



2023

IMPACTO CLÍNICO DEL DIAGNOSTICO GENETICO DE LA HIPOACUSIA DEL ADULTO

TESIS DOCTORAL

IMPACTO CLÍNICO DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO EN LA HIPOACUSIA DEL ADULTO

AUTORA

Patricia Corriols Noval

DIRECTORES

Carmelo Morales Angulo

Rubén Cabanillas Farpón

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

Santander 2023

UC



- **Dr. Carmelo Morales Angulo**, Profesor Titular de la Universidad de Cantabria (UC) y Jefe del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)
- **Dr. Rubén Cabanillas Farpón**, experto en genética molecular- Sr. Director Translational Medicine, T- Therapeutics - Cambrigde.

CERTIFICAN que **Patricia Corriols Noval** ha realizado bajo su dirección la presente tesis doctoral titulada: “Impacto clínico del estudio genético en la hipoacusia del adulto”.

Consideran que este trabajo reúne los requisitos de originalidad y calidad científica necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de optar al grado de **Doctor en Medicina y Ciencias de la Salud por la Universidad de Cantabria**.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado.

En Santander, a 15 de Diciembre de 2023.

Fdo: Carmelo Morales Angulo

Fdo: Rubén Cabanillas Farpón

*“La ceguera nos separa de las cosas,
pero la sordera nos separa de las personas”.*

Helen Keller

AGRADECIMIENTOS

*“Cuando la gratitud es tan absoluta,
las palabras sobran”- Álvaro Mutis.*

Estas líneas van dedicadas a expresar mi más sincero agradecimiento hacia todas las personas que han participado, de una u otra manera, en la consecución de este hito de mi vida profesional y personal.

Carmelo, diste inicio a este gran trabajo con la ilusión que te caracteriza y que le brindas a todo nuevo proyecto. Tu motivación y pasión por la medicina despierta mi más sincera admiración.

Rubén, no logro encontrar palabras que hagan justicia a todo lo que me has dado. Tu genialidad me hizo ver luz donde yo solo veía oscuridad; tu generosidad intelectual y personal no tiene límites. Gracias por este viaje inspirador a tu lado.

María Costales y Rocío González, sembrasteis la semilla de la hipoacusia genética para que germinase en mí y me habéis mostrado lo apasionante que podía llegar a ser este campo.

Al IMOMA y en especial a Juan, Marta y Raquel, que representan el núcleo de la prosperidad, desarrollo científico y excelencia profesional sobre la aplicación de los estudios genéticos para la práctica clínica, para las personas.

Mis padres, Juan y Rosa, me habéis dado una vida indescriptible, unos valores inigualables y un amor desmedido; siempre creyendo en mí. Habéis compartido mis éxitos y mi felicidad como si fuera vuestra, y vuestra ha sido realmente, pues yo soy vuestro futuro hecho realidad. Os debo todo lo que soy y todo lo que he logrado.

Mi tía Margarita, gran ejemplo de mi vida sobre el esfuerzo, la dedicación y el sacrificio que hacen falta para alcanzar tus metas y llegar al final del camino con éxito. Siempre siguiendo mis pasos, de cerca y de lejos.

Mis queridos abuelos, allá dónde estéis, gracias por haberme criado con tanto amor, disteis sentido a primeros pasos; yo espero haber dado sentido a vuestros últimos. Se que estaríais orgullosos de ver donde he llegado.

Julio, la persona de mi vida. Entendiste que la medicina era necesaria para mí, aceptando el sacrificio a nuestro tiempo todos estos años y brindándome tu paciencia y comprensión incondicional. Si se lo que es capaz de curar el amor, es gracias a ti.

RESUMEN

La pérdida auditiva se considera el déficit sensorial más prevalente, por ello su etiología ha sido objeto de estudio durante décadas, lo que ha permitido definir múltiples factores ambientales relacionados con su aparición, conocer diversas patologías que asocian hipoacusia y demostrar centenares de alteraciones genéticas relacionadas con su desarrollo.

Hipótesis: La hipoacusia neurosensorial genética en adultos puede estar infradiagnosticada.

Introducción: La hipoacusia genética entraña una gran dificultad diagnóstica ya que se caracteriza por tener una extrema heterogeneidad genética y fenotípica. Por ello para lograr un diagnóstico etiológico de hipoacusia neurosensorial de inicio en la edad adulta, se plantea la aplicación de secuenciación de nueva generación sobre paneles de genes relacionados con hipoacusia.

Materiales y métodos: Se incluyeron adultos de más de 16 años con hipoacusia neurosensorial evaluados en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (España). Los criterios de exclusión fueron factores ambientales, trauma acústico, hidropesía endolinfática e hipoacusia asociada a la edad. Se utilizó un panel de genes NGS que incluía 196 genes (OTOgenics v3) o 229 genes (OTOgenics v4) relacionados con hipoacusias sindrómicas y no sindrómicas.

Resultados: Sesenta y cinco pacientes fueron incluidos en el estudio (edad media de debut 41 años). Se encontraron 15 variantes patogénicas/probablemente patogénicas en 8 genes que justificaban el fenotipo de los pacientes: *TECTA* (4), *KCNQ4* (3), *GJB2* (2), *ACTG1* (1), *COL2A1* (1), *COCH* (1), *COCH/COL2A1* (1), *STRC* (1) y *ABHD12* (1). Tres pacientes presentaban asociaciones sindrómicas (20% de los pacientes con diagnóstico genético) que no habían sido diagnosticadas previamente (dos Stickler tipo I y síndrome PHARC). Se encontraron siete variantes de significado desconocido (VUS) en *COL11A1* (1), *GSMDE* (2), *DNTM1* (1), *SOX10* (1), *EYA4* (1) y *TECTA* (1). El rendimiento diagnóstico del panel ha sido del 23% en esta serie.

Conclusiones: Los paneles de genes NGS pueden proporcionar rendimientos diagnósticos superiores al 20% para la hipoacusia del adulto, con una proporción significativa de VUS que podrían contribuir potencialmente a aumentar el rendimiento diagnóstico. La identificación de una causa genética facilita el asesoramiento genético, proporciona información pronóstica y

puede revelar síndromes no reconocidos, contribuyendo a una adecuada evaluación y detección precoz de sus manifestaciones asociadas.

Palabras clave: Panel genes, Asesoramiento genético, Hipoacusia genética, Variantes patogénicas, Secuenciación de nueva generación, Variantes de significado desconocido.



SUMMARY

Hearing loss is considered the most prevalent sensory deficit, so its etiology has been the subject of study for decades, which has made it possible to define multiple environmental factors related to its onset, to learn about various pathologies associated with hearing loss and to demonstrate hundreds of genetic alterations related to its development.

Hypothesis: Adult genetic sensorineural hearing loss (SNHL) may be underestimated.

Background: Genetic SNHL in adults may be underestimated due to the difficulty involved in its diagnosis, because it is characterized by extreme genetic and phenotypic heterogeneity. Therefore, to achieve an etiological diagnosis of SNHL starting in adulthood, the application of next-generation sequencing on panels of genes related to hearing loss is proposed for the diagnosis of adult-onset SNHL.

Materials and Methods: Adults (>16-year-old) with SNHL were recruited at the Otolaryngology Department at Marqués de Valdecilla University Hospital (Spain). Environmental factors, acoustic trauma, endolymphatic hydrops, and age-related hearing loss were excluding criteria. An NGS gene panel was used, including 196 genes (OTOgenics v3) or 229 genes (OTOgenics v4) related to syndromic and non-syndromic hearing loss.

Results: Sixty-five patients were included in the study (average age at the onset of SNHL, 41 year). Fifteen pathogenic/likely pathogenic variants considered to be causative were found in 15 patients (23% diagnostic yield) in *TECTA* (4), *KCNQ4* (3), *GJB2* (2), *ACTG1* (1), *COL2A1* (1), *COCH* (1), *COCH/COL2A1* (1), *STRC* (1), and *ABHD12* (1). Three patients had syndromic associations (20% of patients with genetic diagnosis) that had not been previously diagnosed (two Stickler type I and one polyneuropathy, hearing loss, ataxia, retinitis pigmentosa, cataract syndrome). Seven variants of unknown significance were found in *COL11A1* (1), *GSMDE* (2), *DNTM1* (1), *SOX10* (1), *EYA4* (1), and *TECTA* (1).

Conclusion: NGS gene panels can provide diagnostic yields greater than 20% for adult SNHL, with a significant proportion of variant of unknown significance that could potentially contribute to increasing diagnostic output. Identifying a genetic cause enables genetic counseling, provides prognostic information, and can reveal unrecognized syndromes contributing to an accurate management of their associated manifestations.

Key Words: Adults, Gene panel, Genetic counseling, Genetic hearing loss, Next-generation sequencing, Pathogenic variants, Variants of unknown significance.



ABREVIATURAS

- **ACMG:** AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS (COLEGIO AMERICANO DE GENÉTICA CLÍNICA)
- **AD:** AUTOSÓMICO DOMINANTE
- **ADN:** ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO
- **AMP:** ASSOCIATION FOR MOLECULAR PATHOLOGY (ASOCIACION DE PATOLOGÍA MOLECULAR)
- **AR:** AUTOSÓMICO RECESIVO
- **ARN:** ACIDO RIBONUCLEICO
- **BIAP:** BUREAU INTERNACIONAL D'AUDIOPHONOLOGIE (ASOCIACION INTERNACIONAL DE AUDIOFONOLOGIA)
- **CAP:** COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS (COLEGIO AMERICANO DE PATÓLOGOS)
- **CIBERER:** CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED
- **CNV:** COPY NUMBER VARIATION (VARIACION EN EL NUMERO DE COPIAS)
- **CODEPEH:** COMISIÓN PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE LA HIPOACUSIA
- **HNS:** HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL
- **HUMV:** HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA
- **IC:** IMPLANTE COCLEAR
- **IMOMA:** INSTITUTO DE MEDICINA ONCOLÓGICA Y MOLECULAR ASTURIAS
- **MLPA:** MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION (AMPLIFICACIÓN DE SONDAS TRAS LIGACIÓN MÚLTIPLE)
- **NCBI:** NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION (CENTRO INFORMACION NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA)
- **NGS:** NEXT GENERATION SEQUENCING
- **NHGRI:** NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE (INSTITUTO DE INVESTIGACION NACIONAL DEL GENOMA HUMANO)
- **NIH:** NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (INSTITUTO NACIONAL DE SALUD)
- **OMIM:** ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN (HERENCIA MENDELIANA HUMANA ONLINE)
- **OMS:** ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

- **PA:** PRÓTESIS AUDITIVA
- **PCR:** POLYMERASE CHAIN REACTION (REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA)
- **PEATC:** POTENCIALES AUDITIVOS EVOCADOS TRONCOENCEFÁLICOS
- **PGH:** PROYECTO GENOMA HUMANO
- **RM:** RESONANCIA MAGNÉTICA
- **SNP:** SINGLE NUCLEOTID POLYMORPHISM (POLIMORFISMO DE NUCLEOTIDO UNICO)
- **SVI:** SEQUENCE VARIANT INTERPRETATION (INTERPRETACION DE VARIANTE DE SECUENCIA)
- **TC:** TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA
- **VUS:** VARIANT OF UNKNOWN SIGNIFICANCE (VARIANTE DE SIGNIFICADO INCIERTO)
- **WES:** WHOLE EXOME SEQUENCING (SECUENCIACIÓN DEL EXOMA COMPLETO)
- **WGS:** WHOLE GENOME SEQUENCING (SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO)

ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1. Fisiología auditiva del oído interno	4
2. Conceptos genéticos	8
2.1. Estructura y función del genoma humano	8
2.2. Enfermedades genéticas y patrones de herencia	12
2.3. Secuenciación genética	15
2.3.1. Secuenciación convencional o Sanger	15
2.3.2. Secuenciación masiva o de nueva generación	16
3. Herramientas para el análisis genético	21
3.1. Panel de genes	22
3.2. Secuenciación de exomas (WES)	23
3.3. Secuenciación del genoma (WGS)	24
3.4. Genes candidatos	24
4. Interpretación del análisis genético	26
4.1. Bases de datos genéticas	27
4.2. Clasificación de las variantes genéticas	28
5. Hipoacusia	31
5.1. Epidemiología	31
5.2. Clasificación	32
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	39
MATERIAL Y MÉTODOS	43
Marco del estudio	45
Criterios de inclusión	45
Criterios de exclusión	45
Recogida de datos	46
RESULTADOS	49
Variantes genéticas patogénicas y probablemente patogénicas identificadas (P/PP)	52
Variantes de significado incierto (VUS)	58

DISCUSIÓN.....	61
¿Por qué un panel de genes?	73
Relevancia clínica del diagnóstico genético	75
Futuro en la hipoacusia genética.....	78
CONCLUSIONES.....	79
ANEXOS.....	83
BIBLIOGRAFIA.....	99

Correcciones tesis doctoral : "Impacto clínico del diagnóstico genético en la hipoacusia del adulto"

- **Página 5, última frase.**

"están unidas entre sí mediante puentes glucoproteicos (uniones tipo GAP) [9]."
Se elimina el contenido del paréntesis.

- **Página 6, comienzo del tercer párrafo**

"se haya la membrana tectoria" Debe decir "se halla", de hallar,

- **Página 10, líneas 2-3**

"regiones no codificantes llamadas intrones que no se transcriben" se sustituye por regiones no codificantes llamadas intrones que se transcriben, pero no se traducen".

- **Página 13, cuarto párrafo**

"la mutación del gen MT-RNR1 asociado al fenotipo audiológico DFNA20 y DFNA26 responsable del incremento en la susceptibilidad a la ototoxicidad por aminoglucósidos [26]."
Se elimina "asociado al fenotipo audiológico DFNA20 y DFNA26"

- **Página 14, último párrafo**

"la misma variante en un gen puede dar lugar a manifestaciones clínicas diferentes. Por ejemplo, la mutación recurrente 35delG en el gen *GJB2* (conexina 26), puede ocasionar una hipoacusia no sindrómica AR (DFNB1), no sindrómica AD (DFNA3), o un síndrome con manifestaciones cutáneas y oculares además de la hipoacusia [29]."

Debe decir "diferentes mutaciones en un mismo gen pueden dar lugar a manifestaciones clínicas diferentes. En el gen *GJB2* se han descrito mutaciones que ocasionan hipoacusia no sindrómica AR (DFNB1), no sindrómica AD (DFNA3), o síndromes con manifestaciones cutáneas y oculares además de la hipoacusia [29]."

- **Página 27**

"Biothecnology" debe decir "Biotechnology"

- **Se añade en tabla 2 nueva columna titulada "variante en proteína"**

INTRODUCCIÓN

– INTRODUCCIÓN –

La pérdida auditiva se considera el déficit sensorial más prevalente, por ello su etiología ha sido objeto de estudio durante décadas, lo que ha permitido definir múltiples factores ambientales relacionados con su aparición, conocer diversas patologías que asocian hipoacusia y demostrar centenares de alteraciones genéticas relacionadas con su desarrollo.

En la etapa prelocutiva, la percepción auditiva es esencial para la correcta adquisición del lenguaje y el desarrollo cognitivo. Conociendo la importancia de este hecho, surge la necesidad de implantar un programa de detección precoz de hipoacusia infantil, puesto en marcha desde principios los años 90 y que se ha ido actualizando progresivamente en base a las recomendaciones de la Comisión para la Detección de la Hipoacusia (CODEPEH), y cuya finalidad radica en identificar aquellos sujetos con algún déficit o alteración auditiva, ya fuera congénita o adquirida, para iniciar una terapia rehabilitadora auditiva precoz que prevenga consecuencias deletéreas como el empobrecimiento cognitivo, el retraso psicomotor y el aislamiento social [1].

Dadas las repercusiones que la pérdida auditiva genera en la población infantil, el grueso de los datos epidemiológicos y sobre todo etiológicos de la hipoacusia han sido extraídos de este colectivo que ha sido diana de estudio desde hace décadas. Se sabe que aproximadamente el 60% de las hipoacusias infantiles subyacen a una causa genética, conociéndose más de 100 genes causantes de hipoacusia aislada y más de 400 síndromes asociados a hipoacusia [2, 3]. Aunque por norma general la etiología de la hipoacusia es unifactorial, pueden entrar en juego la combinación de varios factores, por lo que es imprescindible tener en cuenta que la presencia de una causa ambiental no excluye necesariamente la existencia de una etiología genética subyacente, si bien es cierto que la presencia de factores ambientales condiciona en mayor medida la etiología genética como único factor [4].

En la etapa postlocutiva la pérdida auditiva no traduce consecuencias tan severas, dado que ya se ha alcanzado el aprendizaje del lenguaje escrito y verbal, así como el desarrollo intelectual, sin embargo, puede generar alteraciones psico-emocionales por el concepto de sordera como estigma y un empobrecimiento social por una comunicación inefectiva debido a la pérdida de inteligibilidad. Además, diversos estudios han encontrado asociación entre la pérdida auditiva en la edad media de la vida como factor de riesgo de hasta un 9% para el desarrollo de demencia [5, 6]. Siendo estas circunstancias no desdeñables, en ocasiones se ha infravalorado el diagnóstico etiológico de la hipoacusia más allá del periodo infantil.

– INTRODUCCIÓN –

Dada la prevalencia y la repercusión que la hipoacusia genera en los pacientes es un motivo de consulta frecuente en las consultas del Otorrinolaringólogo. Aunque las intervenciones destinadas a prevenir, detectar y tratar la pérdida de audición no son económicamente costosas y pueden resultar muy beneficiosas para los pacientes, la búsqueda etiológica de la hipoacusia del adulto no siempre se plantea como una necesidad estricta, y en ocasiones dichas hipoacusias son catalogadas como idiopáticas sin un verdadero diagnóstico de exclusión, ya que, hasta la fecha, el empleo de estudios genéticos en el adulto no está estandarizado.

Lograr la consecución de un diagnóstico genético en la hipoacusia otorga tranquilidad para el paciente al revelarse la causa del síntoma que aqueja y produce satisfacción del especialista al concluir el episodio de búsqueda etiológica del proceso. Sin embargo, del diagnóstico genético se derivan otras cuestiones que competen a áreas muy diversas de la medicina y convierten a la Otorrinolaringología en una especialidad con potencial para liderar una medicina con carácter preventivo y predictivo, personalizada en el individuo. Además, existe una necesidad insatisfecha en el logro de terapias que reduzcan la velocidad o reviertan la pérdida auditiva progresiva; pero para desarrollar tratamientos eficaces, el conocimiento de la base molecular y celular de la hipoacusia genética será esencial. Por ello, en un futuro próximo la expansión de los estudios genéticos irá encaminada a la detección de susceptibilidad genética a desarrollar determinadas patologías o toxicidades auditivas farmacológicas, se tornará una herramienta de peso en el campo de la farmacogenómica para predecir la respuesta a fármacos, y gracias a la terapia génica se iluminarán dianas de actuación para el tratamiento dirigido de la hipoacusia [7, 8].

1. Fisiología auditiva del oído interno

El oído interno se encuentra situado en el centro de la pirámide petrosa del hueso temporal, y se divide anatómicamente en dos segmentos: laberinto anterior o cóclea, responsable de la percepción auditiva, y laberinto posterior (vestíbulo y conductos semicirculares) responsable del equilibrio.

La cóclea es un conducto espiral enrollado sobre el modiolo que da dos vueltas y media. Presenta una excavación en su base que permite el paso de fibras nerviosas del nervio auditivo o VIII par craneal. Su parte externa es la cápsula ótica, que presenta dos aberturas: la ventana

– INTRODUCCIÓN –

oval y la ventana redonda. El interior de la cóclea se encuentra dividido en 3 compartimentos o rampas: vestibular, coclear y timpánica [9] como se muestra en la **Figura 1**.

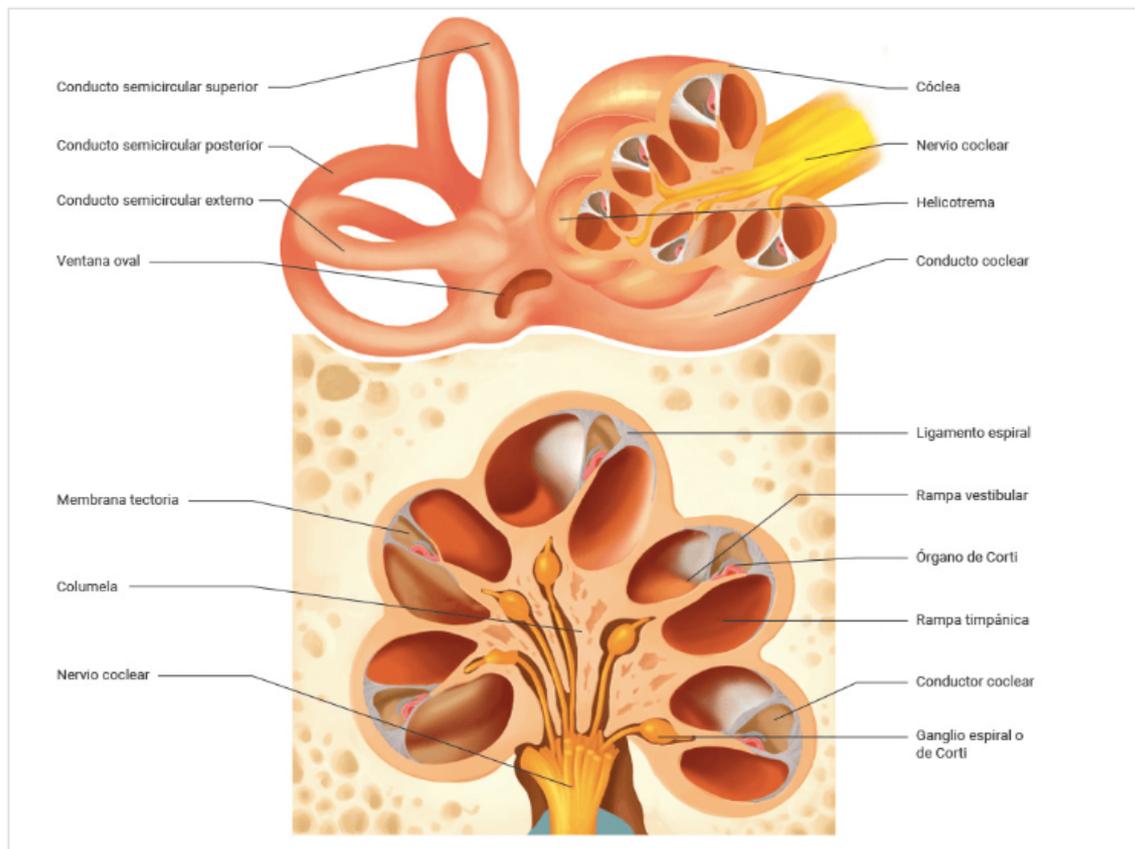


Figura 1: Anatomía del oído interno. En la parte superior la figura muestra el laberinto anterior (cóclea) y el laberinto posterior (conductos semicirculares y vestíbulo). En la parte inferior la figura representa un corte axial de la cóclea, donde se pueden visualizar el órgano de Corti, la entrada del nervio auditivo y las rampas vestibular, timpánica y coclear.

En la cóclea se encuentra el principal órgano de la audición, denominado **órgano de Corti** o **ganglio espiral**, que se encarga de la discriminación de los distintos sonidos según su frecuencia, y que codifica los estímulos en el tiempo según su cadencia y los filtra para una mejor comprensión [10]. Este órgano está formado por un conjunto de células sensoriales subespecializadas:

- Células de sostén o células de Deiters: sirven de soporte a las células receptoras.
- Células ciliadas (células receptoras): Tienen una distribución tonotópica frecuencial a lo largo de la cóclea. En su polo apical se encuentran los estereocilios que se relacionan con canales de potasio y están unidas entre sí mediante puentes glucoproteicos (uniones tipo GAP) [9]. Se dividen en:

– INTRODUCCIÓN –

- Ciliadas externas: su polo basal se apoya sobre las células de sostén y en su polo apical los esterocilios se encuentran anclados en la membrana tectoria. Tienen capacidad contráctil gracias a las proteínas prestinas y forman sinapsis con las neuronas aferentes de tipo II y con el sistema eferente medial.
- Ciliadas internas: se apoyan sobre la membrana basilar y forman sinapsis con las neuronas aferentes de tipo I del ganglio espiral. Son responsables de la conversión del estímulo mecánico sonoro en una energía eléctrica.

Sobre el órgano de Corti se haya la membrana tectoria, una estructura acelular formada sobre todo por glucoproteínas y cuya carga iónica es negativa. Esta membrana se encuentra en contacto con los estereocilios de las células ciliadas externas y en su porción medial se ancla al limbo espiral. La estría vascular se encuentra en la pared lateral de la rampa coclear y su función es la producción de endolinfa, manteniendo una alta concentración de potasio en ella para mantener su potencial eléctrico, necesario para la despolarización e inicio de la transmisión neuronal [9]. Las estructuras anatómicas que conforman el órgano de Corti se encuentran ilustradas en la **Figura 2**.

A grandes rasgos la vía auditiva comienza con la conversión por parte de las células ciliadas internas del estímulo sonoro en una energía eléctrica que se vehiculiza a través de los axones neuronales del nervio auditivo hasta los centros auditivos del tronco del encéfalo y de la corteza temporal, dónde la información es interpretada y procesada. Esta vía auditiva es un complejo entramado de conexiones y sinapsis entre células, dónde la regulación génica es esencial para la correcta formación de las proteínas implicadas en ella, permitiendo la transmisión exacta y competente del sonido. Los genes con mayor repercusión en el funcionamiento de la vía auditiva son aquellos que codifican proteínas de membrana o regulan vías de conexión intercelular o sináptica como pueden ser [10]:

- Proteínas de membrana o asociadas a membrana, reguladas por genes como *KCNQ4* implicado en los canales de potasio, *GJB2* que codifica la familia de proteínas *conexina 26* responsables de las uniones intercelulares de tipo comunicante, o el gen *OTOF* que sintetiza la otoferlina que regula el tráfico de las vesículas sinápticas generadas en las células ciliadas internas.
- Proteínas del citoesqueleto de las células sensoriales del oído interno.

– INTRODUCCIÓN –

- Proteínas de la matriz extracelular, reguladas por genes como *TECTA*, que codifica la alfa-tectorina que ejerce función estructural en la membrana tectoria del oído interno.
- Proteínas reguladoras transcripcionales asociadas a genes como *POU3F4* o *EYA4*.
- Componentes de la maquinaria de biosíntesis de proteínas en la mitocondria, cuyos genes se encuentran en el genoma mitocondrial.

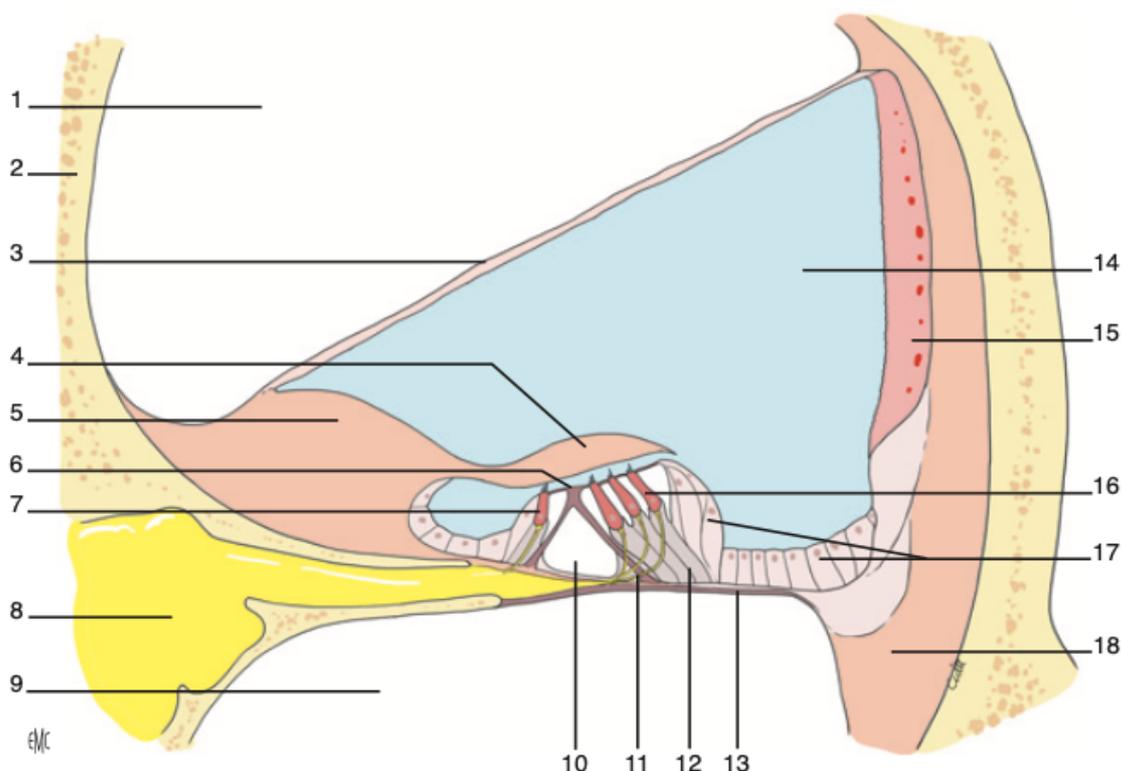


Figura 2. Corte coronal de la cóclea que representa las distintas estructuras del órgano de Corti. 1. Rampa vestibular (perilinf); 2. hueso; 3. membrana de Reissner; 4. membrana tectoria; 5. limbo espiral; 6. lámina reticular; 7. células ciliadas internas; 8. fibras nerviosas; 9. rampa timpánica (perilinf); 10. túnel de Corti; 11. fibras eferentes; 12. células de Deiters; 13. membrana basilar; 14. conducto coclear (endolinf); 15. estría vascular; 16. células ciliadas externas; 17. células de Hensen y Claudius; 18. ligamento espiral. (Adaptación de figura tomada de Saroul et al)

Además de la disrupción metabólica y funcional en la célula, la presencia de alteraciones genéticas durante el periodo de embriogénesis puede conllevar alteraciones en el desarrollo del oído externo, medio e interno, así como de la vía auditiva, dando lugar a malformaciones que condicionan hipoacusia congénita [11, 12].

