



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO
GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO GENÉTICO EN PACIENTES CON HIPOACUSIA DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

AUTORA:

Sara Juárez Rodríguez
4º de Biotecnología

2019/2020

COTUTORA:

Elena Aller Mañas

TUTOR UCV:

José Rafael Blesa Blesa



Instituto de Investigación
Sanitaria La Fe



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

AGRADECIMIENTOS

Después de un intenso período, escribo este apartado de agradecimientos para finalizar mi trabajo de fin de grado (TFG). Ha sido tiempo de aprendizaje, no solo en el campo científico, sino también a nivel personal. Escribir este trabajo ha tenido un gran impacto en mí y es por eso por lo que me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado durante este proceso.

Primero de todo, me gustaría agradecer a mis compañeros del departamento de Biomedicina Molecular, Celular y Genómica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia), por su apoyo y constante ayuda cuando lo necesitaba, así como por la gran oportunidad que me han brindado. Particularmente me gustaría nombrar a mi supervisora Elena Aller. Sin su colaboración, este proyecto de fin de grado no podría haberse realizado.

Además, me gustaría darles las gracias todos los profesores de la Universidad Católica de Valencia (UCV), especialmente a mi tutor de TFG, José Rafael Blesa por sus constantes consejos a la hora de la realización de este proyecto.

También me gustaría agradecer a mis padres por su comprensión y apoyo. Siempre habéis estado ahí para mí.

Finalmente, mis amigos de siempre y a los del grado. No solo habéis estado ahí en los momentos difíciles, sino que también me habéis proporcionado un refugio.

De todo corazón, ¡muchas gracias!

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	III
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS HIPOACUSIAS	1
1.2 GENÉTICA DE LAS HIPOACUSIAS	3
1.3 DIAGNÓSTICO GENÉTICO	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
3.1 PACIENTES	17
3.2 DISEÑO PANEL NGS	17
3.3 SECUENCIACIÓN MEDIANTE PANEL NGS	18
3.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	19
3.4.1 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS Y FILTRADO DE VARIANTES	19
3.4.2 ANÁLISIS DE VARIANTES	21
3.5 COMPROBACIÓN DE LAS MUTACIONES POR SECUENCIACIÓN SANGER	25
3.5.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR	25
3.5.2 COMPROBACIÓN DE LA PCR	28
3.6. ANÁLISIS CNVs	31
3.6.1 MLPA	31
4. RESULTADOS	35
4.1 PACIENTES CON DIAGNÓSTICO POSITIVO	35
4.2 PACIENTES CON RESULTADO NO CONCLUYENTE	40
4.3 PACIENTES CON VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO (VOUS).	40
4.4 PACIENTES CON DIAGNÓSTICO NEGATIVO	43
5. DISCUSIÓN	45
6. CONCLUSIONES	51
7. BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ANATOMÍA DEL OÍDO. EL OÍDO ESTÁ COMPUESTO POR EL OÍDO EXTERNO, MEDIO E INTERNO _____	2
FIGURA 2. TRATAMIENTOS PARA LA PÉRDIDA AUDITIVA _____	3
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN DE LOS GENES RELACIONADOS CON HIPOACUSIA NO SIMDRÓMICA EN 140 CASOS EN ESPAÑA _____	6
FIGURA 4. CÓCLEA Y ÓRGANO ESPIRAL _____	7
FIGURA 5. LA ESTRÍA VASCULAR Y LAS CÉLULAS CILIADAS SENSORIALES _____	8
FIGURA 6. MAPA DE UN SEGMENTO DE ADN DE 600 KB QUE CONTIENE EL LOCUS DFNB1 _____	9
FIGURA 7. PROTOCOLO DE BRAVO NGS SURESELECTQXT AUTOMATED TARGET ENRICHMENT FOR ILLUMINA MULTIPLEXED SEQUENCING DE AGILENT® _____	18
FIGURA 8. FILTRADO DE LAS VARIANTES EN ALISSA INTERPRET DE AGILENT® _____	20
FIGURA 9. LISTADO DE LAS VARIANTES CON UNA FRECUENCIA MENOR A 0,002 EN LA POBLACIÓN GENERAL _____	22
FIGURA 10. VISUALIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ADN DE UN PACIENTE EN EL PROGRAMA IGV _____	24
FIGURA 11. CROMATOGRAMA DE LA SECUENCIA DIRECTA DE GJB2 PARA LA MUTACIÓN C.35DELG _____	31
FIGURA 12. PROTOCOLO DE LA TÉCNICA <i>MLPA</i> DE MRC-HOLLAND® _____	33
FIGURA 13. COMPROBACIÓN DE LA DELECIÓN DE MITF MEDIANTE LA TÉCNICA <i>MLPA</i> _____	36
FIGURA 14. VISUALIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ADN DE UN PACIENTE EN EL PROGRAMA IGV _____	42
FIGURA 15. VISUALIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ADN DE UN PACIENTE EN EL PROGRAMA IGV _____	43
FIGURA 16. REPRESENTACIÓN DE LOS GENES CAUSANTES DE HIPOACUSIA, ADEMÁS DEL NÚMERO DE PACIENTES AFECTADOS POR LOS MISMOS. _____	46

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. SORDERAS SINDRÓMICAS COMUNES _____	5
TABLA 2. LISTADO DE LOS 61 GENES RELACIONADOS CON HIPOACUSIA HEREDITARIA QUE SE HAN INCLUIDO EN EL PANEL NGS _____	17
TABLA 3. SECUENCIAS DE LOS PRIMERS UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL ADN POR PCR _____	25
TABLA 4. REACTIVOS Y VOLUMEN AÑADIDO A LA MEZCLA DE PCR. EN ESTA TABLA SE MUESTRAN LOS VOLÚMENES PARA LA REACCIÓN DE UNA MUESTRA _____	26
TABLA 5. CONDICIONES DE REACCIÓN DE LA PCR EN EL TERMOCICLADOR _____	27
TABLA 6. REACTIVOS Y VOLUMEN AÑADIDO A LA MEZCLA DE PCR PARA EL GEN GJB2 _____	27
TABLA 7. CONDICIONES DE REACCIÓN DE LA PCR EN EL TERMOCICLADOR PARA EL GEN GJB2 _____	28
TABLA 8. CONDICIONES DE REACCIÓN DE LA PCR EN EL TERMOCICLADOR PARA EL GEN OTOF _____	28
TABLA 9. CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE PURIFICACIÓN DE EXOSAP-ITTM EN EL TERMOCICLADOR _____	29
TABLA 10. REACTIVOS Y VOLÚMENES AÑADIDOS POR MUESTRA PARA SU SECUENCIACIÓN POR SANGER _____	30
TABLA 11. CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN EN EL TERMOCICLADOR _____	30
TABLA 12. PACIENTES CON MUTACIONES PUNTUALES DE CARÁCTER PATOLÓGICO O POSIBLEMENTE PATOLÓGICO, EN GENES DE HERENCIA DOMINANTE _____	37
TABLA 13. PACIENTES CON MUTACIONES DE CARÁCTER PATOLÓGICO O POSIBLEMENTE PATOLÓGICO, EN GENES DE HERENCIA RECESIVA _____	39
TABLA 14. PACIENTES CON RESULTADO NO CONCLUYENTE _____	40
TABLA 15. PACIENTES CON VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO (<i>VOUS</i>) _____	40
TABLA 16. PACIENTES CON VARIANTE LOCALIZADA EN EL PSEUDOGEN OTOAP1 ____	42

ABREVIATURAS

NGS: Next Generation Sequencing

CNV: Copy Number Variants

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

AD: Autosómico Dominante

AR: Autosómico Recesivo

VOUS: Variante de Significado Clínico Incierto

RESUMEN

La pérdida de audición es uno de los defectos sensoriales más comunes en humanos. Puede deberse a factores ambientales, causas genéticas, o a una combinación de ambos. La hipoacusia hereditaria se puede clasificar como sindrómica y no-sindrómica, siendo esta última responsable del 70% de los casos. Se han identificado más de 100 genes y más de mil mutaciones implicadas en esta patología, por lo que presenta una gran heterogeneidad genética. En este trabajo se pretende evaluar la eficiencia diagnóstica de un panel de secuenciación, de diseño propio, por *Next Generation Sequencing* (NGS) para el análisis de pacientes con hipoacusia neurosensorial.

En este estudio participaron 37 pacientes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia) a lo largo del 2019, a los cuales se les realizó una secuenciación masiva mediante un panel de secuenciación NGS, con los 61 genes más prevalentes causantes de hipoacusia hereditaria. Con este panel se detectaron mutaciones puntuales patológicas o posiblemente patológicas, las cuales se confirmaron posteriormente por secuenciación Sanger.

Además, se analizó la presencia de variantes en el número de copias (CNVs) de todas las muestras, ya que también pueden ser responsables de hipoacusia neurosensorial. Si había alguna variante candidata, esta se confirmaba por el método de *MLPA*.

Se detectaron mutaciones que podrían considerarse como posibles causantes de hipoacusia neurosensorial en 19 pacientes. En 1 de estos casos se detectó una CNV. También se vio que las mutaciones más predominantes en los pacientes clasificados como positivos se localizan en los genes *GJB2* y *TECTA*.

En conclusión, se consiguió diagnosticar genéticamente un 52,78% de los pacientes. Finalmente, se realizó un informe con los resultados del análisis para informar a los pacientes, además de ofrecerles consejo genético.

Palabras clave: sordera, hipoacusia neurosensorial, genes, *GJB2*, *TECTA*, panel de secuenciación, NGS, mutación puntual, CNVs.

ABSTRACT

Hearing loss is one of the most common sensory defects in humans. It can be caused by environmental factors, genetic causes, or a combination of both. Hereditary hearing loss can be classified as syndromic and non-syndromic, the latter being responsible for 70% of cases. More than 100 genes and more than a thousand mutations involved in this pathology have been identified, which is why it presents great genetic heterogeneity. This work aims to evaluate the diagnostic efficiency of a sequencing panel, of our own design, by *Next Generation Sequencing (NGS)* for the analysis of patients with sensorineural hearing loss.

In this study, 37 patients from La Fe University and Polytechnic Hospital (Valencia) participated in 2019, who underwent massive sequencing using an *NGS* sequencing panel, with the 61 most prevalent genes causing hereditary hearing loss. With this panel, pathological or possibly pathological point mutations were detected, which were subsequently confirmed by Sanger sequencing.

In addition, the presence of copy number variants (*CNVs*) of all samples was analyzed, since they may also be responsible for sensorineural hearing loss. If there was any candidate variant, it was confirmed by the *MLPA* method.

Mutations that could be considered as possible causes of sensorineural hearing loss were detected in 19 patients. In 1 of these cases, a *CNV* was detected. It was also found that the most predominant mutations in patients classified as positive are located in the *GJB2* and *TECTA* genes.

In conclusion, it was possible to genetically diagnose 52.78% of the patients. Finally, a report was made with the results of the analysis to inform patients, in addition to offering them genetic counseling.

Key words: deafness, sensorineural hearing loss, genes, *GJB2*, *TECTA*, sequencing panel, *NGS*, point mutation, *CNVs*.

1. INTRODUCCIÓN

La hipoacusia es una disminución de la capacidad auditiva. Esta pérdida auditiva es el déficit sensorial más común en humanos (Shearer & Smith, 2015). Según datos de la Organización Mundial de la Salud, se estima que más del 5% de la población mundial padece esta enfermedad, es decir, alrededor de 360 millones de personas (OMS, 2013).

