tanto, en base a nuestros resultados no parece existir relación entre el tipo de variantes patogénicas (truncamiento vs cambio de sentido) y el fenotipo de la DFNB9.

Correlación genotipo-fenotipo en el gen *MYO15A*

Los 4 pacientes diagnosticados de HA AR asociada a *MYO15A* (DFNB3) y las 4 variantes nuevas identificadas representan una oportunidad para aportar nuevas evidencias a las correlaciones genotipo-fenotipo propuestas hasta la fecha. Nuestros pacientes reflejan la variabilidad genética y fenotípica de la DFNB3, ya que encontramos 4 variantes nuevas y una conocida, con una presentación variada que incluye HA profunda en dos casos, severa en uno y moderada en otro.

La miosina XVa presenta dos isoformas principales: la isoforma 1 es la de mayor tamaño y contiene un dominio N-terminal codificado por un exón 2 gigante que no se encuentra en la isoforma 2. La isoforma 2 es responsable del desarrollo de los estereocilios, mientras que la isoforma 1 es prescindible para el desarrollo pero fundamental para su mantenimiento (76). En base a esto, Rehman *et al.* han postulado que el fenotipo de HA depende de si están afectadas ambas isoformas o no, de forma que las variantes localizadas en el exón 2 afectarían sólo a la isoforma 1 dando una HA más leve que las variantes que afectan a dominios presentes en ambas isoformas (74).

Para facilitar el análisis de nuestros 4 casos de DFNB3, dividiremos nuestros pacientes en dos grupos en función del grado de HA. Los dos con HA profunda (P050 y P092) son precisamente los que presentan variantes bialélicas que afectan a ambas isoformas de la miosina XVa. La variante del paciente P050 (c.3874T>C, p.Phe1292Leu), de cambio de sentido y en homocigosis, se localiza en el dominio motor presente en las isoformas 1 y 2, por lo que presumiblemente ambas se expresan en cantidad normal pero modificadas. El paciente P092 presenta dos variantes de truncamiento que también afectan a ambas isoformas: la variante c.6004delG (p.Glu2002Argfs*27) de truncamiento y la variante c.4596+4A>G (VSI pero ausente en población general y que según los predictores bioinformáticos altera el *splicing*) que presumiblemente genera un cambio de marco de lectura y truncamiento prematuro de la proteína. En ambos pacientes la HA es profunda, por lo que la consecuencia de la variante a nivel de la proteína (truncamiento vs cambio de sentido) no parece influir en el fenotipo cuando ambos alelos patogénicos afectan a las dos isoformas.

En los otros dos pacientes (P028 y P033) la HA es menos grave y coincide con el hecho de que sus variantes no afectan a ambas isoformas de miosina XVa. La variante del caso P033 (c.1657delC, p.Arg553Glyfs*76 en homocigosis) es de truncamiento pero al estar localizada en el dominio N-terminal sólo afecta a la isoforma 1. Por tanto, presumiblemente la síntesis de la isoforma 2 no estaría afectada cuantitativa ni cualitativamente. Esta variante ha sido descrita en homocigosis en una única familia paquistaní asociada a HA severa (146), igual que ocurre en el paciente P033. Por otro lado, en el caso P028, una de las variantes es de truncamiento y afectaría a ambas isoformas (c.6004delG, p.Glu2002Argfs*27). La otra variante (c.2740G>A, p.Glu914Lys) es de cambio de sentido y al localizarse en el dominio N-terminal sólo afecta a la isoforma 2. El efecto global de estas variantes en el paciente P028 sería el truncamiento de ambas isoformas por uno de los alelos mientras que el otro daría lugar a una isoforma 1 modificada junto con una isoforma 2 normal. Por tanto, podríamos suponer que este último alelo podría mantener cierto grado de funcionalidad debido a la cual la HA en el paciente P028 es moderada, la menos grave de nuestros 4 casos.

Nuestro planteamiento parece apoyar la correlación fenotipo-genotipo propuesta por Rehman *et al.* (74). Sin embargo, en los últimos años se han descrito variantes en el dominio N-terminal (isoforma 1) asociadas a HA severa o profunda, y se han reportado casos en los que una misma variante causa distintos fenotipos (146, 229). Es posible que la concordancia observada en nuestros pacientes sea debida al azar y al bajo número de casos de DFN3 que presentamos. Con el fin de buscar una nueva correlación o mejorar la propuesta por Rehman *et al.*, un artículo reciente describe 15 pacientes con DFN3 y ha revisado todos los casos de HA DFN3 no profundas publicados hasta la fecha (75). Esos autores observan que el fenotipo más leve puede darse con variantes que afectan a cualquier dominio de la miosina XVa, aunque es más frecuente cuando afectan al dominio N-terminal (es decir, sólo a la isoforma 2); las variantes en el dominio N-terminal también pueden causar HA profundas; y además existe variabilidad fenotípica intrafamiliar, lo que sugiere la presencia de modificadores. La influencia de los modificadores genéticos y/o ambientales en la HA moderada-severa ya ha sido planteada previamente por otros autores, tanto en la HA asociada al gen *MYO15A* a como en la causada por otros genes como *GJB2*, *SLC26A4*, *OTOF*, etc. (146). Nuestros pacientes P033 y P050 presentan historia familiar de HA, aunque no ha sido posible estudiar la segregación de las variantes por no disponer de muestra de los familiares. Será necesario el estudio genético de las variantes patogénicas en estas familias para confirmar la variabilidad clínica intrafamiliar de las mismas.

Por tanto, en base a nuestros resultados y con las evidencias disponibles hasta la fecha, podemos decir que: 1) el grado de HA DFN3 parece ser independiente del tipo de variante (truncamiento o cambio

de sentido) cuando están afectadas las isoformas 1 y 2; 2) aunque los casos leves parecen ser más frecuentes cuando las variantes se localizan en el dominio N-terminal afectando sólo a la isoforma 2, esto no se cumple en todos los casos; y 3) la variabilidad intrafamiliar sugiere que existen otros factores que modulan la expresión clínica en cada individuo. Serán necesarios más pacientes y estudios funcionales de las variantes para intentar esclarecer estos aspectos.

Correlación genotipo-fenotipo en el gen *TECTA*

El gen *TECTA* codifica la proteína α -tectorina. Aunque el mecanismo no se conoce todavía, las variantes patogénicas de cambio de sentido en el gen *TECTA* causan HA AD (DFNA8/12) y las variantes patogénicas de truncamiento producen HA AR (DFNB21), menos frecuente. En nuestro estudio hemos encontrado 3 pacientes con DFNA8/12.

Los tres pacientes de esta tesis con DFNA8/12 presentan de forma más o menos marcada el audiograma en forma de U característico de la HA AD causada por este gen, que refleja la afectación predominante de las frecuencias medias y/o altas. Tras el descubrimiento del gen *TECTA* se propuso una correlación genotipo-fenotipo dependiente de dominio, según la cual las variantes patogénicas en los dominios ZP causan HA de frecuencias medias, mientras que las del dominio ZA afectan a las frecuencias altas (230-232). Con el tiempo y el hallazgo de nuevas variantes se observó que, aunque el dominio ZP sigue asociándose principalmente a HA de frecuencias medias, es posible encontrar HA de ambos tipos en variantes localizadas a lo largo de todo el gen (233)(104)(110). En el dominio ZA, las variantes asociadas a HA de frecuencias altas se extienden a lo largo de toda su extensión pero las asociadas a frecuencias medias parecen concentrarse en su mitad N-terminal (subdominios vWFC, vWFD1, TIL1, vWFD2 y TIL2) (104) (110). Las variantes en el dominio ENT son menos numerosas e inicialmente se asociaron también a HA de frecuencias medias, pero posteriormente se ha observado que no existe un fenotipo concreto asociado a este dominio.

Por otra parte, debido a las diferencias en la progresión observadas en los pacientes, se propuso que la sustitución de residuos de cisteína se asociaba a HA progresiva, mientras que la sustitución de otros residuos daba lugar a HA estable (234). Esta correlación fue también descartada por distintos motivos: se identificaron sustituciones de cisteína asociadas a HA estable y cambios de aminoácido en otros residuos asociados a HA progresiva (109). Además, un estudio en ratones demostró que la sustitución de residuos de cisteína no provocaba deterioro estructural de la membrana tectoria a lo largo del tiempo (235). Por último, una publicación reciente en población japonesa reporta la ausencia de

diferencias significativas en la progresión de la HA entre pacientes con DFNA8/12 y población sana y atribuye progresión de la HA a la presbiacusia (110).

Ante las evidencias discordantes halladas hasta la fecha, cualquier paciente adicional con HA DFNA8/12 puede ser de gran ayuda. Aunque nuestros 3 pacientes suponen un número pequeño como para establecer una correlación, presentan 3 variantes localizadas en 3 dominios diferentes. Para empezar, el paciente P088 (variante c.5668C>T, p.Arg1890Cys en el dominio ZP) y el paciente P048 (variante c.3107G>A, p.Cys1036Tyr en el subdominio TIL2 del dominio ZA), presentan HA de frecuencias medias. Estos resultados son consistentes con los estudios previos. El paciente P093 (variante c.714C>G, p.Asn238Lys en el dominio ENT) presenta HA a frecuencias altas, lo que también confirma que este dominio puede asociarse a ambos tipos de HA. Nuestros datos parecen confirmar la correlación establecida para ZP y ZA, y la ausencia de correlación genotipo-fenotipo del dominio ENT. Es más, según la bibliografía revisada, una de las variantes en el dominio ENT (c.589G>A, p.Asp197Asn), reportada como asociada a HA de frecuencias medias (109), ha sido recientemente encontrada en un paciente con HA de frecuencias altas (110), por lo que es muy probable que haya otros factores que influyan en el fenotipo final.

Para analizar la progresión de la HA sólo disponemos de información de los pacientes P088 y P093, y en ambos casos la sustitución de residuos diferentes a cisteína ha dado lugar a HA progresiva. Esto demuestra que tal y como se ha propuesto recientemente, la progresión de la HA no se asocia exclusivamente a la sustitución de residuos de cisteína. Otra evidencia es que la variante c.5668C>T, p.Arg1890Cys de nuestro paciente P088 ha sido descrita previamente en 4 pacientes asociada a HA estable (109). Por tanto, la progresión de la HA tampoco depende de la variante concreta implicada.