Es relevante tener en cuenta que, de los genes implicados en la hipoacusia no todos se expresan exclusivamente en las células de la vía auditiva, por lo que la hipoacusia puede

– INTRODUCCIÓN –

aparecer como síntoma en conjunto con otras alteraciones en otros órganos conformando un síndrome. Por ejemplo, el gen *SCL26A4* codifica la proteína *pendrina*, que se expresa en las células del oído y también en la glándula tiroidea, siendo responsable del intercambio de iones entre el medio intra y el extracelular, y conduciendo su alteración a hipoacusia y disfunción tiroidea en el conocido como síndrome de Pendred [13]. Hasta la fecha se conocen más de 400 síndromes de causa genética donde la hipoacusia constituye uno de sus potenciales síntomas, por ello las investigaciones genéticas acerca del sistema auditivo proporcionan información de gran trascendencia sobre cómo el sistema nervioso decodifica la información molecular y sobre como las alteraciones genéticas alteran la función auditiva, lo que ayudará a mejorar el conocimiento sobre la fisiopatología de la hipoacusia.

2. Conceptos genéticos

2.1. Estructura y función del genoma humano

La información que determina las características de un ser vivo está contenida en el ácido desoxirribonucleico (ADN), una molécula que consta de dos cadenas enrolladas formando una doble hélice, constituida por una sucesión de monómeros: los nucleótidos. Existen cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales contiene una base nitrogenada: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C). El orden en que se suceden estos nucleótidos determina el código genético de cada individuo. En el caso del ser humano, nuestro **genoma** (conjunto de ADN) está formado por una secuencia de aproximadamente 3.200.000.000 de pares de bases de ADN que, además, está presente en cada célula por duplicado (una copia heredada de nuestra madre y otra de nuestro padre). El genoma se encuentra en el núcleo de cada célula (genoma nuclear) organizado en 46 cromosomas, dos de los cuales determinan el sexo y se conocen como cromosomas sexuales (XX en la mujer, XY en el varón), y los 44 cromosomas restantes son denominados autosomas.

Una pequeña proporción del ADN de la célula se encuentra dentro de las mitocondrias confeccionando el **genoma mitocondrial**. La peculiaridad de este genoma es que se hereda casi exclusivamente por vía materna y que acumula variantes patogénicas con facilidad ya que no dispone de un sistema de detección y reparación de errores durante la replicación, a diferencia del genoma nuclear. La dotación genética de un individuo es aportada casi a partes iguales por cada uno de los progenitores, por los que existen 23 parejas de cromosomas que son

– INTRODUCCIÓN –

homólogos entre sí y que contienen genes equivalentes, que se denominan alelos. Si los dos alelos que porta un individuo son iguales se dice que es homocigoto para ese gen, si son diferentes se dice que es heterocigoto.

Los cromosomas contienen una sucesión de genes; los **genes** representan las unidades mínimas de información del mensaje genético, y son secuencias específicas de bases que contienen la información necesaria para producir, de manera específica, los principales ejecutores de las funciones vitales: las proteínas. La ubicación física de un gen o de una variante genética del ADN en un cromosoma se define mediante el término *locus* (*loci* en plural).

El ser humano tiene unos 21.000 genes, el conjunto de todos ellos es lo que se denomina **genotipo**, y su a manifestación clínica se denomina **fenotipo**. No obstante, el genoma del ser humano tiene una similitud entre individuos de la misma especie del 99,9 %, lo que significa que entre ellos tienen más de 3 millones de diferencias en las bases de nucleótidos. Este es debido a los polimorfismos de nucleótido único o *single nucleotide polymorphisms* (SNP) y a las variaciones en el número de copias o *Copy Number Variation* (CNV). Los SNP se consideraban hasta hace años la mayor fuente de variación genética entre individuos. Consisten en la sustitución en una sola base dentro del ADN o en la pérdida (eliminación) o aumento (duplicación o inserción) de una o varias bases. Aparecen cada 1.300 bases en promedio a lo largo del genoma humano, pero no siempre están asociados al desarrollo de enfermedades. Los SNP más frecuentemente relacionados con la aparición de enfermedades son aquellos en los que se produce una sustitución de nucleótido que dictamina un cambio de sentido en la traducción proteica o que generan la aparición de un codón de stop prematuro que trunca la síntesis proteica. El resultado es que la proteína alterada puede reducir su funcionalidad, quedar totalmente inhabilitada o bien adquirir una función completamente nueva y perjudicial [14].

Sin embargo, gracias a los avances en las técnicas de análisis genómico se ha podido descubrir que las CNV contribuyen en mayor medida a la diversidad genómica interindividual que los SNP, algo que ya sugería Freeman et al en 2006. Según el National Human Genome (NIH) los CNV son un tipo de variación estructural del ADN en el que un fragmento determinado está reducido, o por el contrario duplicado o incluso tri o cuatriplicado con respecto a la versión del genoma humano de referencia, debido a procesos de deleción o duplicación. Estas regiones de CNV pueden contener o no genes, y de ello va a depender su importancia en la promoción de alteraciones genéticas que conlleven enfermedad [15].

– INTRODUCCIÓN –

Dentro de las secuencias de bases que definen un gen, existen regiones codificantes llamadas **exones** (que se transcriben y traducen para formar proteínas), regiones no codificantes llamadas **intrones** que no se transcriben y ADN intergénico (que no forma ni intrones ni exones). El **exoma** (conjunto de regiones codificantes) representa solamente el 1-2% del genoma humano, por lo que aproximadamente el 98% restante lo constituyen las regiones no codificantes, cuyas funciones son indispensables para brindar integridad estructural a los cromosomas y contribuir al control de la actividad genética al contener secuencias que actúan como elementos reguladores (promotores, potenciadores y silenciadores de la expresión de los genes o incluso elementos estructurales como las secuencias repetitivas), que determinan cuándo y dónde se “activan” y “desactivan” los genes [16]. Los cambios en la secuencia del ADN de una región codificante tienen en muchos casos consecuencias clínicas, ya sea aumentado a la susceptibilidad a enfermedades o infecciones o alterando la respuesta a productos químicos o fármacos. Por otra parte, se pueden producir modificaciones del ADN que no alteran la secuencia de este, pero que determinan su regulación, y que se conocen como **cambios epigenéticos**. Estos cambios epigenéticos pueden modificar los genes de tal manera que provoquen activación incorrecta o silencien erróneamente un gen, lo que deriva a su vez en una alteración funcional celular. Fundamentalmente las diferentes exposiciones que sufre un individuo en el medio ambiente en el que vive, influyen dichos cambios epigenéticos [17].

Respecto al **genoma no codificante** (intrones y regiones intergénicas) cabe destacar que fue considerado al inicio de su descubrimiento como ADN basura, vestigio de la evolución de la especie. Sin embargo, resulta inaudito asumir que el 98% de nuestro genoma no esconde funcionalidad, por lo que ha sido fruto de estudio exhaustivo en las últimas décadas a través de varios proyectos mundiales. Los avances en genómica de los últimos años han permitido esclarecer que este genoma no codificante es esencial en la regulación de la expresión génica del genoma codificante, y es clave en la evolución de la especie, pero también en el desarrollo de las enfermedades. Además, el genoma no codificante también se transcribe, y de él se sintetizan secuencias conocidas como ARN no codificante. Hoy en día es bien sabido que el ARN no codificante y sus productos de traducción también sufren errores de síntesis y cambios aberrantes que pueden contribuir a la patogenicidad[18-20].

Otro concepto que merece especial mención es el de **pseudogén**, que se define como una secuencia de ADN genómico que parece una versión truncada de un gen funcional conocido. Se calcula que existen entre 12.000 y 20.000 pseudogenes en el genoma humano. Los primeros

– INTRODUCCIÓN –

esfuerzos por caracterizar las funciones de los pseudogenes fueron infructuosos, por lo que se consideraron reliquias sin función derivadas de la selección evolutiva (ADN basura o fósiles genéticos). Sorprendentemente, cada vez son más los pseudogenes que se expresan como transcritos de ARN por encima de los niveles considerados de transcripción accidental y cada vez hay más pruebas de que algunos pseudogenes expresados tienen funciones biológicas y deberían definirse como una subclase de ARN no codificante, responsables de la regulación de cambios epigenéticos en el ADN y por tanto del desarrollo de enfermedades y procesos tumorales [21, 22]. En relación con el desarrollo de hipoacusia se conocen varios genes con variantes pseudogénicas que son importantes en la práctica clínica, pero sobre todo en lo que respecta al diagnóstico genético, pudiendo ser técnicamente difícil distinguir si la variante está en el gen o en el pseudogen. Por ejemplo, el gen *STRC* relacionada con hipoacusia sindrómica y no sindrómica forma parte de una duplicación en tándem, y la segunda copia es un pseudogén (*pSTRC*). El pseudogén distal resulta altamente homólogo con respecto al gen (>99%) lo que hace que el análisis molecular para detectar mutaciones de *STRC* mediante secuenciación de nueva generación (NGS) y secuenciación del exoma (WES) sea todo un reto. Por ello se requieren técnicas complementarias específicas para el estudio dirigido de esas regiones, como la realización de reacción en cadena polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real o amplificación de sondas tras ligación múltiple (MLPA) [2, 22].

Como ya habíamos comentado toda la humanidad comparte el 99 % del ADN y el 1 % restante encierra todas las diferencias que existen entre seres humanos. Para comprender las diferencias genómicas dentro de nuestra especie se crearon secuencias del genoma humano de referencia que han sido usadas como estándar comparativo en los diferentes estudios genéticos. Sin embargo, un solo genoma de referencia no puede mostrar la diversidad genómica existente en la humanidad. Para que las comparaciones sean más fiables, es necesario un mapa genético mucho más completo, que disponga no solo de un modelo del genoma, sino también de sus variaciones y posibles diferencias; por ello surge el concepto del pangenoma. El **pangenoma** humano se refiere al conjunto de genomas de la especie humana, teniendo en cuenta no solo las partes que tienen en común sino también sus variaciones, cuantificando la frecuencia de dichas variantes. El desarrollo de este concepto ha ido de la mano del crecimiento de las tecnologías de secuenciación del genoma, que han permitido lecturas más específicas de áreas complejas o repetitivas del código genético. Mediante fusión digital de secuencias del genoma humano se crea este pangenoma que se puede usar como comparación para alinear, ensamblar

– INTRODUCCIÓN –

y estudiar otras secuencias del genoma humano de diferentes sujetos. Esto permite comparaciones mucho más acertadas reduciendo el riesgo de inequidades en los análisis genómicos, ya que, por ejemplo, predecir una enfermedad genética podría no ser acertado en el caso de un individuo cuyo genoma fuera más diferente respecto al genoma de referencia [19, 23].

Las enormes implicaciones asociadas al conocimiento del genoma para entender los estados de salud y enfermedad del ser humano son la principal motivación para su análisis y estudio en profundidad. Tal es así que tras la primera secuenciación completa del genoma humano en 2003 [24], se han ido produciendo modificaciones y engendrando nuevos conceptos que han evolucionado desde la secuencia del genoma de referencia inicial que era única y lineal, al nuevo pangenoma que representa diversas versiones de la secuencia del genoma humano al mismo tiempo. Con esto se pone de manifiesto que existe un avance continuo en el mundo de la genética y que la mejora en el conocimiento del código genético va a determinar que, en un futuro cercano, se desvelen certezas sobre la etiopatogenia de determinadas enfermedades, incluida la hipoacusia [19].

2.2. Enfermedades genéticas y patrones de herencia

Las enfermedades genéticas pueden tener un sustrato monogénico, poligénico, cromosómico o mitocondrial.

- Las enfermedades **monogénicas** surgen por variantes patogénicas en las bases del ADN de un gen, lo que llevará a la formación de una proteína anómala, insuficiente o ausente, y por ello a un fallo en su función. Se transmiten habitualmente bajo patrón mendeliano: autosómico dominante (AD), autosómico recesivo (AR), dominante ligado a X o recesivo ligado a X. Las hipoacusias hereditarias son trastornos fundamentalmente monogénicos, si bien los fenotipos pueden estar modulados por la influencia de genes reguladores.
- Las enfermedades poligénicas son debidas al efecto aditivo de alteraciones en varios genes y en su expresión tiene importancia la acción ambiental, por lo que también se utiliza el término enfermedad multifactorial.
- Las cromosomopatías son debidas a pérdidas (monosomías, deleciones) o excesos de este material cromosómico (trisomías).

– INTRODUCCIÓN –

- Las enfermedades mitocondriales son debidas a alteración en el ADN mitocondrial (ADNmt) transmitidas por vía materna.

Los patrones de herencia se clasifican en función de la localización y comportamiento de cada gen implicado. Así, la herencia autosómica es propia de los genes que se localizan en los autosomas y la herencia ligada al sexo en los cromosomas sexuales. Si la variante genética se manifiesta en heterocigosis se habla de herencia dominante, es decir, el alelo mutado domina sobre el normal, por lo que aparecen repercusiones fenotípicas (generalmente tardías) y se constatan antecedentes familiares de la patología en cuestión, siendo la probabilidad de transmitir la enfermedad a los descendientes del 50%. Cuando el fenotipo sólo se manifiesta si las dos copias alélicas están mutadas estamos ante una herencia recesiva, dónde los progenitores son por regla general portadores asintomáticos y la probabilidad de tener un descendiente afecto es del 25%. Este tipo de herencia es la más común en las variantes genéticas encontrada en la hipoacusia infantil.

En la herencia recesiva ligada al cromosoma X, los varones van a expresar un fenotipo patológico, naciendo en general de padres no afectados y siendo la madre una portadora asintomática. La afectación es casi exclusiva de varones y no existe transmisión varón a varón en el árbol genealógico. La herencia dominante ligada al X es característica de un grupo muy reducido de patologías, pero estará presente en todos los varones y en la mitad de las mujeres descendientes de madre afecta. Este tipo de herencia es muy poco común en la etiopatogenia de la hipoacusia, y sobre todo se detecta en variantes síndrómicas, como por ejemplo el síndrome de Alport, que condiciona alteraciones renales e hipoacusia [25].

Las variantes patogénicas en el genoma mitocondrial se transmiten según un patrón de herencia materna, por lo que la proporción de varones y mujeres afectados son aproximadamente iguales. La variante patogénica más conocida responsable de hipoacusia por este tipo de herencia es la mutación del gen *MT-RNR1* asociado al fenotipo audiológico DFNA20 y DFNA26 responsable del incremento en la susceptibilidad a la ototoxicidad por aminoglucósidos [26].

Las enfermedades que presentan un sustrato genético pueden presentar diferentes características:

- **Penetrancia incompleta:** hace referencia a la probabilidad de que una persona que tiene una variante patogénica específica (genotipo) que causa una determinada enfermedad

– INTRODUCCIÓN –

genética tenga las características de esa enfermedad (fenotipo). La penetrancia es completa cuando el 100% de los casos con una determinada variante patogénica padecen la enfermedad, si no se habla de penetrancia incompleta, es decir sólo un porcentaje de los individuos portadores del gen alterado manifestarán la enfermedad. La penetrancia incompleta puede justificarse por la presencia de una etiología multifactorial y, por tanto, su expresión fenotípica puede verse inhibida por otros factores, ya sean ambientales o genéticos.

- **Expresividad variable:** las manifestaciones clínicas (tipo y severidad) pueden ser distintas entre individuos portadores de la misma variante, incluso dentro de la misma familia. Por ejemplo, el gen *EYA1* que se asocia al síndrome branquio-oto-renal tiene una alta penetrancia, pero con una expresividad variable, por lo que la aparición de síntomas es altamente probable, pero el rango de severidad de los mismos es muy variable entre individuos, pudiendo ir desde malformaciones leves en oído y riñón hasta agenesias completas en dichos órganos [27].
- **Heterogeneidad genética:** la presencia de variantes patogénicas en genes diferentes puede producir la misma manifestación clínica. De hecho, se conocen al menos 30 genes capaces de producir una hipoacusia prelocutiva no sindrómica de herencia autosómica recesiva (*GJB2*, *GJB6*, *OTOF*, *TECTA*, *MYO7A*)
 - **No alélica o de locus:** se presenta cuando variantes patogénicas en diferentes locus situados en cromosomas distintos causan la misma expresión fenotípica de una enfermedad. Un ejemplo es el síndrome de Usher, para el cuál se han identificado hasta la fecha 11 loci diferentes (*USH1A-USH1G*, *USH2A-USH2C*, *USH3*) y 8 genes causantes de la enfermedad (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *SANS*, *USH2A*, *VLGR1* y *USH3*) [28].
 - **Alélica:** la misma variante en un gen puede dar lugar a manifestaciones clínicas diferentes. Por ejemplo, la mutación recurrente 35delG en el gen *GJB2* (conexina 26), puede ocasionar una hipoacusia no sindrómica AR (DFNB1), no sindrómica AD (DFNA3), o un síndrome con manifestaciones cutáneas y oculares además de la hipoacusia [29].

2.3. Secuenciación genética

La secuenciación del ADN es el proceso mediante el cual se determina el orden preciso de las bases nitrogenadas de la cadena de ADN de un individuo o ser vivo. Para realizar un estudio genético es preciso obtener ADN celular de una muestra de sangre periférica o un hisopado de la mucosa oral (saliva) para la obtención de células nucleadas.

2.3.1. Secuenciación convencional o Sanger

La necesidad de desarrollar un método de secuenciación del ADN se hizo especialmente evidente tras la publicación de Francis Crick en la revista *Nature* en 1970, dónde se ponía en evidencia que la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN condiciona la secuencia de aminoácidos de las proteínas que ejecutan la actividad celular [30]. Esto no ocurre directamente, sino con un intermediario, el ARN, que se transcribe a partir del ADN, respetando su secuencia (salvo porque el uracilo sustituye a la timina), y que es leído por los ribosomas, encargados de transformar cada secuencia de nucleótidos codificantes en una secuencia de aminoácidos.

En la misma década Frederick Sanger, con el método enzimático de terminación de cadena [31] y Walter Gilbert, mediante la fragmentación química [32], desarrollan los primeros procedimientos robustos para obtener secuencias de ADN. Ambos métodos eran manuales, tediosos y conllevaban el uso de compuestos radioactivos, leyendo solamente de unas decenas a unos pocos cientos de bases. En las décadas de los 80 y de los 90 el avance en las técnicas bioquímicas permitió que se desarrollaran estrategias de secuenciación más automatizables, basadas en el método de Sanger, gracias a la sustitución de los compuestos radiactivos por didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia y a una mejor detección a través de la electroforesis capilar (**Figura 3**). Esto permitió mejorar y aumentar el rendimiento del proceso de secuenciación, hasta el punto en que los nuevos avances hicieron posible el desarrollo de los primeros secuenciadores automáticos, que ayudaron en la obtención de la secuenciación completa del Proyecto Genoma Humano (PGH) [33].

El método de Sanger permite detectar variantes genéticas de pequeño tamaño, pero tiene la limitación de realizar solamente unas 96 a 384 reacciones en paralelo, lo que supone largo periodos de tiempo y costes por base secuenciada elevados. Cuando hay deleciones, inserciones o alteraciones estructurales en los genes, la técnica de Sanger no puede detectarlas, por lo que para descartarlas es recomendable hacer una amplificación de sondas dependiente de ligandos, una técnica dirigida al estudio completo de un gen concreto. Otra desventaja de

– INTRODUCCIÓN –

este método reside en variantes patogénicas con frecuencias alélicas inferiores al 20%, dónde el riesgo de no ser detectadas es muy alto. Sin embargo, esta metodología resulta de gran utilidad para el análisis de genes candidatos, de manera específica y dirigida.

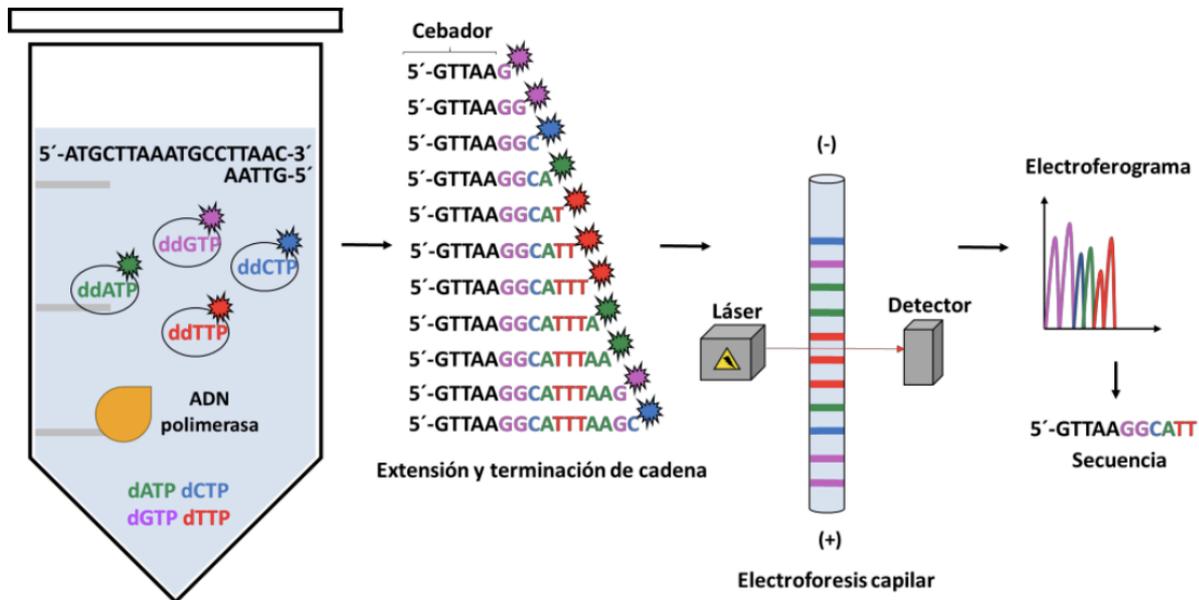


Figura 3. Secuenciación de Sanger automatizada fluorescente. Un oligonucleótido sintetizado químicamente, que forma un dúplex con el ADN monocatenario a secuenciar, es el sustrato sobre cuyo extremo 3' la ADN polimerasa incorpora los nucleótidos complementarios a la cadena a secuenciar, a partir de una mezcla de desoxinucleótidos y didesoxinucleótidos trifosforilados (dNTP y ddNTPs, respectivamente). Esta mezcla está compuesta mayoritariamente por cantidades equimoleculares entre sí de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, así como, en mucha menor proporción, por cantidades, también equimoleculares entre sí, de ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP. Estos últimos están marcados con un fluoróforo diferente en función de la base nitrogenada que los compone y, cuando se incorporan a la cadena, al tener un átomo de hidrógeno en lugar de un grupo OH unido al carbono 3' de su desoxirribosa, detienen la polimerización. De este modo, se genera una mezcla de cadenas monocatenarias fluorescentes de diversos tamaños y complementarias al ADN a secuenciar. Todas las moléculas del mismo tamaño terminan en el mismo nucleótido y, por lo tanto, producen la fluorescencia de la misma longitud de onda al ser excitadas. La separación de estas moléculas monocatenarias mediante electroforesis capilar y la detección de su fluorescencia dibuja un electroferograma en el que la sucesión de colores permite determinar la secuencia de nucleótidos complementaria al fragmento a secuenciar. [Diñeiro M. (2020). Diagnóstico molecular del cáncer, las sorderas y las cegueras mediante secuenciación genómica masiva. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo]

2.3.2. Secuenciación masiva o de nueva generación

El empleo de la genética en Medicina demanda que las pruebas sean capaces de identificar el mayor porcentaje de variantes patogénicas en un periodo breve de tiempo. Por ello se han ido buscando alternativas de alto rendimiento que reduzcan los tiempos de procesamiento de las muestras y los costes derivados. Así en 2005 nace la tecnología de secuenciación masiva o de segunda generación, también conocida por su terminología anglosajona **Next Generation Sequencing (NGS)**. Esta tecnología es capaz de determinar la

– INTRODUCCIÓN –

secuencia de los 3.200 millones de nucleótidos de nuestro genoma a partir de millones de lecturas de longitud variable, que se ensamblan unas con otras mediante métodos bioinformáticos hasta reconstruir una secuencia genómica individual completa, lo cual reduce el tiempo y el coste económico [16, 34]. Sin embargo, para esto es necesaria su comparación con un genoma de referencia, motivo por el cual no podría haberse desarrollado con éxito sin contar con los resultados del PGH.

Esta metodología tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o variantes patogénicas puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y traslocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones), que la técnica de Sanger no puede abarcar. Aunque también lleva intrínsecas una serie de limitaciones diagnósticas, fundamentalmente en variantes estructurales de gran tamaño, mosaicismos o enfermedades genéticas producidas como consecuencia de la repetición de tripletes (p.e. Huntington).

Existen diversas técnicas de secuenciación consideradas de segunda generación, pero las fases generales del proceso son compartidas por todas ellas: A) Preparación de la librería de ADN (genoteca); B) Enriquecimiento; C) Secuenciación y D) Control de calidad y análisis de datos.

A) Preparación de la librería de ADN (genoteca)

Consiste en generar segmentos del ADN para secuenciar, flanqueados por secuencias de ADN externas, llamadas adaptadores, que son requeridas para el funcionamiento de las diferentes tecnologías de secuenciación de nueva generación. Estos adaptadores se pueden añadir mediante PCR, ligándolos a los extremos de fragmentos del ADN objeto de análisis o intercalándolos en el mismo mediante transposición [35, 36].

Habitualmente, antes de secuenciar las librerías se realiza una amplificación por PCR usando cebadores complementarios a dichos adaptadores para obtener la cantidad de ADN necesaria para el proceso de secuenciación, ya que por ejemplo para la detección de reordenamientos genómicos es preferible tener mayor tamaño del fragmento de ADN situado entre los adaptadores, aunque sin embargo para para la detección de SNVs valdría con fragmentos más pequeños.

– INTRODUCCIÓN –

Una vez preparada la librería, esta puede ser secuenciada por igual en toda su extensión (por ejemplo, si queremos secuenciar un genoma completo) o se puede enriquecer previamente para obtener más cantidad de secuencia de determinadas regiones genómicas de interés.

B) Enriquecimiento

Cuando realizamos secuenciación genética, el objetivo no suele ser secuenciar el genoma completo, sino parte de él. Por ello es importante definir hacia donde queremos orientar nuestro estudio genético, eliminando los fragmentos del ADN que no son de interés previamente a introducir la muestra en la fase de secuenciación. Este procedimiento de cribado de la muestra es lo que se denomina enriquecimiento. Si los adaptadores se añaden a la muestra de ADN mediante técnica de PCR, la secuencia de los propios cebadores se diseña para ser específica de las regiones diana que queremos secuenciar, y el proceso es intrínseco a la preparación. Sin embargo, cuando los adaptadores se han añadido mediante ligación o transposición el procesamiento es adicional, siendo los métodos más utilizados la hibridación o captura con sondas [37].

C) Secuenciación

Los procedimientos más usados en la actualidad son la secuenciación con nucleótidos terminadores reversibles fluorescentes en los equipos de tecnología Illumina y la detección de protones mediante semiconductores en los secuenciadores Ion Torrent.