Las causas de hipoacusia pueden ser ambientales, debido, por ejemplo, a una infección, genéticas, o incluso a una combinación de ambos tipos. La hipoacusia hereditaria se puede clasificar como sindrómica, si se asocia con malformaciones del oído externo, de otros órganos o problemas médicos que involucran otros órganos; y no-sindrómica (constituye el 70% de los casos), que aparece aislada, sin anomalías visibles en el oído externo, y sin problemas médicos relacionados, pero puede estar asociada a malformaciones del oído medio y/o interno (Shearer *et al.*, 1993; Van Camp & Smith, 2006)

La hipoacusia hereditaria es una enfermedad genéticamente muy heterogénea, habiendo más de 100 genes identificados y más de mil mutaciones implicadas (Van Camp & Smith, 2006). Por lo tanto, el diagnóstico genético para la hipoacusia no-sindrómica es extremadamente difícil, pero proporciona información sobre el pronóstico y la heredabilidad genética, pudiendo excluir de esta forma causas sindrómicas de la pérdida auditiva, y por lo tanto pruebas innecesarias y de alto coste (Shearer & Smith, 2015).

1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS HIPOACUSIAS

La hipoacusia puede clasificarse de diversas formas. Una de ellas es dependiendo de dónde se encuentre el defecto en el oído, denominándose conductiva cuando esas anomalías se sitúan en el oído externo y/o en los huesecillos del oído medio; neurosensorial si resulta del mal funcionamiento de estructuras del oído interno; y mixta si es una combinación de los dos tipos anteriormente nombrados (Shearer *et al.*, 1993) (Figura 1).

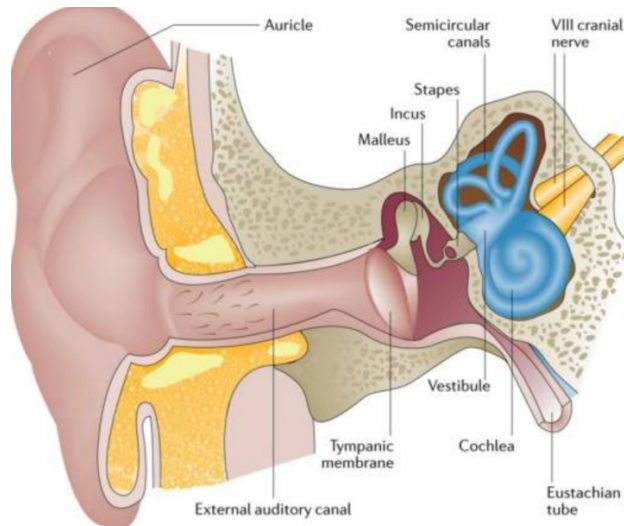


Figura 1. Anatomía del oído. El oído está compuesto por el oído externo, medio e interno. El oído externo incluye la aurícula y el canal auditivo externo, se separa del oído medio por la membrana timpánica. El oído medio, alberga tres huesos, el martillo, el yunque y el estribo, y une el oído externo y el interno. El oído interno se divide en la porción vestibular y la porción coclear (Korver et al. 2017).

Otra forma de clasificarla es según el momento en el que se desarrolla, llamándose prelingual si está presente antes de que se desarrolle el habla; y postlingual si esa pérdida de audición ocurre después del desarrollo del habla. Toda pérdida auditiva congénita, es decir, presente desde el nacimiento, es prelingual, pero no toda pérdida auditiva prelingual es congénita (Shearer et al., 1993).

El diagnóstico de la hipoacusia neurosensorial se puede llevar a cabo mediante test fisiológicos o audiometría. En esta última se evalúa la agudeza auditiva del paciente en decibelios (dB). La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la pérdida de audición leve entre 26-40 dB, moderada entre 41-60 dB, severa entre 61-80 dB y profunda >80 dB (Mackenzie & Smith, 2009). La pérdida de audición severa o profunda se conoce comúnmente como sordera, mientras que la leve o moderada se conoce como dificultad auditiva (Smith et al., 2005).

La restauración de la audición se logra mediante implantes auditivos o dispositivos no implantarles. Entre ellos se incluyen audífonos convencionales, implantes cocleares y audífonos anclados en los huesos, todos ellos observables en la siguiente imagen (Figura 2) (Korver et al., 2017).

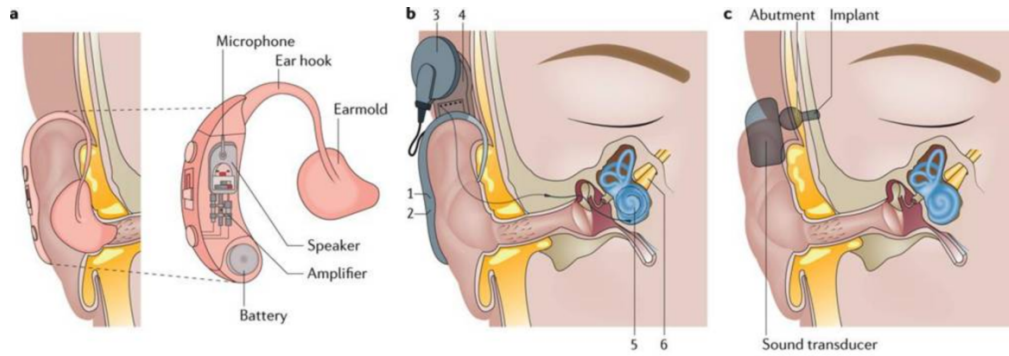


Figura 2. Tratamientos para la pérdida auditiva (Korver et al., 2017). A: audifono convencional; B: implante coclear convierte los sonidos en señales eléctricas, está compuesto por un micrófono (1) recoge los sonidos ambientales y los transmite a un procesador de voz. Una bobina magnética (3), transmite las señales acústicas desde el procesador de voz a un receptor/estimulador implantado subcutáneamente (4) que convierte la señal acústica en impulsos eléctricos. Los electrodos (5) colocado en la escala timpánica de la cóclea estimula directamente eléctricamente el nervio auditivo (6); C: audifono anclado en el hueso.

Los audífonos convencionales se emplean en la rehabilitación de la mayoría de los pacientes con pérdida auditiva neurosensorial. También se emplean en los que tienen pérdida auditiva conductiva, especialmente cuando las opciones médicas o quirúrgicas no son factibles (McCreery et al., 2012). Las limitaciones de los audífonos convencionales han generado una preferencia por los implantes auditivos en el oído medio.

Los implantes cocleares se usan en pacientes en los cuales la pérdida auditiva se ha vuelto severa o profunda (Gaylor et al., 2013), además de usarse también en pacientes con audición relativamente buena de baja frecuencia, pero mala de alta frecuencia, donde se usan implantes 'híbridos' o 'estimulación electroacústica' (Golub et al., 2012; Roland et al., 2016). Sin embargo, la necesidad de cirugía, los altos costos y la falta de reembolso han limitado su implementación.

También pueden estar disponibles otras opciones quirúrgicas para pacientes con hipoacusia conductiva por anomalías del conducto auditivo externo, membrana timpánica u osículos (Schwager, 2007).

1.2 GENÉTICA DE LAS HIPOACUSIAS

El déficit auditivo de carácter no-sindrómico suele ser neurosensorial. Actualmente, en los estudios acerca de las hipoacusias se ha observado una creciente demanda de

diagnóstico molecular y el posterior asesoramiento genético. El diagnóstico puede complicarse debido a múltiples loci genéticos o a diferentes mutaciones de un solo gen, a la existencia de pseudogenes y a otros factores, como la endogamia que existe en la comunidad de sordos (Rehman *et al.*, 2017).

Las hipoacusias tienen diferentes modos de herencia, siendo de herencia autosómica recesiva en un 80% de los casos (normalmente de carácter prelingual), y de herencia autosómica dominante en aproximadamente el 20% de los casos restantes (normalmente de carácter postlingual). También encontramos menos de un 1% de casos de herencia ligada al cromosoma X o mitocondrial (Hilgert *et al.*, 2009).

En el caso de las hipoacusias sindrómicas, el diagnóstico se basa en los signos clínicos observables. Aunque este sea aproximado, permite dirigir el diagnóstico molecular hacia los genes que se creen que son los implicados en el síndrome. Cabe señalar que muchos de estos signos característicos que acompañan la hipoacusia pueden aparecer años después (Suárez *et al.*, 2007). Se han identificado más de 400 síndromes con pérdida auditiva (McKusick, 2007). Algunos de los más importantes se presentan en la siguiente tabla (Tabla 1), indicando el tipo de herencia, los genes causantes y sus síntomas característicos (Suárez *et al.*, 2007; Van Camp & Smith, 2006).

Tabla 1. Sorderas sindrómicas comunes.

Síndrome	Herencia ¹	Genes	Características clínicas ²
Waardenburg	Tipo I: AD Tipo II: AD Tipo III: AD Tipo IV: AD, AR	Tipo I: <i>PAX3</i> Tipo II: <i>MITF</i> , <i>SNAI2</i> , <i>SOX10</i> Tipo III: <i>PAX3</i> Tipo IV: <i>ENDRB</i> , <i>EDN3</i> , <i>SOX10</i>	Anomalías pigmentarias de la piel, cabello e iris y pérdida de la audición.
Branchio-Oto-Renal (BOR)	AD	<i>EYA1</i> , <i>SIX5</i> , <i>SIX1</i>	Quistes branquiales o fístulas, y anomalías en el oído externo y medio y renales
Usher	Tipo I: AR Tipo II: AR Tipo III: AR	Tipo I: <i>MYO7A</i> , <i>CDH23</i> , <i>USH1C</i> , <i>PCDH15</i> , <i>SANS</i> , <i>CIB2</i> Tipo II: <i>WHRN</i> , <i>USH2A</i> , <i>ADGRV1</i> Tipo III: <i>CLRN1</i> , <i>HARS</i>	Se caracteriza por pérdida auditiva y retinosis pigmentaria
Pendred	AR	<i>SLC26A4</i> , <i>FOX11</i> , <i>KCNJ10</i>	Presenta bocio, hipoacusia y puede estar acompañado de trastornos vestibulares.
Jervell and Lange-Nielsen	AR	<i>KCNQ1</i> , <i>KCNE1</i>	Presenta pérdida auditiva neurosensorial bilateral profunda congénita, y arritmia cardiaca (intervalo QT largo)

¹. AD, autosómico dominante; AR, autosómico recesivo; X-linked, ligado al cromosoma X.

². Se mencionan las características clínicas más representativas de cada síndrome, además de las que afectan al oído o al sistema auditivo

En el caso de las hipoacusias no-sindrómicas, como ya se ha comentado anteriormente, se observa una alta heterogeneidad genética (Suárez *et al.*, 2007). Hasta la fecha, hay descritos 120 genes asociados (Van Camp & Smith, 2006), de los cuales se van a nombrar a continuación algunos de los más prevalentes en nuestra población (Figura 3).

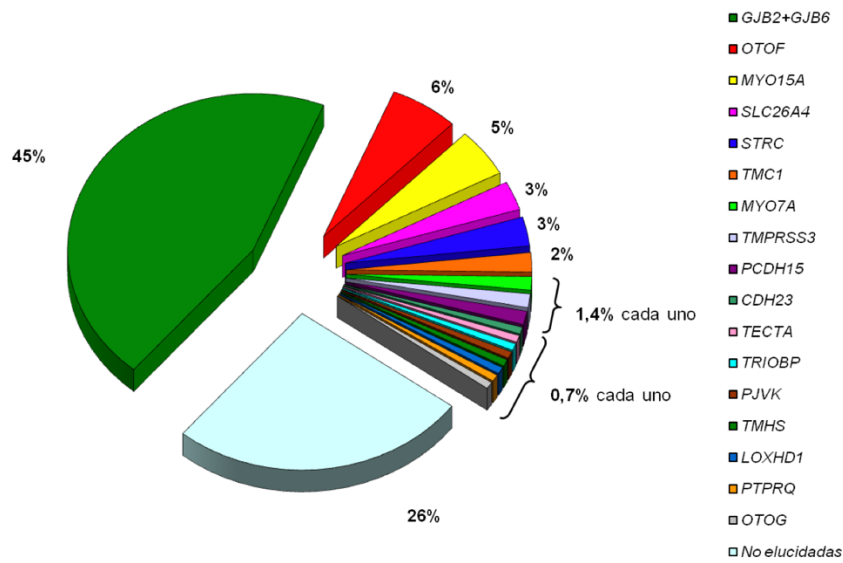


Figura 3. Representación de los genes relacionados con hipoacusia no-sindrómica en 140 casos en España (Dominguez, 2015).