En resumen, en base a nuestros hallazgos y a las evidencias disponibles hasta la fecha, proponemos que 1) el fenotipo de la HA AD DFNA8/12 asociada al gen *TECTA* depende en parte del dominio afectado, sobre todo cuando la variante se encuentra en el dominio ZP, que se asocia a HA de frecuencias medias; 2) la consecuencia de las variantes en los dominios ZA y el ENT no es predecible en cuanto a frecuencias afectadas; y 3) una misma variante puede presentar variabilidad tanto el tipo de HA como en la progresión de la misma, lo que sugiere la existencia de factores genéticos y/o ambientales individuales. El esclarecimiento del mecanismo de patogenicidad de las variantes en el gen *TECTA* probablemente ayude a conocer estos factores y su influencia en el fenotipo. Para ello, serán necesarios más pacientes y estudios funcionales adicionales.

Correlación genotipo-fenotipo en el gen *BSND*

El gen *BSND* codifica la barttina. Dos de los pacientes de nuestro estudio presentan HA AR asociada al gen *BSND* DFNB73 (P015 y P035), en ambos casos causada por la variante c.23G>A (p.Arg8Gln) en homocigosis. Ambos pacientes presentan HA perilingual, progresiva, severa en P015 y moderada en P035 y ninguno presenta enfermedad renal. El paciente P015 refiere antecedentes familiares de HA con inicio más tardío (8 años su hermana y 20 años su padre), aunque no ha sido posible confirmar la variante en dichos familiares por no disponer de muestra de los mismos.

En general, las variantes de truncamiento en este gen dan lugar a un fenotipo grave de síndrome de Bartter tipo IV (236), mientras que las de cambio de sentido se han asociado tanto a fenotipos de distinto grado de este síndrome como a HA no sindrómica (237). Los estudios funcionales sobre algunas de estas variantes han demostrado que la existencia de enfermedad renal y su gravedad dependen del efecto de la barttina modificada sobre los canales CLC-K, y se cree que el OI es más sensible que el asa de Henle a la reducción de la conductancia de cloruro (121, 238, 239). La variante c.23G>A (p.Arg8Gln) identificada en nuestros pacientes ha sido reportada en la literatura una única vez, en un paciente español con HA no sindrómica (34). Se conocen otras variantes patogénicas que afectan al mismo residuo, aunque siempre asociadas a síndrome de Bartter tipo IV: c.22C>G (p.Arg8Gly); c.22C>T (p.Arg8Trp); c.23G>T (p.Arg8Leu) (120, 236, 240, 241). En el caso de las variantes c.22C>T (p.Arg8Trp) y c.23G>T (p.Arg8Leu), se ha demostrado que aunque no impiden la inserción de los canales en la membrana, sí afectan a su activación, lo que lleva a una pérdida completa de función de los mismos (120), y por tanto a síndrome de Bartter tipo IV. Estas evidencias demuestran el residuo 8 de arginina es esencial para la barttina y que una modificación del mismo afecta a su función. Nuestros dos pacientes con la variante c.23G>A (p.Arg8Gln) nos dan la oportunidad de comparar la expresión clínica resultante de la sustitución de este residuo por distintos aminoácidos:

En base a nuestros resultados postulamos que la variante c.23G>A (p.Arg8Gln) presente en nuestros pacientes altera en menor medida la función de los canales de cloruro en comparación con los cambios descritos hasta la fecha en este mismo residuo. Aunque para demostrar esta teoría serían necesarios estudios funcionales, podemos hacer una aproximación mediante la comparación de las características físico-químicas de la arginina en el residuo 8 y de los aminoácidos que la sustituyen en cada uno de los casos (glutamina en nuestros pacientes; triptófano, leucina, glicina en los descritos en la bibliografía). La arginina es un aminoácido básico con carga positiva y, por tanto, hidrofílico. Los aminoácidos glicina, leucina y triptófano (cambios descritos previamente asociados a síndrome de Bartter tipo IV) son aminoácidos apolares neutros, por tanto, hidrofóbicos. Sin embargo, la glutamina

presente nuestros pacientes es un aminoácido polar neutro, por lo que mantiene cierto grado de hidrofilia, mucho menor que la arginina, pero sin duda mayor que los la glicina, leucina o triptófano implicados en los demás cambios. Esto nos lleva a postular que los efectos de este cambio son menores, por lo que el fenotipo final es de HA no sindrómica DFNB73. Serán necesarios estudios funcionales para confirmar o descartar esta hipótesis.

Correlación genotipo-fenotipo en el gen *MYO6*

La HA asociada al gen *MYO6* es generalmente progresiva, postlingual y AD (DFNA22), aunque también se ha asociado a HA congénita profunda AR (DFNB37) (16). Tras el descubrimiento en el año 1995 del gen *Myo6* como causante de HA AR en ratones (242), en 2001 se describió la primera familia con HA AD asociada a su gen homólogo en humanos *MYO6* (DFNA22) (243), a lo que siguió el descubrimiento de 3 familias en las que la HA co-segregaba de forma AR con alteraciones en este gen (DFNB37) (244). Sin embargo, algunas variantes descritas inicialmente como recesivas han sido posteriormente halladas en varias familias co-segregando con HA progresiva de forma AD (245). Por tanto, se ha postulado que el mecanismo subyacente en estas variantes parece ser semi-dominante, de manera que en heterocigosis dan lugar a una HA más leve y progresiva que podría pasar desapercibida sin una exploración clínica adecuada, mientras que si se presentan con otra variante patogénica en *trans* se agravaría este cuadro (66, 71). Nuestros pacientes P020 y P101 presentan variantes en heterocigosis en *MYO6* e HA moderada, lo que concuerda con dicha correlación.

Según las evidencias disponibles hasta la fecha, el fenotipo de la DFNA22 parece depender también de la combinación del dominio afectado y el tipo de variante, de forma que las variantes de cambio de sentido en el dominio motor provocan la HA más grave (72), probablemente debido a un efecto dominante negativo, mientras que las variantes de truncamiento y/o fuera del dominio motor dan lugar a fenotipos más leves (71, 245). En nuestro estudio, el paciente P101 presenta en heterocigosis la variante c.1976G>A (p.Arg659Gln) en el dominio motor, lo que se debería reflejar en una HA más grave que en el paciente P020, cuya variante en heterocigosis (c.2544delA, p.Lys848Asnfs*9), de truncamiento, se localiza fuera de este dominio. La HA es moderada en ambos pacientes, aunque en P101 es de inicio congénito, lo que representa una mayor afectación y cuadraría con esta hipótesis. Por otra parte, el paciente P020 presenta un audiograma en forma de U, que se ha descrito en algunos pacientes con variantes patogénicas en *MYO6* (71). Por tanto, aunque sólo hemos encontrado dos pacientes con HA causada por el gen *MYO6*, los fenotipos encontrados en éstos parecen confirmar las correlaciones propuestas en la bibliografía.

Correlación genotipo-fenotipo en el gen *MYO7A*

Las alteraciones en el gen *MYO7A* causan principalmente síndrome de Usher AR tipo 1 (el más grave, caracterizado por HA congénita profunda, retinitis pigmentosa (RP) de inicio prepuberal y disfunción vestibular), aunque también se han descrito algunas variantes asociadas a síndrome de Usher AR tipo 2 (menos severo, con HA moderada y RP de inicio postpuberal, sin disfunción vestibular), HA AD (DFNA11) e HA AR (DFNB2). La presencia de RP (pérdida progresiva de visión periférica con ceguera nocturna) es el rasgo diferencial entre el síndrome de Usher y la HA no sindrómica, aunque existe gran variabilidad tanto en el inicio como en la expresión de la misma.

Sin embargo, la existencia de DFNB2 ha estado en entredicho desde el principio (246, 247). La primera familia con DFNB2 se describió en 1997 (248). Inicialmente se sugirió que las variantes en *MYO7A* causantes de DFNB2 inducían el desarrollo de un fenotipo más leve que los alelos asociados a síndrome de Usher 1B debido a que la proteína resultante mantenía cierto grado de funcionalidad en la retina (249). Sin embargo, una reevaluación clínica de la familia descrita por Guilford *et al* reveló que en los 7 años transcurridos desde la publicación, 5 de los 12 pacientes mayores de 25 años habían desarrollado RP (246). Las evidencias contradictorias han ido sumándose desde entonces. Mientras que algunos estudios funcionales demostraron actividad residual de la miosina VIIA en alguna de las mutaciones asociadas a DFNB2 (250), en otros casos asociaron esta actividad residual a formas más leves de retinopatía e HA (251). Por otra parte, la mayoría de familias reportadas con DFNB2 no han sido evaluadas en edades más avanzadas o los métodos utilizados para excluir RP no han sido los óptimos (252-254). Por tanto, es probable que la DFNB22 se trate en realidad de un síndrome de Usher, pero con una presentación más leve o tardía. Hasta la fecha, no se ha establecido una correlación entre el tipo de variante o el dominio de la proteína y el fenotipo resultante.

En cuanto a la HA AD asociada al gen *MYO7A* (DFNA11), fue reportada por primera vez en 1996 (255) y desde entonces sólo se han identificado 8 variantes patogénicas asociadas a esta HA, ninguna de las cuales provoca truncamiento prematuro de la proteína. La mayoría de estas variantes afectan al dominio motor de la miosina VIIa, aunque también se han descrito variantes en otros dominios de la proteína. Sin embargo, no se observan correlaciones genotipo-fenotipo y la expresión clínica es muy variable tanto en el grado de HA como en la edad de inicio y las frecuencias afectadas. Esta variabilidad se manifiesta inter- e intra-familiarmente e incluso entre pacientes de la misma edad (256).

Ante esta ausencia de correlaciones genotipo-fenotipo para el gen *MYO7A*, los pacientes identificados en nuestro estudio pueden aportar información de gran interés. La paciente P059 presenta en

homocigosis una variante intrónica (c.849+5G>A) que según los predictores afecta al *splicing*, también presente en homocigosis en su hermano afecto de HA. Esta variante ha sido descrita previamente en heterocigosis compuesta con una variante de truncamiento en *MYO7A*, en un paciente alemán con Usher atípico (148). Aunque el paciente P059 y su hermano no presentan actualmente enfermedad ocular, en la actualidad tienen 16 y 19 años de edad, por lo que ésta podría aparecer en los próximos años dando lugar a un fenotipo Usher sindrómico. Sin embargo, a diferencia del paciente reportado por Neuhaus *et al.*(148), nuestros dos pacientes presentan la variante intrónica en homocigosis, que según los predictores provoca una pérdida del 60% de la capacidad de *splicing*. Por tanto, postulamos que esto permitiría la expresión de una cantidad de proteína menor pero funcionalmente normal, que mantuviese cierta actividad residual de la miosina VIIa evitando la aparición de retinosis pigmentaria. Esto apoyaría la existencia de HA AR a *MYO7A*, DFNB22. Sin embargo, son necesarios estudios funcionales para conocer el de la variante c.849+5G>A y un seguimiento clínico adecuado y a lo largo del tiempo a los pacientes, con el fin de detectar RP leves o tardías en caso de que aparecieran.