En ambos casos, el primer paso consiste en la amplificación clonal de cada fragmento de la librería. Mediante sucesivas reacciones de síntesis a partir de una única molécula de ADN, se genera un conjunto de fragmentos idénticos (clones) que posteriormente son secuenciados. El objetivo de esta amplificación es generar una señal lo suficientemente intensa como para permitir la detección. Con el formato de Ion Torrent, la amplificación clonal ocurre mediante PCR en emulsión, es decir, cada molécula de ADN de la librería hibrida a través de sus adaptadores en microperlas sólidas de acrilamida que llevan unidas los cebadores y cada perla se incorpora en una emulsión cuidadosamente controlada, en la que cada burbuja constituye un microreactor con todo lo necesario para llevar a cabo la PCR (**Figura 4A**).

En cambio, la tecnología Illumina emplea una PCR en fase sólida, sobre una flow-cell recubierta de oligonucleótidos complementarios a los adaptadores, donde se lleva a cabo una amplificación en puente, llamada así porque las cadenas de ADN replicadas tienen que arquearse

– INTRODUCCIÓN –

para poder cebar la siguiente ronda de polimerización con los oligonucleótidos cercanos unidos a la superficie (**Figura 4B**).

Una vez completada la amplificación clonal de la librería, el siguiente paso es la lectura de los clones. En sus inicios la metodología usada por Ion Torrent fue la pirosecuenciación (detección de grupos de pirofosfato). En 2005, combinando este mismo principio con la PCR en emulsión, se desarrollaron las máquinas de secuenciación 454 capaces de producir lecturas de alrededor de 400-500 pares de bases, permitiendo la paralelización masiva de las reacciones de secuenciación y aumentando en gran medida la cantidad de ADN que se podía secuenciar en un mismo experimento.

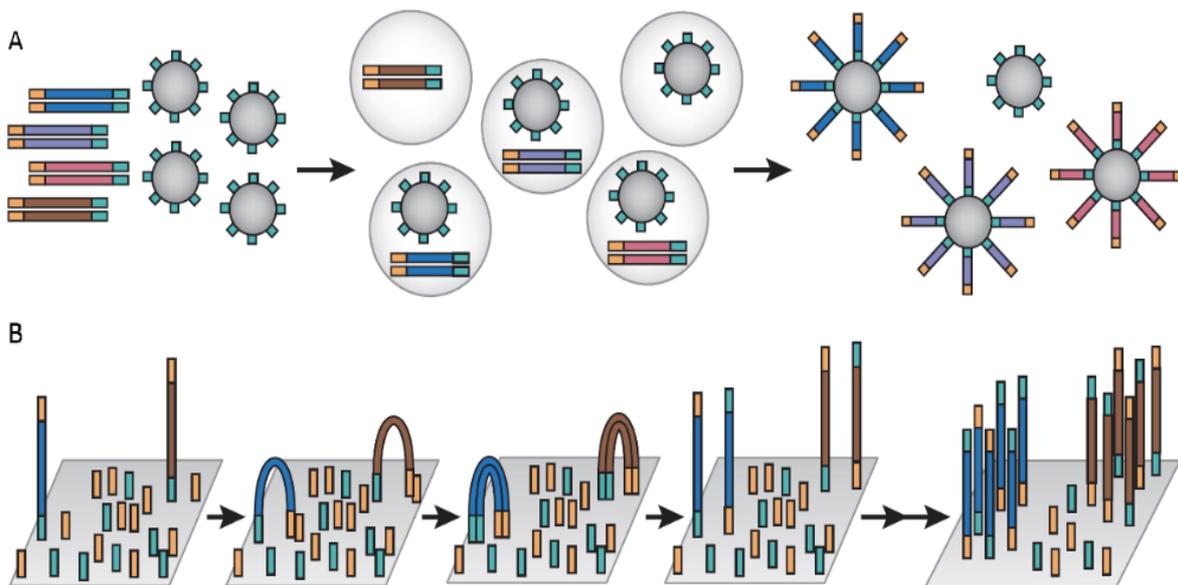


Figura 4. Amplificación clonal (adaptado de Shendure et al, 2008) [38].

(A) PCR en emulsión, Ion Torrent: Los fragmentos de la librería y las microperlas, recubiertas de oligonucleótidos complementarios a los adaptadores, se mezclan y diluyen en una emulsión, de modo que cada microgota contiene idealmente un único fragmento y una única microperla. Mediante un proceso de amplificación, cada microperla queda recubierta de múltiples copias del mismo fragmento de ADN;

(B) Amplificación "en puente", Illumina: Los fragmentos de la librería se unen a oligonucleótidos, complementarios a sus adaptadores, que están repartidos en un soporte sólido. Al existir oligonucleótidos complementarios a ambos adaptadores del fragmento, se produce una amplificación en puente que va formando clones de moléculas agrupadas físicamente y procedentes del mismo fragmento de ADN original.

En 2010 surgieron los secuenciadores Ion Torrent, en los que la detección de luminiscencia generada a partir de grupos pirofosfato se sustituyó por la detección de protones generados durante la polimerización del ADN. Al generarse un cambio en el pH, éste es registrado como un cambio de voltaje por un sensor de iones (semiconductor). Pero el método de secuenciación

– INTRODUCCIÓN –

más determinante fue Solexa, que surgió en 2006, y que se basa en la PCR en fase sólida con la amplificación en puente mencionada previamente, combinada con una lectura basada en nucleótidos terminadores reversibles fluorescente **Figura 5**.

Esta técnica es más robusta y capaz de distinguir mejor el tamaño de polímeros de un mismo nucleótido y es el principio de la actual plataforma de secuenciación Illumina, metodología de referencia en secuenciación genómica de segunda generación en la actualidad [39].

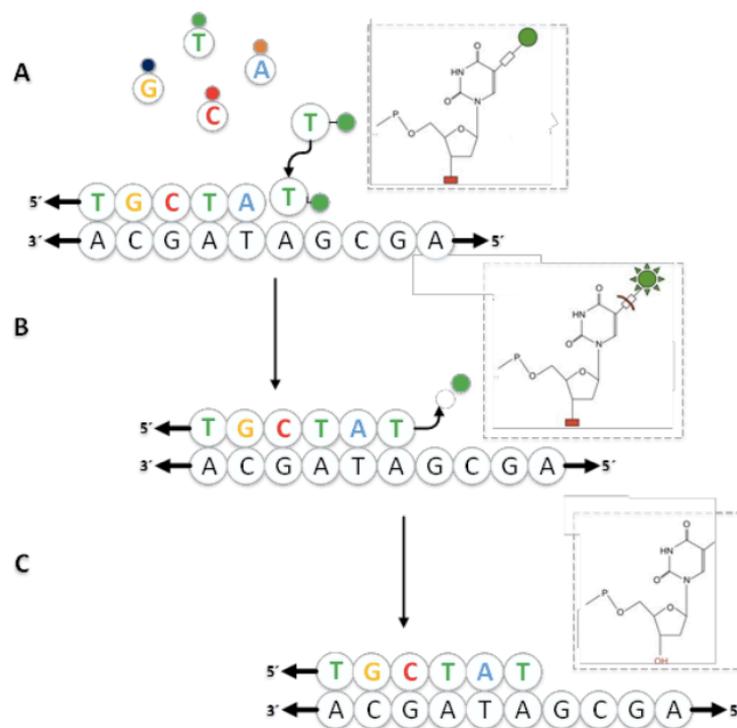


Figura 5. Secuenciación y detección Illumina **A)** Por cada ciclo de síntesis, se añaden a la Flow-cell los 4 ddNTPs terminadores reversibles marcados con fluorescencia, de modo que a cada cadena en síntesis solo se puede unir uno de ellos (el complementario a la siguiente base del fragmento a secuenciar). **(B)** Después de lavar los ddNTP no incorporados, se excita la celda y una cámara recoge la emisión de fluorescencia, lo que determinará el nucleótido unido en esa posición. **(C)** Químicamente se elimina el fluoróforo y se revierte la capacidad terminadora de síntesis para comenzar un nuevo ciclo. [Diñeiro M. (2020). Diagnóstico molecular del cáncer, las sorderas y las cegueras mediante secuenciación genómica masiva. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo]

D) Control de calidad

La interpretación de los datos crudos originados por el secuenciador requiere recursos bioinformáticos capaces de convertir imágenes en datos, datos en información interpretable e información en conocimiento utilizable. En este proceso existen varios pasos, y cada uno de ellos

– INTRODUCCIÓN –

aborda un paso necesario para la transformación de datos crudos en conocimiento clínicamente utilizable [40, 41].

El primer análisis va a transformar los archivos de señales generados por el secuenciador en archivos de datos denominados FASTQ, que contienen secuencias de caracteres A, C, G y T asociadas a una puntuación que valora la calidad de las bases de cada secuencia. Sobre estos archivos FASTQ se filtran las lecturas de baja calidad y se eliminan las secuencias de los adaptadores añadidos en la primera parte de todo el proceso [42]. El segundo análisis conlleva el alineamiento de las lecturas de la muestra analizada con respecto a una secuencia de referencia (que suele ser la última versión del genoma humano) para la identificación de diferencias o variantes entre ellas [43]. Y finalmente el tercer análisis, que consiste en la anotación, filtrado e interpretación de variantes para poder evaluar su origen, singularidad, impacto funcional y sus consecuencias clínicas [2, 4, 44].

La NGS y sus continuas mejoras han reducido drásticamente los tiempos de realización de los estudios genéticos, así como en los costes asociados a ellos. Pero existe una constante expansión de dichas tecnologías (ya en vías de desarrollo secuenciaciones de 3ª y 4ª generación) que buscan una mayor precisión y agilidad diagnóstica acorde al desarrollo de la medicina de precisión [45].

3. Herramientas para el análisis genético

La incorporación de la NGS a la práctica clínica tiene diferentes aplicaciones: la secuenciación de genoma completo (Whole Genome Sequencing – WGS), la secuenciación del exoma completo (Whole Exome Sequence – WES) y la secuenciación de paneles de genes. Actualmente en el ámbito de la hipoacusia, las pruebas basadas en la NGS han sustituido a los test basados en la secuenciación Sanger debido al mayor rendimiento y precisión diagnóstica que aportan respecto al formato convencional.

Hoy en día, los paneles de genes se consideran la herramienta diagnóstica con mayor rentabilidad para el estudio de diversas enfermedades y patologías, entre ellas las hipoacusias neurosensoriales, lo cual sustenta el trabajo de la presente Tesis Doctoral [2, 4] en la que se aplica esta herramienta diagnóstica para el estudio genético de la cohorte. En el caso de las hipoacusias genéticas, la penetrancia incompleta, la expresividad variable y la heterogeneidad genética alélica y no alélica dificultan el establecimiento de correlaciones entre una determinada variante genética (genotipo) y sus manifestaciones clínicas y audiométricas (fenotipo), por lo que

– INTRODUCCIÓN –

la aproximación diagnóstica ha de ser empírica y agnóstica, conceptos que profundizaremos más adelante en la discusión de este trabajo.

Si bien hay que tener en cuenta que, si existe una alta sospecha acerca de una correlación específica genotipo-fenotipo, cabría la posibilidad de realizar el estudio genético dirigido al gen en cuestión. Por ejemplo, ante una hipoacusia desarrollada tras la exposición a aminoglucósidos, pensaríamos en la variante patogénica A1555G en el gen *MT-RNR1*. No obstante, si el resultado genético de la prueba dirigida resulta negativo, estaría indicado completar el estudio con otra herramienta genética de mayor rango diagnóstico, como sería un panel de genes.

A continuación, se pasan a detallar las características relativas a los 3 tipos fundamentales de estudios genéticos: panel de genes, secuenciación de exomas y secuenciación de genoma. Las ventajas y desventajas relativas a su empleo en la práctica clínica se comparan en la **Tabla 1**.

3.1. Panel de genes

Los estudios basados en paneles de genes consisten en un análisis específico de secciones del genoma que corresponden a regiones codificantes y/o no codificantes en genes que están clínicamente asociados a una patología concreta relacionada con el fenotipo observado en el paciente. Con el empleo de paneles maximizamos la secuencia que es clínicamente relevante y hallazgos secundarios que podemos encontrar de forma incidental en otros estudios más amplios como el WES y WGS. De la ventaja que supone acotar la región del genoma analizada, deriva también la principal limitación de los paneles de genes, y es que, es preciso conocer el abanico genético que engloba una determinada patología para poder explorar todos los genes relacionados hasta la fecha, así como los genes candidatos potencialmente relacionados con la enfermedad a estudio. Por ello, el panel sólo tendrá éxito si el gen que causa la enfermedad está incluido en el mismo [46].

Cabe aclarar no obstante, que los paneles proporcionan la flexibilidad para agregar o eliminar genes incluidos, y si por ejemplo, se actualizan nuevas variantes genéticas para la patología en bases de datos poblacionales, es posible enriquecer la librería con las nuevas aportaciones [16]. Pero esto conlleva una permanente vigilancia y actualización para evitar que el panel quede obsoleto.

El número de genes de cada panel es variable y dependiente de las circunstancias y prioridades de cada laboratorio. En algunos sólo se incluyen genes para los cuales existe

– INTRODUCCIÓN –

suficiente literatura que justifica su relevancia diagnóstica, terapéutica o pronóstica, y en otros se enriquecen con análisis más amplios, incluyendo genes diana adicionales cuya asociación con la enfermedad en la literatura científico-médica es incipiente. Debe señalarse que una característica importante del panel de genes es que contemple la prevalencia de los genes de la población a estudio, asegurándose al menos que los más frecuentes se encuentren incluidos. Sin embargo, cuando la prevalencia genética de una población respecto a una patología es desconocida, el panel debe incluir el mayor número de genes posibles asociados a la enfermedad para evitar pérdidas diagnósticas. Esto es lo que sucede precisamente en la hipoacusia del adulto, donde no contamos con información genética poblacional y en consecuencia sólo un estudio con un panel de genes amplio puede dar un rendimiento significativo [47]. De nuevo y como enfatizaremos en la discusión, la aproximación agnóstica es la clave para la ganancia de rentabilidad de los estudios genéticos en este colectivo y patología concreta.

3.2. Secuenciación de exomas (WES)

La secuenciación del exoma tiene como propósito determinar la secuencia de todas las regiones codificantes del genoma, es decir, la parte funcional y codificante de proteínas (exones). Su utilidad es especialmente relevante en el diagnóstico de patologías con extrema heterogeneidad genética, en pacientes con dos o más fenotipos no relacionados o en ausencia de características clínicas claves en el momento del estudio, recomendándose la realización de tríos padre-madre-paciente, con el fin de mejorar su rendimiento diagnóstico [48]. Esta técnica ayuda a revelar la expansión de los fenotipos asociados con alteraciones genéticas ya descritas en otros pacientes con patologías similares, pero aparentemente diferentes, así como identificar nuevos genes candidatos [49]. Sin embargo, con el análisis se pueden generar sesgos en la secuenciación, ya que se están omitiendo las áreas no codificantes del genoma que sabemos tienen gran relevancia en el desarrollo de enfermedades genéticas [24].

La principal ventaja de la secuenciación de exomas frente a un panel de genes es que constituye una prueba única y similar para todos los casos y que no precisa ser actualizada cada vez que se descubre un nuevo gen asociado a una determinada patología.

El principal inconveniente de esta metodología reside en la profundidad de la secuenciación, es decir, el número de veces que se lee cada una de las posiciones que queremos secuenciar. Debido al elevado número de regiones que abarca un exoma, lo más factible económicamente es utilizar una profundidad de lectura menor, pero esto repercute

– INTRODUCCIÓN –

directamente en la capacidad de detección de algunas alteraciones (p.e. mosaicismos). Además, dado que el WES no tiene en cuenta la información contenida en las regiones no codificantes, la detección de pseudogenes puede pasar desapercibida, algo que en el caso de la hipoacusia tiene mucha relevancia, ya que sabemos que pseudogenes como *STRC* y *OTOA* están asociados a hipoacusia sindrómica y no sindrómica [22, 50].

3.3. Secuenciación del genoma (WGS)

La secuenciación del genoma completo ofrece la capacidad de determinar toda la secuencia de ADN del genoma sin la necesidad de utilizar técnicas de captura selectiva para aislar regiones específicas. Conceptualmente, este enfoque es muy atractivo y permite la identificación de otras clases de variantes patogénicas cuya detección puede escapar a la secuenciación por exoma o paneles, como serían las grandes alteraciones estructurales, translocaciones equilibradas o mosaicismos [16]. También ofrece la oportunidad de evaluar regiones no codificantes de ADN e identificar variantes de secuencia funcionalmente importantes que pueden influir en la expresión génica. Al eliminar la necesidad de capturar las secuencias se elimina el riesgo intrínseco al sesgo de selección para que la cobertura a través de las secuencias sea más uniforme, aportando el máximo nivel de información genética con el menor sesgo asumible.

Los principales obstáculos de la secuenciación del genoma son fundamentalmente derivados de la logística y el coste, pero sobre todo el gran hándicap radica en la cobertura no homogénea, lo cual supone que regiones genómicas de interés no sean suficientemente escrutadas y se reduzcan los hallazgos identificados en el estudio. Por ello, aunque el coste económico del procedimiento pudiera llegar a ser asumible con la NGS, esta técnica no se implementará a corto plazo como herramienta diagnóstica en el estudio genético hasta que su rendimiento, precisión y tiempo de ejecución lo hagan factible [16, 24, 51].

3.4. Genes candidatos

Otro análisis distinto en contraste con los estudios previamente descritos es la identificación de **genes candidatos**, que se han usado para identificar factores de riesgo genéticos de trastornos complejos, como es el caso de la hipoacusia. La estrategia empleada para proponer genes candidatos se basa en el hecho de que su posición genómica o bien las características funcionales de la proteína que codifican, permite plantear que pudieran estar

– INTRODUCCIÓN –

implicados en la patogénesis de la enfermedad. Estos genes son seleccionados a menudo en estudios basados en un conocimiento *a priori* del impacto biológico y funcional que produciría su alteración [52].

El análisis de genes candidatos permiten analizar los efectos de las variantes de un gen candidato en los miembros de una familia afectada o en casos y controles no relacionados y es útil para determinar de forma rápida la relación de una variante genética con una enfermedad. No obstante, este método está limitado por el grado de conocimiento de la biología de la enfermedad investigada.

Otra manera de definir genes candidatos consiste en la identificación de regiones cromosómicas de alto riesgo para desarrollar una determinada enfermedad o fenotipo concreto; los genes que quedan ubicados dentro de dichas regiones se consideran por ende genes candidatos. Esto sucede con el gen *OTOA*, codificante de la proteína otoancorina involucrada en la unión de la matriz extracelular del oído interno a la superficie apical de las células no sensoriales subyacentes, y donde la presencia de variantes patogénicas está asociada con hipoacusia [50, 53].

Tabla 1. Comparación de las diferentes herramientas de diagnóstico genético

Test genético	Ventajas	Desventajas
Panel de genes	Gran sensibilidad y bajo coste Baja probabilidad de hallazgos genómicos incidentales Alta cobertura regiones analizadas	Restricción del análisis a los genes incluidos Necesidad de actualización periódica con nuevos genes descubiertos o según prevalencia poblacional
Secuenciación exoma	Análisis de toda la región codificante del genoma (se leen todos los genes)	Ausencia de información de regiones no codificantes Limitación en la detección de pseudogenes y variantes estructurales Hallazgos genómicos incidentales
Secuenciación genoma	Sin sesgos en la secuenciación Muy efectiva en la detección de variantes estructurales	Análisis e interpretación de datos complejo Coste económico elevado Hallazgos genómicos incidentales Cobertura poco profunda

4. Interpretación del análisis genético

Una vez explicadas las distintas herramientas para el estudio genético en la práctica clínica, es preciso conocer y saber interpretar la información derivada de su aplicación, así como sus principales limitaciones. Los estudios genéticos pueden darnos ingentes cantidades de información que debe ser filtrada y puesta en el contexto clínico para su interpretación. A mayor cantidad de ADN secuenciado (estudios WES o WGS), mayor es la proporción de variantes genéticas identificadas; algunas de ellas como los SNPs o CNVs pueden tener consecuencias clínicas inciertas, modificando el riesgo de enfermedad o simplemente representando una modificación neutra en el genoma. Otras veces las variantes genéticas encontradas resultan ser variantes patogénicas o potencialmente patogénicas, pero que no forman parte de la patología a estudio (hallazgos incidentales). Debido a esto, comprender la importancia clínica de las variaciones resulta una tarea ardua y compleja, ya que nuestros conocimientos son limitados en cuanto al tipo de genes involucrados en una enfermedad o afección en particular y a las interacciones gen-gen o gen-medio ambiente relacionadas con las enfermedades.

Considerando las pruebas genéticas poderosas herramientas de diagnóstico, surgen de su empleo varios desafíos como la precisión para definir la variante, la interpretación clínica de los resultados y la traducción de los mismos en recomendaciones para el paciente y/o familiares [54]. Desde años se han ido desarrollando herramientas bioinformáticas y bases de datos específicas diseñadas para ayudar a filtrar y desechar información genética irrelevante, así como para comprender la importancia funcional de las variantes genéticas en el desarrollo de las enfermedades.

Para una buena interpretación de un estudio genético hay dos puntos clave a determinar: la frecuencia alélica de las variantes encontradas y la cobertura y calidad del estudio genético realizado. Tras la identificación de una variante, ésta ha de ser comparada con múltiples bases de datos poblacionales, funcionales y relacionadas con la enfermedad a estudio para poder determinar la **frecuencia alélica** de dicha variante en la población, es decir, la proporción en que se observa dicho alelo específico. Así se pueden establecer relaciones genotipo-fenotipo o predecir la función de la variante.

También es preciso definir la calidad del estudio genético determinando la **cobertura** o profundidad de lectura del estudio. Este concepto hace referencia al número de veces que se lee un nucleótido durante la secuenciación. Una mayor profundidad de cobertura aumenta la confianza en los resultados finales y ayuda a diferenciar los polimorfismos de un solo nucleótido

– INTRODUCCIÓN –

de los errores de secuenciación. Esto es particularmente útil ante mosaicismos o enfermedades genéticas heterogéneas. Por ello, coberturas insuficientes en regiones clave del genoma pueden llevar a no detectar variantes clínicamente relevantes [55]. En función del tipo de estudio genético se recomiendan diferentes rangos de cobertura, siendo lo ideal una cobertura para WGS de 30X -50X y de 100X para WES. En cambio, a la hora de diseñar paneles es importante considerar una profundidad superior, de 500X o 1000X, para asegurar una cobertura pareja y completa que justifique el objetivo acotado de los genes a analizar [55].

Así es que un punto importante a considerar, sobre todo cuando no se encuentran variantes diagnósticas tras la realización del estudio genético, es analizar la cobertura “real”, ya que, si dicha cobertura es baja, hay una alta posibilidad de que la variante se encuentre en alguna de las regiones menos leídas, por lo que se puede optar por estudiar específicamente dichas regiones con otras técnicas como secuenciación Sanger o MLPA.

4.1. Bases de datos genéticas

El uso generalizado de la NGS en el diagnóstico clínico trae consigo la identificación continua de variantes no descritas previamente cuyo significado clínico es desconocido. Por ello es preciso estandarizar toda esa nueva información con el fin de lograr una correcta interpretación del significado clínico de las variantes. A día de hoy se han desarrollado múltiples bases de datos de variantes germinales que facilitan la organización del conocimiento con respecto a las alteraciones genéticas y sus fenotipos asociados [56, 57]. Las bases de datos poblacionales pueden ser herramientas muy poderosas para la interpretación de variantes genéticas debido a la gran cantidad de datos capturados y cotejados dentro de ellas. Varios estudios internacionales han contribuido significativamente a enriquecer esta base de conocimiento, entre ellos la *Base de datos de Polimorfismo de Nucleótido Único*, el *Consortio de Agregación de Exomas*, el *Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERER) con su programa Exome Server* y el *Proyecto 1000 Genomas*. Pero de forma más concreta, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se han empleado fundamentalmente las bases ClinVar y OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man).

ClinVar es un recurso público y gratuito, que se puso en marcha en 2013 por el National Center of Biothecnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Actualmente contiene más de 801.000 variantes genéticas que afectan a más de 11.000 genes. Su principal finalidad es que tanto los laboratorios clínicos, los investigadores y los paneles de

– INTRODUCCIÓN –

expertos puedan compartir sus interpretaciones de las variantes genéticas junto a su correspondiente evidencia, permitiendo identificar fácilmente aquellas variantes que han sido revisadas por paneles de expertos, lo cual proporciona transparencia en su concordancia o discordancia sobre la relevancia clínica de las mismas [57].

OMIM es una base de datos que recoge la descripción de genes y fenotipos humanos y las relaciones entre ellos. Desde 1964 donde nace en el seno de la Universidad Johns Hopkins ha ido desarrollándose en diferentes versiones y actualizaciones. Está disponible en el sitio web oficial, OMIM.org (<http://omim.org>), con el fin de proporcionar una búsqueda ágil y rápida [56]. En la actualidad, con más de 450 actualizaciones cada mes (mediante revisión por pares), contiene información de más de 16.300 genes y casi 10.000 fenotipos diferentes. Cada entrada de OMIM contiene un resumen completo de un fenotipo genético y/o de un gen determinado, por lo que se encuentra en el pódium de bases de datos en lo relativo al nomenclatura y clasificación de fenotipos genéticos.

Todas estas bases de datos se van actualizando paulatinamente en base a nuevos contenidos exclusivamente publicados en la literatura biomédica, que pongan de manifiesto nuevas evidencias o nuevos genes descubiertos a nivel mundial. Sin embargo, aunque todas ellas son de gran ayuda a menudo contienen variantes incorrectamente clasificadas y/o propuestas de clasificaciones contradictorias para una misma variante. Es por ello que en 2013 el NHGRI (*National Human Genome Research Institute*) fundó **ClinGen**, un recurso público cuya principal motivación es definir la relevancia clínica de genes y variantes para su uso en la medicina de precisión e investigación [58].

4.2. Clasificación de las variantes genéticas

Una nomenclatura uniforme, basada en unos criterios estandarizados garantiza la designación inequívoca y permite el intercambio y uso efectivo de la información genética. Además, la interpretación que se haga de las variantes secuenciadas es determinante, puesto que las discrepancias en la clasificación e interpretación de las mismas conllevan serias implicaciones clínicas para el paciente.

En el año 2000 el grupo de trabajo del Colegio Americano de Genética Molecular (ACMG) elabora una propuesta que sienta los cimientos para la estandarización de la interpretación clínica de variantes genómicas, definiendo 5 categorías para clasificar las variantes genéticas: (1) descritas previamente y consideradas como causa de enfermedad, (2) no descritas previamente

– INTRODUCCIÓN –

como patogénicas, pero que por sus características se espera que sean responsables del fenotipo, (3) no descritas previamente, pero con dudas al respecto de su patogenicidad, (4) no descritas previamente y probablemente no causantes de enfermedad y (5) descritas previamente y consideradas neutrales.

Sin embargo, la llegada de la NGS supuso un punto de inflexión en los estudios genéticos con un aumento notable del número de genes y variantes asociados a enfermedades. Por ello en 2013 se formó un grupo de trabajo compuesto por miembros del ACMG, la Asociación de Patología Molecular (AMP) y el Colegio de Patólogos Americanos (CAP) con el objetivo de revisar los estándares para clasificar las variantes genéticas utilizando la evidencia disponible en el momento del análisis. Así, en 2015 se publicaron las primeras **guías ACMG/AMP** con un sistema de puntuación para clasificar las variantes de forma consensuada como: “patogénica”, “probablemente patogénica”, “significado incierto (variants of unknown significance – VUS)”, “probablemente benigna” y “benigna” [59]. La publicación de esta guía fue un hito para el diagnóstico molecular y la genética clínica, sin embargo, únicamente es aplicable para variantes con herencia monogénica, no para variantes somáticas, farmacogenómicas o de genes asociados con trastornos complejos no mendelianos multigénicos.

En las especificaciones iniciales de la guía ACMG/AMP se proporcionaron dos tipos de criterios, unos para evaluar patogenicidad y otros para evaluar benignidad. Dentro de ellos se estratificaron los criterios en varios subgrupos según el nivel de evidencia: *stand-alone* (para criterios que se valen por sí mismos para otorgarle clasificación a la variante), *very strong*, *strong*, *moderate* o *supporting*, en orden decreciente en nivel de evidencia. En el **Anexo A** y **Anexo B** se detallan los criterios de patogenicidad y benignidad, respectivamente. Para proporcionar cierta flexibilidad, algunos criterios inicialmente definidos en un determinado nivel de evidencia se pueden ascender o degradar de nivel utilizando el juicio profesional. Por ejemplo, la segregación de la variante en miembros de la familia puede considerarse como *moderate*, pero en casos donde la cosegregación de la enfermedad es elevada puede pasar a considerarse *strong* [59].