GENES DE HERENCIA AUTOSÓMICA RECESIVA

En el tipo de herencia autosómica recesiva han sido descritos 76 genes que causan pérdida auditiva no-sindrómica (Van Camp & Smith, 2006).

- **GJB2**

Este gen codifica una proteína denominada conexina 26, un componente crítico de la vía intracelular para el ciclo del potasio entre la endolinfa y la perilinfa del oído interno, concretamente en el conducto coclear (Figura 4), en la estría vascular (Figura 5) (Kelsell *et al.*, 1997). Desde ese momento empezó a cobrar importancia ya que las mutaciones en este gen, *GJB2*, y *GJB6*, representan hasta el 50% de los casos con hipoacusia no-sindrómica de herencia autosómica recesiva (Lucotte & Mercier, 2001).

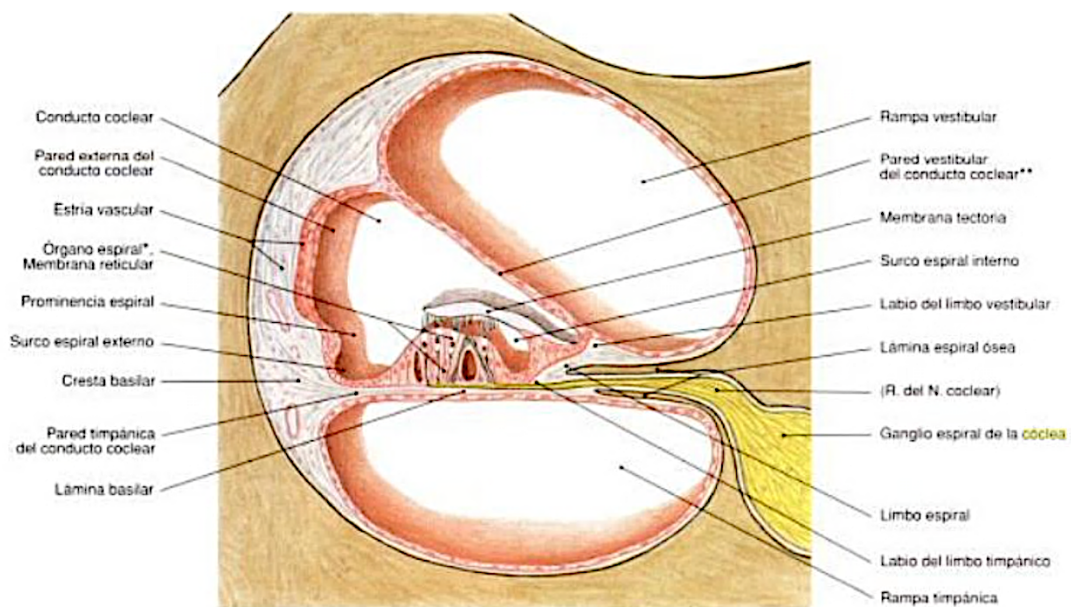


Figura 4. Cóclea y órgano espiral (Pabst et al., 2006).

*Órgano de Corti.

**Membrana de Reissner.

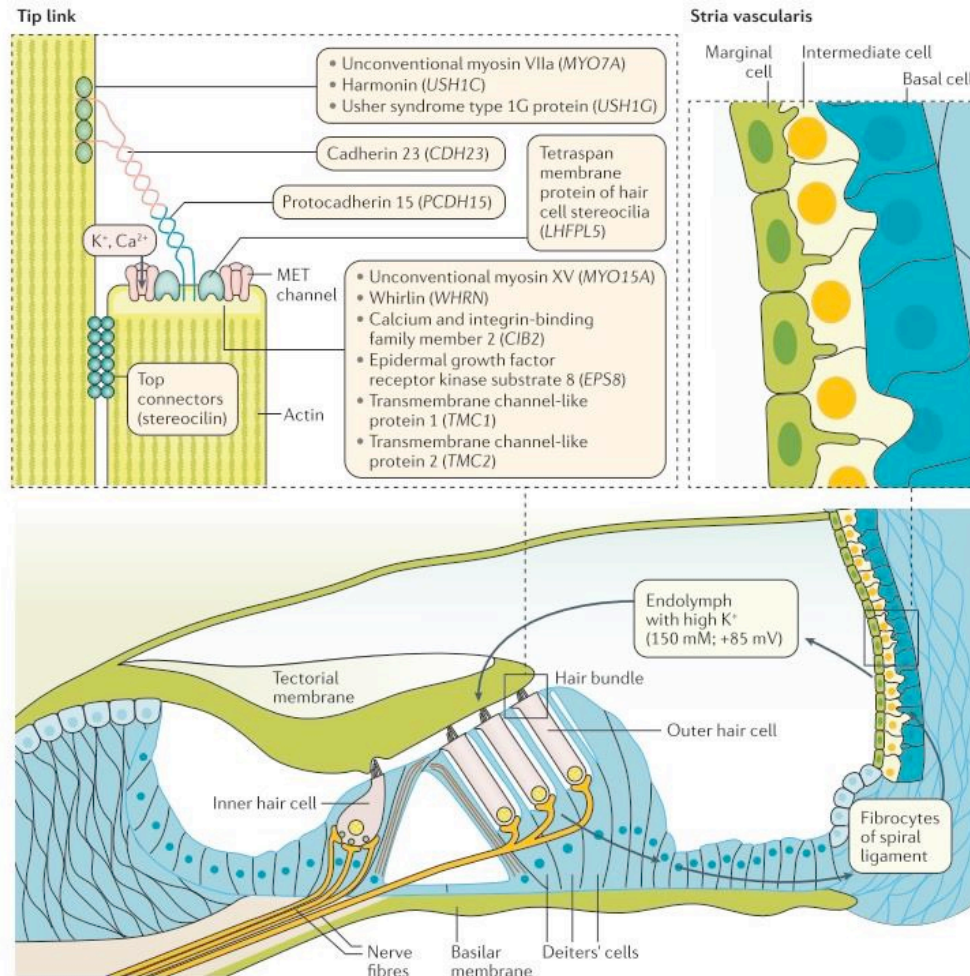


Figura 5. La estria vascular y las células ciliadas sensoriales. La estria vascular es un tejido especializado que produce la endolinfa. Se encuentra en la pared lateral del conducto endolinfático en la cóclea y consta de capas celulares marginales, intermedias y basales. La corriente de K^+ despolariza las células ciliadas y desencadena actividad eléctrica en las fibras del nervio auditivo (Korver *et al.*, 2017).

Se han identificado 361 mutaciones, siendo la mutación c.35delG la más común (Azadegan-Dehkordi *et al.*, 2019). Las mutaciones que son capaces de inactivar el gen *GJB2*, es decir, mutaciones sin sentido que generan codones de parada o mutaciones de desplazamiento de marco de lectura, se suelen asociar con hipoacusia severa/profunda. En cambio, las mutaciones de cambio de sentido que dan lugar a cambios de base produciendo la sustitución de aminoácidos, están asociadas con hipoacusia moderada y leve (Snoeckx *et al.*, 2005).

Se cree que deleciones de gran tamaño en regiones no codificantes adyacentes al gen *GJB6*, que codifica la proteína conexina 30, causan pérdida de audición por sus efectos sobre la expresión de *GJB2* (del Castillo *et al.*, 2002). En la siguiente figura

(Figura 6) se puede apreciar la poca distancia entre ambos genes y 2 deleciones de gran tamaño adyacentes al gen *GJB6* frecuentes en población española, del(*GJB6-D13S1830*) y del(*GJB6-D13S1854*) (del Castillo et al., 2005) :

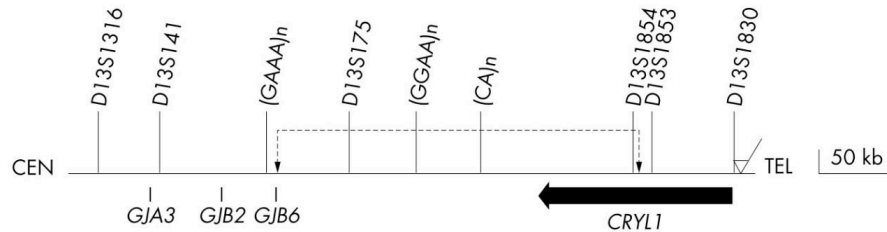


Figura 6. Mapa de un segmento de ADN de 600 kb que contiene el locus *DFNB1* (del Castillo et al., 2005). En este mapa se detallan dos deleciones en *GJB6*, del(*GJB6-D13S1830*) en azul y del(*GJB6-D13S1854*) en línea discontinua.

- **SLC26A4**

SLC26A4 codifica un transportador de aniones cloruro, yoduro y bicarbonato, denominado pendrina. Se sitúa en la glándula tiroides y el oído interno y se ha visto que está relacionada con la regulación del pH y la composición iónica de la endolinfa (Ammar-Khodja et al., 2015; Dossena et al., 2011).

Se ha visto que es el segundo gen con más prevalencia en casos de hipoacusia no-sindrómica además de poder también causar hipoacusia sindrómica, en el síndrome de Pendred (Hilgert et al., 2009; Royaux et al., 2001).

- **MYO15A**

Las mutaciones en el gen *MYO15A* causan hipoacusia no-sindrómica severa y profunda. Este gen codifica la miosina XVA, clave en el alargamiento gradual y el mantenimiento de los estereocilios y la organización de la actina en las células ciliadas del oído interno (Figura 5). Estos procesos son esenciales para que la audición funcione de manera normal (Wang et al., 1998).

- **OTOF**

El gen *OTOF* codifica la proteína otoferlina, esencial para la exocitosis de las vesículas sinápticas, y el principal sensor de calcio que permite la fusión de la membrana en la sinapsis interna de las células ciliadas (Figura 5) (Roux *et al.*, 2006).

Se han visto que mutaciones en este gen son una de las causas más frecuentes de hipoacusia neurosensorial recesiva no-sindrómica. Hay constancia de más de 160 mutaciones en *OTOF*. La mayoría de los afectados por estas mutaciones tienen pérdida auditiva estable, prelingual y de severa a profunda (Iwasa *et al.*, 2013; Matsunaga *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016).

- ***STRC***

El gen *STRC* codifica una proteína estereocilina altamente conservada que asegura la conexión de los estereocilios vecinos de las células ciliadas externas, siendo muy importante para unir estereocilios con la membrana tectorial (Verpy *et al.*, 2011).

Los diagnósticos en los cuales se implica al gen *STRC* son desafiantes debido a la presencia de un pseudogen (*pSTRC*) altamente homólogo, teniendo un 99,6% de similitud para la secuencia codificante y un 98,9% de similitud para las secuencias intrónicas (Marková *et al.*, 2018). La presencia de mutaciones puntuales detectadas por la secuenciación de nueva generación (NGS) debe verificarse mediante PCR de largo alcance y secuenciación Sanger para, de esta forma, evitar contaminación por *pSTRC* (Back *et al.*, 2019).

- ***TMPRSS3***

La proteasa transmembrana serina 3 es codificada por el gen *TMPRSS3*, y pertenece a la subfamilia de serinas proteasas transmembrana tipo II (Hooper *et al.*, 2001). Esta enzima presenta una estructura que incluye una cola N-terminal corta, un dominio transmembrana (TM) y un gran segmento C-terminal (Szabo *et al.*, 2003).

La enzima codificada por el gen *TMPRSS3* puede estar asociada con hipoacusia no-sindrómica y relacionada con el mantenimiento de Na⁺ dentro del ambiente endolinfático en la cóclea (Figura 5) (Bonne-Tamir *et al.*, 1996).