En el caso del paciente P082, con dos variantes de cambio de sentido heterocigotas en *MYO7A* (c.479C>G, p.Ser160Cys y c.5722T>A, p.Phe1908Ile), la historia familiar sugiere una HA de herencia AD con inicio en edad adulta, mientras que el paciente presenta HA de inicio congénito. La variante c.479C>G (p.Ser160Cys) ha sido descrita previamente asociada a HA DFNA11 (149), mientras que la c.5722T>A (p.Phe1908Ile) es una variante nueva. Nuestra hipótesis es que la HA AD que presentan los familiares maternos de este paciente es debida a la variante conocida c.479C>G (p.Ser160Cys), y en el caso del niño, se ha heredado la segunda variante por vía paterna, lo que agravaría la expresión clínica del paciente adelantando la edad de inicio de la HA respecto a lo observado en su familia materna. El hecho de que algunos familiares por vía paterna hayan referido HA puede reforzar esta teoría, aunque no se dispone de más información clínica sobre éstos. Por otra parte, hay que recordar que además del adelanto en el debut de la HA, la expresión clínica en este paciente podría dar lugar a afectación ocular, ya que las alteraciones bialélicas en *MYO7A* pueden causar síndrome de Usher. Si esto fuese así, estaríamos ante un caso de DFNA11 y síndrome de Usher coexistiendo en la misma familia. Sin embargo, para confirmar este hecho será necesario del seguimiento del paciente con el fin de detectar la aparición de RP.

Identificación de variantes nuevas

Es necesario recordar que en esta tesis se han considerado variantes nuevas aquellas que no han sido reportadas en las bases de datos *Deafness Variation Database* (DVD) (base de datos específica de variantes en genes asociados a HA identificadas por la Universidad de Iowa), *Human Gene Mutation*

Discusión

Database (HGMD) Professional (base de datos actualizada sobre variantes germinales asociadas a patología genética publicadas en la literatura científica) (48), o *ClinVar* (base de datos pública de variantes identificadas y registradas por los principales laboratorios internacionales de diagnóstico genético).

La gran heterogeneidad genética y alélica de la HA se refleja en el número de variantes nuevas encontradas en este trabajo. El 18% de los pacientes diagnosticados (11/62) presentaban alguna variante patogénica nueva en alguno de los genes del Panel 1, y en 4 de ellos ambas variantes patogénicas implicadas en la HA AR eran nuevas. Si tenemos en cuenta el total de variantes patogénicas diferentes identificadas mediante el Panel 1, el 27% resultó ser nueva (14/53). Varios estudios publicados en otras poblaciones han reportado también la detección de variantes nuevas en gran parte de los pacientes estudiados (200, 257, 258). Por tanto, no parece que sea característico de nuestra población sino un hallazgo general en todas las poblaciones.

El gen con más variantes patogénicas nuevas en nuestra cohorte es el *MYO15A* (AR), en el que el 80% de las variantes patogénicas diferentes que hemos identificado son nuevas (4 de 5). Hasta la fecha, se han descrito 266 variantes patogénicas en *MYO15A* (48). Teniendo en cuenta el tamaño de este gen, con más de 66 exones y un exón 2 de 3.828 nucleótidos, el número de variantes conocidas actualmente es muy bajo y contrasta con el alto porcentaje de variantes nuevas en *MYO15A* que hemos encontrado en nuestro estudio. Esto podría deberse por una parte a su gran tamaño y por otra al hecho de que no haya sido estudiado de forma rutinaria hasta la generalización de la tecnología NGS. Cabe resaltar que la variante nueva c.6004delG ha sido identificada en dos pacientes no emparentados, en ambos casos en heterocigosis con otra variante patogénica en *MYO15A*. Al no haberse descrito esta variante en otras poblaciones, es poco probable que se trate de un *hotspot*, por lo que postulamos que podría tratarse de una variante fundadora característica de población del País Vasco.

Otro de los genes con un porcentaje relativamente alto de variantes nuevas en nuestra cohorte es el gen *OTOF*: 2 de los 6 pacientes con HA asociada a *OTOF* presentan variantes nuevas que representan el 43% de todas las variantes patogénicas que hemos identificado en este gen (3 de 7 variantes diferentes). A día de hoy, se han publicado 192 variantes patogénicas en el gen *OTOF* (48). La variante recurrente en población española, c.2485C>T(p.Gln829*) está implicada en 4 de nuestros 6 pacientes con DFNB9 (80%). A pesar de no haber encontrado la misma variante nueva en dos pacientes, es posible que alguna de ellas sea recurrente en el País Vasco, aunque será necesario el estudio de un mayor número de pacientes para confirmar esta posibilidad.

Para terminar, podemos decir que la información que hemos obtenido es relevante en muchos sentidos:

Por una parte, la descripción del espectro mutacional de una población aporta información de gran interés, aunque es una tarea costosa y que requiere tiempo. Hasta la fecha se ha descrito el espectro mutacional para genes de HA de distintas poblaciones de todo el mundo, aunque en el caso de las europeas la información disponible es limitada si no tenemos en cuenta el gen *GJB2*. Por tanto, nuestro estudio es una oportunidad para avanzar en el conocimiento de las causas genéticas de HA en esta población del sur de Europa. Además, al no existir precedentes de estudios de este tipo realizados en Euskadi, nuestro estudio aporta las primeras evidencias respecto a la etiología genética de la HA en esta población.

Por otro lado, aunque la ampliación del diagnóstico genético a grandes paneles de genes supone un reto respecto al manejo de las variantes inciertas, duplica en nuestro caso el rendimiento diagnóstico, por lo que es evidente que es necesario. La limitación del estudio a los genes de alta o moderada evidencia facilitará la priorización de variantes causales sin aportar excesivas incertidumbres que compliquen el consejo genético al paciente. La información disponible gracias al exoma clínico podría suponer la posibilidad de ampliar el análisis a otros genes conforme se vayan encontrando más evidencias científicas de las asociaciones gen-HA.

Para finalizar, la identificación de la causa genética de la HA ayuda a establecer correlaciones genotipo-fenotipo que son fundamentales por distintos motivos: permiten tener un pronóstico de la enfermedad; pueden diagnosticar precozmente síndromes que cursan inicialmente con HA aislada; pueden ayudar a los pacientes o a sus familiares a tomar decisiones sobre su descendencia; y aportan información sobre los mecanismos de patogenicidad, lo que puede ayudar al desarrollo de futuras terapias génicas.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo y a la información previa publicada, podemos concluir que:

- 1) La tasa diagnóstica obtenida en esta tesis es mayor a la descrita previamente, probablemente por los criterios de selección de los pacientes que hemos utilizado. Además, es dependiente de la edad de inicio y la gravedad de la HA, aumentando si es congénita y profunda.
- 2) La inclusión de un mayor número de genes asociados a HA pero con menos evidencia no aumenta el rendimiento diagnóstico, por lo que la utilización de un estudio básico de los genes más frecuentes seguido de un panel de genes de causalidad demostrada se considera la aproximación óptima para el diagnóstico de la HA en el entorno clínico.
- 3) El espectro genético de la HA en la población del País Vasco es similar al descrito en la española y en otras poblaciones caucásicas, siendo el gen *GJB2* (y en concreto la variante recurrente en españoles c.35delG) la causa más frecuente de hipoacusia. El gen *STRC*, del que no existen datos en población española, es la segunda causa más frecuente en nuestra población y comparable a otras poblaciones caucásicas y europeas. Otros genes relevantes son los descritos también en otras poblaciones europeas, principalmente *OTOF*, *MYO15A* y *MT-RNR1*. Respecto a la HA de origen mitocondrial, la prevalencia en el País Vasco es del 4% y está muy por debajo de lo descrito en población española, aunque es probable que los datos publicados en la misma sobrevaloren su implicación real.
- 4) La frecuencia de portadores heterocigotos de delección del gen *STRC* en el País Vasco es del 1/66 individuos de la población general, lo que puede definirse como polimórfico y justifica su estudio en el diagnóstico de HA e incluso su inclusión en el análisis de portadores sanos.
- 5) Se han encontrado 17 variantes patogénicas nuevas, que amplían el espectro mutacional descrito previamente en la bibliografía y confirman la heterogeneidad genética de esta patología. Una de las variantes nuevas en el gen *MYO15A* se ha encontrado en dos pacientes, por lo que podría tratarse de una variante recurrente en el País Vasco.
- 6) Aportamos nuevas evidencias que refuerzan la asociación de *ATP2B2* con la HA no sindrómica, describiendo además una variante nueva en este gen que se consideraba de evidencia moderada.

- 7) Nuestros datos confirman que las correlaciones genotipo-fenotipo en el caso del *GJB2* no siempre son útiles y que probablemente existan modificadores genéticos, tal y como han propuesto otros autores. Proponemos que estos modificadores genéticos también pueden jugar un papel importante en los genes *STRC*, *OTOF*, *MYO15A* y *TECTA*, en mayor o menor medida. Además, proponemos un fenotipo para una variante hallada en *BSND*, y un posible caso de HA AR asociada a *MYO7A* (DFNB22) de cuya existencia se dudaba. Por último, describimos la coexistencia de HA no sindrómica AD y sindrómica AR debida a dos variantes patogénicas el gen *MYO7A*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Hayes SH, Ding D, Salvi RJ, Allman BL. Anatomy and physiology of the external, middle and inner ear. In: Handbook of Clinical Neurophysiology. Elsevier Health Sciences; 2013. p. 3-23.
2. Biga LM, Dawson S, Harwell A, Hopkins R, Kaufmann J, LeMaster M, et al. Hearing. In: Anatomy & Physiology. Corvallis, OR: OpenStax/Oregon State University; 2019.
3. Pickles JO. Auditory pathways: anatomy and physiology. Handbook of clinical neurology. 2015;129:3-25.
4. Le son [Internet].; 2016 []. Available from: <https://son2016.wordpress.com/author/son2016/>.
5. Hudspeth AJ. SnapShot: Auditory Transduction. Neuron (Cambridge, Mass.). 2013;80(2):536,536.e1.
6. Xu Z. Cellular Structure for Hair-Cell Mechanotransduction. In: Mechanotransduction of the Hair Cell. Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 5-13.
7. Dale Purves, George J Augustine, David Fitzpatrick, Lawrence C Katz, Anthony-Samuel LaMantia, James O McNamara, et al. Neuroscience. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.
8. Frank E Musiek, Jane A Baran. The auditory system: anatomy, physiology, and clinical correlates. Boston: Pearson/A and B; 2007.
9. Zhao HB. Hypothesis of K(+)-Recycling Defect Is Not a Primary Deafness Mechanism for Cx26 (GJB2) Deficiency. Front Mol Neurosci. 2017;10:162.
10. Goutman JD, Elgoyhen AB, Gómez-Casati ME. Cochlear hair cells: The sound-sensing machines. FEBS Lett. 2015;589(22):3354-61.
11. Ear as a frequency analyser [Internet]. Available from: <https://www.information-book.com/neurosciences/ear-as-frequency-analyser-otacoustic-emissions/>.
12. Collazo T, Corzón T, de Vergas JJ. Evaluación del paciente con hipoacusia. In: Sociedad Española de Otorrinolaringología, editor. Libro virtual de formación en ORL; 2014.
13. Manrique Rodríguez M, Marco Algarra J. Audiología. SEORL PCF Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-facial; 2014.
14. Perez Legorburu A. Programa de Cribado Auditivo Neonatal de Euskadi. 2016.
15. Shalit E, Avraham KB. Genetics of Hearing Loss. In: Auditory Trauma, Protection and Repair. Boston, MA: Springer; 2008. p. 9-47.