Dado que existen diferencias notorias en prevalencia, penetrancia y contribución genética entre los diferentes tipos de variantes y su patrón de herencia en las diferentes enfermedades con carga genética como la hipoacusia neurosensorial, la interpretación del umbral de frecuencia para los alelos recesivos y los dominantes es determinante para la asignación de una variante a un criterio benigno o patogénico. Por ello, en 2018 se publicaron las “Especificaciones de las directrices ACMG/AMP para la interpretación de variantes genéticas asociadas a

– INTRODUCCIÓN –

hipoacusia”. En estas especificaciones, elaboradas por el Panel de Expertos en Hipoacusia Hereditaria de ClinGen, de los 28 criterios ACMG/AMP publicados en 2015 se eliminaron 4, se detallaron 21 y 3 se mantuvieron sin cambios [60]. Esta guía ha sido un punto de apoyo clave en la interpretación de los resultados genéticos de esta Tesis Doctoral.

A pesar del gran avance que supuso la estandarización de la clasificación de variantes en base a éstas y otras guías posteriores, algunos autores como Amendola y col., describen importantes inconsistencias y una tendencia a la sobreestimación de la patogenicidad al aplicar estos criterios [61]. En consecuencia, el Grupo de Trabajo de Interpretación de Variantes de Secuencia (**Sequence Variant Interpretation** - SVI) de ClinGen, se ha implicado en el refinamiento de las directrices de la interpretación de las guías ACMG /AMP para desarrollar enfoques cuantitativos en la interpretación de variantes, como por ejemplo recomendaciones específicas para la interpretación de las variantes de pérdida de función [62], especificaciones para las variantes de novo o recomendaciones para interpretar variantes que afectan a los dos alelos del mismo gen [63].

Como ya hemos comentado previamente, para poder llegar a interpretar correctamente una variante genética es preciso conocer la prevalencia y la frecuencia de dicha variante en la población. Pero en ocasiones durante la realización del estudio genético nos encontramos con variantes para las que hoy en día no existen datos cuantitativos poblacionales suficientes que respalden la asignación certera a hacia la categoría de patogenicidad o benignidad, no pudiendo asociarse, pero tampoco descartarse su implicación en el desarrollo de la patología a estudio; estas variantes quedan enmarcadas en la categoría de VUS. No obstante, conforme el estudio genómico avance y conozcamos más acerca de ellas, muchas de las VUS acabarán reasignándose objetivamente hacia una categoría definida de benignidad o patogenicidad. Por eso dado que el conocimiento de la genética humana está en fase de continuo descubrimiento, es preciso mantener una constante revisión de las actualizaciones de las bases de datos de genes para reducir el riesgo de errores durante el asesoramiento genético cuando nos encontramos ante una VUS [64].

Por otra parte, aunque la mayor parte de las variantes patogénicas de un individuo son transmitidas por sus progenitores, pueden aparecer **variantes de novo**. Mayoritariamente de ellas se manifiestan con patrones heterocigotos con patrón AD, dado que es muy poco probable que los dos alelos de un gen hayan sufrido una alteración espontánea durante los procesos de replicación del DNA, simulando un modo de herencia AR. Para poder definir si una mutación es

– INTRODUCCIÓN –

o no *de novo* es preciso indagar si los progenitores están afectados, o en su defecto realizar el pertinente estudio genético de cosegregación. Como norma general la presencia de una variante patogénica *de novo* en un gen asociado a enfermedad en un sujeto afecto, cuyos progenitores están asintomáticos, sugiere evidencia de patogenicidad de dicha variante asociada con el pertinente fenotipo [58]. La contribución de variantes patogénicas *de novo* a enfermedades raras se ha vuelto más clara con la implementación de la NGS aplicada al uso de paneles y de exomas familiares y seguirá siendo un punto importante de desarrollo de la genética clínica.

Por otra parte, el concepto de variante *de novo* no debe ser confundido con **variante genética nueva**, que es el hallazgo de una variante genética que no está descrita en ninguna base de datos poblacional hasta la fecha.

5. Hipoacusia

5.1. Epidemiología

Según los datos de Marzo del 2021 del *Instituto Nacional de Hipoacusia y Trastornos de la Comunicación*, la pérdida auditiva afecta a 2-3 de cada 1000 recién nacidos y a más de la mitad de la población mayor de 75 años. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2020, 66 millones de personas en todo el mundo padecían pérdida de audición incapacitante (entendiendo esto como una pérdida de audición superior a 40dB en el oído con mejor audición en los adultos y superior a 30dB en el oído con mejor audición en los niños) de las cuales 34 millones son niños; y se calcula que, en 2050, más de 900 millones de personas —es decir, una de cada 10 personas— sufrirá una pérdida de audición incapacitante. Respecto a la etiología de la hipoacusia los datos que se manejan son basadas en el colectivo más estudiado hasta la fecha: la población infantil. En este colectivo más del 60% de los casos de pérdida auditiva son atribuidos a causas genéticas, de las cuales el 70% son formas no síndrómicas; mientras que el 30% restante se asocian a síndromes clínicos [3, 4]. Para la población adulta no se disponen de datos epidemiológicos respecto a la etiología genética dado que apenas se han realizado estudios en este grupo. Además, teniendo en cuenta que tanto los patrones de herencia como las variantes encontradas pueden no ser similares entre población pediátrica y adulta, no es válido extrapolar las cifras de la hipoacusia infantil a la hipoacusia del adulto.

5.2. Clasificación

Existen varios criterios para realizar la clasificación de una hipoacusia, permitiendo definir la localización de la patología, el grado de pérdida auditiva y las frecuencias más afectadas o el periodo de comienzo.

Según el tipo de la lesión:

- Hipoacusias conductivas o de transmisión: por trastornos que afectan al oído externo o en el oído medio.
- Hipoacusias neurosensoriales o de percepción: debidas a lesiones en el oído interno o en la vía auditiva. Dentro de ellas se puede diferenciar si el problema acontece por una alteración localizada a nivel del órgano sensorial receptor (hipoacusias cocleares) o en la vía aferente que conduce la transmisión del sonido hasta los centros auditivos del sistema nervioso central (hipoacusias retrococleares).
- Hipoacusias mixtas: coexiste al mismo tiempo un componente conductivo y neurosensorial.

Según el grado de pérdida auditiva, que supone el factor más importante ya que traduce la repercusión de la hipoacusia en la vida diaria:

- Hipoacusias leves: déficit de 21 a 40 dB.
- Hipoacusias moderadas: déficit de 41 a 70 dB.
- Hipoacusias severas: déficit de 71 a 90 dB.
- Hipoacusias profundas: déficit de 91 a 119 dB.
- Cofosis: hipoacusias de 120 o más dB.

Según las frecuencias más afectadas:

- Bajas o graves: afectación predominante de frecuencias por debajo de 500 Hz.
- Medias o conversacionales: pérdida mayoritaria entre 500 y 2000 Hz.
- Altas o agudas: afectación de frecuencias por encima de 2000 Hz.

– INTRODUCCIÓN –

Según la edad de comienzo con relación al desarrollo del lenguaje (factor determinante en el pronóstico de la hipoacusia):

- Hipoacusias prelocutivas o prelinguales: el déficit se produce antes de la adquisición del lenguaje (0-2 años). En este grupo estarían incluidas las hipoacusias congénitas, presentes al nacer.
- Hipoacusias perilocutivas o perilinguales: la pérdida se manifiesta durante la adquisición del lenguaje (2-5 años).
- Hipoacusias postlocutivas o postlinguales: el déficit auditivo aparece tras la estructuración del lenguaje (a partir de los 5 años).

Pero la clasificación que más compete al desarrollo de esta tesis y por ende mayor importancia acarrea es la clasificación etiológica:

- Hipoacusias no hereditarias o adquiridas: son debidas a factores ambientales presentes en el periodo perinatal, o que acontecen posterior a él.
- Hipoacusias hereditarias o genéticas: son el resultado de la aparición de variantes genéticas en regiones de genes implicados en la percepción auditiva. A su vez se subdividen en *sindrómicas* (la pérdida auditiva se asocia a otras alteraciones clínicas) y *no sindrómicas* dónde (la hipoacusia aparece como síntoma aislado).

Acerca de la hipoacusia genética sabemos que se caracteriza por ser en su gran mayoría monogénica, es decir, la aparición de una variante genética en un gen produce por sí sola la aparición de la patología. A la hora de plantear el estudio de las hipoacusias hereditarias resulta fundamental conocer los conceptos genéticos que las caracterizan: penetrancia incompleta, expresividad variable y heterogenicidad genética alélica y no alélica. La conjunción de estas características en las hipoacusias genéticas dificulta el establecimiento de correlaciones entre una determinada variante genética (genotipo) y sus manifestaciones clínicas y audiométricas (fenotipo), y hacen del diagnóstico etiológico un reto para el especialista.

HIPÓTESIS

– HIPÓTESIS –

Del total de pacientes adultos con diagnóstico de hipoacusia hay un porcentaje en el que no se concluye una etiología específica tras haber descartado las principales causas que pudieran justificarla.

Por ello podría presuponerse que, en aquellos pacientes con patrones audiométricos de perfil neurosensorial o mixto que no se puedan justificar por la pérdida asociada a la edad u a otra patología que entre dentro del diagnóstico diferencial, presenten una alteración genético-molecular como causa subyacente a dicha pérdida auditiva.

OBJETIVOS

– OBJETIVOS –

En esta Tesis Doctoral abordaremos los siguientes objetivos específicos:

- I. Definir la utilidad del empleo de un panel de genes como estudio de elección para el diagnóstico molecular de la hipoacusia hereditaria.
- II. Conocer la epidemiología de la genética de la hipoacusia del adulto en nuestra población, identificando las principales variantes patogénicas encontradas.
- III. Establecer las características fenotípicas más determinantes para la realización de estudios genéticos en la pérdida auditiva de inició en la edad adulta.
- IV. Establecer la relevancia clínica del diagnóstico genético de la hipoacusia neurosensorial no congénita postlocutiva de etiología no filiada y de debut en la edad adulta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Marco del estudio

El trabajo realizado se basa en un estudio epidemiológico descriptivo de carácter prospectivo sobre las hipoacusias neurosensoriales no congénitas postlocutivas, de inicio en la edad adulta, diagnosticadas en las consultas externas del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) en el periodo comprendido de enero de 2018 hasta enero de 2022, sobre las que se decidió realizar un estudio genético para el diagnóstico etiológico.

Previamente al inicio y desarrollo de este estudio, su protocolo fue presentado y aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Sistema Cántabro de Salud (código interno: 2022.183).

Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión de los pacientes en el estudio serían:

- Pacientes con hipoacusia neurosensorial leve a severa no filiada en los que se hayan descartado factores ambientales.
- Pacientes con hipoacusia neurosensorial leve a severa y sospecha de etiología sindrómica.
- Debut de la hipoacusia posterior a los 16 años.

Criterios de exclusión

Los criterios determinantes de exclusión en el estudio se detallan a continuación:

- Hipoacusias unilaterales que cumplen diagnóstico de hipoacusia súbita.
- Enfermedad de Menière o síndromes menieriformes.
- Hipoacusias neurosensoriales asociadas a vértigo o inestabilidad.
- Enfermedad inmunomediada del oído interno.
- Pacientes con hipoacusia leve o moderada secundaria a traumatismo acústico agudo o crónico.
- Pacientes mayores de 60 años con pérdida leves o moderadas en frecuencias agudas, sin antecedentes familiares de sordera de aparición en etapas tempranas o medias de la vida y sin antecedentes familiares de patología sindrómica asociada a hipoacusia.

Recogida de datos

Historia clínica

En la entrevista clínica realizada a los pacientes se indagó acerca de posibles factores ambientales relevantes relacionados con hipoacusia (infecciones o eventos perinatales, situación laboral, o fármacos), así como otros datos clínicos relacionados con etiología sindrómica de la hipoacusia (patología oftalmológica, traumatológica, cardíaca, renal...). Los antecedentes familiares de hipoacusia y el grado de parentesco fueron anotados.

Se recogió información relativa a las pruebas complementarias solicitadas durante el estudio y seguimiento de la hipoacusia, fundamentalmente tomografía computerizada (TC), resonancia magnética (RM) y potenciales auditivos evocados troncoencefálicos (PEATC).

La definición de hipoacusia, así como el grado de severidad de la misma se basó en la clasificación de la *Bureau International d'Audiophonologie* (BIAP) aplicada a las audiometrías tonales realizadas, realizando la media de los umbrales obtenidos para las frecuencias de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 kHz. Se examinaron retrospectivamente todas las audiometrías que se encontraron disponibles para poder orientar la edad de inicio de la hipoacusia ya que en muchos casos el paciente no podía concretarlo con exactitud. Por otra parte, se emplearon dichas audiometrías para evaluar la evolución posterior hasta la fecha; también se tuvo en cuenta la morfología y la simetría de los patrones. La opción terapéutica elegida para el manejo de la hipoacusia fue registrada en todos los pacientes.

Estudio genético

Todos los sujetos participaron en un proceso de asesoramiento genético pre y post test. Este proceso fue realizado por un especialista otorrinolaringólogo subespecializado en genética de la hipoacusia en coordinación con un genetista clínico del centro de trabajo. De esta manera todos los pacientes recibieron información previa a la realización del estudio genético sobre el motivo de su petición y las consecuencias derivadas del mismo, información reflejada en el pertinente consentimiento informado que se firmaba antes de llevar a cabo el test genético. A posteriori, el mismo personal era el responsable de transmitir los resultados e información derivada del estudio genético al paciente, ayudándole a entender las implicaciones clínicas de los hallazgos en cuanto a pronóstico de la hipoacusia, opciones terapéuticas, o pertinencia de una valoración por otro especialista en el caso pérdida auditivas con potencial relación con

– MATERIAL Y MÉTODOS –

síndromes. De igual forma, si existía deseo reproductivo se asesoraba sobre las posibilidades de descendencia afecta y se derivaba a la consulta de genética de la reproducción.

Para el análisis genético se extrajeron 4 ml de sangre periférica en tubos de EDTA convencionales en el Laboratorio de Genética del HUMV. Las muestras eran enviadas al *Instituto de Medicina Oncológica y Molecular Asturias* (IMOMA) donde eran procesadas según el protocolo habitual [2].

Para el estudio genético se empleó el panel OTOgenics™, conformado por genes consistentemente asociados en la literatura científico-médica con HNS y/o mixta de origen genético, así como otros genes candidatos, con evidencia preliminar a favor de su asociación con HNS y/o mixta hereditarias en publicaciones científicas y bases de datos poblacionales. La primera versión clínica (v3), constaba de 154 genes consistentemente asociados a sordera hereditaria y 45 genes candidatos, y ya que el panel es objeto de revisión y optimización continua, la siguiente actualización (v4) constaba de un total de 229 genes. Estas versiones de los paneles de genes están especificadas en el **Anexo C** y **Anexo D**.

La determinación mediante NGS optimizada del panel OTOgenics™ se dirige a los codones, exones y uniones intrón-exón de genes relacionados hasta la fecha con el desarrollo de hipoacusia tanto de asociación sindrómica como no sindrómica, e independientemente de su patrón de herencia.

El aislamiento de DNA genómico se realizó mediante el procesador Genomic DNA ScreenTape en un sistema TapeStation 4200 (Agilent Technologies, CA), mientras que la preparación de la biblioteca génica se realizó en ADN genómico fragmentado físicamente por ultrasonidos Covaris S2 (Covaris, MA). A continuación, el enriquecimiento en secuencias codificantes y otras regiones de interés de los genes evaluados se llevó a cabo por captura híbrida mediante el procesador *SureSelect^{XT}*, Agilent según protocolo y la secuenciación de los fragmentos de DNA se realizó en un secuenciador *NextSeq500* (Illumina, CA, EE. UU.) siguiendo las especificaciones del fabricante. Finalmente, los resultados de NGS se procesaron utilizando el software bioinformático HD Genome One (DREAMgenics, Oviedo, España) certificado mediante marcado CE-IVD y basado en algoritmos científicamente validados. El flujo de trabajo para el análisis bioinformático, que incluye la generación de lecturas FASTQ, la alineación, la eliminación de duplicados, la identificación de variantes, el filtrado y la anotación, ha sido descrito previamente por Cabanillas y Cadiñanos [4]. Brevemente, las lecturas FASTQ se

– MATERIAL Y MÉTODOS –

generaron utilizando el software de conversión bcl2fastq2 v2.19. Los archivos FASTQ sin procesar se sometieron a un control de calidad con FastQC y se eliminaron las bases de baja calidad, los adaptadores y otras secuencias técnicas con Trimmomatic. Cada archivo FASTQ se alineó con el genoma humano de referencia GRCh38/hg38 con BWAmem, y se utilizó SAMtools para generar archivos BAM. Los duplicados ópticos y de reacción en cadena de la polimerasa se eliminaron con Picard. Las SNVs y los indels se identificaron utilizando una variación del algoritmo de Sidrón, descrito previamente [65]. La detección de CNVs se realizó con una versión adaptada del algoritmo exome2cnv, que incorpora una combinación de cálculos de profundidad de lectura y desequilibrio alélico para la evaluación del número de copias [66].

Las variantes se anotaron utilizando varias bases de datos que contenían información funcional (Ensembl, CCDS, RefSeq, Pfam), poblacional (dbSNP, 1000 Genomes, ESP6500, ExAC) y relacionada con la enfermedad (Clinvar, HGMD professional), y se clasificaron en cinco grupos siguiendo las directrices específicas para la hipoacusia genética del ACMG/AMP en su actualización más reciente [60]. Para el criterio PP3/BP4 se siguieron las recientes recomendaciones del Grupo de Trabajo de Interpretación de Variantes de Secuencia de ClinGen: "*Evidence-based calibration of computational tools for missense variant pathogenicity classification and ClinGen recommendations for clinical use of PP3/BP4 criteria*" disponible en <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.03.17.484479v>.

Con relación a cada variante se identificó el gen implicado, la proteína alterada, el patrón de herencia característico y el fenotipo audiológico asociado al gen.

Base de datos y análisis estadístico

La base de datos de los pacientes incluidos en el estudio se conformó en formato Excel asegurando la confidencialidad de los datos registrados mediante un algoritmo de anonimización. El análisis estadístico de los parámetros se realizó mediante el programa SPSS versión 15.0. Se consideraron resultados estadísticamente significativos aquellos con un valor menor de 0,05.

RESULTADOS

– RESULTADOS –

Se incluyeron en el estudio 65 pacientes mayores de 16 años, 45 (69%) mujeres y 20 hombres (31%), con una edad media de 52 años. La edad media de debut de la hipoacusia fue de 41 años (rango de 16 a 68 años). El 63% de los pacientes de la cohorte tenía antecedentes familiares de hipoacusia de aparición tardía (40% familiares de primer grado, 20% familiares de segundo grado y 3% familiares de primer y segundo grado). Todos los pacientes tenían una HNS de aparición tardía (a partir de los 16 años) bilateral y prácticamente simétrica en ambos oídos, leve en el 21% (14/65), moderada en el 57% (37/65), severa en el 18% (12/65) y profunda en 4% (2/65).

Se obtuvieron un total de 15 resultados genéticos positivos, de los cuales el 60% (9/15) presentaban una HNS moderada, 20% (3/15) leve, 13% (2/15) severa y 7% (1/15) profunda. El estudio genético fue negativo en el 66% (43/65) de los pacientes y en un 11% (7/65) se obtuvo un resultado no concluyente por la presencia de VUS. El rendimiento diagnóstico global del panel OTOgenics™ en la cohorte ha sido del 23% (15/65), porcentaje que podría incrementarse en el futuro cuando se resuelva la incógnita actual que plantean las VUS descubiertas. Explorando el rendimiento en función de otros factores como la edad de inicio de la hipoacusia, el grado de pérdida auditiva o la presencia de antecedentes familiares previos, los porcentajes difieren del rendimiento diagnóstico global. Por ejemplo, analizando el porcentaje de pacientes con diagnóstico genético positivo y antecedentes familiares previos encontramos al 60% de los pacientes (9/15). Si evaluamos el rendimiento diagnóstico en función de la edad debut se identifica un mayor rendimiento en el rango de edad comprendido entre los 20 y los 50 años, donde se encuentran el 73% de los diagnósticos genéticos positivos (11/15). Respecto al rendimiento del estudio en función del grado de hipoacusia podemos decir que los grados moderado-severo de HNS son los que cuentan con mayor tasa de diagnóstico (66%) frente a los grados leve y profundo (34 %). Por ello podríamos determinar que el subgrupo con mayor rendimiento en el estudio genético fueron los pacientes con edades comprendidas entre los 20 y los 50 años, con HNS moderada-severa y que además referían AF de hipoacusia.

Dentro de los resultados genéticos concluyentes, tres pacientes fueron diagnosticados de una hipoacusia sindrómica, teniendo en cuenta que, solo para uno de ellos existía presunción del síndrome previa a la solicitud del estudio debido a la presencia de múltiples antecedentes médicos ya constatados, y siendo los otros dos por tanto síndromes ocultos hasta el resultado genético. Respecto a los datos relativos a las VUS cabe decir que el 85% (6/7) presentaban antecedentes familiares de hipoacusia.

Variantes genéticas patogénicas y probablemente patogénicas identificadas (P/PP)

Como ya hemos mencionado se identificaron 15 variantes P/PP repartidas en *TECTA* (4), *KCNQ4* (3), *GJB2* (2), *ACTG1* (1), *COL2A1* (1), *COCH* (1), *COCH + COL2A1* (1), *STRC* (1), y *ABHD12* (1), que justificaban el fenotipo audiológico los pacientes. Las variables clínicas de estos pacientes, así como las características relativas a su fenotipo y genotipo se detallan en la . Los patrones audiométricos relativos a las variantes P/PP encontradas se muestran en el **Anexo E**.

El gen causal más frecuente en nuestra población fue *TECTA* (4 pacientes), que puede estar asociado a HNS no síndrómica (DFNA8/12) con patrón AD y con menor frecuencia a HNS no síndrómica (DFNB21) con patrón AR; pero que en ambos casos presenta habitualmente penetrancia incompleta y expresividad variable. Los cuatro pacientes con alteración del gen *TECTA* tenían la misma variante en heterocigosis (c.3107G>A), considerada P, y todos presentaban AF de hipoacusia.

KCNQ4 fue el segundo gen en frecuencia encontrado en 3 pacientes, dos de ellos con variantes PP y el otro P. Las variantes en este gen se han asociado en la literatura médico-científica con HNS no síndrómica (DFNA2A) con modo de herencia AD, como ha sido el caso en nuestro estudio. También en los 3 pacientes se habían recogido datos de hipoacusia familiar precoz.

GJB2 fue el tercer gen en frecuencia en nuestra muestra. Un paciente era homocigoto para una variante (c.109G>A) y el otro heterocigoto compuesto para dos variantes recesivas (c.35delG y c.617A>G). Las variantes patogénicas en *GJB2* se han asociado mayormente a HNS no síndrómica (DFNB1) con patrón AR, convirtiéndose desde hace décadas en el gen más prevalente causante de hipoacusia infantil prelocutiva en países occidentales. Si bien, este gen también puede estar asociado a HNS no síndrómica (DFNA3A) con patrón AD y a fenotipos síndrómicos como la queratosis palmo-plantar con sordera, el síndrome de queratosis-ictiosis-sordera, el síndrome de Bart-Pumphrey o el síndrome de Vohwinkel [29, 67, 68]. En el caso de nuestros pacientes, el genotipo detectado justificaba el fenotipo audiológico DFNB1, no existiendo dudas pre ni post test sobre asociación síndrómica de las variantes. Aunque de entrada la identificación de este gen en una hipoacusia tardía pueda resultar una sorpresa genómica, cada vez hay más evidencia de que ciertas variantes en este gen pueden asociarse a HNS leve-moderada con penetrancia incompleta, como es el caso de la variante P (c.109G>A) detectada en homocigosis

– RESULTADOS –

en uno de los pacientes del estudio. Esto plantea un cambio de mentalidad, ya que no sería apropiado excluir este gen en el diagnóstico de hipoacusia genética del adulto.

COCH se presentó como PP en un paciente en heterocigosis simple. Se sabe que *COCH* es responsable de HNS no sindrómica (DFNA9) con patrón AD y de manifestación tardía y eventualmente asocia síntomas vestibulares. De forma menos frecuente *COCH* también puede ser responsable de hipoacusia con patrón AR. Tras obtener el diagnóstico genético de *COCH* en nuestro paciente y a pesar de que éste se encontraba asintomático desde el punto de vista del sistema vestibular, se propuso verificar si existía algún grado de disfunción vestibular asociada. Así es que, tras realizar una videonistagmografía y pruebas calóricas se concluyó que el paciente presentaba además de la HNS una arreflexia vestibular bilateral, que bien podía estar justificada por la variante diagnosticada.

STRC se encontró en un paciente en heterocigosis compuesta. Este gen se asocia a HNS no sindrómica (DFNB16) con modo de herencia AR. Al igual que sucede con *GJB2*, es típico de la hipoacusia prelocutiva infantil, generando frecuentemente grados severos de sordera de inicio muy precoz, por lo que su hallazgo como causa de una hipoacusia tardía en el adulto merece ser tenido en cuenta, ya que este pseudogen podría quedar excluido si realizamos test genéticos como el WES (que no detecta áreas no codificantes) o si no lo incluimos dentro del catálogo de genes de un panel.

Como ya habíamos explicado en la introducción de este proyecto, existen variantes genéticas de hipoacusia asociadas a fenotipos sindrómicos. En nuestra muestra el 20% de los diagnósticos genéticos (3/15) está asociado a un síndrome. Los diagnósticos fueron por un lado dos síndromes de Stickler (*COL2A1*) y un síndrome PHARC (*ABHD12*). En 2 de los casos no existía sospecha sindrómica previa al test, es decir, eran síndromes ocultos que a raíz del resultado del estudio fueron confirmados como tal.

Las variantes P/PP en *COL2A1* están relacionadas con HNS con patrón AD en el contexto del síndrome de Stickler tipo I. En uno de los sujetos con síndrome de Stickler, los resultados genéticos mostraron la presencia de dos variantes P/PP concurrentes (*COCH* y *COL2A1*). Los individuos con variantes P/PP en *COL2A1* casi siempre presentan problemas oculares como miopía elevada, degeneración vitreoretiniana, desprendimiento de retina o cataratas. Otras variantes en el gen *COL2A1* pueden conllevar el desarrollo de diversos grados de colagenopatías, incluyendo desde displasias óseas con afectación auditiva hasta anomalías orofaciales severas.

– RESULTADOS –

Una de las pacientes de nuestro estudio afectada por esta variante no presentaba a priori antecedentes personales relacionados con el síndrome, sin embargo, tras una reevaluación dirigida se le detectaron cataratas oculares bilaterales incipientes y artrosis precoz, que, en adición a la HNS permitieron esclarecer el fenotipo sindrómico de Stickler tipo I (#MIM 108300).

En contraste con lo anterior, la segunda paciente a la que se le diagnosticó el síndrome de Stickler tipo I ya reunía un largo historial médico de afecciones articulares y oftálmicas que fueron recogidas en la evaluación previa al test y que hicieron sopesar la posibilidad de un fenotipo sindrómico de la HNS. Era portadora de prótesis de cadera bilaterales a la edad de 46 años debido a una artrosis temprana y había sufrido un desprendimiento de retina bilateral a los 40 años. Tras 15 años de peregrinaje médico fue diagnosticada del síndrome al identificar la variante PP en *COL2A1* en el estudio genético [69].

El tercero de los diagnósticos sindrómicos se relacionó con el gen *ABDH12*, presentándose además como un síndrome oculto. Las variantes P/PP en *ABDH12* están relacionadas con la HNS de herencia AR dentro del síndrome PHARC (#MIM 613599) que implica polineuropatía, hipoacusia, ataxia, retinosis pigmentaria y cataratas. Este síndrome se diagnosticó en una mujer de 56 años que previo al estudio genético padecía de retinosis pigmentaria (agudeza visual de 0,2). Su estudio genético reveló una variante PP en homocigosis en *ABHD12*, tras lo cual fue remitida al Servicio de Neurología donde la evaluación dirigida identificó una ataxia cerebelosa leve y una polineuropatía congruentes con el fenotipo sindrómico.

ACTG1 fue otro de los genes detectados en la cohorte. Las variantes P/PP en este gen están asociadas a HNS no sindrómica (DFNA 20/26) y también al síndrome de Baraitser-Winter tipo II (caracterizado por malformaciones craneofaciales y anomalías cardíacas y renales) ambos con modo de herencia AD. El paciente portador de esta variante no presentaba en el momento del diagnóstico criterios para establecer una asociación sindrómica.