GENES DE HERENCIA AUTOSÓMICA DOMINANTE

Este tipo de herencia se puede apreciar muy fácilmente en el árbol genealógico de los pacientes. Sin embargo, no hay genes que presenten una proporción significativa. Se han descrito 48 genes que causan hipoacusia no-sindrómica de carácter dominante (Van Camp & Smith, 2006).

- **ACTG1**

El gen *ACTG1* codifica una proteína de la familia de proteínas de actina, llamada γ -actina. Es una proteína que forma parte del citoesqueleto. Es particularmente abundante en las células ciliadas del oído interno, por lo tanto, son necesarias para la audición (Bryan *et al.*, 2006; Morín *et al.*, 2009)

- **MYH14**

MYH14, también conocida como cadena pesada no muscular II (NMHCII-C), es un miembro de la familia de las miosinas, junto con MYH9 y MYH10, implicadas en muchos procesos móviles, como la activación de canales iónicos, translocación de orgánulos y reordenamiento del citoesqueleto (Billington *et al.*, 2013; Golomb *et al.*, 2004).

En un estudio se realizó un cribado mutacional en pacientes con discapacidad auditiva, permitiendo demostrar la expresión de MYH14 en la cóclea (Figura 4), y por lo tanto su papel en la pérdida de audición de carácter autosómico dominante (Donaudy *et al.*, 2004).

GENES DE HERENCIA AUTOSÓMICA DOMINANTE/RECESIVA

- **TECTA**

Este gen codifica la α -tectorina. Esta proteína es no colágena y se sitúa en la membrana tectorial, una tira en forma de cinta de matriz extracelular sobre los estereocilios de las células ciliadas (Figura 5), por lo que es fundamental para la transmisión mecánica y la amplificación de sonido (Verhoeven *et al.*, 1998).

- **WFS1**

El gen *WFS1* codifica la wolframina, una proteína transmembrana. Estudios sugieren que se localiza en el retículo endoplásmico y participa en el tráfico de membranas, en el procesamiento de proteínas y en la regulación de calcio (Takeda, 2001).

Mutaciones en este gen se han visto asociadas con el síndrome de Wolfram de herencia autosómica recesiva y el tipo autosómico dominante de hipoacusia no-sindrómica de baja frecuencia. El síndrome de Wolfram se caracteriza por presentar diabetes insípida, diabetes mellitus, atrofia óptica y pérdida auditiva (Rendtorff *et al.*, 2011).

- **COL11A2**

El síndrome de Stickler se caracteriza por anomalías oculares, esqueléticas, orofaciales y auditivas (Rose *et al.*, 2005). Se subdivide en varios subtipos, según su defecto genético de colágeno subyacente. Las mutaciones en *COL11A1* y *COL11A2* (codifican el colágeno tipo XI), están asociados con el tipo II (Allan *et al.*, 1996) y tipo III (Vikkula *et al.*, 1995) respectivamente. Las mutaciones en *COL11A2* también pueden provocar pérdida auditiva no-sindrómica (McGuirt *et al.*, 1999).

- **MYO6**

Se ha visto que mutaciones en *MYO6* pueden dar lugar a hipoacusia no-sindrómica de herencia tanto dominante como recesiva. Este gen codifica la miosina VI, necesaria para la integridad estructural y el correcto funcionamiento de las células ciliadas del oído interno (Figura 5) (Oonk *et al.*, 2013).

GENES DE HERENCIA LIGADA AL CROMOSOMA X

- **POU3F4**

POU3F4 codifica un tipo de factores de transcripción con un dominio POU. Las mutaciones en este gen son la causa más común de pérdida auditiva no-sindrómica ligada al cromosoma X. Estas mutaciones dan como resultado una malformación

radiológica distinta caracterizada por hipoplasia coclear y canales auditivos internos bulbosos (de Kok *et al.*, 1995).

1.3 DIAGNÓSTICO GENÉTICO

El diagnóstico genético siempre comienza estudiando el historial familiar, elaborando un árbol genealógico. Esta información es muy importante sobretodo a la hora de saber el modo de herencia más probable. Esto a su vez nos puede dar una idea de qué mutación en los genes candidatos puede estar causando esta pérdida auditiva (Korver *et al.*, 2017).

A pesar de todos los avances científicos y tecnológicos, el diagnóstico genético de hipoacusia no-sindrómica sigue siendo un reto por los numerosos posibles genes responsables. Los desarrollos tecnológicos, como la secuenciación de ADN masiva paralela o de nueva generación (NGS), han permitido el análisis simultáneo de grandes cantidades de genes. Con esta técnica, los laboratorios pueden ofrecer pruebas genéticas usando paneles de genes relacionados con hipoacusia sindrómica y no-sindrómica (Sloan-Heggen *et al.*, 2016).

Este tipo de paneles permiten identificar la mutación causante de la hipoacusia en aproximadamente el 50% de los casos (Tekin *et al.*, 2016), en comparación con el 25%, reportado en varios estudios clínicos de secuenciación del exoma (Lee *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2013, 2014).

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son los siguientes:

- Diseño y aplicación de un panel de secuenciación *NGS* con los 61 genes con más prevalencia en hipoacusia neurosensorial.
- Evaluación de la eficacia diagnóstica de dicho panel en una muestra de 37 pacientes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia) a lo largo del 2019.
- Informar a los pacientes de los resultados obtenidos y ofrecerles asesoramiento genético.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 PACIENTES

En este trabajo se analizaron 37 pacientes diagnosticados con posible hipoacusia neurosensorial en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia) a lo largo del 2019. Se les ofreció la posibilidad de mediante una pequeña extracción de sangre periférica, realizar un análisis de 61 genes relacionados con hipoacusia hereditaria. Una vez firmado el consentimiento, los pacientes, acudieron a realizarse la extracción con la que posteriormente se obtendría el ADN genómico, necesario para la secuenciación masiva, con un extractor automático.

3.2 DISEÑO PANEL NGS

En este estudio se diseñó un Panel NGS usando la herramienta SureDesign de Agilent® para el análisis de hipoacusias hereditarias. Los genes que se incluyeron en este panel se seleccionaron a partir de los resultados de diferentes estudios (Domínguez, 2015; Sloan-Heggen *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2017), eligiendo los que presentan mayor prevalencia. Finalmente, el panel se configuró con 61 genes (Tabla 2) relacionados con hipoacusia hereditaria.

Tabla 2. Listado de los 61 genes relacionados con hipoacusia hereditaria que se han incluido en el panel NGS.

ACTG1	CDH23	CEP250	CHD7	CIB2
CISD2	CLDN14	CLRN1	COCH	COL11A2
DFNA5	DFNB31	DFNB59	EDN3	EDNRB
ESPN	EYA1	EYA4	GJB2	GJB6
GPR98	KCNE1	KCNQ1	KCNQ4	LHFPL5
LOXHD1	LRTOMT	MITF	MYH14	MYH9
MYO15A	MYO6	MYO7A	OTOA	OTOF
OTOG	OTOGL	PAX3	PCDH15	POU3F4
PTPRQ	SEMA3E	SIX1	SIX5	SLC26A4
SLC45A2	SMPX	SNAI2	SOX10	STRC
TECTA	TIMM8A	TMC1	TMEM1262	TMPRSS3
TPRN	TRIOBP	USH1C	USH1G	USH2A
WFS1				

- Hipoacusia no-sindrómica
- Síndrome de Usher
- Síndrome de Usher/Hipoacusia
- Síndrome de Waardenburg
- Síndrome de Pendred/Hipoacusia
- Síndrome de Wolfram/Hipoacusia
- Síndrome de Charge
- Síndrome Branquio-oto-rena
- Síndrome de Jarvell y Large-Nielsen
- Síndrome de Stickler/Hipoacusia

El color indica si los genes están asociados a hipoacusia no-sindrómica, síndrómica o ambas (Van Camp & Smith, 2006).

3.3 SECUENCIACIÓN MEDIANTE PANEL NGS

Una vez obtenidos los ADN de los pacientes que posteriormente se secuenciaron, se midió las concentraciones del material genético en cada muestra. Esto se realizó mediante Qubit de ThermoFisher®, un fluorímetro que mide la absorbancia del ADN, la cual se compara con dos controles y de este modo se puede calcular la concentración de ADN genómico que hay en la muestra. Para llevar a cabo el protocolo de secuenciación mediante el panel NGS debemos obtener una concentración de 10 ng/ μ L en 5 μ L para cada muestra.

Para preparar las librerías y llevar a cabo la secuenciación se usa el protocolo de Bravo NGS SureSelectQXT Automated Target Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing de Agilent® (Figura 7), para plataformas Illumina.

SureSelect^{QXT} NGS Target Enrichment Workflow

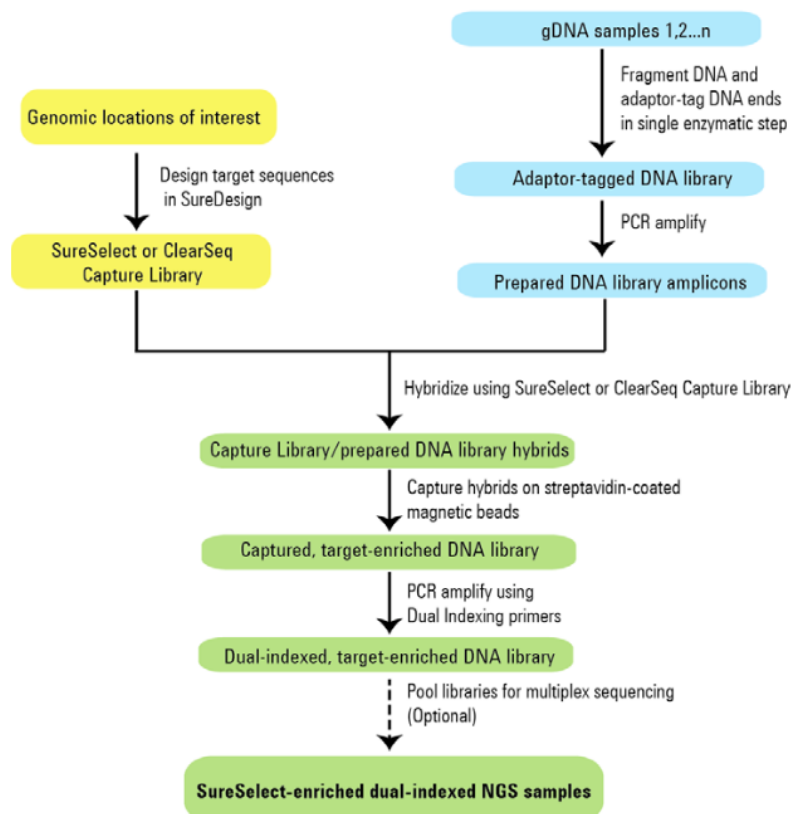


Figura 7. Protocolo de Bravo NGS SureSelectQXT Automated Target Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing de Agilent®.

3.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

3.4.1 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS Y FILTRADO DE VARIANTES

Después de ser secuenciado el material genético, las lecturas obtenidas se deben mapear y ensamblar. Esto es posible gracias al programa Alissa de Agilent®, formado a su vez por dos subprogramas diferentes. En este caso se usa el Alissa Align & Call, donde se importan las muestras en formato fastq para ser alineadas. Hay dos archivos fastq por muestra, uno corresponde a la secuencia directa y el otro a la reversa. Este subprograma permite ver la calidad de las muestras midiendo la profundidad de lectura promedio y la mediana de la profundidad de lectura en regiones objetivo analizables.

Tras el alineamiento, las secuencias son descargadas en archivos .bam donde se encuentran alineadas y mapeadas frente al genoma de referencia. Estos archivos son los que permiten visualizar las secuencias con los alineamientos. También se obtienen archivos .vcf donde se encuentran las variantes anotadas con respecto al genoma de referencia.

Los archivos .vcf son importados al otro subprograma de Alissa de Agilent®, Alissa Interpret. Es en este donde se lleva a cabo el filtrado de las variantes de los genes encontradas en cada paciente en el panel NGS de hipoacusias hereditarias. Este programa filtra las variantes automáticamente, siguiendo el proceso de filtrado de la Figura 8.