16. Shearer AE, Hildebrand MS, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss and Deafness Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al, editors. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
17. Egbert M, Deppermann A. Hearing Aids Communication. Mannheim: Verlag; 2012.
18. Olusanya BO, Davis AC, Hoffman HJ. Hearing loss grades and the International classification of functioning, disability and health. Bull World Health Organ. 2019;97:725-28.
19. Mazzoli. Audiological terms. In: Martini A, Mazzoli M, Stephens D, Read AP, editors. Definitions, Protocols and Guidelines in Genetic Hearing Impairment. Wiley; 2001.
20. Bureau International d'Audiophonologie (BIAP)[Internet]. Available from: www.biap.org.
21. Rouco JM, Vaamonde I, del Río V. Audioprótesis externas. In: SEORL-PCF Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-facial, editor. Libro Virtual de Formación en ORL; 2015.
22. Cochlear implants [Internet].; 2010. Available from: <https://www.nidcd.nih.gov/health/cochlear-implants>.
23. Shearer AE, Hansen MR. Auditory synaptopathy, auditory neuropathy, and cochlear implantation. Laryngoscope Investig Otolaryngol. 2019;4(4):429-40.
24. Manrique M, Cervera-Paz FJ, Huarte A, Molina M. Advantages of Cochlear Implantation in Prelingual Deaf Children before 2 Years of Age when Compared with Later Implantation. Laryngoscope. 2004;114(8):1462-9.
25. Olusanya BO, Davis AC, Hoffman HJ. Hearing loss: rising prevalence and impact. Bull World Health Organ. 2019;97(10):646-646A.
26. Morton CC, Nance WE. Newborn Hearing Screening — A Silent Revolution. N Engl J Med. 2006;354(20):2151-64.
27. Oza AM, DiStefano MT, Hemphill SE, Cushman BJ, Grant AR, Siegert RK, et al. Expert specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss. Hum Mutat. 2018;39(11):1593-613.
28. White KR. Early hearing detection and intervention programs: Opportunities for genetic services. Am J Med Genet A. 2004;130A(1):29-36.
29. Alford RL, Arnos KS, Fox M, Lin JW, Palmer CG, Pandya A, et al. American College of Medical Genetics and Genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss. Genet Med. 2014;16(4):347-55.

Bibliografía

30. Rodríguez-Ballesteros M, Olarte M, Aguirre LA, Galán F, Galán R, Vallejo LA, et al. Molecular and clinical characterisation of three Spanish families with maternally inherited non-syndromic hearing loss caused by the 1494C→T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. *J Med Genet.* 2006;43(11):e54.
31. Bravo O, Ballana E, Estivill X. Cochlear alterations in deaf and unaffected subjects carrying the deafness-associated A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344(2):511-6.
32. Hereditary Hearing Loss Homepage [Internet]. Available from: <https://hereditaryhearingloss.org/>.
33. Hilgert N, Smith RJH, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2009;681(2-3):189-96.
34. Cabanillas R, Diñeiro M, Cifuentes GA, Castillo D, Pruneda PC, Alvarez R, et al. Comprehensive genomic diagnosis of non-syndromic and syndromic hereditary hearing loss in Spanish patients. *BMC Med Genomics.* 2018;11(1):58.
35. Yang T, Guo L, Wang L, Yu X. Diagnosis, Intervention, and Prevention of Genetic Hearing Loss. In: *Hearing Loss: Mechanisms, Prevention and Cure.* Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 73-92.
36. Del Castillo FJ, Del Castillo I. DFNB1 Non-syndromic Hearing Impairment: Diversity of Mutations and Associated Phenotypes. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:428.
37. Wingard JC, Zhao Hong-Bo. Cellular and deafness mechanisms underlying connexin mutation-induced hearing loss - a common hereditary deafness. *Front Cell Neurosci.* 2015;29(9).
38. Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(4):285-95.
39. GJB2 (gap junction protein beta 2) [Internet]. Available from: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_GJB2.html.
40. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature.* 1997;387(6628):80-3.
41. Sun Y, Tang W, Chang Q, Wang Y, King W, Lin X. Connexin30 null and conditional connexin26 null mice display distinct pattern and time course of cellular degeneration in the cochlea. *J Comp Neurol.* 2009;516(6):569-79.
42. DeBoever C, Tanigawa Y, Lindholm ME, McInnes G, Lavertu A, Ingelsson E, et al. Medical relevance of protein-truncating variants across 337,205 individuals in the UK Biobank study. *Nat Commun.* 2018;9(1):1612-10.
43. Del Castillo FJ, Del Castillo I. DFNB1 Non-syndromic Hearing Impairment: Diversity of Mutations and Associated Phenotypes. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:428.

44. Minami SB, Mutai H, Nakano A, Arimoto Y, Taiji H, Morimoto N, et al. GJB2-associated hearing loss undetected by hearing screening of newborns. *Gene*. 2013;532(1):41-5.
45. Snoeckx RL, Huygen PLM, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, et al. GJB2 Mutations and Degree of Hearing Loss: A Multicenter Study. *Am J Hum Genet*. 2005;77(6):945-57.
46. Ramzan K, Huma R, Al-Numair NS, Imtiaz F, Al-Sayed M. Evidence for an autosomal recessive pattern of inheritance in Keratitis-ichthyosis-deafness (KID) syndrome: Exome sequencing reveals a novel homozygous GJB2 mutation. *Meta Gene*. 2019;19:15-22.
47. Kenneson A, Braun K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet Med*. 2002;4(4):258-74.
48. The Human Gene Mutation Database (HGMD)[Internet]. [cited 2020].
49. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brøndum-Nielsen K, et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet*. 2000;8(1):19-23.
50. Lerer I, Sagi M, Ben-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D. A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: A novel founder mutation in Ashkenazi Jews. *Hum Mutat*. 2001;18(5):460.
51. Boulay A-, del Castillo FJ, Giraudet F, Hamard G, Giaume C, Petit C, et al. Hearing Is Normal without Connexin30. *J Neurosci*. 2013;33(2):430-4.
52. Rodriguez-Paris J, Schrijver I. The digenic hypothesis unraveled: The GJB6 del(GJB6-D13S1830) mutation causes allele-specific loss of GJB2 expression in cis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;389(2):354-9.
53. del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, et al. Prevalence and Evolutionary Origins of the del(GJB6-D13S1830) Mutation in the DFNB1 Locus in Hearing-Impaired Subjects: a Multicenter Study. *Am J Hum Genet*. 2003;73(6):1452-8.
54. del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Álvarez A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira CA, et al. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet*. 2005;42(7):588-94.
55. Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. *GenomeBiology.com*. 2009;10(8):235.
56. Bashir Z, Latief N, Belyantseva IA, Iqbal F, Amer Riazuddin S, Khan SN, et al. Phenotypic variability of CLDN14 mutations causing DFNB29 hearing loss in the Pakistani population. *J Hum Genet*. 2012;58(2):102-8.

Bibliografía

57. Ahmed ZM, Riazuddin S, Friedman TB, Riazuddin S, Wilcox ER, Griffith AJ. Clinical Manifestations of DFNB29 Deafness. In: Genetic Hearing Impairment. Basel, Switzerland: S. Karger AG; 2002. p. 156-60.
58. Kitajiri S, Katsuno T. Tricellular Tight Junctions in the Inner Ear. *Biomed Res Int.* 2016;2016:6137541-5.
59. Mašindová I, Šoltýsová A, Varga L, Mátyás P, Ficek A, Hučková M, et al. MARVELD2 (DFNB49) mutations in the hearing impaired Central European Roma population--prevalence, clinical impact and the common origin. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124232.
60. Borck G, Ur Rehman A, Lee K, Pogoda H, Kakar N, von Ameln S, et al. Loss-of-function mutations of ILDR1 cause autosomal-recessive hearing impairment DFNB42. *Am J Hum Genet.* 2011;88(2):127-37.
61. Kim NKD, Higashi T, Lee KY, Kim AR, Kitajiri S, Kim MY, et al. Downsloping high-frequency hearing loss due to inner ear tricellular tight junction disruption by a novel ILDR1 mutation in the Ig-like domain. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116931.
62. Drummond MC, Belyantseva IA, Friderici KH, Friedman TB. Actin in hair cells and hearing loss. *Hear Res.* 2012;288(1-2):89-99.
63. Neuhaus C, Lang-Roth R, Zimmermann U, Heller R, Eisenberger T, Weikert M, et al. Extension of the clinical and molecular phenotype of DIAPH1-associated autosomal dominant hearing loss (DFNA1). *Clin Genet.* 2017;91(6):892-901.
64. ClinGen, Clinical Genome Resource [Internet]. Available from: <https://clinicalgenome.org/>.
65. PanelApp Genes and Entities [Internet]. Available from: <https://panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/entities/>.
66. Brownstein Z, Abu-Rayyan A, Karfunkel-Doron D, Sirigu S, Davidov B, Shohat M, et al. Novel myosin mutations for hereditary hearing loss revealed by targeted genomic capture and massively parallel sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(6):768-75.
67. Dror AA, Avraham KB. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu Rev Genet.* 2009;43:411-37.
68. Schwander M, Kachar B, Müller U. Review series: The cell biology of hearing. *J Cell Biol.* 2010;190(1):9-20.
69. Masters TA, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosins: Domain Organisation, Motor Properties, Physiological Roles and Cellular Functions. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;235:77-122.
70. Volk AE, Lang-Roth R, Yigit G, Borck G, Nuernberg G, Rosenkranz S, et al. A novel MYO6 splice site mutation causes autosomal dominant sensorineural hearing loss type DFNA22 with a favourable outcome after cochlear implantation. *Audiol Neurootol.* 2013;18(3):192-9.