El patrón de herencia AD en la hipoacusia del adulto no resultó ninguna sorpresa, ya que generalmente este patrón de herencia se caracteriza por debuts tardío y leve, siendo los recesivos más precoces y severos. Así la mayoría de los diagnósticos genéticos de nuestra muestra cumplieron esta premisa, siendo el 73% (11/15) AD y el 27% (4/15) AR, que correspondían a variantes homocigóticas o heterocigóticas compuestas en *ABHD12*, *GJB2* y *STRC*. En los pacientes con patrón AD se encontraron antecedentes familiares de hipoacusia en el 80% (9/11) de los pacientes, algo esperable ya que la transmisión genética en estos casos es

– RESULTADOS –

del 50%. Sin embargo, en el 20% restante (2/11) con genes en heterocigosis no tenían antecedentes familiares de hipoacusia. Esto plantea la posibilidad de que su sordera haya sido causada por variantes *de novo*, es decir, mutaciones espontáneas en su genoma que no han tenido transmisión desde sus progenitores. Desgraciadamente esta cuestión no pudo esclarecerse debido a que no existían familiares cercanos vivos sobre los que estudiar la segregación de la variante. Por último, ninguno de los pacientes con un patrón AR tenía antecedentes familiares de HNS, algo que de igual manera resulta congruente ya que estas variantes en heterocigosis no conllevan el desarrollo de enfermedad en los progenitores, que se comportan exclusivamente como portadores.

Tabla 2. Datos clínicos de los pacientes con variantes patogénica

Caso	Edad debut	Género	AF hipoacusia	AP	Hipoacusia	Manejo	Gen	Variante ADN	Coordenadas genómicas (GRCh38)	MAF gnomAD (Población)	Reglas ACMG	ACMG	Fenotipo audiológico	Reportada previamente
1	58	V	Padre	AR Enfermedad cardiaca	HNS bilateral moderada	PA	TECTA	Heterocigosis c.3107G>A	11: 121137586	0.00006547 (América Latina)	PP1_Strong, PP3_Strong, BP5	P	DFNA8/12	Si [70, 71]
2	30	M	No	No	HNS bilateral moderada	PA	ACTG1	Heterocigosis c.94C>A	17:81512261	Ausente	PP3_Strong, PM5, PM2_Supporting	PP	DFNA20/26	No
3	19	M	Madre	No	HNS bilateral severa	PA	KCNQ4	Heterocigosis c.777_778del insCC	1:40819415	Ausente	PM5, PP3_Moderate, PS4_Supporting, PM2_Supporting, PP1	PP	DFNA2A	No
4	37	M	Abuela paterna	No	HNS bilateral moderada	PA	TECTA	Heterocigosis c.3107G>A	11: 121137586	0.00006547 (América Latina)	PP1_Strong, PP3_Strong, BP5	P	DFNA8/12	Si [70, 71]
5	41	M	No	No	HNS bilateral moderada	PA	GJB2 Heterocigosis compuesta	c.35delG	13:20189547	0.009802 (Europea)	PVS1, PM3_VeryStrong, PS4, PP1_Strong	P	DFNB1A	Si [72-74]
								c.617A>G	13:20188965	0.0009159 (América Latina)	PM3_VeryStrong, PS3_Moderate, PM5, PP3_Moderate, PM2_Supporting			P
6	37	M	Abuela materna		HNS bilateral leve	Control	TECTA	Heterocigosis c.3107G>A	11: 121137586	0.00006547 (América Latina)	PP1_Strong, PP3_Strong, BP5	P	DFNA8/12	Si [70, 71]
7	56	M	No	Osteoartritis precoz DR	HNS bilateral moderada	PA	COL2A1	Heterocigosis c.816+1G>A	12: 47992877	Ausente	PVS1, PM2_Supporting	PP	Síndrome Stickler tipo I	Si [78]
8	22	M	Hermano	No	HNS bilateral leve	Control	KCNQ4	Heterocigosis c.777_778del insCC	1:40819415	Ausente	PM5, PP3_Moderate, PS4_Supporting, PM2_Supporting, PP1	PP	DFNA2A	No
9	26	M	No	Pie zambo	HNS bilateral moderada	Rechaza PA	GJB2	Homocigosis c.109G>A	13: 20189473	0.07049 (Este Asia)	PM3_Very Strong, PS3, PP1_Strong, PP3	P	DFNB1A	Si [70, 79, 80]
10	23	M	Hermana	Cataratas y retinosis pigmentaria	HNS bilateral profunda	IC	ABHD12	Homocigosis c.846_852dup	20:25307980	Ausente	PVS1, PM2_Supporting, PP1	PP	Síndrome PHARC	Si [81]
11	23	M	Abuela paterna	No	HNS bilateral leve	Control	TECTA	Heterocigosis c.3107G>A	11: 121137586	0.00006547 (América Latina)	PP1_Strong, PP3_Strong, BP5	P	DFNA8/12	Si [70, 71]
12	42	M	Abuela paterna	Catarata precoz bilateral	HNS bilateral moderada	Rechaza PA	COCH	Heterocigosis c.236C>G	14:30878834	Ausente	PM5, PP3_Moderate, PS4_Supporting, PM2_Supporting	PP	Síndrome Stickler tipo I	No
							COL2A1	Heterocigosis c.1833+1G>A	12:47984994	Ausente	PVS1, PM2_Supporting, PP1			P

V: varón; M: mujer; AF: antecedentes familiares; AP: antecedentes personales; AR: artritis reumatoide; DR: desprendimiento retina; HNS: hipoacusia neurosensorial; PA: prótesis auditiva; IC: implante coclear; MAF: frecuencia alélica máxima

Caso	Edad debut	Género	AF hipoacusia	AP	Hipoacusia	Manejo	Gen	Variante ADN	Coordenadas genómicas (GRCh38)	MAF gnomAD (Población)	Reglas ACMG	ACMG	Fenotipo audiológico	Reportada previamente
13	68	V	No	Arreflexia vestibular	HNS bilateral profunda	PA + IC	COCH	Heterocigosis c.263G>C	14:30878834	Ausente	PM5, PP3_Moderate, PS4_Supporting, PM2_Supporting	PP	DFNA9	No
14	39	V	Abuela materna	No	HNS bilateral moderada	PA	STRC Heterocigosis compuesta	c.4917_4918 delinsCT	15:43600609	0.003622 (Sur Asia)	PM3_VeryStrong, PM2_Supporting	PP	DFNB16	Si [85-87]
								Delección completa gen	NC_000015.10: g(?_43599563)_ (43618800?)del	Ausente	PVS1, PM3_VeryStrong, PP1_Supporting	P		Yes [85, 88]
15	50	M	Varios de 1º y 2º grado	No	HNS bilateral moderada	PA	KCNQ4	Heterocigosis	1:40818598	Ausente	PP3_Strong, PS4_Supporting, PM2_Supporting, PP1	PP	DFNA2A	No

V: varón; M: mujer; AF: antecedentes familiares; AP: antecedentes personales; AR: artritis reumatoide; DR: desprendimiento retina; HNS: hipoacusia neurosensorial; PA: prótesis auditiva; IC: implante coclear; MAF: frecuencia alélica máxima

Variantes de significado incierto (VUS)

En el 11% (7/65) de los pacientes sometidos al estudio genético mediante panel de genes se detectaron VUS heterocigotas únicas en los siguientes genes: *GSDME* (2), *COL11A1* (1), *DNMT1* (1), *SOX10* (1), *EYA4* (1) y *TECTA* (1).

De estos pacientes el 72% (5/7) presentaban AF de hipoacusia y el 28% (2/7) no. Respecto al grado de HNS el 28% (2/7) presentaban grado leve, 44% (3/7) moderada y 28% (2/7) severa. Las características clínicas, audiológicas y genéticas de estos pacientes vienen recogidas en la .

Los genotipos de HNS con patrones AD se asocian generalmente con variantes P/PP en la mayoría de los genes. No obstante, existen otros genes para los que la evidencia científica no tiene datos suficientes que establezcan su relevancia clínica en el desarrollo de la hipoacusia, por ello no reúnen los criterios específicos para ser consideradas variantes P/PP.

En ocasiones es posible esclarecer la patogenicidad de las variantes valorando su segregación en otros miembros de la familia o definiendo si son variantes *de novo* (ausentes en los progenitores). Respecto a ambos supuestos sucede que, es preciso contar con al menos 4 familiares para el estudio de segregación y de ambos progenitores vivos para el estudio de variante *de novo*; tratándose de pacientes adultos esto puede resultar arduo y en ocasiones imposible debido a la ausencia de progenitores vivos o insuficiente número de familiares cercanos.

Por ello es vital establecer un estrecho seguimiento sobre futuras actualizaciones en las bases de datos acerca de estas VUS, de tal forma que en un tiempo puedan cambiar de categoría hacia patogenicidad o benignidad. Este punto es fundamental para no perder el veredicto diagnóstico final, incrementando el rendimiento diagnóstico del panel de genes y por supuesto otorgando información relevante para estos pacientes y su descendencia [64, 89].

Pasando a mencionar específicamente cada VUS, vamos a comenzar con el gen *GSDME*, que ha sido detectado en dos pacientes del estudio. Las variantes P/PP identificadas en este gen se asocian a HNS no sindrómica (DFNA5) con modo de herencia AD; pero solo aquellas que provocan la ausencia del exón 8 en el transcrito maduro son consideradas hasta la fecha variantes P/PP por ClinVar y OMIM. Las variantes truncantes identificadas en el gen que no conllevan la pérdida del exón 8, como las identificadas en nuestros pacientes, no cosegregan con

– RESULTADOS –

el fenotipo de hipoacusia en las familias en las que se encontraron y/o pueden estar presentes en individuos normoyentes.

DTNM1 fue identificado en un paciente de la muestra en heterocigosis, pero la variante está ausente en bases de datos poblacionales. Sin embargo, si esta variante fuese *de novo* (ausente en los progenitores) y el fenotipo del paciente fue compatible con los síndromes asociados a este gen (ataxia-sordera-narcolepsia o neuropatía hereditaria sensorial IE), pasaría a considerarse PP según a los criterios ACMG/AMP;

COL11A1 fue otra de las VUS encontrada en un paciente. Las variantes patogénicas identificadas en este gen se han relacionado con el síndrome de Stickler tipo II y el síndrome de Marshall, con modo de herencia AD. Si el fenotipo del probando fuese compatible con alguno de estos síndromes, y la variante fuese *de novo*, su clasificación clínica pasaría a PP.

Con las VUS identificadas en *SOX10*, *EYA4* sucede el mismo patrón; solo en el caso de que se tratara de variantes *de novo*, ascenderían a la categoría de patogenicidad pudiendo justificar el fenotipo audiológico de los pacientes. En el caso de *TECTA*, también habría servido además la cosegregación de la enfermedad por la misma variante en 4 miembros más de la familia.

Como ya apuntábamos anteriormente en el desarrollo de esta tesis, el estudio de población adulta entraña una serie de limitaciones respecto a la resolución de veredictos genéticos inconclusos, en los que sería preciso contar con el estudio de los progenitores para determinar la presencia/ausencia de la variante o un mínimo de miembros familiares directos sobre los que poder estudiar la cosegregación de la misma.

Tabla 3: Datos clínicos de los pacientes con variantes de significado incierto

Caso	Edad debut	Género	AF	AP	Grado Hipoacusia	Manejo	Gen	Variante ADN	Coordenadas genómicas (GRCh38)	MAF gnomAD (Población)	ACMG	Fenotipo audiológico	Reportado previamente
1	23	V	2	No	HNS bilateral moderada	PA	<i>GSDME</i>	Heterocigosis c.1227delA	7:24702789	Ausente	PM2_Supporting	DFNA5	No
2	54	M	4	Inestabilidad idiopática crónica	HNS bilateral moderada	Control	<i>GSDME</i>	Heterocigosis c.361dupC	7:24744604	Ausente	PM2_Supporting	DFNA5	No
3	52	V	1	No	HNS bilateral leve	Control	<i>DNMT1</i>	Heterocigosis c.885C>A	19:10166604	Ausente	PM2_Supporting, BP4	Síndrome Waardenburg 2E y 4C Síndrome PCWH	No
4	29	V	0	No	HNS bilateral moderada	PA	<i>SOX10</i>	Heterocigosis c.782G>A	22:37974114	0.0001309 (Latino América)	PM2_Supporting	Ataxia cerebelosa + sordera narcolepsia + NP sensorial hereditaria	No
5	49	M	0	VPPB	HNS bilateral leve	Control	<i>EYA4</i>	Heterocigosis c.1099G>A	6:133481591	Ausente	PM2_Supporting	DFNA10 HNS sindrómica con miocardiopatía dilatada	No
6	17	M	4	No	HNS bilateral moderada	PA	<i>TECTA</i>	Heterocigosis c.5383+6T>A	11:121165389	Ausente	PM2_Supporting, PP3	DFNA8 DFNA12 DFNA21	No
7	19	V	Hija	No	HNS bilateral severa	PA	<i>COL11A1</i>	Heterocigosis c.4474G>T	1:102888910	Ausente	PP3_Strong, PM2_Supporting	Síndrome Stickler tipo II	No

V: varón; M: mujer; AF: antecedentes familiares; AP: antecedentes personales; VPPB: vértigo posicional paroxístico benigno; HNS: hipoacusia neurosensorial; PA: prótesis auditiva; IC: implante coclear; MAF: frecuencia alélica máxima; NP: neuropatía

DISCUSIÓN



– DISCUSIÓN –

La pérdida auditiva es uno de los trastornos neurosensoriales hereditarios conocidos más heterogéneos genéticamente. El elevado número de genes involucrados en esta patología, así como su heterogeneidad genética, suponen un desafío para la identificación de alteraciones genómicas que concluyan en su diagnóstico molecular [52]. En los últimos años, los estudios genéticos convencionales, consistentes habitualmente en el análisis de un único gen, están siendo reemplazados por la evaluación simultánea de cientos de genes implicados en la fisiopatología de las enfermedades. Mediante esta aproximación, basada en NGS, la obtención de información molecular es más rápida y costo-efectiva que el análisis por separado de cada uno de los genes diana, permitiendo obtener rendimientos diagnósticos muy superiores a los alcanzables mediante las metodologías convencionales.

En consecuencia, el conocimiento sobre la etiología de la hipoacusia con base genética ha sido testigo en los últimos años de un crecimiento exponencial y debido a ello tanto la actualización de las recomendaciones de la CODEPEH para el “Screening de hipoacusia en el recién nacido” como la última actualización de la “Guía específica para la Evaluación Clínica y el Diagnóstico Etiológico de la Hipoacusia” emitida por la ACMG, incluyen en el algoritmo diagnóstico la realización de estudios genéticos mediante técnicas de NGS [1, 90].

La hipoacusia genética del adulto es un campo poco explorado hasta la fecha, por lo que el conocimiento sobre la prevalencia de los genes implicados en su desarrollo es limitado. Además, a diferencia de la hipoacusia infantil donde existen protocolos diagnósticos específicos, la hipoacusia del adulto carece de un abordaje diagnóstico sistemático. La realidad actual es que, en la pérdida auditiva del adulto tras el descarte de los principales factores causales, no se realizan estudios dirigidos a la determinación de variantes patogénicas subyacentes y por ello muchos de los diagnósticos quedan inconclusos designándose como idiopáticos cuando probablemente no lo sean.

Dado que la medicina del siglo XXI aboga por una “medicina de precisión”, basada en la integración de los aspectos genéticos y ambientales de las enfermedades para individualizar su prevención, el pronóstico y tratamiento, es fundamental lograr el diagnóstico etiológico de una hipoacusia, y para ello es necesario incluir los estudios genéticos como prueba complementaria en la práctica clínica. Sabemos con amplia experiencia, derivada del estudio genético de la hipoacusia infantil desde hace décadas, que la identificación de variantes genéticas subyacentes tiene consecuencias clínicas relevantes para el manejo de una gran proporción de los pacientes. Está ampliamente reconocido como esos diagnósticos sirven para establecer el pronóstico de la

– DISCUSIÓN –

hipoacusia en cuanto a severidad y progresión, permiten guiar las opciones terapéuticas más adecuadas en función de si la variante ocasiona o no alteraciones en la conducción nerviosa y determinar potenciales asociaciones con otras alteraciones sistémicas en el contexto de síndromes [3, 4]. Sin embargo, la población infantil y adulta son dos colectivos completamente distintos en lo que a hipoacusia genética se refiere. Como hemos visto en nuestros resultados, el patrón de herencia en la hipoacusia del adulto es predominantemente AD, frente a la hipoacusia infantil donde predominan patrones AR. Esto era algo fácil de predecir, ya que, por norma general las enfermedades monogénicas dominantes se manifiestan de forma más tardía y leve, mientras que las recesivas suelen presentarse de manera más precoz y severa. No obstante, el porcentaje de descendencia afecta para el patrón AD es del 50% y frente al 25% del patrón AR, por lo que aquellos diagnósticos de hipoacusia de aparición tardía repercuten en mayor medida en la descendencia, asociando mayor número de familiares afectados que en el caso de la hipoacusia de desarrollo en la infancia.

La proporción de HNS sindrómica en nuestra cohorte fue del 20% (3/15), un porcentaje ligeramente inferior al de la hipoacusia genética infantil, que se sitúa entre el 30% y el 60% según las series [1-3]. Como ya hemos detallado, la sordera es una manifestación presente hasta en 400 síndromes diferentes, algunos de ellos muy poco frecuentes y en los que la gravedad de la hipoacusia varía. La extrema heterogeneidad genética y la expresividad variable de estos fenotipos sindrómicos representan grandes desafíos para su evaluación clínica, lo cual dificulta la identificación de un síndrome sin un estudio genético que lo soporte. Además, la aparición tardía de la sintomatología asociada al síndrome suele estar relacionada con patrones AD, más frecuentes en adultos, mientras que en niños el desarrollo de síntomas sindrómicos suele ser más precoz y severo. Por ello es fundamental incluir en los estudios genéticos de la población adulta genes sindrómicos que permitan revelar "síndromes ocultos", es decir, síndromes que no habían sido diagnosticados clínicamente antes de la realización del estudio genético. En nuestra muestra fueron 3 los diagnósticos sindrómicos, 2 de ellos detectados tras la realización del test genético (síndrome de Stickler y síndrome PHARC); en el tercero había una sospecha de potencial asociación sindrómica previa a la prueba por la alta documentación de antecedentes personales que reunía la paciente, sin embargo, el diagnóstico solo se concluyó tras el resultado genético, tratándose de un Stickler tipo I.

Esto pone de manifiesto como la penetrancia incompleta puede distorsionar o anular la sospecha diagnóstica pretest. Desde el punto de vista clínico es posible presumir algunas

– DISCUSIÓN –

relaciones genotipo-fenotipo sobre todo en el caso de hipoacusias sindrómicas; poniendo de ejemplo el gen *COL2A1* asociado al síndrome de Stickler, este se presenta habitualmente con malformaciones craneofaciales, articulares y oftalmológicas. No obstante, algunos pacientes portadores de variantes P/PP en este gen, como han sido nuestros dos pacientes del estudio, pueden presentar fenotipos incompletos del síndrome, por ejemplo, ausencia de alteraciones en el esqueleto óseo facial o un desarrollo tardío de las alteraciones articulares y oftálmicas. Este hecho nos lleva al concepto de la expansión fenotípica, ya que a raíz de la aplicación de la NGS en los estudios genéticos, se ha descubierto que, síndromes específicos causados por una variante en un gen conocido y con sus características fenotípicas bien definidas, podían manifestarse con la presencia de nuevos signos o síntomas no identificados hasta entonces, e incluso diagnosticarse en ausencia de algunas que se consideraban estrictamente necesarias. Así es como la aplicación de paneles agnósticos contribuye a la ampliación del espectro fenotípico de muchas enfermedades genéticas [91-93].

Otro punto a resaltar es que el diagnóstico de hipoacusia genética en el adulto entraña mayor dificultad, ya que se ven involucrados factores ambientales confusores y enfermedades otoneurológicas que pueden despistar nuestra sospecha genética, aunque hemos de ser conscientes de que la presencia de un posible factor ambiental no excluye una potencial causa genética subyacente [2, 4]. En consonancia, la ausencia de protocolización sobre la solicitud de estudios genéticos en el adulto determina que, sólo a un porcentaje muy reducido de pacientes se les realicen pruebas genéticas, por lo que con muestras poblacionales tan pequeñas se limita enormemente el conocimiento de la prevalencia de la hipoacusia hereditaria en este grupo, así como de las principales variantes implicadas. Adicionalmente, la ausencia de progenitores o familiares cercanos y la incapacidad de reclasificación de las VUS por este motivo (imposibilidad de confirmar o descartar si los progenitores eran portadores de las variantes), dificulta la conclusión de los resultados genéticos en una proporción no desdeñable (11% en nuestra serie). Estos factores condicionan la diferencia del rendimiento diagnóstico de los estudios genéticos del adulto con respecto a los pediátricos.

Como ya hemos apuntado, la interpretación clínica de los hallazgos genómicos es un componente crítico para un diagnóstico genético preciso y las discrepancias en la interpretación y clasificación de variantes pueden tener serias implicaciones para la atención al paciente. Los resultados obtenidos en la cohorte de hipoacusia hereditaria, incluida en la presente Tesis

– DISCUSIÓN –

Doctoral, fueron interpretados manualmente en base a las directrices ACMG/AMP publicadas en 2015, que son instrucciones generales aplicables a cualquier patología hereditaria mendeliana y a las “Especificaciones de las directrices ACMG/AMP para la interpretación de variantes genéticas asociadas a hipoacusia”, elaboradas por el Panel de Expertos en Hipoacusia Hereditaria de ClinGen en 2018.

En base a esto, en nuestro estudio se han identificado variantes genéticas consideradas responsables de hipoacusia en 8 genes diferentes que explicaban el fenotipo de 15 pacientes. Estos resultados han contribuido a definir el espectro de alteraciones genéticas responsables de la hipoacusia en la población española en un área concreta del territorio nacional, resaltando la heterogeneidad genética característica de la pérdida auditiva neurosensorial del paciente adulto, pero es importante tener en cuenta que cada región puede presentar prevalencias genéticas diferentes. Este punto merece una breve mención, apoyándonos en datos recogidos paralelamente en otra base genética de hipoacusia de una Comunidad Autónoma (Asturias) adyacente a la de nuestro estudio (Cantabria), que también emplea el mismo panel de genes que en el presente estudio para la hipoacusia de debut en adultos, pero cuyos resultados aún no han sido publicados. En su cohorte es posible evidenciar como por ejemplo la presencia del gen *TECTA* o *KCNQ4* (los dos genes más prevalentes en nuestra serie) no es notoria, y sin embargo, genes como *MT-TL1* o *MYO7A*, que no han sido identificados en nuestra muestra, tienen un peso relevante en esta cohorte de área geográfica muy cercana.

Existen pocas publicaciones en la literatura para poder comparar nuestros resultados con respecto a la epidemiología genética en la hipoacusia del adulto en otros países o regiones. Un reciente estudio realizado en 2022 por Uehara et al. [94] analizó a 48 pacientes japoneses con HNS bilateral de aparición tardía e identificó las posibles causas genéticas de hipoacusia en 29 casos (60,4%), siendo las mutaciones mitocondriales las variantes más frecuentes (7 de 48). Las diferencias en cuanto a la mayor tasa de diagnóstico y las variantes genéticas prevalentes entre nuestras cohortes podrían explicarse porque la mayor parte de los casos del estudio de Uehara contaban con múltiples familiares afectados incluidos, y sobre todo con antecedentes familiares maternos que son clave en la sospecha de trastornos genéticos mitocondriales.

Como se pone de manifiesto con lo expuesto en el párrafo anterior, una evaluación clínica detallada previa, optimizando la selección de los pacientes candidatos al estudio, es clave para aumentar el rendimiento diagnóstico del test genético. En la entrevista clínica se deben registrar

– DISCUSIÓN –

los antecedentes familiares y los personales del paciente haciendo hincapié en las afecciones oftalmológicas, articulares o renales y también los síntomas otológicos o neurotológicos asociados a la hipoacusia. Aunque no es la norma, genes como *COCH* pueden estar asociados a la conjunción de hipoacusia y síndrome vestibular periférico [95], lo cual puede actuar como factor confusor sobre la decisión de llevar a cabo un estudio genético en aquellos pacientes donde la presencia de HNS y vértigo nos inclinaría hacia el diagnóstico de otras patologías de oído interno no genéticas. No obstante, una anamnesis exhaustiva o la realización de pruebas complementarias (RM con gadolinio, perfil de autoinmunidad) pueden ayudar en la exclusión de factores ambientales, presbiacusia y otras causas de hipoacusia secundaria como el hidrops endolinfático o la enfermedad inmunomediada de oído interno, para así ofrecer las pruebas genéticas a los casos "idiopáticos", que suponen el escenario más rentable. Trabajos como el presente, son necesarios para aumentar nuestro conocimiento de esta patología y así contribuir a definir la población candidata a un estudio genético, optimizando el uso de los recursos disponibles. En nuestra cohorte, el subgrupo de pacientes entre 30 a 60 años con HNS moderada-grave, principalmente en frecuencias bajas-medias y especialmente con antecedentes familiares positivos de hipoacusia, obtuvo el diagnóstico genético más rentable, aumentando el rendimiento diagnóstico del 23% al 33% en este subgrupo.

La búsqueda de patrones que permitan definir que pacientes adultos con hipoacusia se benefician de los estudios genéticos, permitirá su implementación de forma sistemática en la práctica clínica en todos los centros del territorio nacional, pero nuevamente, para establecer dichos patrones y guías de manejo clínico específicas, precisamos de mayor conocimiento respecto a la epidemiología genética de nuestra población, siendo necesario para ello que se estudien mayor número de pacientes adultos con hipoacusia tardía y que se agrupen datos de varios centros y de otros países.

Un dato interesante a destacar respecto al diagnóstico genético de la hipoacusia de inicio tardío es el género. En nuestra muestra hay un claro predominio de diagnóstico genético en mujeres respecto a varones (69% versus 31%), que establece una ratio mujer-varón de 3:1. Con un tamaño muestral limitado y sin estudios poblacionales de esta índole con los que realizar comparativa, es difícil establecer si se trata de un sesgo muestral derivado de una mayor demanda diagnóstica del síntoma en mujeres o es una característica que está definiendo una enfermedad diferencial en cuanto al género. Así es que la realización de futuros estudios genéticos en población adulta permitirá aumentar el conocimiento sobre la prevalencia genética

– DISCUSIÓN –

de este grupo y comparar las diferencias relacionadas no sólo con el género sino también con el origen étnico y la geografía según los resultados genéticos obtenidos en las distintas cohortes y también determinar qué factores pueden conducir a mayores tasas de diagnóstico según los grupos.

Respecto al **rendimiento diagnóstico**, cabe mencionar que en nuestro estudio la tasa ha sido del 23%, es decir, en casi 1 de cada 4 pacientes se ha obtenido un resultado concluyente. Presumiblemente el rendimiento sea mayor al actual, ya que no hay que perder de vista la presencia de las VUS, que en nuestra cohorte representan el 11% de los hallazgos. Las VUS son actualmente un factor limitante en la estimación real del rendimiento diagnóstico, pero es evidente que pueden incrementar de forma notable el rendimiento en el futuro próximo, puesto que, aunque algunas VUS puedan acabar siendo consideradas benignas, otras reunirán criterios de patogenidad. Por ello es necesario mantener una revisión anual de los datos publicados sobre las VUS, lo que ayudará a reducir la incertidumbre sobre sus consecuencias clínicas y a enriquecer el conocimiento sobre la hipoacusia genética del adulto.

Sin ninguna duda las VUS plantean el principal problema dentro de la interpretación de resultados genéticos; tal es así que los criterios reconocidos por la clasificación ACMG/AMP se han modificado a lo largo de los años y paralelamente también se han ido desarrollando otras clasificaciones con nuevas directrices para entender y armonizar este grupo indeterminado de variantes. Una de estas nuevas clasificaciones es el sistema ABC, recientemente publicado por Houge y colaboradores del departamento de Medicina Genética de la Universidad de Haukeland (Noruega) que clasificar las variantes en dos pasos: primero en función de las consecuencias conocidas o probables de la función del gen o la proteína (paso A - clasificación funcional) y, posteriormente, en función de las consecuencias/correlaciones clínicas conocidas o sospechadas (paso B - clasificación clínica) y, opcionalmente, se aporta un comentario estándar que se ajuste a la cuestión clínica (paso C – situación clínica) [89].