Este proceso de filtrado se utiliza para eliminar del análisis las variantes en regiones no codificantes (se excluyen sitios de *splicing* flanqueantes al exón hasta +/-10 nucleótidos), variantes sinónimas (se excluyen de los filtros variantes en los 4 primeros o últimos nucleótidos del exón), y las variantes con elevada frecuencia tanto en la población general (MAF>0.02) como en la base de datos propia de la Unidad de Genómica del IIS-La Fe. También se eliminan del análisis los cambios encontrados en población sana y descritos como benignos por diversas fuentes (ClinVar (Landrum *et al.*, 2018), gnomAD (Karczewski *et al.*, 2019), LOVD (Fokkema *et al.*, 2011), HGMD (Stenson *et al.*, 2003), Deafness Variation Database (Azaiez *et al.*, 2018), HSF 3.1 (Desmet *et al.*, 2009), Varsome (Kopanos *et al.*, 2019) y dsSNP (Sherry *et al.*, 2001)), por considerarse cambios polimórficos (SNPs) sin relevancia clínica.

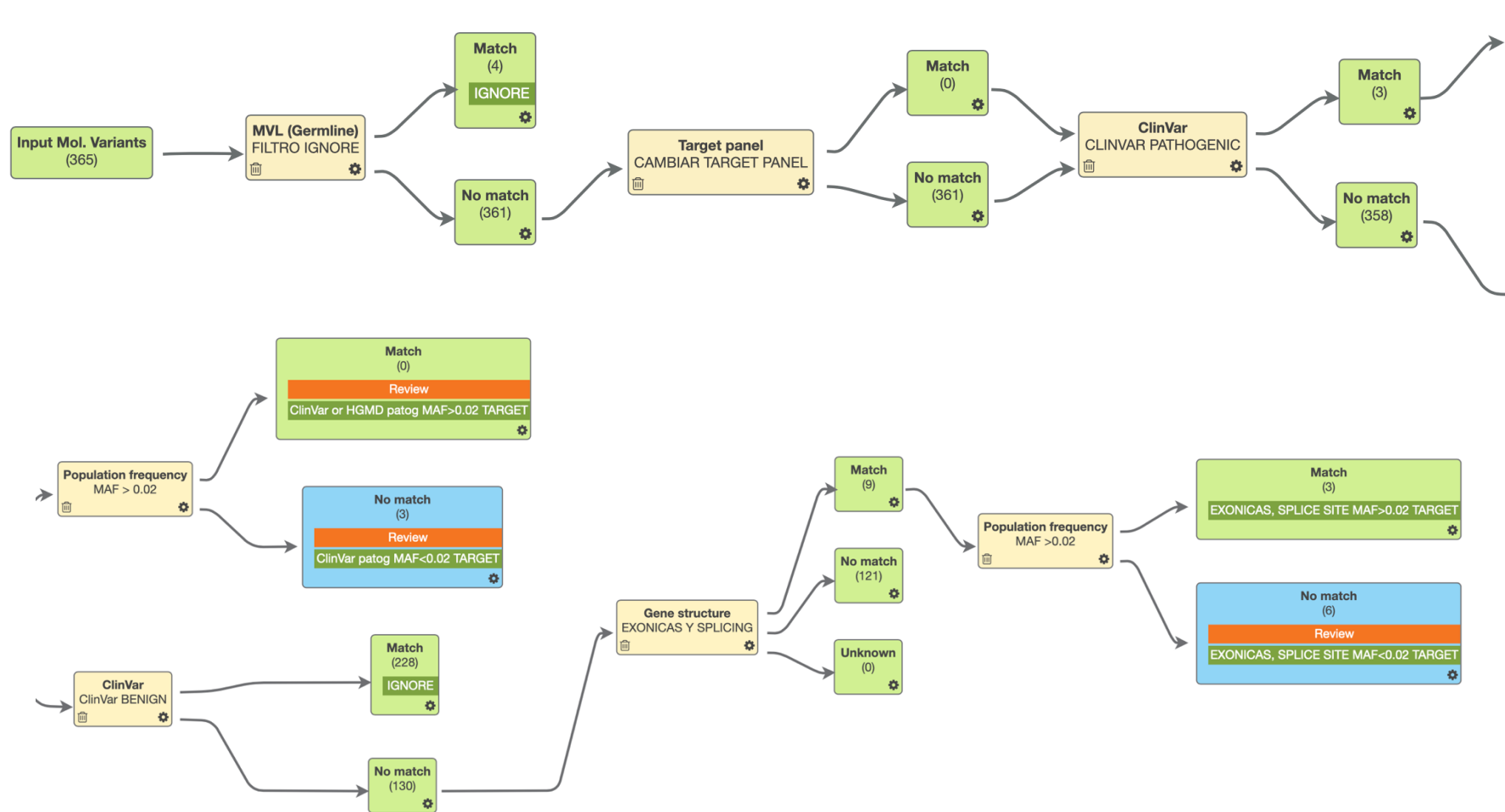


Figura 8. Filtrado de las variantes en Alissa Interpret de Agilent®. Los recuadros en azul son las variantes que nos interesan, puesto que presentan una frecuencia menor al 0,02.

3.4.2 ANÁLISIS DE VARIANTES

Al final del proceso de filtrado, mostrado en la Figura 8, se obtienen entre 10-15 variantes (Figura 9). El programa Alissa enlaza directamente con las bases de datos OMIM (McKusick 2007), dsSNP (Sherry *et al.*, 2001), HGMD (Stenson *et al.*, 2003) y ClinVar (Landrum *et al.*, 2018). OMIM permite ver el tipo de herencia al que está ligado el gen. También incluye, de todas las enfermedades de base genética, si existe, su manifestación fenotípica. Una vez entendido el tipo de herencia se busca si la mutación se encuentra en población control, con qué frecuencia y si está presente de forma homocigota o sólo en heterocigosis en Varsome (Kopanos *et al.*, 2019). Esta plataforma contiene información de Clinvar y gnomAD (Karczewski *et al.*, 2019; Landrum *et al.*, 2018) y se usa para la interpretación de datos de NGS. Además, utiliza predictores informáticos de patogenicidad que permiten predecir de manera aproximada la patogenicidad de las variantes.

Para obtener más información sobre la patogenicidad se consultaron las bases de datos Deafness Variation Database y LOVD (Azaiez *et al.*, 2018; Fokkema *et al.*, 2011). Deafness Variation Database es una base de datos de sordera que proporciona una guía completa sobre la variación genética en genes que se sabe que están asociados con la misma, mientras que LOVD es un software que alimenta la red más grande de bases de datos de variantes genéticas.

El proceso de filtrado también incluye las variantes que se encontraban en regiones no codificantes de hasta ± 10 pb estas se analizaron con el programa en HSF 3.1 (Desmet *et al.*, 2009) y de esta forma predecir si afectaban o no al *splicing*.

Toda esta información permitió clasificar las variantes en patogénica, probablemente patogénica, VOUS (Variante de significado incierto), probablemente benigna o benigna. Cabe señalar que el programa Alissa Interpret permite indicar la patogenicidad de la variante y ver si hay más pacientes que la presentan.

Variant List: 365 variants (total) ▶ 9 variants (2 classification tree bins)

Show warning list
 Show all

ClinVar or HGMD patog MAF>0.02 TARGET
 ClinVar patog MAF<0.02 TARGET
 EXONICAS, SPLICE SITE MAF<0.02 TARGET
 EXONICAS, SPLICE SITE MAF>0.02 TARGET
 IGNORE

	Gene	Position	Ref	Patient	Read	Type	Transcript	cDNA	Location	Exon	Effect	Protein	CT Labels	External Databases	MVL		Info	Classification	Assessment	
															Depth	Other				Simil.
<input type="checkbox"/>	USH2A	1:216,420,371	C	T	C	265	snp	NM_206933.2	c.2365G>A	exonic	13	nonsynonymous	p.Val789Ile	EXONICAS	dbSNP				Likely benign	
<input type="checkbox"/>	ADGRV1	5:89,924,514	T	A	T	199	snp	NM_032119.3	c.1374T>A	exonic	8	nonsynonymous	p.Phe458Leu	ClinVar	dbSNP				Likely benign	
<input type="checkbox"/>	GJB2	13:20,763,104	T	C	T	212	snp	NM_004004.5	c.617A>G	exonic	2	nonsynonymous	p.Asn206Ser	ClinVar	dbSNP	HGMD			Pathogenic	
<input type="checkbox"/>	GJB2	13:20,763,451	.	A	A	312	insertion	NM_004004.5	c.269dupT	exonic	2	frameshift	p.Val91Serfs*11	ClinVar	dbSNP	HGMD			Pathogenic	
<input type="checkbox"/>	STRC	15:43,907,748	T	C	T	288	snp	NM_153700.2	c.2016A>G	exonic	4	synonymous	p.Leu672=	EXONICAS	dbSNP				Likely benign	
<input type="checkbox"/>	STRC	15:43,910,867-43,910,869	C A G	.	.	160	deletion	NM_153700.2	c.52_54delCTG	exonic	1	inframe	p.Leu18del	EXONICAS	HGMD				Likely benign	
<input type="checkbox"/>	OTOA	16:21,756,214	C	T	C	327	snp	NM_144672.3	c.2632C>T	exonic	23	nonsynonymous	p.Pro878Ser	EXONICAS	dbSNP				VOUS	
<input type="checkbox"/>	CEP250	20:34,089,736	T	A	T	193	snp	NM_007186.5	c.3963T>A	exonic	29	synonymous	p.Thr1321=	EXONICAS					VOUS	
<input type="checkbox"/>	TRIOBP	22:38,121,040	C	T	C	249	snp	NM_001039141.2	c.2477C>T	exonic	7	nonsynonymous	p.Ser826Leu	EXONICAS	dbSNP				Benign	

Actions on selection
 Show 20 results Page: 1 of 1

Figura 9. Listado de las variantes con una frecuencia menor a 0,02 en la población general. En este listado se presenta la lista de genes con una mutación, su posición cromosómica, el nucleótido de referencia y el que tiene el paciente en su ADN, el tipo de cambio nucleotídico la profundidad de lectura, el nombre del transcrito, el cambio a nivel de cDNA, la localización de la mutación, el cambio a nivel de proteína y las bases de datos en las que podemos encontrar información sobre la mutación.

Para visualizar las variantes se utilizó el programa IGV de libre acceso (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>), en el cual se pueden ver las secuencias mapeadas en formato .bam. Esto permitió asegurar que las mutaciones no eran un artefacto creado en el proceso de secuenciación masiva, sino que realmente se encontraba en el ADN del paciente, además de permitir visualizar que el alineamiento se había realizado correctamente (Figura 10).

Las mutaciones que finalmente se consideraron patológicas y/o probablemente patológicas y por lo tanto pueden ser responsables de la hipoacusia del paciente, fueron confirmadas mediante secuenciación Sanger.