71. Oka S, Day TF, Nishio S, Moteki H, Miyagawa M, Morita S, et al. Clinical Characteristics and In Vitro Analysis of MYO6 Variants Causing Late-Onset Progressive Hearing Loss. *Genes (Basel)*. 2020;11(3).
72. Tropsakal V, Hilgert N, van Dinther J, Tranebjaerg L, Rendtorff ND, Zarowski A, et al. Genotype-phenotype correlation for DFNA22: characterization of non-syndromic, autosomal dominant, progressive sensorineural hearing loss due to MYO6 mutations. *Audiol Neurootol*. 2010;15(4):211-20.
73. Zazo Seco C, Wesdorp M, Feenstra I, Pfundt R, Hehir-Kwa JY, Lelieveld SH, et al. The diagnostic yield of whole-exome sequencing targeting a gene panel for hearing impairment in The Netherlands. *Eur J Hum Genet*. 2017;25(3):308-14.
74. Rehman AU, Bird JE, Faridi R, Shahzad M, Shah S, Lee K, et al. Mutational Spectrum of MYO15A and the Molecular Mechanisms of DFNB3 Human Deafness. *Hum Mutat*. 2016;37(10):991-1003.
75. Zhang J, Guan J, Wang H, Yin L, Wang D, Zhao L, et al. Genotype-phenotype correlation analysis of MYO15A variants in autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *BMC Med Genet*. 2019;20(1):60.
76. Fang Q, Indzhykulian AA, Mustapha M, Riordan GP, Dolan DF, Friedman TB, et al. The 133-kDa N-terminal domain enables myosin 15 to maintain mechanotransducing stereocilia and is essential for hearing. *Elife*. 2015;4.
77. Wang A, Liang Y, Fridell RA, Probst FJ, Wilcox ER, Touchman JW, et al. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science*. 1998;280(5368):1447-51.
78. Kim BJ, Kim AR, Lee C, Kim SY, Kim NKD, Chang MY, et al. Discovery of CDH23 as a Significant Contributor to Progressive Postlingual Sensorineural Hearing Loss in Koreans. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165680.
79. Pepermans E, Michel V, Goodyear R, Bonnet C, Abdi S, Dupont T, et al. The CD2 isoform of protocadherin-15 is an essential component of the tip-link complex in mature auditory hair cells. *EMBO Mol Med*. 2014;6(7):984-92.
80. Miyagawa M, Nishio S, Usami S. Prevalence and clinical features of hearing loss patients with CDH23 mutations: a large cohort study. *PLoS One*. 2012;7(8):e40366.
81. Ahmed ZM, Riazuddin S, Friedman TB, Riazuddin S, Wilcox ER, Griffith AJ. Clinical manifestations of DFNB29 deafness. *Adv Otorhinolaryngol*. 2002;61:156-60.
82. Naito T, Nishio S, Iwasa Y, Yano T, Kumakawa K, Abe S, et al. Comprehensive genetic screening of KCNQ4 in a large autosomal dominant nonsyndromic hearing loss cohort: genotype-phenotype correlations and a founder mutation. *PLoS One*. 2013;8(5):e63231.
83. Hilgert N, Smith RJH, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res*. 2009;681(2-3):189-96.

Bibliografía

84. Wu C, Tsai C, Lin Y, Chen P, Lin P, Cheng Y, et al. Genetic Epidemiology and Clinical Features of Hereditary Hearing Impairment in the Taiwanese Population. *Genes (Basel)*. 2019;10(10).
85. Santarelli R, del Castillo I, Cama E, Scimemi P, Starr A. Audibility, speech perception and processing of temporal cues in ribbon synaptic disorders due to OTOF mutations. *Hear Res*. 2015;330(Pt B):200-12.
86. Shearer AE, Smith RJ. OTOF-Related Deafness. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al, editors. *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
87. Cabanillas Farpón R, Cadiñanos Bañales J. Hipoacusias hereditarias: asesoramiento genético. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2011;63(3):218-29.
88. Migliosi V, Modamio-Høybjør S, Moreno-Pelayo MA, Rodríguez-Ballesteros M, Villamar M, Tellería D, et al. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *J Med Genet*. 2002;39(7):502-6.
89. Verpy E, Leibovici M, Michalski N, Goodyear RJ, Houdon C, Weil D, et al. Stereocilin connects outer hair cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane. *J Comp Neurol*. 2011;519(2):194-210.
90. Back D, Shehata-Dieler W, Vona B, Hofrichter MAH, Schroeder J, Haaf T, et al. Phenotypic Characterization of DFNB16-associated Hearing Loss. *Otol Neurotol*. 2019;40(1):e48-55.
91. Hackney CM, Furness DN. The composition and role of cross links in mechano-electrical transduction in vertebrate sensory hair cells. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 8):1721-31.
92. Mandelker D, Amr SS, Pugh T, Gowrisankar S, Shakhbatyan R, Duffy E, et al. Comprehensive diagnostic testing for stereocilin: an approach for analyzing medically important genes with high homology. *J Mol Diagn*. 2014;16(6):639-47.
93. Knijnenburg J, Oberstein, S. A. J. Lesnik, Frei K, Lucas T, Gijsbers ACJ, Ruivenkamp CaL, et al. A homozygous deletion of a normal variation locus in a patient with hearing loss from non-consanguineous parents. *J Med Genet*. 2009;46(6):412-7.
94. Vona B, Hofrichter MaH, Neuner C, Schröder J, Gehrig A, Hennermann JB, et al. DFNB16 is a frequent cause of congenital hearing impairment: implementation of STRC mutation analysis in routine diagnostics. *Clin Genet*. 2015;87(1):49-55.
95. Plevova P, Paprskarova M, Tvrda P, Turska P, Slavkovsky R, Mrazkova E. STRC Deletion is a Frequent Cause of Slight to Moderate Congenital Hearing Impairment in the Czech Republic. *Otol Neurotol*. 2017;38(10):e393-400.

96. Baux D, Vaché C, Blanchet C, Willems M, Baudoin C, Moclyn M, et al. Combined genetic approaches yield a 48% diagnostic rate in a large cohort of French hearing-impaired patients. *Sci Rep.* 2017;7(1):16783.
97. Yokota Y, Moteki H, Nishio S, Yamaguchi T, Wakui K, Kobayashi Y, et al. Frequency and clinical features of hearing loss caused by STRC deletions. *Sci Rep.* 2019;9(1):4408.
98. Sloan-Heggen CM, Bierer AO, Shearer AE, Kolbe DL, Nishimura CJ, Frees KL, et al. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Hum Genet.* 2016;135(4):441-50.
99. Hoppman N, Aypar U, Brodersen P, Brown N, Wilson J, Babovic-Vuksanovic D. Genetic testing for hearing loss in the United States should include deletion/duplication analysis for the deafness/infertility locus at 15q15.3. *Mol Cytogenet.* 2013;6(1):19.
100. JanssensdeVarebeke SPF, Van Camp G, Peeters N, Elinck E, Widdershoven J, Cox T, et al. Bi-allelic inactivating variants in the COCH gene cause autosomal recessive prelingual hearing impairment. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(4):587-91.
101. Bae S, Robertson NG, Cho H, Morton CC, Jung DJ, Baek J, et al. Identification of pathogenic mechanisms of COCH mutations, abolished cochlin secretion, and intracellular aggregate formation: genotype-phenotype correlations in DFNA9 deafness and vestibular disorder. *Hum Mutat.* 2014;35(12):1506-13.
102. Gao J, Xue J, Chen L, Ke X, Qi Y, Liu Y. Whole exome sequencing identifies a novel DFNA9 mutation, C162Y. *Clin Genet.* 2013;83(5):477-81.
103. Gao X, Huang S, Yuan Y, Xu J, Gu P, Bai D, et al. Identification of TMPRSS3 as a Significant Contributor to Autosomal Recessive Hearing Loss in the Chinese Population. *Neural Plast.* 2017;2017:3192090.
104. Ganapathy A, Pandey N, Srisailapathy CRS, Jalvi R, Malhotra V, Venkatappa M, et al. Non-syndromic hearing impairment in India: high allelic heterogeneity among mutations in TMPRSS3, TMC1, USH1C, CDH23 and TMIE. *PLoS One.* 2014;9(1):e84773.
105. Weegerink NJD, Schraders M, Oostrik J, Huygen PLM, Strom TM, Granneman S, et al. Genotype-phenotype correlation in DFNB8/10 families with TMPRSS3 mutations. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2011;12(6):753-66.
106. Pan B, Géléoc GS, Asai Y, Horwitz GC, Kurima K, Ishikawa K, et al. TMC1 and TMC2 are components of the mechanotransduction channel in hair cells of the mammalian inner ear. *Neuron.* 2013;79(3):504-15.
107. Jia Y, Zhao Y, Kusakizako T, Wang Y, Pan C, Zhang Y, et al. TMC1 and TMC2 Proteins Are Pore-Forming Subunits of Mechanosensitive Ion Channels. *Neuron.* 2020;105(2):310,321.e3.