Los casos en los que no se ha identificado ninguna variante responsable de la hipoacusia siguen a día de hoy sin diagnóstico etiológico. Esto podría deberse a una causa ambiental no identificada o a las limitaciones propias de la NGS aplicada a los paneles (grandes deleciones/duplicaciones, reordenamientos, variantes en regiones genómicas no implicadas hasta la fecha en HNS, etc.). La clave para esclarecer muchos de los escenarios clínicos que hoy quedan sin resolver radica en el análisis de mayor un número de pacientes, lo que permitiría

– DISCUSIÓN –

profundizar en el conocimiento de la hipoacusia hereditaria del adulto y reunir mayor volumen de datos sobre las variantes encontradas y su significación clínica para el enriquecimiento de las bases de datos poblacionales, paralelamente al continuo desarrollo y mejora de las herramientas de secuenciación genética.

Después de lo tratado, vamos a entrar a discutir de forma más concreta algunos de nuestros resultados. De los tres genes más prevalentes en nuestra cohorte (*TECTA*, *GJB2* y *KNCQ4*), los dos primeros se relacionan principalmente en la literatura con la HNS de inicio precoz y, por lo tanto, son a priori inesperados como causantes de hipoacusia en la edad adulta. Por el contrario, otros genes detectados en el estudio, como *STRC*, *COCH* o *ACTG1*, están relacionados con hipoacusia postlocutiva, por lo que la pérdida auditiva de inicio tardío no resulta una sorpresa genómica en estos casos.

Respecto al gen más frecuente, *TECTA*, cabe mencionar que codifica la proteína tectorina α que es el principal componente no colagenoso de la membrana tectoria (matriz extracelular que cubre la superficie apical del epitelio sensorial de la cóclea) y juega un papel importante en la transmisión de la energía mecánica del sonido a los paquetes de estereocilios de las células ciliadas, donde el sonido se traduce en potenciales neuronales. Las variantes P/PP en *TECTA* se asocian mayoritariamente con el fenotipo DFNB21, de herencia AR y carácter prelocutivo, con HNS de intensidad variable moderada- profunda, en algunos casos con afectación predominante de las frecuencias en torno a 1000-2000 Hz (audiometrías en forma de “U”). Pero también hay variantes en este gen asociadas a las formas DFNA8 y DFNA12, de herencia AD, que han sido las encontradas en nuestra cohorte. De las formas AD se han descrito tres fenotipos diferentes: a) hipoacusia prelocutiva estable, de intensidad moderada-severa, que afecta a las frecuencias medias; b) hipoacusia postlocutiva progresiva afectando a las frecuencias agudas; c) hipoacusia postlocutiva progresiva en las frecuencias medias. Se cree que esta diversidad fenotípica varía según el aminoácido afectado y el dominio de la tectorina α que se vea afectado, por ello es un gen con un rango de expresividad muy variable, que juega un papel importante en la hipoacusia infantil, pero cuya aparición como variante P/PP en la hipoacusia del adulto resulta concordante a su intrínseca variabilidad en cuanto a expresividad se refiere [70, 96].

Como ya es bien conocido en la genética de la hipoacusia, la pérdida de un codón de guanina en posición 36 (c35delG) en *GJB2* resulta ser la causa más frecuente de HNS no sindrómica AR en la población infantil asociada al fenotipo DFNB1, de aparición prelingual con

– DISCUSIÓN –

HNS severo-profundas. Este gen considerado causante por excelencia de la hipoacusia infantil también puede manifestarse con un debut más tardío. Es bien sabido que, cuando se trata de variantes que alteran la transcripción de este gen, cuanto más alejada del inicio del gen se presenta la variante, mayor proporción de proteína funcional se sintetiza y por ello más leves y tardíos son los síntomas. Los dos sujetos portadores de variantes P/PP en este gen estaban asociados al fenotipo DFNB1A, uno de ellos en heterocigosis compuesta y el otro en homocigosis. En el primer sujeto la heterocigosidad de la variante se presupone el principal factor para el debut tardío; en el caso del segundo se puede justificar por lo previamente comentado: p.Val371Ie supone una alteración en la posición 371 del gen *GJB2*, frente a la más conocida alteración c35delG en la posición 35, siendo por ello el debut más tardío cuanto más atrasada se presenta la alteración en el gen [97]. En la literatura se ha descrito la existencia de otras alteraciones menos frecuentes en el gen *GJB2*, asociado al fenotipo DFBN3 de herencia AD y debut postlingual con HNS leve-moderada, y que en ocasiones cursa con alteraciones cutáneas tipo ictiosis, dado que la conexina 26 se expresa no sólo en las células de la cóclea sino también en los queratinocitos de la epidermis [97, 98]. A priori este fenotipo sería el más esperado en un adulto por su patrón de herencia, sin embargo, no fue diagnóstico en ninguno de nuestros sujetos.

Respecto a *KCNQ4*, el segundo gen en frecuencia identificado en la muestra; está asociado a hipoacusia no sindrómica progresiva AD, y se caracteriza por una pérdida auditiva que comienza en frecuencias agudas en la 2ª y 3ª década de la vida, progresando a hipoacusias moderadas-severas y comprometiendo seguidamente las frecuencias medias y graves. Este gen se encarga de la expresión de una proteína que forma parte de los canales de potasio dependientes de voltaje de las células ciliadas del oído interno, por lo que su alteración determina una transmisión ineficaz de las señales eléctricas nerviosas. Hasta la fecha, se han identificado un total de 72 variantes del gen con diversos fenotipos clínicos. En este gen las variantes de sentido erróneo se asocian con una pérdida auditiva de inicio más precoz y pantonales, mientras que las deleciones conllevan pérdidas auditivas de inicio más tardío en frecuencia agudas [99]. Por ello es posible detectarlo como causa de HNS en la edad adulta.

Como ya hemos explicado previamente, la aparición tardía de las hipoacusias asociadas a las alteraciones de estos genes puede deberse a la naturaleza de las variantes específicas identificadas en los mismos. Por otra parte, la expresividad variable intrafamiliar e interindividual determina que dos portadores de la misma variante genética no desarrollen la

– DISCUSIÓN –

hipoacusia a la misma edad o con la misma intensidad. Además, la hipoacusia hereditaria presenta una heterogeneidad genética alélica, en la que diferentes variantes del mismo gen producen cambios en las manifestaciones clínicas o incluso dan lugar a condiciones clínicas diferentes, lo que también podría justificar la edad de debut diferente para el mismo gen. En conjunto, estas características relacionadas con la hipoacusia genética dificultan el establecimiento de correlaciones entre una determinada variante genética (genotipo) y sus manifestaciones clínicas y audiométricas (fenotipo) [4].

Entrando en otro punto objeto de análisis, hay que destacar como la irrupción de la tecnología de secuenciación masiva aplicada a los diversos estudios de genética molecular (paneles de genes, WES o WGS) ha permitido superar las limitaciones de las estrategias empleadas hasta hace unos años (estudio dirigido mediante técnica de Sanger), contribuyendo a mejorar sustancialmente la identificación de las variantes y agilizar el proceso diagnóstico de las hipoacusias genéticas. Elegir la prueba genética más completa mejora las posibilidades de un diagnóstico genético y por ello es esencial considerar los siguientes puntos: 1) número de genes incluidos en el análisis y su asociación sindrómica y no sindrómica; 2) metodología de detección; 3) búsqueda de SNP y CVN en los genes analizados; 4) guías analíticas y de validación; 5) coste y tiempo para la obtención del informe genético.

El gran número de genes relacionados hasta la fecha con la hipoacusia plantea una dificultad para realizar estudios genéticos dirigidos en la práctica clínica rutinaria. Aun así, una de las cuestiones fundamentales a la hora de planificar una estrategia para afrontar el diagnóstico genético de la HNS es conocer el porcentaje de casos que pueden ser explicados por las variantes más prevalente en la población a estudio. Dependiendo de esta frecuencia, se podría plantear la realización de un cribado previo al empleo de tecnología NGS, mediante el análisis de estos genes con métodos convencionales (secuenciación Sanger y PCR específica). Por ejemplo, en la población pediátrica, donde se conoce que las variantes P/PP en *GJB2/GJB6* son la causa más frecuente de HNS autosómica recesiva, podrían ser objeto de estudio dirigido inicial. Si bien, estudios como el de Costales et al, muestran que la implementación de cribado pre-test en la hipoacusia infantil depende de la prevalencia genética específica en la población a estudio, y esta puede oscilar notablemente entre diferentes áreas geográficas, por lo que solamente sería útil cuando la proporción de una variante concreta sea elevada; en caso contrario aboga por una detección precoz inicial con panel de genes [3].

– DISCUSIÓN –

En el adulto, en cambio, se desconoce la prevalencia de las variantes genéticas de la hipoacusia, por lo que la utilidad de estudios genéticos de *screening* no tiene cabida, así que debemos realizar una aproximación agnóstica en su abordaje. Esta falta de conocimiento de los genes más relevantes implicados en la sordera del adulto justifica el uso de estudios genéticos amplios para aumentar el rendimiento diagnóstico, permitiendo la detección de variantes causantes de HNS que afectan a genes a priori inesperados.

Pero incluso en la era de las técnicas de nueva secuenciación, el uso de las pruebas genéticas dirigidas se podría considerar una opción idónea en 3 escenarios:

- a) Como estudio de *screening* previo a otra herramienta genética de amplio espectro cuando tenemos alta sospecha sobre la correlación genotipo-fenotipo de un sujeto o si en base a la historia clínica o antecedentes familiares podemos orientar con alta probabilidad una etiología genética subyacente. Por ejemplo, sospecha de ototoxicidad inducida por aminoglucósidos por el gen *MT-RNR1*, de transmisión mitocondrial, al evaluar la historia clínica y el árbol genealógico dónde los sujetos afectados reciben el gen por herencia materna [26].
- b) Cuando encontramos una variante P/PP en un estudio genético y queremos confirmar dicho hallazgo se puede realizar una secuenciación convencional dirigida al gen concreto.
- c) Cuando se realizan estudios de familiares del sujeto afecto en el que ya se ha identificado una variante P/PP concreta.

¿Por qué un panel de genes?

El factor más importante al elegir una prueba genética es determinar si apuntará adecuadamente a los genes de interés de la patología a estudio y por tanto resultará la más rentable en la consecución del diagnóstico genético [100].

En la actualidad se están aplicando principalmente dos tipos de test basados en NGS para el diagnóstico genómico de las enfermedades hereditarias: los paneles de genes y la secuenciación de exoma completo [101, 102]. En el caso de la sordera hereditaria, la WES abarca un número de genes diana casi 100 veces superior al de los paneles (20.000 versus 200 aproximadamente), y requiere recursos de secuenciación mucho mayores para obtener coberturas similares en las regiones genómicas de interés. En la práctica, la cobertura de los exomas no alcanza a la de los paneles, lo cual puede provocar coberturas insuficientes en regiones clave y, en consecuencia, la no detección de variantes clínicamente relevantes. Además, la mayor cantidad de secuencia requerida para la secuenciación de exomas encarece los costes de secuenciación y complica el análisis bioinformático. Además, dado que el análisis mediante WES rastrea áreas del genoma no exclusivamente relacionadas con la patología a estudio, se derivan de sus resultados hallazgos secundarios (aquellos que causan patologías no relacionadas con el fenotipo objeto de estudio), que complican notablemente el proceso de asesoramiento genético [100]. En el caso del panel, la restricción del análisis a los genes específicos de la patología disminuye los costes y mejora la calidad de la secuenciación, facilitando el análisis e interpretación posterior de los resultados y reduciendo considerablemente los hallazgos genéticos secundarios.

No obstante, el mayor inconveniente que tienen los paneles es que deben ser enriquecidos y actualizados con la incorporación de nuevos genes que se vayan identificando relacionados con la patología, lo que exige una continuada revisión de los datos publicados en la literatura. En este respecto, la WES tiene una ventaja con respecto a la secuenciación de paneles: la capacidad de identificar alteraciones en genes que, en el momento del análisis, no se han asociado con la enfermedad. Estas alteraciones podrían servir para explicar el fenotipo del paciente si, en estudios posteriores, se demuestra la asociación consistente del gen afectado con el fenotipo objeto de estudio. Para minimizar esta desventaja, durante el desarrollo de los paneles OTOgenics™ implementó un enfoque con dos grupos de genes: genes consistentemente asociados con HNS y genes candidatos. Las variantes identificadas en los genes candidatos no se incluyen en el informe final de forma sistemática, sino solo en aquellos

– DISCUSIÓN –

casos en los que, en base a la evidencia disponible y a la coincidencia entre el fenotipo del paciente y el asociado al gen afectado, podrían explicar la hipoacusia. Esta solución de compromiso tiene como objetivo maximizar el rendimiento diagnóstico del panel sin complicar el procedimiento de asesoramiento genético.

Otro motivo que aboga al empleo de paneles es la presencia de pseudogenes dentro de las regiones codificantes del genoma analizadas. Un pseudogen es un segmento de ADN que estructuralmente se asemeja a un gen, pero que no es codificante de proteína. Los pseudogenes en su mayoría derivan de genes que, debido a la acumulación de mutaciones a lo largo de la evolución, han sido inactivados y en consecuencia han perdido su función. El caso más ilustrativo para explicar este fenómeno es el pseudogen *STRC*, asociado a HNS moderada-severa, y que escapa a la evaluación mediante exomas, y en algunos casos también al estudio mediante paneles de genes si no es tenido en cuenta [2, 100, 103]. En nuestro panel ya se había previsto y solventado esta cuestión a priori del estudio en la fase de optimización, y gracias a ello se pudo detectar el caso de un paciente afecto por *STRC*, demostrando su relevancia también en la población adulta.

Otra característica fundamental de cualquier panel diagnóstico es que sea capaz de obtener secuencia de la suficiente calidad en la máxima cantidad posible de nucleótidos diana. Nuestro panel de genes tras el refinamiento de su versión inicial tiene una sensibilidad analítica para detectar SNVs e indels con frecuencias alélicas superiores a 0,1 mayor del 99,5 %, con una especificidad por encima del 99,9% en la última versión del panel (v3). Cada destacar que la NGS aplicada en las distintas modalidades de estudios genéticos no está exenta de sesgos, ya que no permite descartar la presencia de determinadas variantes genómicas para cuya detección esta metodología es intrínsecamente limitada, como por ejemplo grandes deleciones o duplicaciones, reordenamientos o alteraciones en regiones de alta homología por la presencia de pseudogenes, sobre todo si estos no se tienen en cuenta a la hora de la planificación.

Por todo lo argumentado, la mayoría de los estudios publicados apuntan a que el panel de genes es la herramienta de elección para el diagnóstico genético de la hipoacusia [2, 3, 44]. Este diagnóstico genético exacto es el principal prerrequisito de la medicina de precisión para la gestión clínica de enfermedades genéticas, pero además, como ilustraremos en la siguiente fase de esta Tesis doctoral, el proceso no concluye con la identificación del gen implicado, puesto que su trascendencia clínica su compete al asesoramiento genético, la prevención y el pronóstico así como en la decisión terapéutica.

Relevancia clínica del diagnóstico genético

Los resultados de este estudio reflejan las características de la hipoacusia genética, caracterizada por una extrema heterogeneidad genética y fenotípica combinada con una expresividad variable y ponen de manifiesto la importancia de un diagnóstico etiológico rápido incluso en la hipoacusia de inicio tardío. De igual manera, evidencian la utilidad de emplear paneles fenotipo-agnóstico para el diagnóstico de la hipoacusia hereditaria en el adulto, donde el conocimiento sobre sus bases genéticas es aún muy limitado. Pero aun siendo una población poco estudiada, los beneficios del diagnóstico genético son clínica y científicamente relevantes [2, 3, 44]. Nuestros resultados aportan información acerca del espectro de alteraciones genéticas responsables de la hipoacusia en la población adulta española y ponen de manifiesto que el diagnóstico genético en el adulto no se limita exclusivamente a esclarecer la etiología del paciente, ya que esa información genética guarda estrecha relación con otras áreas de la medicina.

Siendo la población que estamos estudiando un colectivo que se encuentra en plena edad reproductiva, entra en juego la transmisión del gen a la descendencia que, como ya sabemos, en el caso de patrones de herencia AD es del 50% de tener un hijo afectado por embarazo [3, 4]. En muchos casos teniendo en cuenta que los diagnósticos de la HNS genética son complejos, estos pacientes portadores de genes dominantes desconocen la carga genética transmitida y las potenciales consecuencias que esto pueda tener en sus hijos. Por ello en el ámbito de la **reproducción**, los resultados de las pruebas genéticas proporcionan información trascendental para el asesoramiento genético del propio paciente, su descendencia y sus familiares. Con esto se ratifica la indudable utilidad del estudio genético para el asesoramiento y la planificación familiar, además de la posibilidad de realizar un despistaje precoz si existe descendencia potencialmente afecta. De esta manera ofrecemos a los progenitores la oportunidad de tomar conciencia de estos hechos de cara a la decisión reproductiva, definiendo alternativas u optando por terapias preimplantacionales para evitar la transmisión del gen, sobre todo en aquellos casos de asociación sindrómica donde las comorbilidades derivadas puedan comprometer la supervivencia y calidad de vida del recién nacido. El claro ejemplo se plantea con los diagnósticos sindrómicos de Stickler en nuestra serie; una de las pacientes no había tenido descendencia, la otra en cambio tenía un hijo, que no presentaba alteraciones fenotípicas evidentes, pero al que se le realizó el estudio genético dirigido a la variante patogénica de su progenitora, que concluyó que no era portador de la misma. Sin embargo, dado que la

– DISCUSIÓN –

probabilidad en los patrones AD es del 50% de transmisión, es pertinente estudiar a todos los descendientes incluso aunque no presenten hipoacusia o no tengan rasgos sindrómicos.

En el ámbito de la **prevención** el conocimiento de un diagnóstico genético permite una ganancia en la calidad asistencial sobre todo en el caso de las hipoacusias síndrómicas. Es posible que, previamente al diagnóstico genético, existen otras alteraciones en otros órganos puedan haberse desarrollado y detectado, pero sin embargo en otras ocasiones la hipoacusia es el único síntoma evidente. Por ello los resultados genéticos pueden arrojar sorpresas diagnósticas como la detección de síndromes ocultos. Como buen ejemplo para ilustrar este hecho, tenemos dos pacientes de nuestra serie, un síndrome de Stickler y otro de PHARC, donde solamente la hipoacusia se había manifestado de forma evidente y no había diagnóstico sindrómico previo al test genético. Tras su identificación ambos pacientes fueron derivados a los correspondientes especialistas, detectándose en el caso del Stickler la presencia de cataratas y artrosis incipientes y en el caso del PHARC la presencia de polineuropatía y ataxia leves. Esto pone de manifiesto como el diagnóstico precoz de los síndromes permite prestar atención a los rasgos del mismo que aún no se han desarrollado o detectado, lo que podría mitigar las consecuencias o secuelas con el paso del tiempo al permitir que los pacientes sean evaluados por atención especializada. A su vez puede llevarse a cabo una prevención primaria sobre los individuos de la familia para esclarecer si son portadores de la variante diagnosticada, lo cual permite realizar un despistaje precoz mediante un estudio genético dirigido a descendencia o familiares para determinar si son portadores y en ese caso si están afectados [4].

En el ámbito **predictivo**, una vez conocemos la causa genética de una hipoacusia, es relativamente factible (gracias a las bases poblacionales) comprender cuál ha de ser su evolución en cuanto a severidad, tiempo de instauración o límite de progresión, lo cual permite definir mejor las necesidades médicas y/o educativas requeridas en cada caso, y también cuál puede ser una opción terapéutica apropiada. Por ejemplo, aquellas alteraciones genéticas que causan neuropatías sin alterar la conducción nerviosa pueden ser candidatas a la colocación de un implante coclear como terapia de rehabilitación auditiva. Además, es importante llevar a cabo un seguimiento de los pacientes con variantes P/PP en loci asociados con hipoacusia síndrómica, ya que se puede lograr la detección de futuros síntomas que converjan en la recopilación de los criterios necesarios para establecer el diagnóstico sindrómico que no pudo hacerse en un primer momento dada la ausencia de los mismos. Como ejemplo, el gen *ACTG1* asociado a HNS no síndrómica y también al síndrome de Baraitser-Winter tipo II, caracterizado por malformaciones

– DISCUSIÓN –

craneofaciales y anomalías cardíacas, oculares y renales, fue detectado en una paciente de nuestra serie, que, en el momento del diagnóstico a sus 30 años, no presentaba criterios para establecer la asociación sindrómica ya que no había evidencia de alteraciones en otros órganos. Aun así, teniendo en cuenta la pronta edad del diagnóstico, podría llegar a desarrollar alteraciones oculares, que pusieran en entredicho el veredicto inicial.

De la misma forma, todos aquellos pacientes con presencia de VUS en sus estudios genéticos y que no hayan podido ser reclasificados en ese momento, merecen el seguimiento posterior para la reevaluación de sus variantes, ya que, si éstas sufren modificaciones en cuanto a patogenicidad, deben ser informados y atendidos en consecuencia.

Como ya hemos mostrado previamente, lograr un diagnóstico etiológico de la hipoacusia de inicio en el adulto es de vital importancia porque conlleva múltiples ventajas para los pacientes, sus familiares y el sistema de salud [4]. Los estudios genéticos abogan por la medicina de las 4P (Personalizada, Preventiva, Predictiva y Participativa) y ofrecen la posibilidad de abarcar todas ellas al mismo tiempo. Proporcionar estos diagnósticos moleculares es un elemento fundamental de la medicina de precisión, si bien la atención individualizada de los pacientes suele estar limitada por nuestro conocimiento actual sobre las etiologías de las enfermedades y el enfoque del diagnóstico basado en el fenotipo. Sin embargo, como habíamos mencionado anteriormente, estamos viviendo una expansión fenotípica que hace mella fundamentalmente en los diagnósticos sindrómicos con la aparición de fenotipos adicionales inesperados (p.e. síndrome de Stickler sin malformaciones craneofaciales), lo cual justifica la necesidad de una aproximación agnóstica cuando se trata de enfermedades genéticas tan heterogéneas y con penetrancia incompleta como es el caso de la hipoacusia hereditaria.

Por ello, la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes nos ayuda a integrar la información genómica en el tratamiento y la atención individualizada del paciente y a tomar mejores decisiones clínicas [93]. Y no se puede menospreciar que la consecución de un diagnóstico etiológico ofrece respuestas sobre la enfermedad que ayudan a los pacientes a comprender su discapacidad auditiva, evita pruebas adicionales costosas y potencialmente iatrogénicas y genera satisfacción tanto en el paciente como en el profesional (9,43). De nuevo el caso de uno de nuestros síndromes de Stickler ejemplifica cómo muchas veces el diagnóstico se concluye de forma tardía y tras una larga peregrinación médica, ya que la aparición de alteraciones oftálmicas y articulares severas previas al diagnóstico genético no se sabían subrogadas a la presencia del síndrome.

Futuro en la hipoacusia genética

Nuestros resultados proporcionan una primera y valiosa aproximación a la epidemiología genética en la población adulta con hipoacusia de inicio tardío. Sin embargo, las variantes genéticas responsables de un gran número de casos de hipoacusia idiopática y potencialmente hereditaria siguen siendo desconocidas. Los futuros enfoques deberían centrarse en confirmar lo que ya hoy en día está creciendo en evidencia: la rentabilidad de las herramientas genéticas, como los paneles de genes, en la práctica diaria [3].

Este estudio estimula la necesidad realizar estudios multicéntricos, que aporten un mayor tamaño muestral para verificar la prevalencia de la hipoacusia genética en adultos en nuestro país y en otras regiones del planeta. Un conocimiento más exhaustivo en este campo allanará el camino para una investigación y una labor clínica más eficaces, como el asesoramiento genético y el cribado auditivo, lo que en última instancia contribuirá al rápido diagnóstico genético de la hipoacusia y a sus correspondientes medidas preventivas. Además, el diagnóstico genético es el criterio clave de elegibilidad para los ensayos clínicos y los tratamientos basados en la terapia génica [104-106], que se van desarrollando de la mano del conocimiento de las enfermedades genéticas.

El objetivo futuro sería alcanzar un diagnóstico etiológico cercano al 100% de los pacientes con HNS de origen desconocido. Si bien, muchos de los resultados negativos, puedan ser revisados en un periodo ulterior, cuando la biblioteca de genes se amplíe con la adición de otras variantes asociadas a hipoacusia que hasta la fecha son desconocidas o su implicación clínica aún no está bien constatada, como sucede en las VUS.

CONCLUSIONES

– CONCLUSIONES –

- I. El rendimiento diagnóstico obtenido en el estudio con el empleo de NGS aplicada en el panel de genes OTOgenics™ fue del 23% en nuestra serie, con la detección de 2 casos de síndromes ocultos.
- II. En nuestra población, la HNS genética no sindrómica en el adulto representó el 80% de los diagnósticos, siendo el 20% restante hipoacusia de asociación sindrómica. Los genes *TECTA* y *KNCQ4* fueron los más prevalentes en esta serie y el patrón hereditario predominante fue autosómico dominante. La detección de *GJB2* y *STRC* resultó una sorpresa genómica, ya que hasta la fecha se han considerado genes típicamente asociados a la hipoacusia prelocutiva infantil.
- III. La hipoacusia de debut en edad adulta presenta perfiles de pérdida auditiva de grado moderado, y predominantemente bilateral y simétrico, existiendo también perfiles leves y severos según la variante patogénica. La hipoacusia sindrómica del adulto tiene un desarrollo menos florido de la sintomatología acompañante, por lo que la presencia de síndromes ocultos es relativamente frecuente.
- IV. El diagnóstico genético de la hipoacusia de debut en la edad adulta resulta útil desde el punto de vista de la aplicación del asesoramiento genético, así como para el desarrollo de actividades preventivas y predictivas que aportan grandes beneficios para el paciente y sus familiares. Además, la detección del sustrato genético responsable de la hipoacusia abre la puerta al estudio de terapias génicas específicas.

ANEXOS



Anexo A: Criterios ACMG/AMP que indican patogenicidad.

La primera letra del nombre del criterio, **P**, indica que es un criterio de patogenicidad. Las siguientes letras indican el nivel: **VS**: very strong; **S**: strong; **M**: moderate y **P**: supporting. Los números sirven para distinguir criterios del mismo nivel.

CRITERIO	DESCRIPCIÓN	FUNDAMENTO
PVS1	Variante inactivadora en un gen en el cual la pérdida de función es un mecanismo conocido de enfermedad.	Se basa en las consecuencias drásticas que tiene la inactivación completa de un gen.
PS1	Variante en la cual el cambio de aminoácido es el mismo que el de una variante previamente clasificada como patogénica, pero con otro cambio de nucleótido.	Se basa en que dos secuencias de aminoácidos idénticas, aun siendo sus secuencias de nucleótidos diferentes, se comportarán de manera idéntica o muy similar.
PS2	Variante <i>de novo</i> en un paciente sin historia familiar de la enfermedad. (<i>confirmadas maternidad y paternidad</i>).	Se basa en la infrecuencia de las variantes <i>de novo</i> , lo cual las hace especialmente sospechosas cuando aparecen en un individuo afecto sin antecedentes familiares.
PS3	Estudios funcionales <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> sólidamente establecidos apoyan un efecto deletéreo de la variante en el gen o el producto del gen.	Se basan en la evidencia de patogenicidad derivada del análisis funcional de la variante en un contexto experimental.
PS4	La prevalencia de la variante es significativamente mayor en afectados que en controles (<i>Odds Ratio</i> >5).	Se basa en el análisis estadístico de la asociación entre la presencia de una variante y la aparición de la enfermedad.
PM1	Variante localizada en un <i>hot-spot</i> mutacional y/o un dominio funcional sólidamente establecido sin variación benigna. Aplicable solo a variantes no sinónimas (<i>missense</i>) o que no cambian la pauta de lectura (<i>inframe</i>).	Se basa en la ubicación de la variante en regiones que, según la información disponible, parecen especialmente sensibles a las alteraciones genéticas.
PM2	Variante ausente o con una frecuencia extremadamente baja en individuos control.	Se basa en la ausencia/infrecuencia de la variante en individuos sanos, lo que la hace especialmente sospechosa si aparece en un individuo afecto.