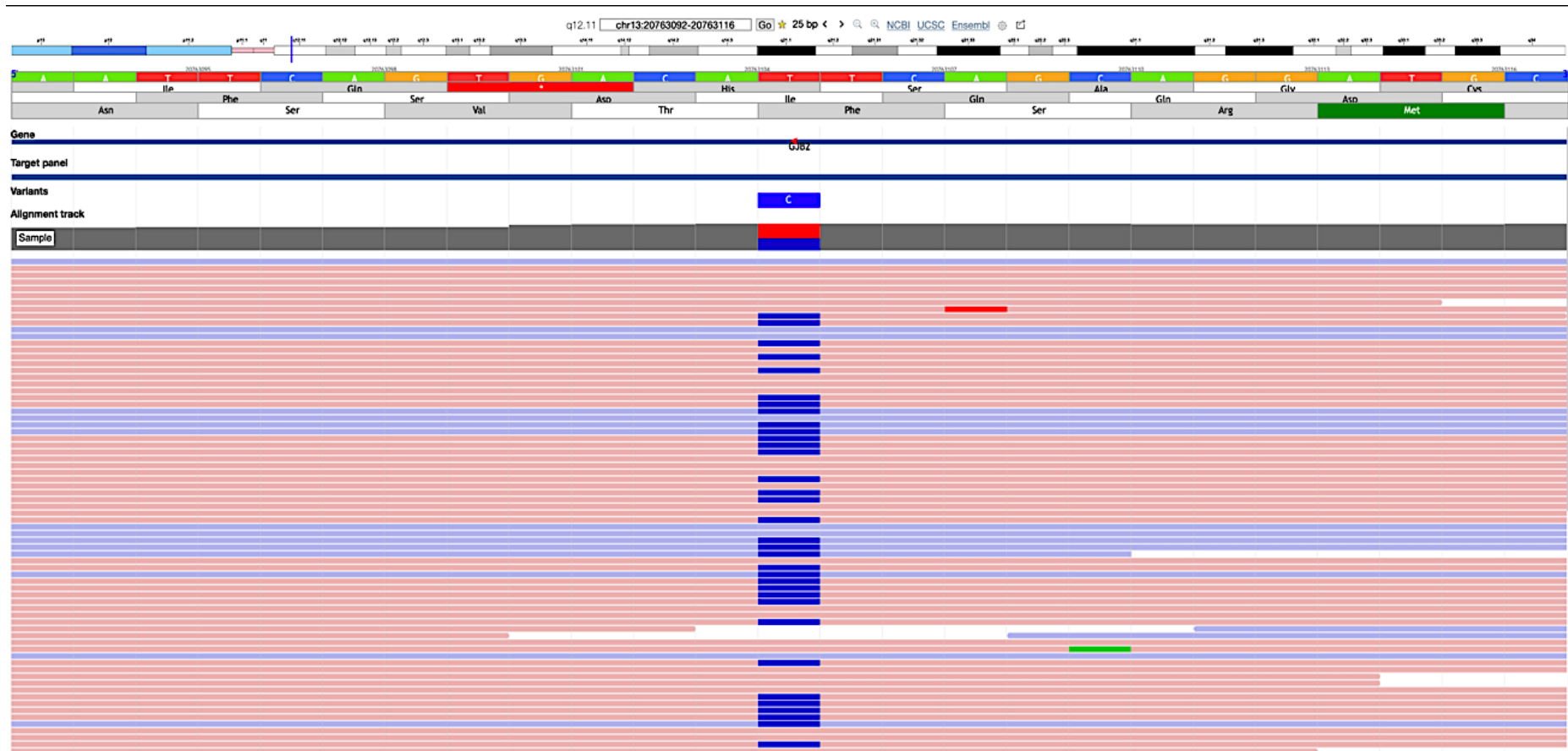


Figura 10. Visualización de las secuencias de ADN de un paciente en el programa IGV. En este caso se observa la mutación c.617A> G en el gen GJB2 del paciente 40372, la cual se encuentra en heterocigosis. En el visor vemos en color azul el cambio nucleotídico. Ambos nucleótidos, tanto el de referencia como el mutado, están representados cada uno en un 50% de las secuencias.

3.5 COMPROBACIÓN DE LAS MUTACIONES POR SECUENCIACIÓN SANGER

3.5.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR

La secuenciación de Sanger permitió verificar los resultados obtenidos con el panel NGS. El primer paso para realizar es la amplificación del ADN por PCR. Por lo tanto, el diseño de primers es necesario para realizar este paso (Tabla 3). Los primers se diseñaron usando el programa SNPCheck (<https://secure.ngsl.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm>), este programa permite detectar SNPs en sitios de unión de cebadores. Las secuencias de referencia se obtuvieron de Ensembl (Yates *et al.*, 2020) a excepción de los primers para los genes *ESPN* (Naz *et al.*, 2004) y *STRC* (Vona *et al.*, 2015) pues ambos tienen un pseudogen y su diseño presenta mayor dificultad. Los primers para *TMPRSS3* también se obtuvieron de otro estudio donde se habían analizado diferentes familias para este gen (Weegerink *et al.*, 2011).

Tabla 3. Secuencias de los primers utilizados para la amplificación del ADN por PCR.

GEN	EXÓN ¹	SECUENCIA 5'-3'	GEN	EXÓN	SECUENCIA 5'-3'
ACTG	5-6D	CGAGGCTACAGCTTCACC	OTOF	22D	GCCTGGTTGTGAGAAGGTG
	5-6R	CATGAGGTGTGTGCATTTGC		22R	GGGTCTAGCCTCCTGATTG
COL11A2	19D	GTAATGGATGGGCTAAGTGC	SOX10	3D	GCCTCACATCTTCCAAGATG
	19R	GCAGGAAGGCAGCTAGAAAG		3R	CTCATTGCCATCCAGCCATC
ESPN	11-12D	AGCTCTGAGGGGGTGTGAC		4D	CGCTGCCTGAAGGTGAACC
	11-12D	TACAAGGGCCAAGAGACAGG		4R	CTCAGCCTCCTCCACTGC
EYA1	16D	GAAATATGTTGGTCAGGAA	TECTA	12D	CTGCTCAAACCTCCCTCTGG
	16R	CTAAATCCAGTTTTGCAAATTG		12R	CTCAGTTCAAAGTGCATATC
EYA4	12D	CCATCAGGAGGTTTCTATTG		17D	GCTGCCATCTGACCATTTC
	12R	GAGTTGTAAAATGCCTATCAC		17R	CAGATTGCTTCCTTGTCTGC
MITF	7D	CAGTTTCCGTTGTCATGAC	TMPRSS3	4D	CTTGCACTGTGTTCTCTGG
	7R	GGGGAGACTTCTTACTTTAG		4R	GCCAGTTCAATCCCAGCTG
MYH14	37D	CCCAGGTCTGCAGGGTTC		12D	GTCCCAACTCCATAGCAAGC
	37R	CAGGGACCCTGTGGTTAGC		12R	CACGCCCTGGTTTTATAGC
MYO6	13D	CATTTATCTGTGCCTATTCTC	WFS1	8AD	CAGAGGCAGGGTGGTCAG
	13R	CCCTATCTAGGTCATATTATG		8AR	GAGCCACACCAGGATGAGC

¹. D, Directo; R, Reverso.

Los volúmenes de los reactivos para poder llevar a cabo la PCR se establecieron a partir de protocolos para PCR Standard para un volumen final de 25 μL (Tabla 4). Para cada reacción de PCR se incluyó un control negativo para poder descartar que hubiese contaminación.

Las condiciones de reacción de la PCR fueron establecidas de nuevo a partir de protocolos para PCR Standard (Tabla 5). Si con las concentraciones de los reactivos de la Tabla 4 y las condiciones de la Tabla 5, la muestra no se amplificaba correctamente, la PCR se optimizó con diferentes aproximaciones:

1. Cambiando la TM. Por ejemplo, en el protocolo estándar especifica 60° C, sin embargo, si se amplificaba algo inespecífico, esa temperatura se aumentó, mientras que, si no había suficiente cantidad, se disminuyó,
2. Otra forma fue aumentando el MgCl_2 a 1 μL o añadiendo 2,5 μL de DMSO.

Tabla 4. Reactivos y volumen añadido a la mezcla de PCR. En esta tabla se muestran los volúmenes para la reacción de una muestra.

Reactivo	Volumen (μL)
H ₂ O	19 μL
Buffer 10x	2,5 μL
dNTPs [5 mM]	1,25 μL
MgCl ₂ [50 mM]	0,75 μL
Primer Directo [100 μM]	0,1 μL
Primer Reverso [100 μM]	0,1 μL
Taq Biotools® [50 U/ μL]	0,3 μL
ADN [50-150 ng/ μL]	1 μL
Total	25 μL

Tabla 5. Condiciones de reacción de la PCR en el termociclador. La TM varía en caso de que queramos hacer un gradiente de temperaturas para optimizar la PCR.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95° C	--- 5'	
95° C	--- 30"	35x
TM (60° C)	--- 30"	
72° C	--- 30"	
72° C	--- 10'	
4° C	--- ∞	

Los reactivos y volúmenes para poder realizar la PCR y las condiciones del termociclador en el caso del gen *GJB2* fueron notablemente distintas (Tabla 6 y Tabla 7). Esto es debido a que esta PCR ya se había puesto a punto en el laboratorio años atrás, pues este gen es el más prevalente en hipoacusia no sindrómica. Entre los reactivos necesarios encontramos Master Mix (Fermentas), que es una mezcla que contiene dNTPs, MgCl₂, Taq polimerasa y un tampón de pH.

Tabla 6. Reactivos y volumen añadido a la mezcla de PCR para el gen *GJB2*. En esta tabla se muestran los volúmenes para la reacción de una muestra.

Reactivo	Volumen (µL)
H ₂ O	11 µL
Master Mix	12,5 µL
Primer Directo [100 µM]	0,2 µL
Primer Reverso [100 µM]	0,2 µL
ADN [50-150 ng/ µL]	1 µL
Total	25 µL

Tabla 7. Condiciones de reacción de la PCR en el termociclador para el gen GJB2.

Temperatura	Tiempo	Ciclos	
95° C	---	5'	
95° C	---	30"	
63° C	---	30" (-1° C/X)	5x
72° C	---	30"	
95° C	---	30"	40x
58° C	---	30"	
72° C	---	30"	
72° C	---	5'	
4° C	---	∞	

Otro caso similar sería el del gen *OTOF*, el cual utiliza los mismos reactivos y volúmenes que para el gen *GJB2* (Tabla 6) pero con otras condiciones de reacción de PCR indicadas a continuación (Tabla 8):

Tabla 8. Condiciones de reacción de la PCR en el termociclador para el gen *OTOF*.

Temperatura	Tiempo	Ciclos	
94° C	---	2'	
94° C	---	40"	30x
60° C	---	40"	
72° C	---	7'	
4° C	---	∞	

3.5.2 COMPROBACIÓN DE LA PCR

Para comprobar que no había habido contaminación, que el ADN se había amplificado correctamente en la PCR, y que, por lo tanto, los primers fueron bien diseñados, se utilizó el QIAxcel ScreenGel 1.4.1 de QIAGEN®, donde se llevaba a cabo una electroforesis capilar de manera automática de 12 en 12 muestras hasta un máximo de 96. Además, este aparato permite observar el recorrido de la banda en tiempo real en la pantalla del ordenador al que está conectado. Cuando el proceso finaliza, permite descargar un informe donde se muestra el resultado de la electroforesis.

3.5.3 PURIFICACIÓN DEL AMPLIFICADO POR PCR

Una vez comprobado que el producto de PCR se había amplificado correctamente y que no se había producido contaminación, el siguiente paso fue purificar el ADN amplificado. Para ello se usó ExoSAP-IT™ de Applied Biosystems™ que contiene una enzima exonucleasa que degrada el ADN de cadena sencilla.

Para llevar a cabo la purificación se utilizó 1,5 µL de ExoSAP-IT™ y 4,5 µL de producto de PCR previamente comprobado mediante la electroforesis automática. Las condiciones de la reacción de la purificación se obtuvieron siguiendo el protocolo de ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones de la reacción de purificación de ExoSAP-IT™ en el termociclador.

Temperatura	Tiempo
37° C ---	15'
80ª C ---	15'
4° C ---	∞

3.5.4 SECUENCIACIÓN SANGER

La secuenciación Sanger es una estrategia de replicación de ADN. Esta técnica emplea una ADN polimerasa, los cuatro 2'-deoxinucleótidos que componen la secuencia del ADN (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP). Estos últimos nucleótidos carecen del grupo hidroxilo en el carbono 3', de manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento, la ADN polimerasa no puede añadir el siguiente nucleótido, por lo que esta se detiene. Esto hace que se obtengan fragmentos secuenciados de diferente tamaño, según dónde se incorporen los dideoxinucleótidos. Con estos resultados y tras una simple electroforesis, se puede dilucidar la secuencia (Sanger *et al.*, 1977).