Bibliografía

108. Yamamoto N, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S, Nishi Y, et al. Prevalence of TECTA mutation in patients with mid-frequency sensorineural hearing loss. *Orphanet J Rare Dis.* 2017 09 25;;12(1):157.
109. Hildebrand MS, Morín M, Meyer NC, Mayo F, Modamio-Hoybjor S, Mencía A, et al. DFNA8/12 caused by TECTA mutations is the most identified subtype of nonsyndromic autosomal dominant hearing loss. *Hum Mutat.* 2011 Jul;32(7):825-34.
110. Yasukawa R, Moteki H, Nishio S, Ishikawa K, Abe S, Honkura Y, et al. The Prevalence and Clinical Characteristics of TECTA-Associated Autosomal Dominant Hearing Loss. *Genes (Basel).* 2019 09 24;;10(10).
111. Fukuoka H, Kanda Y, Ohta S, Usami S. Mutations in the WFS1 gene are a frequent cause of autosomal dominant nonsyndromic low-frequency hearing loss in Japanese. *J Hum Genet.* 2007;52(6):510-5.
112. Pollak A, Lechowicz U, Kędra A, Stawiński P, Rydzanicz M, Furmanek M, et al. Novel and De Novo Mutations Extend Association of POU3F4 with Distinct Clinical and Radiological Phenotype of Hearing Loss. *PLoS One.* 2016;11(12):e0166618.
113. Su Y, Gao X, Huang S, Mao J, Huang B, Zhao J, et al. Clinical and molecular characterization of POU3F4 mutations in multiple DFNX2 Chinese families. *BMC Med Genet.* 2018;19(1):157.
114. Usami S, Nishio S. Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, Mitochondrial. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al, editors. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
115. Dean L. Gentamicin Therapy and MT-RNR1 Genotype. In: Pratt VM, McLeod HL, Rubinstein WS, Scott SA, Dean LC, Kattman BL, et al, editors. *Medical Genetics Summaries*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
116. Kokotas H, Petersen MB, Willems PJ. Mitochondrial deafness. *Clin Genet.* 2007;71(5):379-91.
117. Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, Rodríguez-Ballesteros M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo I, Moreno F. [Prevalence of the 35delG mutation in the GJB2 gene, del (GJB6-D13S1830) in the GJB6 gene, Q829X in the OTOF gene and A1555G in the mitochondrial 12S rRNA gene in subjects with non-syndromic sensorineural hearing impairment of congenital/childhood onset]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2005;56(10):463-8.
118. Mutai H, Watabe T, Kosaki K, Ogawa K, Matsunaga T. Mitochondrial mutations in maternally inherited hearing loss. *BMC Med Genet.* 2017;18(1):32.
119. Estévez R, Boettger T, Stein V, Birkenhäger R, Otto E, Hildebrandt F, et al. Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature.* 2001;414(6863):558-61.

120. Janssen AGH, Scholl U, Domeyer C, Nothmann D, Leinenweber A, Fahlke C. Disease-causing dysfunctions of barttin in Bartter syndrome type IV. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(1):145-53.
121. Riazuddin S, Anwar S, Fischer M, Ahmed ZM, Khan SY, Janssen AGH, et al. Molecular Basis of DFNB73: Mutations of BSND Can Cause Nonsyndromic Deafness or Bartter Syndrome. *Am J Med Genet*. 2009;85(2):273-80.
122. Edvardson S, Jalas C, Shaag A, Zenvirt S, Landau C, Lerer I, et al. A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(5):1170-2.
123. Strande NT, Riggs ER, Buchanan AH, Ceyhan-Birsoy O, DiStefano M, Dwight SS, et al. Evaluating the Clinical Validity of Gene-Disease Associations: An Evidence-Based Framework Developed by the Clinical Genome Resource. *Am J Hum Genet*. 2017;100(6):895-906.
124. Abou Tayoun AN, Al Turki SH, Oza AM, Bowser MJ, Hernandez AL, Funke BH, et al. Improving hearing loss gene testing: a systematic review of gene evidence toward more efficient next-generation sequencing-based diagnostic testing and interpretation. *Genet Med*. 2016;18(6):545-53.
125. Martin AR, Williams E, Foulger RE, Leigh S, Daugherty LC, Niblock O, et al. PanelApp crowdsources expert knowledge to establish consensus diagnostic gene panels. *Nat Genet*. 2019;51(11):1560-5.
126. Bauduer F, Feingold J, Lacombe D. The Basques: review of population genetics and Mendelian disorders. *Hum Biol*. 2005;77(5):619-37.
127. Martí Massó JF, Zarranz JJ, Otaegui D, López de Munain A. Neurogenetic disorders in the Basque population. *Ann Hum Genet*. 2015;79(1):57-75.
128. Shearer AE, Smith RJH. Massively Parallel Sequencing for Genetic Diagnosis of Hearing Loss: The New Standard of Care. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;153(2):175-82.
129. Primer3Plus [Internet]. Available from: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plusAbout.cgi>.
130. Exon Primer [Internet]. Available from: <https://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/www.html>.
131. SNP Check [Internet]. Available from: <https://genetools.org/SNPCheck/snpcheck.htm>.
132. UCSC In-Silico PCR [Internet]. Available from: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>.
133. MRC Holland [Internet]. Available from: <https://www.mrcholland.com/product/P163/1886>.
134. MLPA General Protocol - MRC Holland [Internet]. Available from: [vhttps://support.mrcholland.com/downloads/files/mlpa-general-protocol-one-tube](https://support.mrcholland.com/downloads/files/mlpa-general-protocol-one-tube).

Bibliografía

135. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*. 2011;83(22):8604-10.
136. Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(11):1544-57.
137. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17(6):333-51.
138. FastQC [Internet]. Available from: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
139. Roy S, LaFramboise WA, Nikiforov YE, Nikiforova MN, Routbort MJ, Pfeifer J, et al. Next-Generation Sequencing Informatics: Challenges and Strategies for Implementation in a Clinical Environment. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(9):958-75.
140. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
141. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D886-94.
142. Ensembl Variation Pathogenicity Prediction [Internet]. Available from: https://m.ensembl.org/info/genome/variation/prediction/protein_function.html.
143. Hoefsloot LH, Roux A, Bitner-Glindzicz M, contributors to EMQN DFNB1 best practice meeting. EMQN Best Practice guidelines for diagnostic testing of mutations causing non-syndromic hearing impairment at the DFNB1 locus. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(11):1325-9.
144. Su C, Li S, Su M, Chen W, Yang J. Mutation R184Q of connexin 26 in hearing loss patients has a dominant-negative effect on connexin 26 and connexin 30. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(9):1061-4.
145. Pangršič T, Reisinger E, Moser T. Otoferlin: a multi-C2 domain protein essential for hearing. *Trends Neurosci*. 2012;35(11):671-80.
146. Naz S, Imtiaz A, Mujtaba G, Maqsood A, Bashir R, Bukhari I, et al. Genetic causes of moderate to severe hearing loss point to modifiers. *Clin Genet*. 2017;91(4):589-98.
147. Maekawa K, Nishio S, Abe S, Goto S, Honkura Y, Iwasaki S, et al. Mutational Spectrum and Clinical Features of Patients with LOXHD1 Variants Identified in an 8074 Hearing Loss Patient Cohort. *Genes (Basel)*. 2019;10(10).

148. Neuhaus C, Eisenberger T, Decker C, Nagl S, Blank C, Pfister M, et al. Next-generation sequencing reveals the mutational landscape of clinically diagnosed Usher syndrome: copy number variations, phenocopies, a predominant target for translational read-through, and PEX26 mutated in Heimler syndrome. *Mol Genet Genomic Med*. 2017;5(5):531-52.
149. Iwasa Y, Nishio S, Usami S. Comprehensive Genetic Analysis of Japanese Autosomal Dominant Sensorineural Hearing Loss Patients. *PLoS One*. 2016;11(12):e0166781.
150. Wattenhofer M, Di Iorio MV, Rabionet R, Dougherty L, Pampanos A, Schwede T, et al. Mutations in the *TMPRSS3* gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients. *J Mol Med (Berl)*. 2002;80(2):124-31.
151. Rendtorff ND, Lodahl M, Boulahbel H, Johansen IR, Pandya A, Welch KO, et al. Identification of p.A684V missense mutation in the *WFS1* gene as a frequent cause of autosomal dominant optic atrophy and hearing impairment. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(6):1298-313.
152. Qian X, Qin L, Xing G, Cao X. Phenotype Prediction of Pathogenic Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms in *WFS1*. *Sci Rep*. 2015;5:14731.
153. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019;35(11):1978-80.
154. Choi B, Kang SH, Hyun YS, Kanwal S, Park SW, Koo H, et al. A complex phenotype of peripheral neuropathy, myopathy, hoarseness, and hearing loss is linked to an autosomal dominant mutation in *MYH14*. *Hum Mutat*. 2011;32(6):669-77.
155. Donaudy F, Snoeckx R, Pfister M, Zenner H, Blin N, Di Stazio M, et al. Nonmuscle myosin heavy-chain gene *MYH14* is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet*. 2004;74(4):770-6.
156. Kim BJ, Kim AR, Han JH, Lee C, Oh DY, Choi BY. Discovery of *MYH14* as an important and unique deafness gene causing prelingually severe autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *J Gene Med*. 2017;19(4).
157. Donaudy F, Zheng L, Ficarella R, Ballana E, Carella M, Melchionda S, et al. *Espin* gene (*ESPN*) mutations associated with autosomal dominant hearing loss cause defects in microvillar elongation or organisation. *J Med Genet*. 2006;43(2):157-61.
158. Wang R, Han S, Khan A, Zhang X. Molecular Analysis of Twelve Pakistani Families with Nonsyndromic or Syndromic Hearing Loss. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2017;21(5):316-21.
159. Hoskins BE, Cramer CH, Silvius D, Zou D, Raymond RM, Orten DJ, et al. Transcription factor *SIX5* is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome. *Am J Hum Genet*. 2007;80(4):800-4.

Bibliografía

160. Krug P, Morinière V, Marlin S, Koubi V, Gabriel HD, Colin E, et al. Mutation screening of the EYA1, SIX1, and SIX5 genes in a large cohort of patients harboring branchio-oto-renal syndrome calls into question the pathogenic role of SIX5 mutations. *Hum Mutat.* 2011;32(2):183-90.
161. Klesert TR, Cho DH, Clark JI, Maylie J, Adelman J, Snider L, et al. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet.* 2000;25(1):105-9.
162. Sarkar PS, Appukuttan B, Han J, Ito Y, Ai C, Tsai W, et al. Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet.* 2000;25(1):110-4.
163. Milunsky JM. Waardenburg Syndrome Type I. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al, editors. *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
164. del Castillo FJ, del Castillo I. The DFNB1 subtype of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011;16:3252-74.
165. Sakuma N, Moteki H, Takahashi M, Nishio S, Arai Y, Yamashita Y, et al. An effective screening strategy for deafness in combination with a next-generation sequencing platform: a consecutive analysis. *J Hum Genet.* 2016;61(3):253-61.
166. Shearer AE, Black-Ziegelbein EA, Hildebrand MS, Eppsteiner RW, Ravi H, Joshi S, et al. Advancing genetic testing for deafness with genomic technology. *J Med Genet.* 2013;50(9):627-34.
167. Guan M. Mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity. *Mitochondrion.* 2011;11(2):237-45.
168. Estivill X, Govea N, Barceló E, Badenas C, Romero E, Moral L, et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet.* 1998;62(1):27-35.
169. Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng J, Han D, et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet.* 2004;74(1):139-52.
170. Rabionet R, Zelante L, López-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet.* 2000;106(1):40-4.
171. Chan DK, Chang KW. GJB2-associated hearing loss: systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype. *Laryngoscope.* 2014;124(2):34.
172. Rodríguez-Ballesteros M, Reynoso R, Olarte M, Villamar M, Morera C, Santarelli R, et al. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy. *Hum Mutat.* 2008;29(6):823-31.