CRITERIO	DESCRIPCIÓN	FUNDAMENTO
PM3	Variante descrita en homocigosis o en heterocigosis compuesta con otra alteración patogénica en el mismo gen. Aplicable solo a enfermedades recesivas.	Se basa en la probabilidad de que la variante, bien en homocigosis o en heterocigosis compuesta con otra variante, cause un fenotipo recesivo
PM4	La longitud de la proteína cambia como resultado de una inserción/delección en pauta en una región no repetitiva.	Se basa en el efecto potencialmente deletéreo que tienen los cambios de longitud en una proteína.
PM5	Se ha descrito otra variante no sinónima que afecta al mismo aminoácido y que ha sido considerada como patogénica.	Se basa en la probabilidad de que una variante que afecta a una posición en la que ya se han descrito variantes patogénicas sea también patogénica.
PM6	Variante asumida de novo en un paciente sin historia familiar de la enfermedad.	Similar a PS2, pero sin confirmación de paternidad y maternidad por parte de los supuestos progenitores en los que la variante está ausente.
PP1	Cosegregación de la variante con la enfermedad en miembros afectados de una familia/varias familias en un gen claramente causante de la enfermedad.	Se basa en la probabilidad de que la concurrencia de una variante con el fenotipo en diversos miembros de una familia sea indicativa de patogenicidad.
PP2	Variante no sinónima en un gen con baja tasa de variación no sinónima benigna y en el cual las variantes no sinónimas son un mecanismo común de la enfermedad.	Se basa en la probabilidad de que una variante no sinónima cualquiera pueda desencadenar una enfermedad cuando el gen al que afecta no tiene muchas variantes no sinónimas benignas.
PP3	La evaluación bioinformática de la variante predice un efecto funcional deletéreo.	Se basa en la capacidad de los algoritmos informáticos para predecir la patogenicidad de una variante.
PP4	El fenotipo del paciente se asocia de manera altamente específica con el gen.	Se basa en la probabilidad de que, al ser el gen afectado por la variante el único o uno de los únicos asociados con la enfermedad, la variante sea patogénica.
PP5	Una fuente reputada (LOVD/INSIGHT) ha reportado recientemente la variante como patogénica, pero la evidencia no está disponible para hacer una evaluación independiente.	Se basa en la clasificación hecha por terceros que ofrezcan fiabilidad.

Anexo B: Criterios ACMG/AMP que indican benignidad

La primera letra del nombre del criterio, **B**, indica que es un criterio de benignidad. Las siguientes letras indican el nivel: **A**: stand alone; **S**: strong; **M**; moderate y **P**: supporting. Los números sirven para distinguir criterios del mismo nivel.

CRITERIO	DESCRIPCIÓN	FUNDAMENTO
BA1	Variante que puede ser considerada benigna por su alta frecuencia alélica.	Se basa en improbabilidad de que las variantes frecuentes en la población causen enfermedades monogénicas.
BS1	La frecuencia alélica de la variante es superior a la esperada para la enfermedad.	Similar a BA1, pero para variantes no tan frecuentes.
BS2	Variante observada en un individuo adulto sano para una enfermedad con penetrancia completa esperada a temprana edad.	Se basa en la presencia de la variante en individuos sanos como argumento a favor de su benignidad.
BS3	Estudios funcionales in vitro o in vivo sólidamente establecidos muestran un efecto no patogénico de la variante en la función de la proteína o en el splicing.	De modo análogo a PS3, se basa en evidencia de neutralidad derivada del análisis funcional de la variante en un contexto experimental.
BS4	Ausencia de cosegregación en miembros afectados de la familia.	Se basa en la improbabilidad de que dos individuos afectados de la misma familia tengan causas genéticas diferentes.
BP1	Variante no sinónima en un gen para el cual las variantes causantes de enfermedad conocidas son principalmente variantes truncantes.	Se basa en la improbabilidad de que una variante no truncante cause la enfermedad cuando las causas descritas provocan la inactivación del gen.
BP2	Variante observada en trans con una variante patogénica en un gen/enfermedad dominante con penetrancia completa u observada en cis con una variante patogénica para cualquier modo de herencia.	Se basa en la ausencia/infrecuencia de la variante en individuos sanos, lo que la hace especialmente sospechosa si aparece en un individuo afecto.

CRITERIO	DESCRIPCIÓN	FUNDAMENTO
BP3	Inserción/delección en pauta en una región repetitiva sin función conocida.	Se basa en la improbabilidad de que una inserción/delección que no modifica la pauta de lectura y afecta a una región sin función conocida cause la enfermedad.
BP4	La evaluación bioinformática de la variante no predice un efecto funcional deletéreo.	Se basa en la capacidad de los algoritmos informáticos para predecir la benignidad de una variante.
BP5	Variante identificada en un caso con una causa alternativa de enfermedad.	Se basa en la improbabilidad de que la enfermedad de un individuo tenga dos causas genéticas independientes.
BP6	Una fuente reputada ha reportado recientemente la variante como benigna, pero la evidencia no está disponible para hacer una evaluación independiente.	Se basa en la clasificación hecha por terceros que ofrezcan fiabilidad.
BP7	Variante sinónima para la que los algoritmos predictores de efecto funcional consideran que la variante no tiene efecto en el splicing.	Se basa en la improbabilidad de que una variante sinónima sin otros efectos conocidos sobre el gen que el cambio de su secuencia cause la enfermedad.

Anexo C y D: Genes relacionados con la pérdida auditiva hereditaria consistentes y candidatos incluidos en el panel OTOgenics™.

Los genes con nombres en **negrita** estaban presentes en las versiones v3 y v4 de OTOgenics™.

Los genes subrayados solo estaban presentes en v4.

GENES CONSISTENTES

ABHD12	ACTB	ACTG1	ADGRV1	AIFM1	ALMS1	<u>AMMECR1</u>	ANKH	AP1S1	ATP1A3
<u>ATP6VOA4</u>	ATP6V1B1	BCAP31	BCS1L	BRAF	BSND	CABP2	CACNA1D	CCDC50	CDH23
CEACAM16	CHD7	CIB2	CISD2	CLCNKA	CLCNKB	CLDN14	CLPP	CLRN1	COCH
COL2A1	COL4A3	COL4A4	COL4A5	COL4A6	COL9A1	COL9A3	COL11A1	COL11A2	<u>COLEC11</u>
DCAF17	DDX11	DIABLO	DIAPH1	DNMT1	ECHS1	EDN3	EDNRB	EPS8L2	ESPN
ESRRB	EYA1	EYA4	FGF3	FGFR3	FTO	GATA3	GIPC3	GJB2	GJB3
GJB6	GPSM2	GRHL2	GRXCR1	GSDME	<u>HARS1</u>	HARS2	HGF	HOMER2	HOXA1
HOXB1	HSD17B4	ILDR1	KARS1	KCNE1	KCNJ10	KCNQ1	KCNQ4	LARS2	LHFPL5
LHX3	LOXHD1	LRP2	LRTOMT	MARVELD2	MASP1	MIR96	MITF	MSRB3	MT-CO1
MT-RNR1	MT-TH	MT-TK	MT-TL1	MT-TS1	MYH14	MYH9	MYO3A	MYO6	MYO7A
MYO15A	NARS2	NDP	NLRP3	OPA1	OSBPL2	OTOA	OTOF	OTOG	OTOGL
P2RX2	PAX3	PCDH15	PDZD7	PEX1	PEX2	PEX26	PEX3	PEX5	PEX6
PJKK	<u>POGZ</u>	POU3F4	POU4F3	PRPS1	PTPN11	PTPRQ	RAF1	RDX	RMND1
<u>SALL1</u>	SERAC1	SERPINB6	SIX1	SLC17A8	SLC19A2	SLC26A4	SLC33A1	SLC52A2	SLC52A3
SLITRK6	SMPX	SNAI2	SOX10	SPATA5	STRC	SYNE4	TBC1D24	TECTA	TIMM8A
TJP2	TMC1	TMEM132E	TMIE	TMPRSS3	TPRN	TRIOBP	<u>TRPV4</u>	TSPEAR	USH1C
USH1G	USH2A	WFS1	WHRN	XYLT2					

Anexo C: 165 genes consistentemente asociados con la pérdida auditiva neurosensorial o mixta hereditaria.

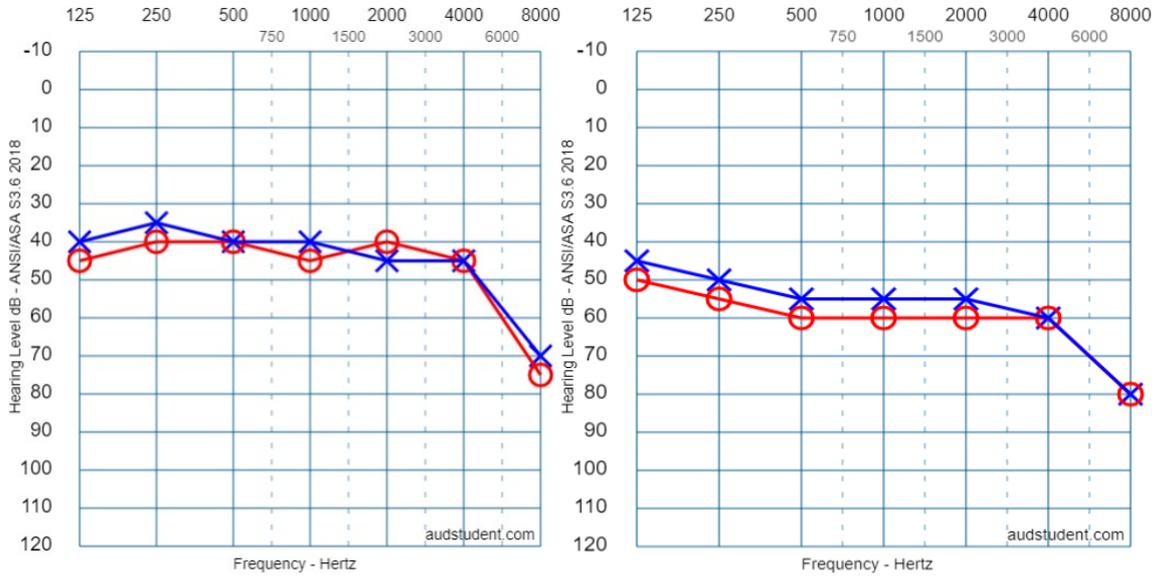
GENES CANDIDATOS

<i>ADCY1</i>	<i><u>AP3D1</u></i>	<i>ATP2B2</i>	<i>ATP6V1B2</i>	<i>BDP1</i>	<i>CATSPER2</i>	<i><u>CCS</u></i>	<i><u>CD151</u></i>	<i><u>CD164</u></i>	<i><u>CDC14A</u></i>
<i><u>CLIC5</u></i>	<i>COL9A2</i>	<i>COQ6</i>	<i>CRYM</i>	<i>DCDC2</i>	<i>DIAPH3</i>	<i>DSPP</i>	<i>ELMOD3</i>	<i>EPS8</i>	<i><u>ERAL1</u></i>
<i><u>EXOSC2</u></i>	<i>FBLN1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>FOXI1</i>	<i>GRXCR2</i>	<i><u>GSTP1</u></i>	<i>GTF2IRD1</i>	<i>HMX2</i>	<i>HMX3</i>
<i>KITLG</i>	<i>MAF</i>	<i><u>MAFB</u></i>	<i>MARS2</i>	<i>MCM2</i>	<i>MT-CO3</i>	<i>MT-TA</i>	<i>MT-TE</i>	<i>MT-TS2</i>	<i>NDUFA13</i>
<i>NFIX</i>	<i><u>NTRK3</u></i>	<i><u>PANX1</u></i>	<i><u>PMP22</u></i>	<i>PNPT1</i>	<i><u>POLD1</u></i>	<i><u>PSIP1</u></i>	<i><u>PTPRD</u></i>	<i><u>RAI1</u></i>	<i>RIPOR2</i>
<i><u>ROR1</u></i>	<i><u>S1PR2</u></i>	<i>SEMA3E</i>	<i>SIX5</i>	<i>SLC4A11</i>	<i>SLC9A1</i>	<i><u>SLC22A4</u></i>	<i>SLC26A5</i>	<i><u>SLC44A4</u></i>	<i><u>TBL1XR1</u></i>
<i>TK2</i>	<i>TMPRSS5</i>	<i>TNC</i>	<i>TP63</i>	<i><u>TUBB4B</u></i>	<i><u>TWIST1</u></i>	<i><u>WBP2</u></i>	<i><u>YWHAH</u></i>		

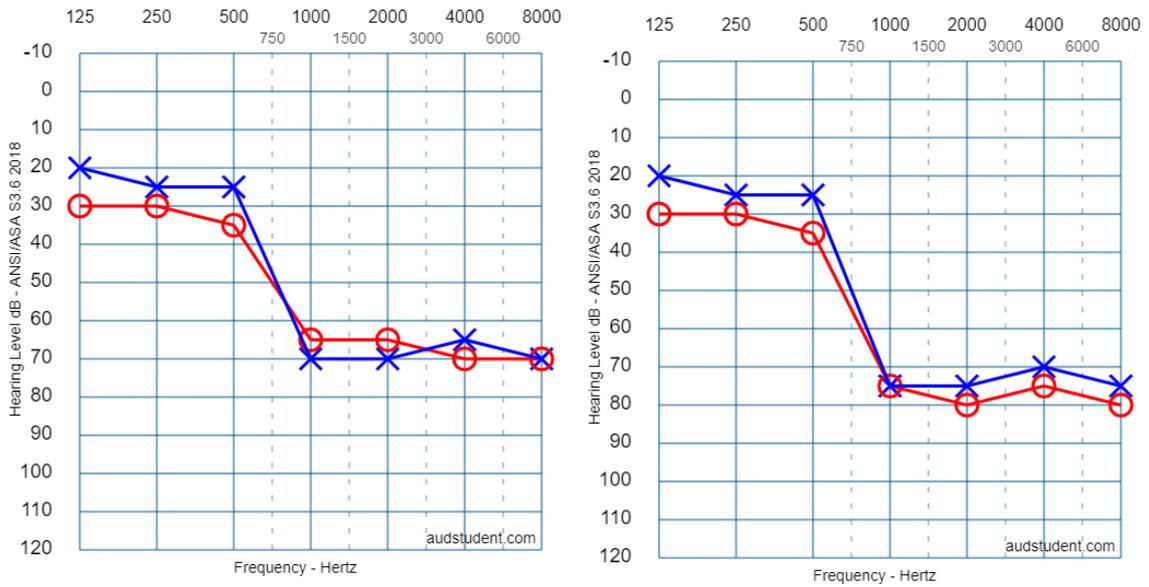
Anexo D: 68 genes con evidencia preliminar que los asocia con pérdida auditiva neurosensorial hereditaria o mixta.

Anexo E: Audiometrías tonales de los pacientes con variantes P/PP.

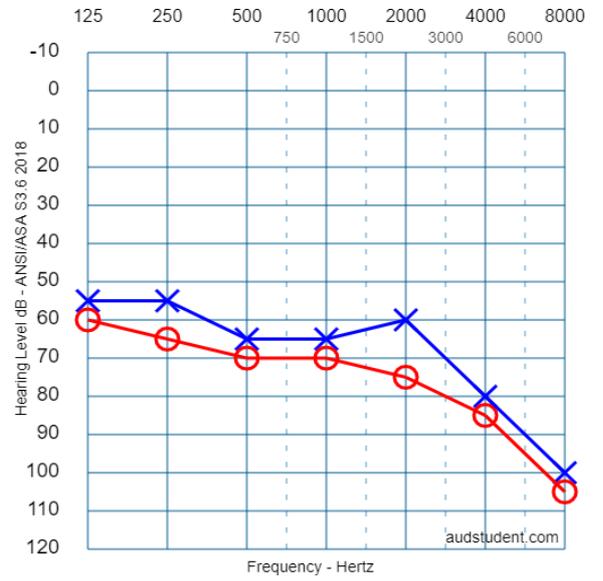
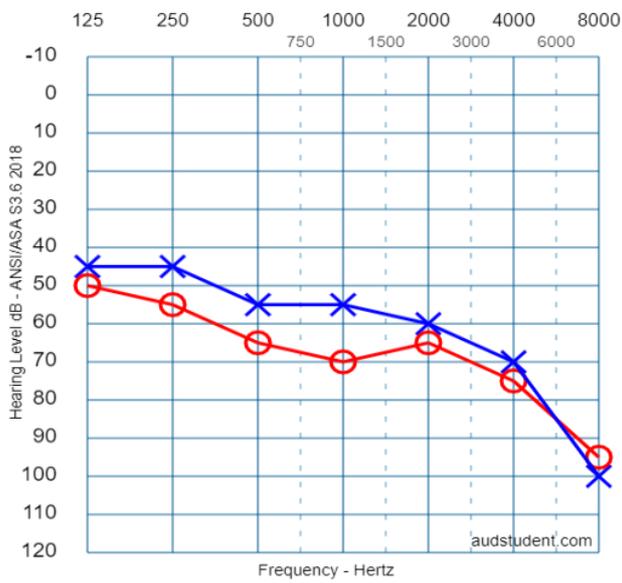
Caso 1 TECTA: 2010 y 2020



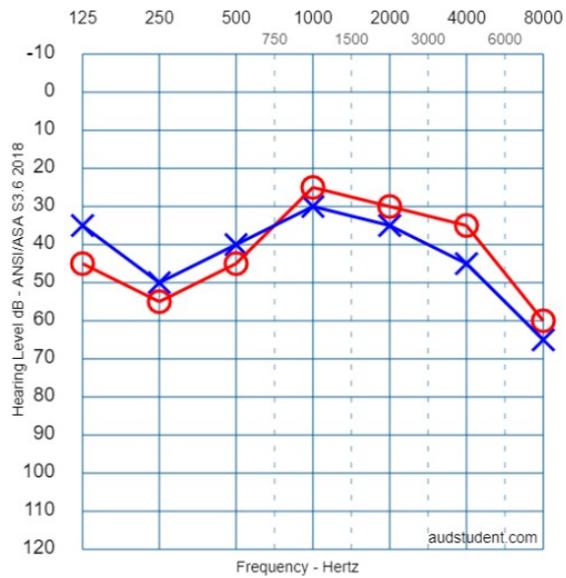
Caso 2 ACTG1: 2016 y 2020



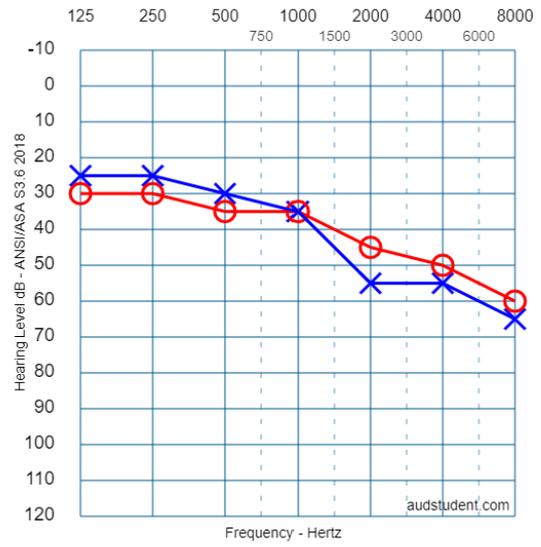
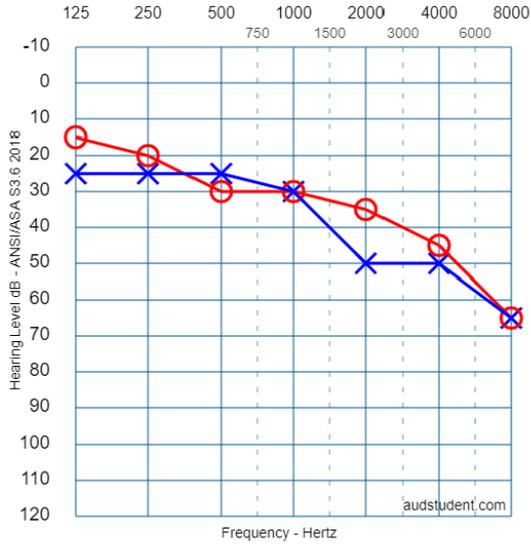
Caso 3 KNCQ4: 2016 y 2021



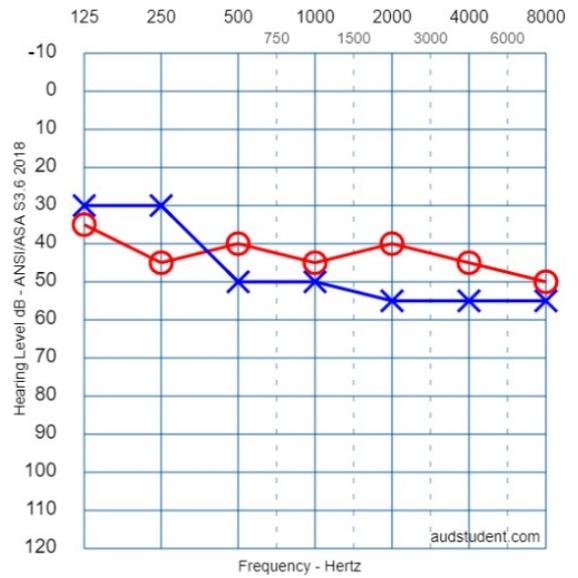
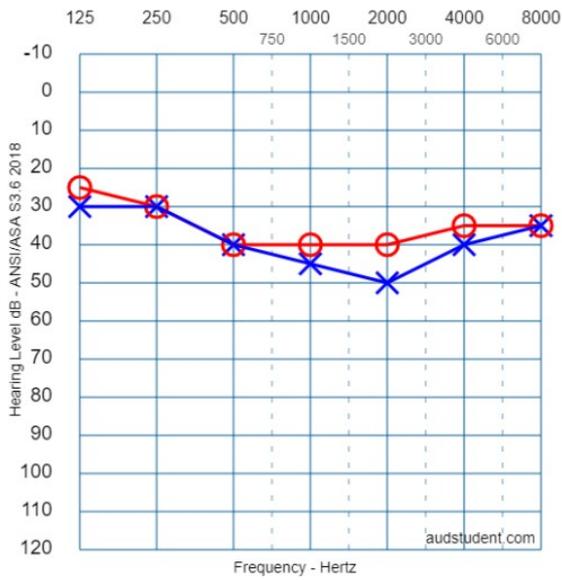
Caso 4 TECTA: 2018



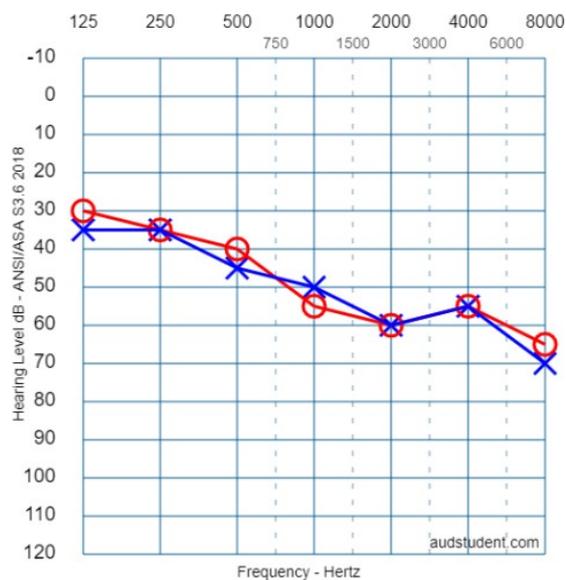
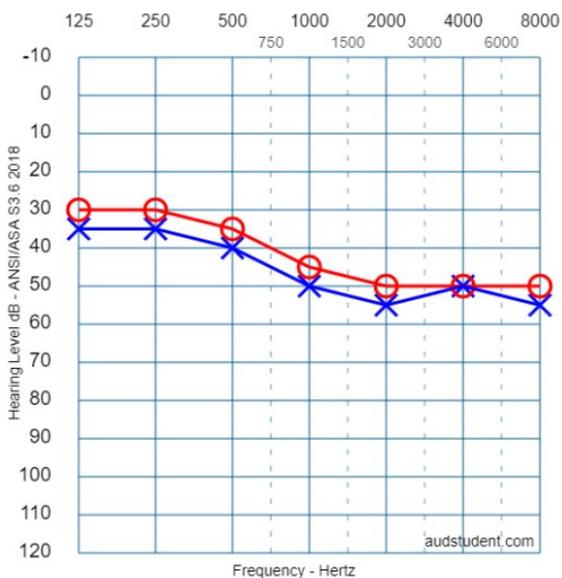
Caso 5 GJB2: 2016 y 2020



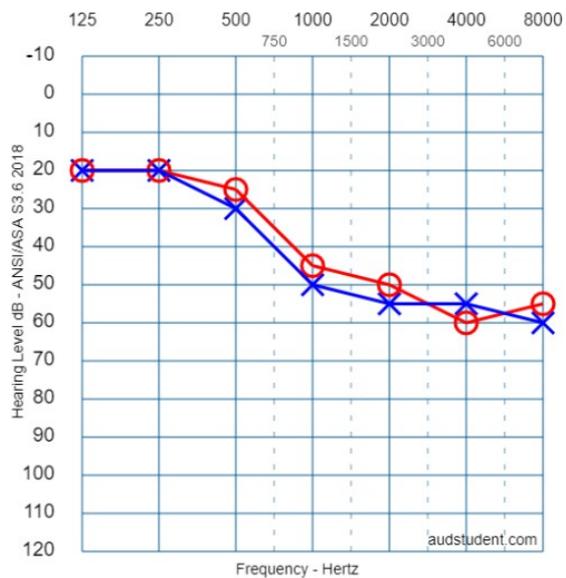
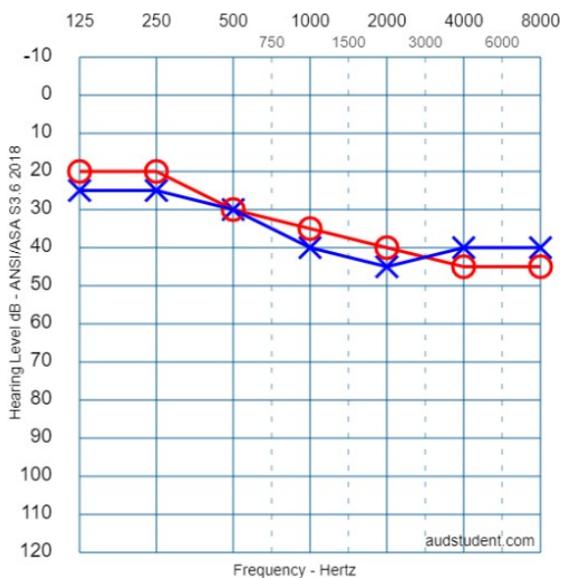
Caso 6 TECTA: 2011 y 2020



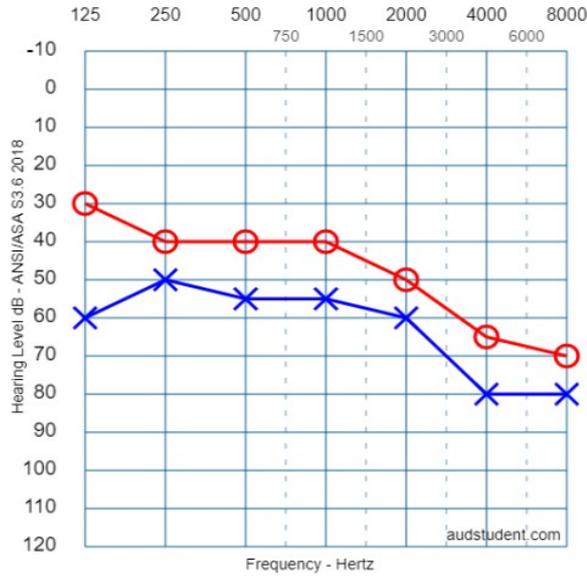
Caso 7 COL2A1: 2014 y 2020



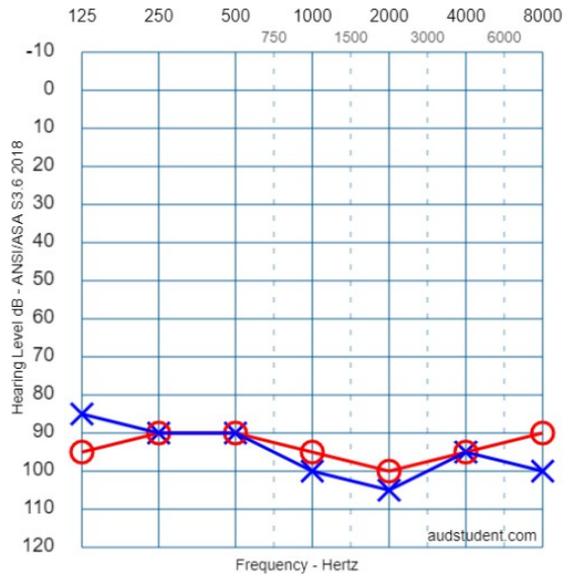
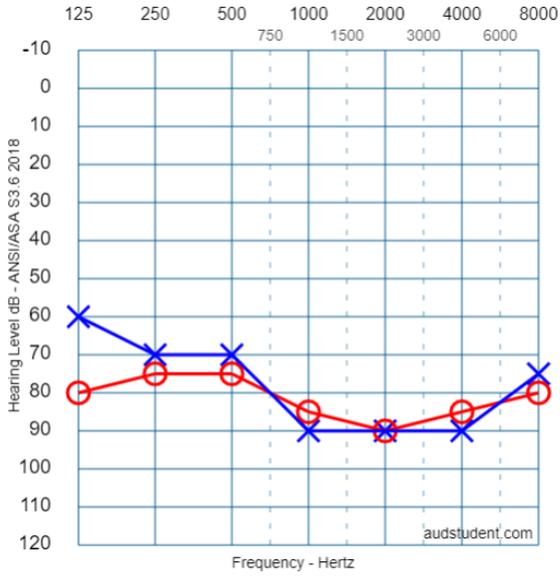
Caso 8 KNCQ4: 2010 y 2020