Para la reacción de secuenciación se utilizó una serie de reactivos (Tabla 10) de los cuales, los primers eran los mismos utilizados para la amplificación del ADN por PCR (Tabla 3) pero en lugar de estar a una concentración de 100 µM, se utilizaron a una

concentración de 3,2 pmol/ μ L. Las condiciones de secuenciación se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 10. Reactivos y volúmenes añadidos por muestra para su secuenciación por Sanger. Cada muestra tendrá dos mezclas diferentes, una correspondiente al primer directo y la otra al reverso.

Reactivo	Volumen (μ L)
ADN amplificado y purificado	6 μ L
Buffer de secuenciación 5x	2 μ L
Big Dye 3.1/1.1 de Applied Biosystems™	1 μ L
Primer Directo o Reverso (3,2 pmol/ μ L)	1 μ L
Total	25 μ L

Tabla 11. Condiciones de la reacción de secuenciación en el termociclador.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94° C	---	5'
96° C	---	30''
50° C	---	6''
60° C	---	4'
4° C	---	∞

35x

Una vez terminada la reacción de secuenciación, se purificaron las secuencias por columna de parafina y se mezclaron con formamida para cargarlas en el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer de Applied Biosystems®. Después se analizaron las secuencias observando los cromatogramas de la secuencia directa y reversa de cada muestra con el fin de localizar la mutación y comprobar que realmente se encuentra en el ADN del paciente. Los cromatogramas los observamos con los programas Sequence Scanner de Applied Biosystems® y Sequencher de Genes Code Corporation (Figura 11).

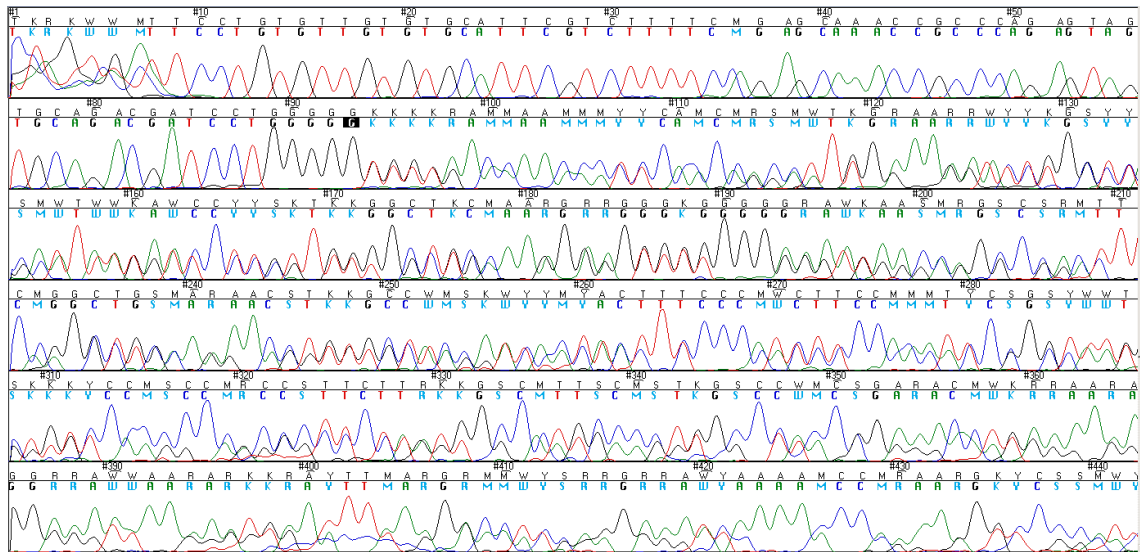


Figura 11. Cromatograma de la secuencia directa de GJB2 para la mutación c.35delG. La posición marcada en negro es donde se encuentra la mutación. En este caso, el paciente es heterocigoto.

3.6 ANÁLISIS CNVs

Las CNVs o variantes en el número de copias (*Copy Number Variants*) son variaciones en el genoma que alteran su estado diploide, aumentando o disminuyendo el número de alelos, y por lo tanto de variantes de un gen. Son responsables de las deleciones de uno o más exones en un mismo gen (o varios genes). Las CNVs han sido identificadas como una de las posibles causas de hipoacusia no-sindrómica neurosensorial (Shearer *et al.*, 2014)

Para detectar CNVs llevamos a cabo un análisis mediante el programa DECoN v1.0.2. de libre acceso (Fowler *et al.*, 2016). Es una herramienta que detecta las variantes en el número de copias a partir de las secuencias alineadas, basándose en el número de lecturas de cada posición. Las deleciones/duplicaciones obtenidas mediante este programa se comprobaron mediante la técnica de *MLPA* (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

3.6.1 MLPA

Para comprobar las CNVs detectadas con el programa DECoN v1.0.2. se usó la técnica *MLPA* de MRC-Holland®, la cual permite cuantificar simultáneamente el número de copias de 45-50 loci del ADN. El protocolo consiste en (Figura 12):

1. Desnaturalización del ADN.
2. Hibridación de las sondas al ADN. Cada sonda corresponde a un exón de un determinado gen. Cada una de las sondas está formada por dos fragmentos. Uno de ellos contiene el sitio de unión para el primer directo y el otro para el primer reverso.
3. Ligación de las sondas hibridadas mediante la enzima Ligasa-65. Esta enzima es muy específica y solo ligará las dos partes de una misma sonda mediante un enlace covalente si no hay ningún nucleótido de diferencia entre cada parte de la sonda y el ADN genómico.
4. Amplificación de las sondas ligadas. El primer directo para cada sonda tiene fluorescencia, por lo que los amplicones de las sondas tendrán una etiqueta con fluorescencia que permite identificarlas.
5. Separación de los fragmentos amplificados por electroforesis capilar. Los amplicones se separan por longitud, ya que cada sonda tiene un tamaño diferente.
6. Análisis de los datos. Los datos que obtenidos son la separación de las sondas por tamaño y su nivel de fluorescencia. Estos datos se analizaron con el programa Coffalyser.Net de MRC- Holland®, donde se compararon las muestras entre ellas y frente unas de referencia para normalizar el resultado. De esta manera, podemos detectar una variación en el número de copias para un determinado exón de un determinado gen.

El genoma del ser humano es diploide, por lo que, tenemos dos copias de un mismo exón y al estar los datos normalizados, la proporción será de 1. Por ello, en un paciente heterocigoto para una CNV, la proporción será de 0,5 si se trata de una delección y 1,5 si fuese una duplicación. Por otro lado, para un paciente homocigoto, la proporción será de 0 si se tratase de una delección de un determinado exón y de 2 para el caso de una duplicación del exón.

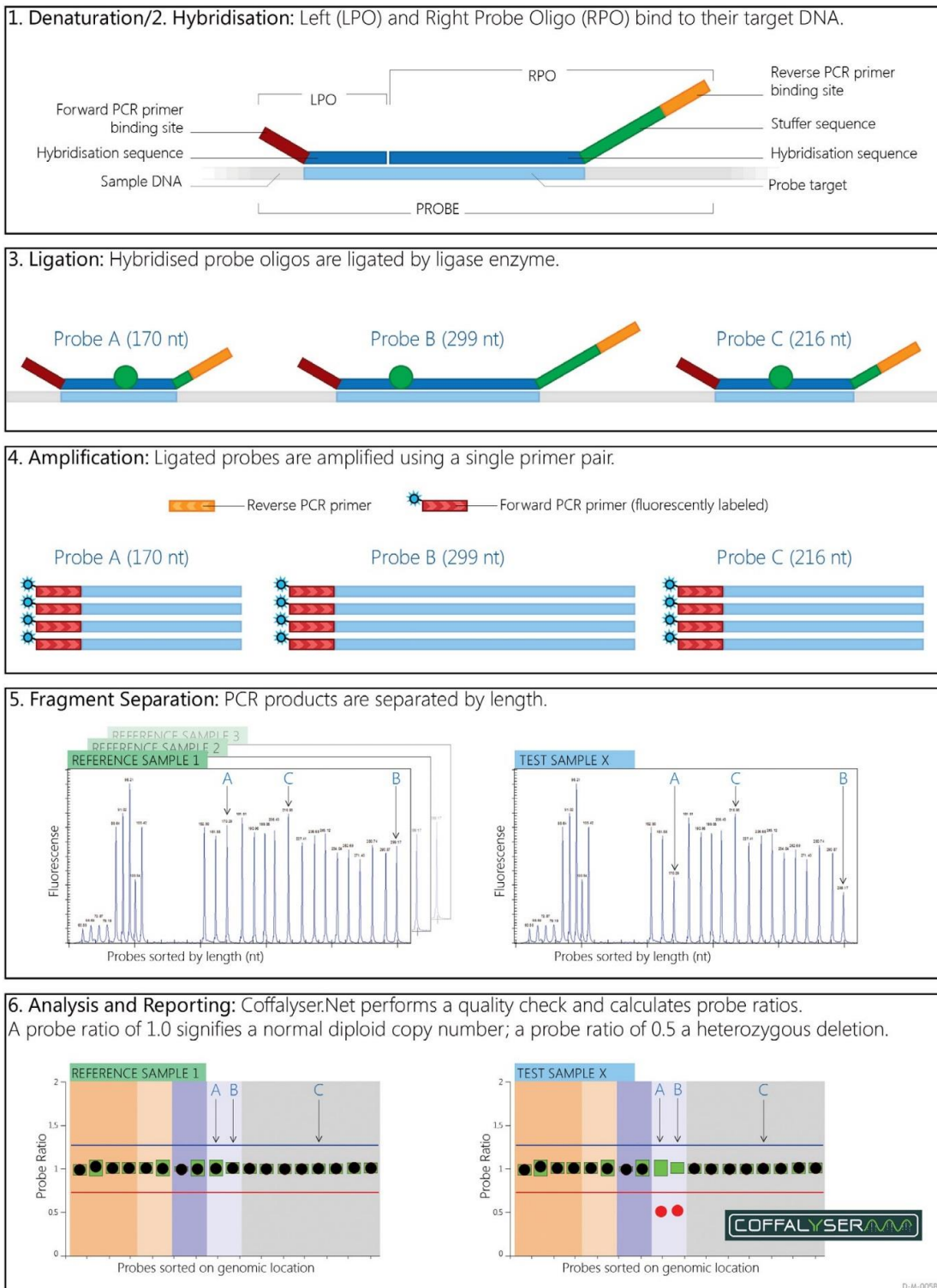


Figura 12. Protocolo de la técnica MLPA de MRC-Holland®.

4. RESULTADOS

4.1 PACIENTES CON DIAGNÓSTICO POSITIVO

Se diagnosticaron genéticamente un total de 19 pacientes de los 37 analizados mediante la secuenciación del panel NGS, obteniendo una proporción de eficacia del 52,78%. Casi la mitad de todos ellos presentaban antecedentes familiares.

Las mutaciones responsables de hipoacusia hereditaria se localizaron en 14 de los 61 genes incluidos en el panel de secuenciación.

Todas las mutaciones detectadas fueron mutaciones puntuales, a excepción de una de ellas, que resultó ser una delección completa en heterocigosis del gen *MITF* (Figura 13). Por tanto, sólo un 2,63% de los pacientes diagnosticados como positivos presentaban una mutación de tipo CNV.

PACIENTES CON MUTACIONES RESPONSABLES DE HIPOACUSIA DE HERENCIA DOMINANTE

Se trata de 12 pacientes (2 de ellos de la misma familia). Estos pacientes presentaban al menos una mutación patológica o probablemente patológica, en un gen de herencia dominante.

Se detectaron mutaciones puntuales en los genes: *COL11A2*, *MITF*, *EYA1*, *COCH*, *TECTA*, *ACTG1*, *ESPN*, *WFS1*, *MYO6* y *EYA4* (TABLA 12). Uno de ellos, el paciente 4293, también presentaban además una mutación en un gen de herencia recesiva (*GJB2*). Por sí sola, esta mutación no podría ser la causa de hipoacusia.