173. Shearer AE, Kolbe DL, Azaiez H, Sloan CM, Frees KL, Weaver AE, et al. Copy number variants are a common cause of non-syndromic hearing loss. *Genome Med.* 2014;6(5):37.
174. Francey LJ, Conlin LK, Kadesch HE, Clark D, Berrodin D, Sun Y, et al. Genome-wide SNP genotyping identifies the Stereocilin (STRC) gene as a major contributor to pediatric bilateral sensorineural hearing impairment. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(2):298-308.
175. Sommen M, Schrauwen I, Vandeweyer G, Boeckx N, Corneveaux JJ, van den Ende J, et al. DNA Diagnostics of Hereditary Hearing Loss: A Targeted Resequencing Approach Combined with a Mutation Classification System. *Hum Mutat.* 2016;37(8):812-9.
176. Iwasa Y, Nishio S, Sugaya A, Kataoka Y, Kanda Y, Taniguchi M, et al. OTOF mutation analysis with massively parallel DNA sequencing in 2,265 Japanese sensorineural hearing loss patients. *PLoS One.* 2019;14(5):e0215932.
177. Farjami M, Assadi R, Afzal Javan F, Alimardani M, Eslami S, Mansoori Derakhshan S, et al. The worldwide frequency of MYO15A gene mutations in patients with non-syndromic hearing loss: A meta-analysis. *Iran J Basic Med Sci.* 2020;23(7):841-8.
178. Bademci G, Foster J, Mahdieh N, Bonyadi M, Duman D, Cengiz FB, et al. Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive nonsyndromic deafness in a large multiethnic cohort. *Genet Med.* 2016;18(4):364-71.
179. Vona B, Müller T, Nanda I, Neuner C, Hofrichter MAH, Schröder J, et al. Targeted next-generation sequencing of deafness genes in hearing-impaired individuals uncovers informative mutations. *Genet Med.* 2014;16(12):945-53.
180. Guan Q, Balciuniene J, Cao K, Fan Z, Biswas S, Wilkens A, et al. AUDIOME: a tiered exome sequencing-based comprehensive gene panel for the diagnosis of heterogeneous nonsyndromic sensorineural hearing loss. *Genet Med.* 2018;20(12):1600-8.
181. Mehta D, Noon SE, Schwartz E, Wilkens A, Bedoukian EC, Scarano I, et al. Outcomes of evaluation and testing of 660 individuals with hearing loss in a pediatric genetics of hearing loss clinic. *Am J Med Genet A.* 2016;170(10):2523-30.
182. Reardon W, Coffey R, Phelps PD, Luxon LM, Stephens D, Kendall-Taylor P, et al. Pendred syndrome--100 years of underascertainment? *QJM.* 1997;90(7):443-7.
183. Albert S, Blons H, Jonard L, Feldmann D, Chauvin P, Loundon N, et al. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(6):773-9.
184. Booth KT, Ghaffar A, Rashid M, Hovey LT, Hussain M, Frees K, et al. Novel loss-of-function mutations in COCH cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Genet.* 2020;139(12):1565-74.

Bibliografía

185. Street VA, McKee-Johnson JW, Fonseca RC, Tempel BL, Noben-Trauth K. Mutations in a plasma membrane Ca²⁺-ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice. *Nat Genet.* 1998;19(4):390-4.
186. McCullough BJ, Tempel BL. Haplo-insufficiency revealed in deafwaddler mice when tested for hearing loss and ataxia. *Hear Res.* 2004;195(1-2):90-102.
187. Carpinelli MR, Manning MG, Kile BT, Burt RA, Rachel AB. Two ENU-induced alleles of *Atp2b2* cause deafness in mice. *PLoS One.* 2013;8(6):e67479.
188. Schultz JM, Yang Y, Caride AJ, Filoteo AG, Penheiter AR, Lagziel A, et al. Modification of human hearing loss by plasma-membrane calcium pump PMCA2. *N Engl J Med.* 2005;352(15):1557-64.
189. Ficarella R, Di Leva F, Bortolozzi M, Ortolano S, Donaudy F, Petrillo M, et al. A functional study of plasma-membrane calcium-pump isoform 2 mutants causing digenic deafness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(5):1516-21.
190. Smits JJ, Oostrik J, Beynon AJ, Kant SG, de Koning Gans, Pia A. M., Rotteveel LJC, et al. De novo and inherited loss-of-function variants of *ATP2B2* are associated with rapidly progressive hearing impairment. *Hum Genet.* 2019;138(1):61-72.
191. Ozaki H, Watanabe Y, Ikeda K, Kawakami K. Impaired interactions between mouse *Eyal* harboring mutations found in patients with branchio-oto-renal syndrome and Six, Dach, and G proteins. *J Hum Genet.* 2002;47(3):107-16.
192. Chang EH, Menezes M, Meyer NC, Cucci RA, Vervoort VS, Schwartz CE, et al. Branchio-oto-renal syndrome: the mutation spectrum in *EYA1* and its phenotypic consequences. *Hum Mutat.* 2004;23(6):582-9.
193. Schultz JM, Khan SN, Ahmed ZM, Riazuddin S, Waryah AM, Chhatre D, et al. Noncoding mutations of *HGF* are associated with nonsyndromic hearing loss, *DFNB39*. *Am J Hum Genet.* 2009;85(1):25-39.
194. Shibata S, Miwa T, Wu H, Levitt P, Ohshima T. Hepatocyte Growth Factor-c-MET Signaling Mediates the Development of Nonsensory Structures of the Mammalian Cochlea and Hearing. *J Neurosci.* 2016;36(31):8200-9.
195. Chen S, Dong C, Wang Q, Zhong Z, Qi Y, Ke X, et al. Targeted Next-Generation Sequencing Successfully Detects Causative Genes in Chinese Patients with Hereditary Hearing Loss. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2016;20(11):660-5.
196. Richard EM, Santos-Cortez RLP, Faridi R, Rehman AU, Lee K, Shahzad M, et al. Global genetic insight contributed by consanguineous Pakistani families segregating hearing loss. *Hum Mutat.* 2019;40(1):53-72.
197. Hilgert N, Alasti F, Dieltjens N, Pawlik B, Wollnik B, Uyguner O, et al. Mutation analysis of *TMC1* identifies four new mutations and suggests an additional deafness gene at loci *DFNA36* and *DFNB7/11*. *Clin Genet.* 2008;74(3):223-32.

198. Walsh T, Pierce SB, Lenz DR, Brownstein Z, Dagan-Rosenfeld O, Shahin H, et al. Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. *Am J Hum Genet.* 2010;87(1):101-9.
199. Kim M, Kim Y, Sagong B, Cho H, Bae JW, Kim J, et al. Genetic analysis of genes related to tight junction function in the Korean population with non-syndromic hearing loss. *PLoS One.* 2014;9(4):e95646.
200. Gu X, Guo L, Ji H, Sun S, Chai R, Wang L, et al. Genetic testing for sporadic hearing loss using targeted massively parallel sequencing identifies 10 novel mutations. *Clin Genet.* 2015;87(6):588-93.
201. Baumann M, Giunta C, Krabichler B, Rüschenhoff F, Zoppi N, Colombi M, et al. Mutations in FKBP14 cause a variant of Ehlers-Danlos syndrome with progressive kyphoscoliosis, myopathy, and hearing loss. *Am J Hum Genet.* 2012;90(2):201-16.
202. Giunta C, Rohrbach M, Fauth C, Baumann M. FKBP14 Kyphoscoliotic Ehlers-Danlos Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al, editors. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
203. Stapelbroek JM, Peters TA, van Beurden, Denis H. A., Curfs, Jo H. A. J., Joosten A, Beynon AJ, et al. ATP8B1 is essential for maintaining normal hearing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(24):9709-14.
204. Baker S, Booth C, Fillman C, Shapiro M, Blair MP, Hyland JC, et al. A loss of function mutation in the COL9A2 gene causes autosomal recessive Stickler syndrome. *Am J Med Genet A.* 2011;155A(7):1668-72.
205. Briggs MD, Wright MJ, Mortier GR. Multiple Epiphyseal Dysplasia, Autosomal Dominant. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al, editors. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
206. Bradley DJ, Towle HC, Young WS. Alpha and beta thyroid hormone receptor (TR) gene expression during auditory neurogenesis: evidence for TR isoform-specific transcriptional regulation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(2):439-43.
207. Rusch A, Ng L, Goodyear R, Oliver D, Lisoukov I, Vennstrom B, et al. Retardation of cochlear maturation and impaired hair cell function caused by deletion of all known thyroid hormone receptors. *J Neurosci.* 2001;21(24):9792-800.
208. Merrill RA, Plum LA, Kaiser ME, Clagett-Dame M. A mammalian homolog of unc-53 is regulated by all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells and embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(6):3422-7.
209. Peeters PJ, Baker A, Goris I, Daneels G, Verhasselt P, Luyten, Walter H. M. L., et al. Sensory deficits in mice hypomorphic for a mammalian homologue of unc-53. *Brain Res Dev Brain Res.* 2004;150(2):89-101.