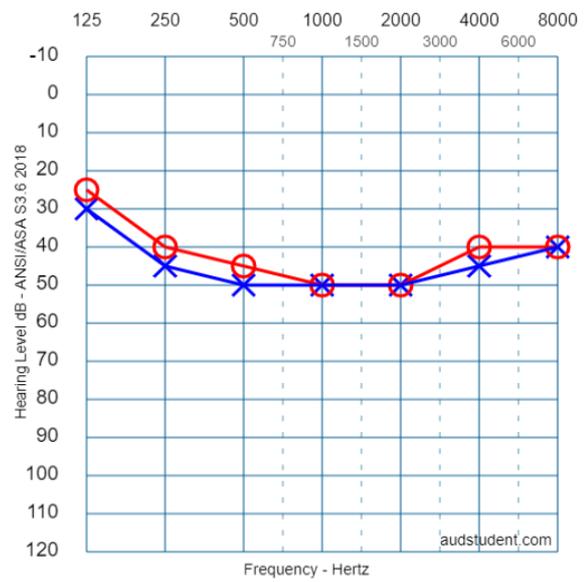
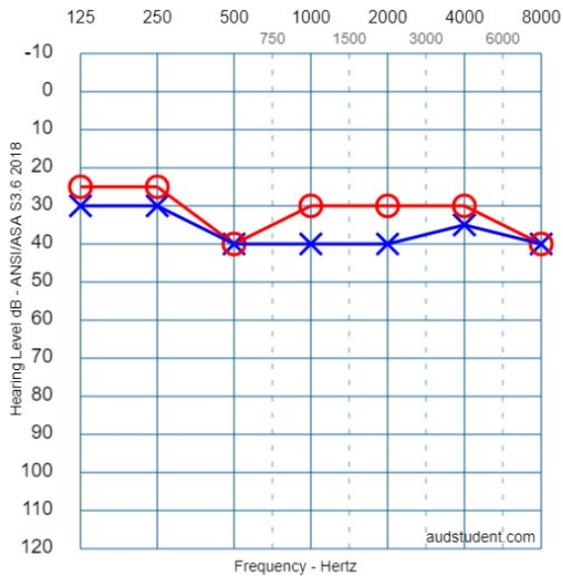
Caso 9 GJB2: 2019



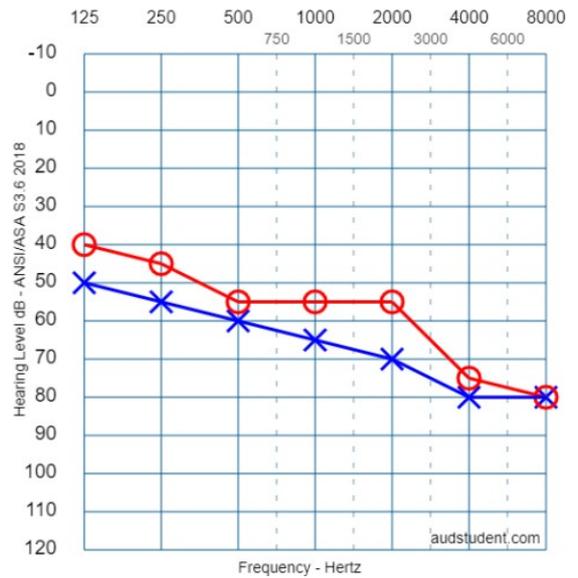
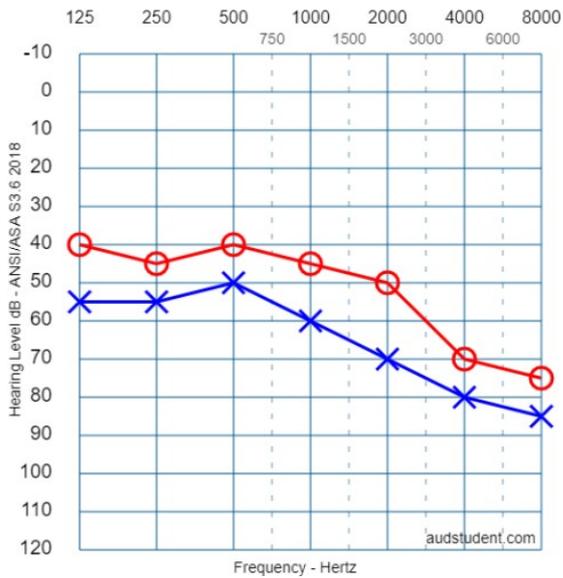
Caso 10 ABDH12: 2012 y 2018



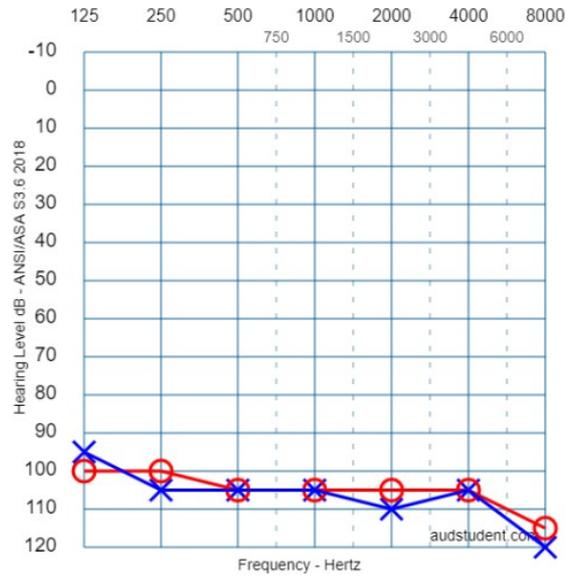
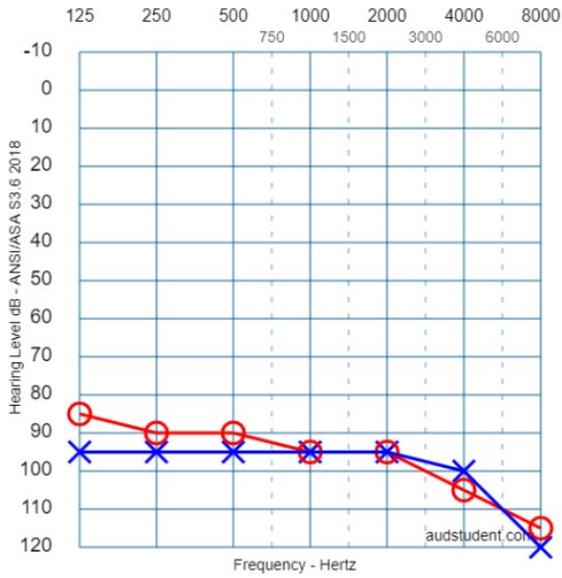
Caso 11 TECTA: 2010 y 2020



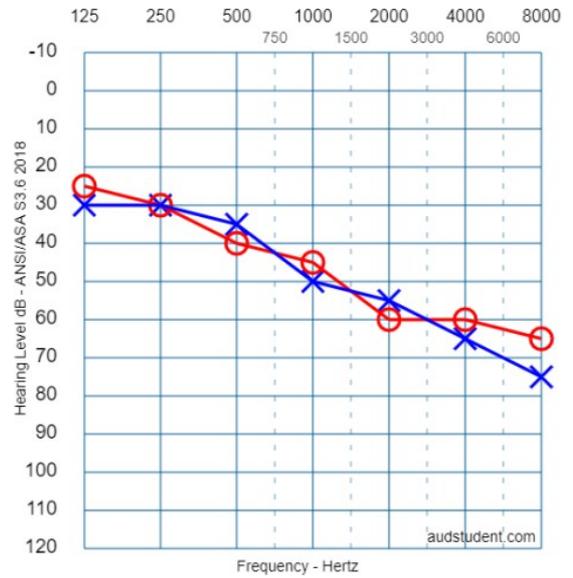
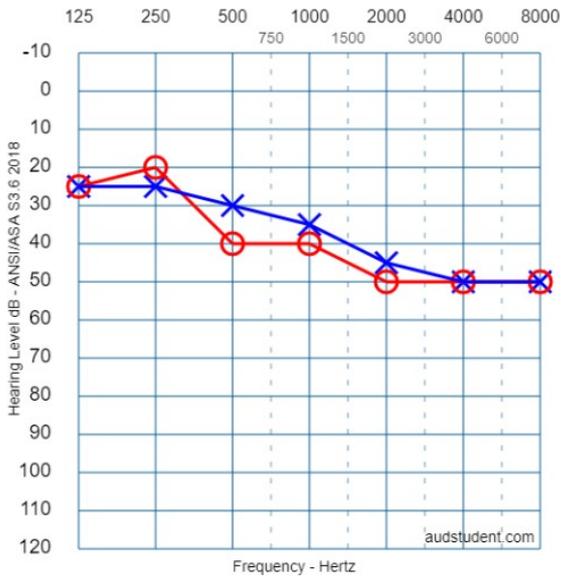
Caso 12 COCH-COL2A1: 2016 y 2020



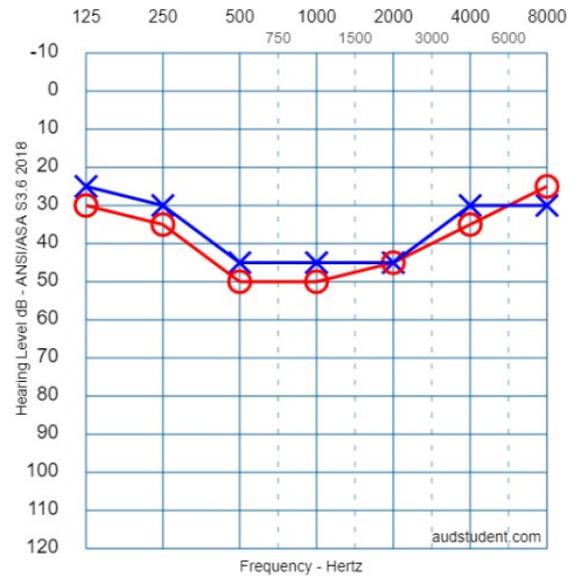
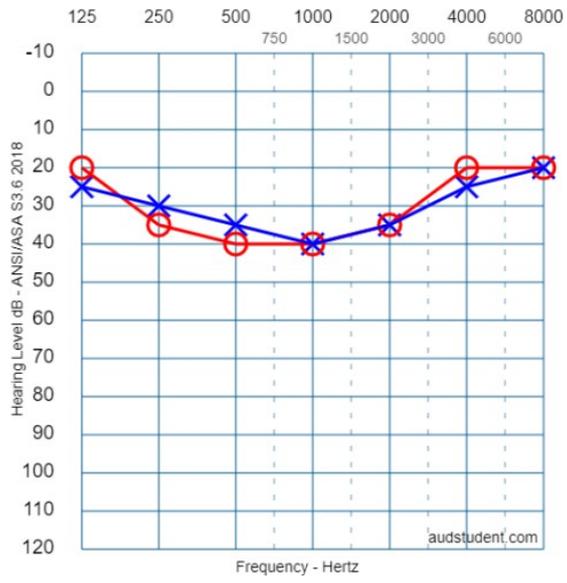
Caso 13 COCH: 2016 y 2020



Caso 14 STRC: 2014 y 2020



Caso 15 KNCQ4: 2018 y 2021



BIBLIOGRAFÍA

1. Nunez-Batalla, F., et al., *New-born Hearing Screening Programmes in 2020: CODEPEH Recommendations*. Acta Otorrinolaringol Esp (Engl Ed), 2021. 72(5): p. 312-323.
2. Cabanillas, R., et al., *Comprehensive genomic diagnosis of non-syndromic and syndromic hereditary hearing loss in Spanish patients*. BMC Med Genomics, 2018. 11(1): p. 58.
3. Costales, M., et al., *Clinical utility of next-generation sequencing in the aetiological diagnosis of sensorineural hearing loss in a Childhood Hearing Loss Unit*. Acta Otorrinolaringol Esp, 2019.
4. Cabanillas Farpon, R. and J. Cadinanos Banales, *Hereditary hearing loss: genetic counselling*. Acta Otorrinolaringol Esp, 2012. 63(3): p. 218-29.
5. Loughrey, D.G., et al., *Association of Age-Related Hearing Loss With Cognitive Function, Cognitive Impairment, and Dementia: A Systematic Review and Meta-analysis*. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2018. 144(2): p. 115-126.
6. Panza, F., et al., *Sensorial frailty: age-related hearing loss and the risk of cognitive impairment and dementia in later life*. Ther Adv Chronic Dis, 2019. 10: p. 2040622.
7. Omichi, R., et al., *Gene therapy for hearing loss*. Hum Mol Genet, 2019. 28(R1): p. R65-R79.
8. Ma, Y., et al., *New molecular therapies for the treatment of hearing loss*. Pharmacol Ther, 2019. 200: p. 190-209.
9. Saroul, N., et al., *Fisiología coclear: bases anatómicas, celulares y electrofisiológicas*. EMC - Otorrinolaringología, 2016. 45(1): p. 1-22.
10. Ekdale, E.G., *Form and function of the mammalian inner ear*. J Anat, 2016. 228(2): p. 324-37.
11. Bommakanti, K., J.S. Iyer, and K.M. Stankovic, *Cochlear histopathology in human genetic hearing loss: State of the science and future prospects*. Hear Res, 2019. 382: p. 107785.
12. Zhao, M., et al., *Characteristics of hearing loss-associated gene mutations: A multi-center study of 119,606 neonates in Gannan*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2023. 174: p. 11744.
13. Mey, K., et al., *The Natural History of Hearing Loss in Pendred Syndrome and Non-Syndromic Enlarged Vestibular Aqueduct*. Otol Neurotol, 2019. 40(3): p. 178-185.
14. Azzadeh-Roodpish, S., M.H. Garzon, and S. Mainali, *Classifying single nucleotide polymorphisms in humans*. Mol Genet Genomics, 2021. 296(5): p. 1161-1173.
15. Izumi, T., *Analysis of Copy Number Variation of DNA Repair/Damage Response Genes in Tumor Tissues*. Methods Mol Biol, 2023. 2701: p. 231-242.

16. Haworth, A., H. Savage, and N. Lench, *Diagnostic Genomics and Clinical Bioinformatics*, in *Medical and Health Genomics*. 2016. p. 37-50.
17. Zhang, L., Q. Lu, and C. Chang, *Epigenetics in Health and Disease*. Adv Exp Med Biol, 2020. 1253: p. 3-55.
18. Kesner, J.S., et al., *Noncoding translation mitigation*. Nature, 2023. 617(7960): p. 395-402.
19. Liao, W.W., et al., *A draft human pangenome reference*. Nature, 2023. 617(7960): p. 312-324.
20. Visscher, P.M., et al., *10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation*. Am J Hum Genet, 2017. 101(1): p. 5-22.
21. Johnson, T.S., et al., *PseudoFuN: Deriving functional potentials of pseudogenes from integrative relationships with genes and microRNAs across 32 cancers*. Gigascience, 2019. 8(5).
22. Claes, K.B.M., T. Rosseel, and K. De Leeneer, *Dealing with Pseudogenes in Molecular Diagnostics in the Next Generation Sequencing Era*. Methods Mol Biol, 2021. 2324: p. 363-381.
23. Frazer, K.A. and N.J. Schork, *The human pangenome reference anticipates equitable and fundamental genomic insights*. Cell Genom, 2023. 3(7): p. 10360.
24. Buchanan, J., et al., *Do health professionals value genomic testing? A discrete choice experiment in inherited cardiovascular disease*. Eur J Hum Genet, 2019. 27(11): p. 1639-1648.
25. Nozu, K., et al., *A review of clinical characteristics and genetic backgrounds in Alport syndrome*. Clin Exp Nephrol, 2019. 23(2): p. 158-168.
26. Rigobello, R., et al., *Clinical Pharmacogenomic MT-RNR1 Screening for Aminoglycoside-Induced Ototoxicity and the Post-Test Counseling Conundrum*. Clin Pharmacol Ther, 2023. 114(2): p. 262-265.
27. Chen, A., et al., *Otological manifestations in branchiootorenal spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis*. Clin Genet, 2021. 100(1): p. 3-13.
28. Najera, C., M. Beneyto, and J.M. Millan, *[Usher syndrome: an example of genetic heterogeneity]*. Med Clin (Barc), 2005. 125(11): p. 423-7.
29. Asgari, T., et al., *Keratitits-ichthyosis-deafness syndrome: Phenotypic heterogeneity and treatment perspective of patients with p.Asp50Asn GJB2 mutation*. Dermatol Ther, 2020. 33(6): p. 14493.
30. Crick, F., *Central dogma of molecular biology*. Nature, 1970. 227(5258): p. 561-3.

31. Sanger, F. and A.R. Coulson, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. J Mol Biol, 1975. 94(3): p. 441-8.
32. Maxam, A.M. and W. Gilbert, *A new method for sequencing DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(2): p. 560-4.
33. Lander E, e.a., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Naure, 2001. 409: p. 860-921.
34. Schenkel, L.C., et al., *Clinical Next-Generation Sequencing Pipeline Outperforms a Combined Approach Using Sanger Sequencing and Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification in Targeted Gene Panel Analysis*. J Mol Diagn, 2016. 18(5): p. 657-667.
35. Borgstrom, E., S. Lundin, and J. Lundeberg, *Large scale library generation for high throughput sequencing*. PLoS One, 2011. 6(4): p. 1919.
36. Picelli, S., et al., *Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects*. Genome Res, 2014. 24(12): p. 2033-40.
37. Turner, E.H., et al., *Methods for genomic partitioning*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2009. 10: p. 263-84.
38. Shendure, J. and H. Ji, *Next-generation DNA sequencing*. Nat Biotechnol, 2008. 26(10): p. 1135-45.
39. Chen, F., et al., *The history and advances of reversible terminators used in new generations of sequencing technology*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2013. 11(1): p. 34-40.
40. Oliver, G.R., S.N. Hart, and E.W. Klee, *Bioinformatics for clinical next generation sequencing*. Clin Chem, 2015. 61(1): p. 124-35.
41. Moorthie, S., A. Hall, and C.F. Wright, *Informatics and clinical genome sequencing: opening the black box*. Genet Med, 2013. 15(3): p. 165-71.
42. Brouwer, R.W., et al., *NARWHAL, a primary analysis pipeline for NGS data*. Bioinformatics, 2012. 28(2): p. 284-5.
43. Flicek, P. and E. Birney, *Sense from sequence reads: methods for alignment and assembly*. Nat Methods, 2009. 6(11 Suppl): p. 6-12.
44. Dineiro, M., et al., *Comprehensive genomic diagnosis of inherited retinal and optical nerve disorders reveals hidden syndromes and personalized therapeutic options*. Acta Ophthalmol, 2020. 98(8): p. 1034-1048.
45. Feng, Y., et al., *Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2015. 13(1): p. 4-16.

46. Sun, Y., et al., *Next-generation diagnostics: gene panel, exome, or whole genome?* Hum Mutat, 2015. 36(6): p. 648-55.
47. Lee, Y.H., et al., *Revisiting Genetic Epidemiology with a Refined Targeted Gene Panel for Hereditary Hearing Impairment in the Taiwanese Population.* Genes, 2023. 14(4).
48. Retterer, K., et al., *Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications.* Genet Med, 2016. 18(7): p. 696-704.
49. Fichna, J.P., et al., *Whole-exome sequencing identifies novel pathogenic mutations and putative phenotype-influencing variants in Polish limb-girdle muscular dystrophy patients.* Hum Genomics, 2018. 12(1): p. 34.
50. Laurent, S., et al., *Molecular characterization of pathogenic OTOA gene conversions in hearing loss patients.* Hum Mutat, 2021. 42(4): p. 373-377.
51. Rodríguez-Santiago, B. and L. Armengol, *Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal.* Diagnóstico Prenatal, 2012. 23(2): p. 56-66.
52. Ingham, N.J., et al., *Functional analysis of candidate genes from genome-wide association studies of hearing.* Hear Res, 2020. 387: p. 10879.
53. Sugiyama, K., et al., *Mid-Frequency Hearing Loss Is Characteristic Clinical Feature of OTOA-Associated Hearing Loss.* Genes (Basel), 2019. 10(9).
54. Shah, N., et al., *Identification of Misclassified ClinVar Variants via Disease Population Prevalence.* Am J Hum Genet, 2018. 102(4): p. 609-619.
55. Sims, D., et al., *Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses.* Nat Rev Genet, 2014. 15(2): p. 121-32.
56. Amberger, J.S., et al., *OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM(R)), an online catalog of human genes and genetic disorders.* Nucleic Acids Res, 2015. 43(Database issue): p. 789-98.
57. Landrum, M.J., et al., *ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence.* Nucleic Acids Res, 2018. 46(D1): p. 1062-1067.
58. Rehm, H.L., et al., *ClinGen--the Clinical Genome Resource.* N Engl J Med, 2015. 372(23): p. 2235-42.
59. Richards, S., 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): p. 405-24.

60. Oza, A.M., et al., *Expert specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss*. Hum Mutat, 2018. 39(11): p. 1593-1613.
61. Amendola, L.M., et al., *Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium*. Am J Hum Genet, 2016. 99(1): p. 247.
62. Abou Tayoun, A.N., et al., *Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion*. Hum Mutat, 2018. 39(11): p. 1517-1524.
63. Brnich, S.E., et al., *Recommendations for application of the functional evidence PS3/BS3 criterion using the ACMG/AMP sequence variant interpretation framework*. Genome Med, 2019. 12(1): p. 3.
64. Hoffman-Andrews, L., *The known unknown: the challenges of genetic variants of uncertain significance in clinical practice*. J Law Biosci, 2017. 4(3): p. 648-657.
65. Puente, X.S., et al., *Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia*. Nature, 2011. 475(7354): p. 101-5.
66. Valdes-Mas, R., et al., *Estimation of copy number alterations from exome sequencing data*. PLoS One, 2012. 7(12): p. e51422.
67. Xie, M.X., et al., *G59S mutation in the GJB2 gene in a Chinese family with classic Vohwinkel syndrome*. J Dermatol, 2019. 46(2): p. 154-157.
68. Ozturk, S., et al., *A Deletion Mutation of the Connexin 26 (Gjb2) Gene in a Turkish Patient with Vohwinkel Syndrome*. Genet Couns, 2016. 27(2): p. 187-91.
69. Richards, A.J. and M.P. Snead, *The influence of pre-mRNA splicing on phenotypic modification in Stickler's syndrome and other type II collagenopathies*. Eye (Lond), 2008. 22(10): p. 1243-50.
70. Hildebrand, M.S., et al., *DFNA8/12 caused byTECTA mutations is the most identified subtype of nonsyndromic autosomal dominant hearing loss*. Hum Mutat, 2011. 32(7): p. 825-34.
71. Capalbo, A., et al., *Optimizing clinical exome design and parallel gene-testing for recessive genetic conditions in preconception carrier screening: Translational research genomic data from 14,125 exomes*. PLoS Genet, 2019. 15(10): p. 1009.
72. Zelante, L., et al., *Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans*. Hum Mol Genet, 1997. 6(9): p. 1605-9.

73. Morell, R.J., et al., *Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness*. N Engl J Med, 1998. 339(21): p. 1500-5.
74. Pampanos, A., et al., *Pseudodominant inheritance of DFNB1 deafness due to the common 35delG mutation*. Clin Genet, 2000. 57(3): p. 232-4.
75. Marlin, S., et al., *Connexin 26 gene mutations in congenitally deaf children: pitfalls for genetic counseling*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2001. 127(8): p. 927-33.
76. Mese, G., et al., *Altered gating properties of functional Cx26 mutants associated with recessive non-syndromic hearing loss*. Hum Genet, 2004. 115(3): p. 191-9.
77. Mese, G., et al., *Connexin26 deafness associated mutations show altered permeability to large cationic molecules*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. 295(4): p. C966-74.
78. Copikova, J., et al., *Expanding the phenotype spectrum associated with pathogenic variants in the COL2A1 and COL11A1 genes*. Ann Hum Genet, 2020. 84(5): p. 380-392.
79. Wilcox, S.A., et al., *High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene*. Hum Genet, 2000. 106(4): p. 399-405.
80. Kelley, P.M., et al., *Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss*. Am J Hum Genet, 1998. 62(4): p. 792-9.
81. Fiskerstrand, T., et al., *Mutations in ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: An inborn error of endocannabinoid metabolism*. Am J Hum Genet, 2010. 87(3): p. 410-7.
82. Freddi, S., R. Savarirayan, and J.F. Bateman, *Molecular diagnosis of Stickler syndrome: a COL2A1 stop codon mutation screening strategy that is not compromised by mutant mRNA instability*. Am J Med Genet, 2000. 90(5): p. 398-406.
83. Sun, W., et al., *Exome Sequencing on 298 Probands With Early-Onset High Myopia: Approximately One-Fourth Show Potential Pathogenic Mutations in RetNet Genes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. 56(13): p. 8365-72.
84. Xiong, H.Y., et al., *RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease*. Science, 2015. 347(6218): p. 12806.
85. Mandelker, D., et al., *Comprehensive diagnostic testing for stereocilin: an approach for analyzing medically important genes with high homology*. J Mol Diagn, 2014. 16(6): p. 639-47.
86. Vona, B., et al., *DFNB16 is a frequent cause of congenital hearing impairment: implementation of STRC mutation analysis in routine diagnostics*. Clin Genet, 2015. 87(1): p. 49-55.

87. Azaiez, H., et al., *Genomic Landscape and Mutational Signatures of Deafness-Associated Genes*. Am J Hum Genet, 2018. 103(4): p. 484-497.
88. Shearer, A.E., et al., *Advancing genetic testing for deafness with genomic technology*. J Med Genet, 2013. 50(9): p. 627-34.
89. Houge, G., et al., *Stepwise ABC system for classification of any type of genetic variant*. Eur J Hum Genet, 2021.
90. Alford, R.L., 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): p. 347-55.
91. Chang, M.Y., et al., *Expansion of phenotypic spectrum of MYO15A pathogenic variants to include postlingual onset of progressive partial deafness*. BMC Med Genet, 2018. 19(1): p. 29.
92. Karaca, E., et al., *Phenotypic expansion illuminates multilocus pathogenic variation*. Genet Med, 2018. 20(12): p. 1528-1537.
93. Yu, H. and V.W. Zhang, *Precision Medicine for Continuing Phenotype Expansion of Human Genetic Diseases*. Biomed Res Int, 2015. 2015: p. 745043.
94. Uehara, N., et al., *Genetic background in late-onset sensorineural hearing loss patients*. J Hum Genet, 2022. 67(4): p. 223-230.
95. Kim, B.J., et al., *Distinct vestibular phenotypes in DFNA9 families with COCH variants*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2016. 273(10): p. 2993-3002.
96. Yasukawa, R., et al., *The Prevalence and Clinical Characteristics ofTECTA-Associated Autosomal Dominant Hearing Loss*. Genes, 2019. 10(10).
97. DeMille, D., et al., *Three novel GJB2 (connexin 26) variants associated with autosomal dominant syndromic and nonsyndromic hearing loss*. Am J Med Genet A, 2018. 176(4): p. 945-950.
98. Press, E.R., et al., *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): p. 9721-9732.
99. Homma, K., *The Pathological Mechanisms of Hearing Loss Caused by KCNQ1 and KCNQ4 Variants*. Biomedicines, 2022. 10(9).
100. Sloan-Heggen, C.M. and R.J. Smith, *Navigating genetic diagnostics in patients with hearing loss*. Curr Opin Pediatr, 2016. 28(6): p. 705-712.

101. Shearer, A.E. and R.J. Smith, *Massively Parallel Sequencing for Genetic Diagnosis of Hearing Loss: The New Standard of Care*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015. 153(2): p. 175-82.
102. Bademci, G., 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): p. 364-71.
103. Cada, Z., 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): p. 3353-3358.
104. Ren, Y., L.D. Landegger, and K.M. Stankovic, *Gene Therapy for Human Sensorineural Hearing Loss*. *Front Cell Neurosci*, 2019. 13: p. 323.
105. Crane, R., et al., *Gene Therapy to the Retina and the Cochlea*. *Front Neurosci*, 2021. 15: p. 65225.
106. Carpena, N.T. and M.Y. Lee, *Genetic Hearing Loss and Gene Therapy*. *Genomics Inform*, 2018. 16(4): p. 20.