Bibliografía

210. Liu Z, Liu Z, Walters BJ, Owen T, Kopan R, Zuo J. In vivo visualization of Notch1 proteolysis reveals the heterogeneity of Notch1 signaling activity in the mouse cochlea. *PLoS One*. 2013;8(5):e64903.
211. Maass JC, Gu R, Basch ML, Waldhaus J, Lopez EM, Xia A, et al. Changes in the regulation of the Notch signaling pathway are temporally correlated with regenerative failure in the mouse cochlea. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:110.
212. Menendez L, Trecek T, Gopalakrishnan S, Tao L, Markowitz AL, Yu HV, et al. Generation of inner ear hair cells by direct lineage conversion of primary somatic cells. *Elife*. 2020;9.
213. Pillers DM, Kempton JB, Duncan NM, Pang J, Dwinnell SJ, Trune DR. Hearing loss in the laminin-deficient mouse model of congenital muscular dystrophy. *Mol Genet Metab*. 2002;76(3):217-24.
214. Baig SM, Koschak A, Lieb A, Gebhart M, Dafinger C, Nürnberg G, et al. Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci*. 2011;14(1):77-84.
215. Liaqat K, Schrauwen I, Raza SI, Lee K, Hussain S, Chakchouk I, et al. Identification of CACNA1D variants associated with sinoatrial node dysfunction and deafness in additional Pakistani families reveals a clinical significance. *J Hum Genet*. 2019;64(2):153-60.
216. Gröschel M, Basta D, Ernst A, Mazurek B, Szczepek AJ. Acute Noise Exposure Is Associated With Intrinsic Apoptosis in Murine Central Auditory Pathway. *Front Neurosci*. 2018;12:312.
217. Ahituv N, Avraham KB. Mouse models for human deafness: current tools for new fashions. *Trends Mol Med*. 2002;8(9):447-51.
218. Wang L, Kempton JB, Brigande JV. Gene Therapy in Mouse Models of Deafness and Balance Dysfunction. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:300.
219. Chan DK, Chang KW. GJB2-associated hearing loss: systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype. *Laryngoscope*. 2014;124(2):34.
220. Burke WF, Warnecke A, Schöner-Heinisch A, Lesinski-Schiedat A, Maier H, Lenarz T. Prevalence and audiological profiles of GJB2 mutations in a large collective of hearing impaired patients. *Hear Res*. 2016;333:77-86.
221. Pollak A, Skórka A, Mueller-Malesińska M, Kostrzewa G, Kisiel B, Waligóra J, et al. M34T and V37I mutations in GJB2 associated hearing impairment: evidence for pathogenicity and reduced penetrance. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(21):2534-43.
222. Bicego M, Beltramello M, Melchionda S, Carella M, Piazza V, Zelante L, et al. Pathogenetic role of the deafness-related M34T mutation of Cx26. *Hum Mol Genet*. 2006;15(17):2569-87.

223. Zonta F, Buratto D, Cassini C, Bortolozzi M, Mammano F. Molecular dynamics simulations highlight structural and functional alterations in deafness-related M34T mutation of connexin 26. *Front Physiol.* 2014;5:85.
224. Rodriguez-Paris J, Tamayo ML, Gelvez N, Schrijver I. Allele-specific impairment of GJB2 expression by GJB6 deletion del(GJB6-D13S1854). *PLoS One.* 2011;6(6):e21665.
225. Iossa S, Marciano E, Franzé A. GJB2 Gene Mutations in Syndromic Skin Diseases with Sensorineural Hearing Loss. *Curr Genomics.* 2011;12(7):475-785.
226. Press ER, Shao Q, Kelly JJ, Chin K, Alaga A, Laird DW. Induction of cell death and gain-of-function properties of connexin26 mutants predict severity of skin disorders and hearing loss. *J Biol Chem.* 2017;292(23):9721-32.
227. Pang X, Chai Y, Sun L, Chen D, Chen Y, Zhang Z, et al. Characterization of spectrum, de novo rate and genotype-phenotype correlation of dominant GJB2 mutations in Chinese hans. *PLoS One.* 2014;9(6):e100483.
228. Čada Z, Šafka Brožková D, Balatková Z, Plevová P, Rašková D, Laštůvková J, et al. Moderate sensorineural hearing loss is typical for DFNB16 caused by various types of mutations affecting the STRC gene. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2019;276(12):3353-8.
229. Chang MY, Lee C, Han JH, Kim MY, Park H, Kim N, et al. Expansion of phenotypic spectrum of MYO15A pathogenic variants to include postlingual onset of progressive partial deafness. *BMC Med Genet.* 2018;19(1):29.
230. Balciuniene J, Dahl N, Jalonen P, Verhoeven K, Van Camp G, Borg E, et al. Alpha-tectorin involvement in hearing disabilities: one gene--two phenotypes. *Hum Genet.* 1999;105(3):211-6.
231. Pfister M, Thiele H, Van Camp G, Franssen E, Apaydin F, Aydin O, et al. A genotype-phenotype correlation with gender-effect for hearing impairment caused by TECTA mutations. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14(4-6):369-76.
232. Plantinga RF, de Brouwer, Arjan P. M., Huygen PLM, Kunst HPM, Kremer H, Cremers, Cor W. R. J. A novel TECTA mutation in a Dutch DFNA8/12 family confirms genotype-phenotype correlation. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2006;7(2):173-81.
233. Choi BY, Kim J, Chung J, Kim AR, Mun SJ, Kang SI, et al. Whole-exome sequencing identifies a novel genotype-phenotype correlation in the entactin domain of the known deafness gene TECTA. *PLoS One.* 2014;9(5):e97040.
234. Moreno-Pelayo MA, del Castillo I, Villamar M, Romero L, Hernández-Calvín FJ, Herraiz C, et al. A cysteine substitution in the zona pellucida domain of alpha-tectorin results in autosomal dominant, postlingual, progressive, mid frequency hearing loss in a Spanish family. *J Med Genet.* 2001;38(5):E13.

Bibliografía

235. Legan PK, Goodyear RJ, Morín M, Mencia A, Pollard H, Olavarrieta L, et al. Three deaf mice: mouse models for TECTA-based human hereditary deafness reveal domain-specific structural phenotypes in the tectorial membrane. *Hum Mol Genet.* 2014;23(10):2551-68.
236. Birkenhäger R, Otto E, Schürmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Maier-Lutz I, et al. Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet.* 2001;29(3):310-4.
237. Miyamura N, Matsumoto K, Taguchi T, Tokunaga H, Nishikawa T, Nishida K, et al. Atypical Bartter syndrome with sensorineural deafness with G47R mutation of the beta-subunit for CLC-Ka and CLC-Kb chloride channels, barttin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(2):781-6.
238. Fahlke C, Fischer M. Physiology and pathophysiology of CLC-K/barttin channels. *Front Physiol.* 2010;1:155.
239. Tan H, Bungert-Plümke S, Fahlke C, Stölting G. Reduced Membrane Insertion of CLC-K by V33L Barttin Results in Loss of Hearing, but Leaves Kidney Function Intact. *Front Physiol.* 2017;8:269.
240. Wang H, Feng Y, Li H, Wu H, Mei L, Wang X, et al. Digenic mutations involving both the BSND and GJB2 genes detected in Bartter syndrome type IV. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2017;92:17-20.
241. Elrharchi S, Riahi Z, Salime S, Nahili H, Rouba H, Kabine M, et al. Two novel homozygous missense mutations identified in the BSND gene in Moroccan patients with Bartter's syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2018;113:46-50.
242. Avraham KB, Hasson T, Steel KP, Kingsley DM, Russell LB, Mooseker MS, et al. The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet.* 1995;11(4):369-75.
243. Melchionda S, Ahituv N, Bisceglia L, Sobe T, Glaser F, Rabionet R, et al. MYO6, the Human Homologue of the Gene Responsible for Deafness in Snell's Waltzer Mice, Is Mutated in Autosomal Dominant Nonsyndromic Hearing Loss. *Am J Hum Genet.* 2001;69(3):635-40.
244. Ahmed ZM, Morell RJ, Riazuddin S, Gropman A, Shaikat S, Ahmad MM, et al. Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. *Am J Hum Genet.* 2003;72(5):1315-22.
245. Miyagawa M, Nishio S, Kumakawa K, Usami S. Massively parallel DNA sequencing successfully identified seven families with deafness-associated MYO6 mutations: the mutational spectrum and clinical characteristics. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2015;124 Suppl 1:148S-57S.
246. Zina ZB, Masmoudi S, Ayadi H, Chaker F, Ghorbel AM, Drira M, et al. From DFNB2 to Usher syndrome: variable expressivity of the same disease. *Am J Med Genet.* 2001;101(2):181-3.
247. Astuto LM, Kelley PM, Askew JW, Weston MD, Smith RJ, Alswaid AF, et al. Searching for evidence of DFNB2. *Am J Med Genet.* 2002;109(4):291-7.

248. Guilford P, Ayadi H, Blanchard S, Chaib H, Le Paslier D, Weissenbach J, et al. A human gene responsible for neurosensory, non-syndromic recessive deafness is a candidate homologue of the mouse sh-1 gene. *Hum Mol Genet.* 1994;3(6):989-93.
249. Weil D, Küssel P, Blanchard S, Lévy G, Levi-Acobas F, Drira M, et al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet.* 1997;16(2):191-3.
250. Riazuddin S, Nazli S, Ahmed ZM, Yang Y, Zulfiqar F, Shaikh RS, et al. Mutation spectrum of MYO7A and evaluation of a novel nonsyndromic deafness DFNB2 allele with residual function. *Hum Mutat.* 2008;29(4):502-11.
251. Ben Rebeh I, Morinière M, Ayadi L, Benzina Z, Charfedine I, Feki J, et al. Reinforcement of a minor alternative splicing event in MYO7A due to a missense mutation results in a mild form of retinopathy and deafness. *Mol Vis.* 2010;16:1898-906.
252. Ben-Salem S, Rehm HL, Willems PJ, Tamimi ZA, Ayadi H, Ali BR, et al. Analysis of two Arab families reveals additional support for a DFNB2 nonsyndromic phenotype of MYO7A. *Mol Biol Rep.* 2014;41(1):193-200.
253. Bakhchane A, Charif M, Bousfiha A, Boulouiz R, Nahili H, Rouba H, et al. Novel compound heterozygous MYO7A mutations in Moroccan families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *PLoS One.* 2017;12(5):e0176516.
254. Ma Y, Xiao Y, Zhang F, Han Y, Li J, Xu L, et al. Novel compound heterozygous mutations in MYO7A gene associated with autosomal recessive sensorineural hearing loss in a Chinese family. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2016;83:179-85.
255. Tamagawa Y, Kitamura K, Ishida T, Ishikawa K, Tanaka H, Tsuji S, et al. A gene for a dominant form of non-syndromic sensorineural deafness (DFNA11) maps within the region containing the DFNB2 recessive deafness gene. *Hum Mol Genet.* 1996;5(6):849-52.
256. Li L, Yuan H, Wang H, Guan J, Lan L, Wang D, et al. Identification of a MYO7A mutation in a large Chinese DFNA11 family and genotype-phenotype review for DFNA11. *Acta Otolaryngol.* 2018;138(5):463-70.
257. Ramzan M, Bashir R, Salman M, Mujtaba G, Sobreira N, Witmer PD, et al. Spectrum of genetic variants in moderate to severe sporadic hearing loss in Pakistan. *Sci Rep.* 2020;10(1):11902.
258. Baek J, Oh S, Kim D, Choi S, Kim U, Lee K, et al. Targeted massive parallel sequencing: the effective detection of novel causative mutations associated with hearing loss in small families. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7:60.