Además, se detectó la delección completa en heterocigosis del gen *MITF* en el paciente 40057 (Figura 13). El paciente no presentaba antecedentes familiares y su clínica era de posible Síndrome de Waardenburg.

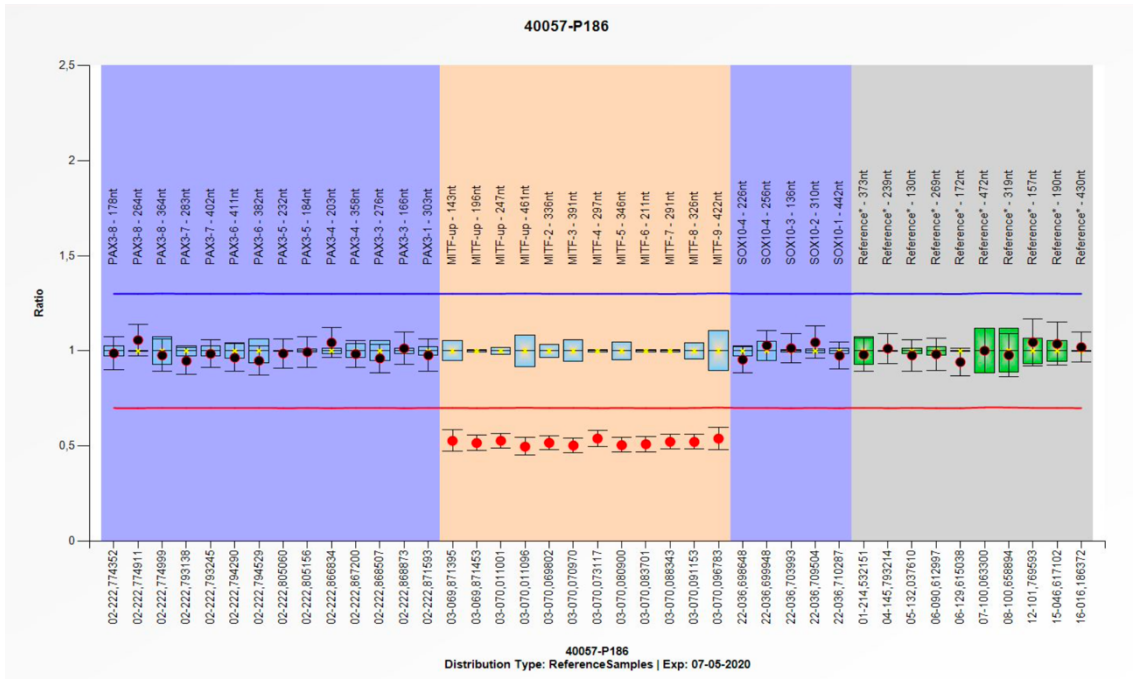


Figura 13. Comprobación de la delección de MITF mediante la técnica MLPA. En este caso, el paciente es heterocigoto para la delección de MITF ya que la proporción es de 0,5.

Tabla 12. Pacientes con mutaciones puntuales de carácter patológico o posiblemente patológico, en genes de herencia dominante.

PACIENTE	GEN	CAMBIO A NIVEL DE cDNA	CAMBIO A NIVEL PROTEICO	EXÓN	CLASIFICACIÓN	CLÍNICA	ANTECEDENTES FAMILIARES	REFERENCIA
4293	COL11A2 NM_080680.2	c.1748G>A	p.Gly583Asp	19	Posibl. Patogénica/ VOUS	Hipoacusia	Sordera familiar vía paterna	(Youssefian <i>et al.</i> , 2019)
	GJB2 NM_004004.5	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	2	Patogénica			
12227	MITF NM_198159.2	c.943C>T	p.Arg315*	8	Patogénica	S. de Waarden./ Hipoacusia	No	(Yang <i>et al.</i> , 2013)
37350	EYA1 NM_000503.5	c.1540_1542delCTG	p.Leu514del	16	Posibl. Patogénica	S. de BOR	No	
38228	COCH NM_001135058.1	c.374-10A>C		5	Posibl. Patogénica	Hipoacusia Postlingual	No	
38971*	TECTA NM_005422.2	c.5509T>G	p.Cys1837Gly	17	Patogénica	Hipoacusia Dominante	Sordera familiar vía materna (AD)	(Legan <i>et al.</i> , 2014)
39490	ACTG1 NM_001199954.1	c.895C>G	p.Leu299Val	5	Posibl. Patogénica	Hipoacusia	Sí	(Miyagawa <i>et al.</i> , 2015)
39629	ESPN NM_031475.2	c.2417G>T	p.Arg806Leu	12	Posibl. Patogénica	Hipoacusia	Padre y tía paterna afectados	
39927*	TECTA NM_005422.2	c.5509T>G	p.Cys1837Gly	17	Patogénica	Hipoacusia Dominante	Sordera familiar vía materna (AD)	(Legan <i>et al.</i> , 2014)
40431	WFS1 NM_006005.3	c.1463_1474dupTCATCACCGTGC	p.Val491_Pro492insLeulleThrVal	8	Posibl. Patogénica	Hipoacusia	No	
40488	MYO6 NM_004999.3	c.1224-9delC		13	Posibl. Patogénica	Hipoacusia	Madre afectada	
40519	EYA4 NM_004100.4	c.988C>T	p.Gln330*	12	Posibl. Patogénica	Hipoacusia Postlingual	No	

*. Estos pacientes pertenecen a la misma familia.

PACIENTES CON MUTACIONES RESPONSABLES DE HIPOACUSIA DE HERENCIA RECESIVA

Aquellos en los que se detectó una mutación patológica o probablemente patológica, en homocigosis, o dos mutaciones en heterocigosis, en el mismo gen de herencia recesiva. Se trata de 7 pacientes con mutaciones en los genes: *GJB2*, *MYO7A*, *OTOF*, *TECTA* y *TMPRSS3* (Tabla 13).

El paciente 39949 presentaba, además, una mutación en heterocigosis en el gen *MYO7A*, previamente descrita como responsable de síndrome de Usher (Ouyang *et al.*, 2005)

Tabla 13. Pacientes con mutaciones de carácter patológico o posiblemente patológico, en genes de herencia recesiva.

PACIENTE	GEN	GENOTIPO	CAMBIO A NIVEL DE cDNA	CAMBIO A NIVEL PROTEICO	EXÓN	CLASIFICACIÓN	CLÍNICA	ANTECEDENTES FAMILIARES	REFERENCIA
38198	TMPRSS3 NM_024022.2	Heterocigoto	c.1276G>A	p.Ala426Thr	12	Posibl. Patogénica	Hipoacusia	No	(Lee <i>et al.</i> , 2003)
		Heterocigoto	c.235T>C	p.Cys79Arg	4	Posibl. Patogénica			
39026	GJB2 NM_004004.5	Homocigoto	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	2	Patogénica	Hipoacusia	No	(Youssefian <i>et al.</i> , 2019)
39611	GJB2 NM_004004.5	Heterocigoto	c.596C>T	p.Ser199Phe	2	Patogénica	Hipoacusia (Caso esporádico)	No	(Yilmaz, 2015)
		Heterocigoto	c.35delG	p.Gly12Valfs*2	2	Patogénica			(Youssefian <i>et al.</i> , 2019)
39949	TECTA NM_005422.2	Homocigoto	c.4055G>A	p.Cys1352Tyr	11	Posibl. Patogénica	Hipoacusia	No	(Hutchin <i>et al.</i> , 2005)
	MYO7A NM_000260.3	Heterocigoto	c.5648G>A	p.Arg1883Gln	41	Patogénica	Hipoacusia	No	(Ouyang <i>et al.</i> , 2005)
40184	OTOF NM_194248.2	Homocigoto	c.2485C>T	p.Gln829*	21	Patogénica	Neuropatía Auditiva	Hermana afectada (41793)	(Gallo-Terán <i>et al.</i> , 2006)
40372	GJB2 NM_004004.5	Heterocigoto	c.617A>G	p.Asn206Ser	2	Patogénica	Hipoacusia	No	(Yilmaz, 2015)
		Heterocigoto	c.269dupT	p.Val91Serfs*11	2	Patogénica	Leve Bilateral		(Denoyelle <i>et al.</i> , 1999)
40453	MYO7A NM_000260.3	Heterocigoto	c.1232T>C	p.Val411Ala	12	Posibl. Patogénica	Hipoacusia	Hermana afectada	
		Heterocigoto	c.6025delG	p.Ala2009Profs*32	44	Posibl. Patogénica			(Bakhchane <i>et al.</i> , 2017)

4.2 PACIENTES CON RESULTADO NO CONCLUYENTE

En este apartado se incluyeron aquellos pacientes que presentaban mutaciones patológicas o posiblemente patológicas, en heterocigosis, en genes de herencia recesiva. Ninguno de los 3 pacientes presentaba antecedentes familiares (Tabla 14).

Tabla 14. Pacientes con resultado no concluyente. En esta tabla se incluyen aquellos pacientes con una mutación en heterocigosis, en un gen de herencia recesiva.

PACIENTE	GEN	CAMBIO A NIVEL DE cDNA	CAMBIO A NIVEL PROTEICO	EXÓN	CLASIFICACIÓN	CLÍNICA	ANTECEDENTES FAMILIARES	REFERENCIA
39353	GJB2 NM_004004.5	c.445G>A	p.Ala149Thr	2	Posibl. Patogénica	Hipoacusia Prelingual Progresiva	No	(Yilmaz, 2015)
39926	PCDH15 NM_00114277 1.1	c.4760_4761 delAT	p.His1587Argfs *17	36	Posibl. Patogénica	Hipoacusia + Retraso	No	
40056	USH2A NM_206933.2	c.4325T>C	p.Phe1442Ser	20	Posibl. Patogénica	Hipoacusia Profunda	No	(González-del Pozo <i>et al.</i> , 2018)

4.3 PACIENTES CON VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO (VOUS).

Las variantes de significado incierto (VOUS) son todas aquellas mutaciones de las que no disponemos de la información suficiente como para poder clasificarlas como benignas o patológicas. 13 de los 37 pacientes fueron asignados a este apartado puesto que no se encontró ninguna mutación que pudiera ser claramente la causante de hipoacusia (Tabla 15).

Tabla 15. Pacientes con variantes de significado incierto (VOUS). En la tabla se incluyen todos los pacientes que no presentan ninguna mutación patológica, ni posiblemente patológica, pero sí una o varias de significado incierto (VOUS).

PACIENTE	GEN	HERENCIA ¹	CAMBIO A NIVEL DE cDNA	CAMBIO A NIVEL PROTEICO	EXÓN	CLÍNICA	ANTECEDENTES FAMILIARES
38348	TPRN NM_00112822 8.2	AR Heterocigoto	c.2025_2036dupGC TGGAGCAGGC	p.Leu676_Ala679 dup	3	Hipoacusia	No
	PCDH15 NM_00114277 1.1	AR Heterocigoto	c.1220G>C	p.Gly407Ala	12		
	OTOG NM_00127726 9.1	AR Heterocigoto	c.79C>T	p.Arg27Trp	1		
	MYO7A NM_000260.3	AD/AR Heterocigoto	c.2738T>C	p.Leu913Pro	23		
	LOXHD1 NM_144612.6	AR Heterocigoto	c.923G>A	p.Arg308Gln	8		
38774	DFNB59 NM_00104270 2.3	AR Heterocigoto	c.284A>G	p.His95Arg	3	Hipoacusia	No
	WFS1 NM_006005.3	AD/AR Heterocigoto	c.1294C>G	p.Leu432Val	8		

Estudio genético en pacientes con hipoacusia de la Comunidad Valenciana

	LHFPL5 NM_182548.3	AR Heterocigoto	c.43C>T	p.His15Tyr	1		
	OTOGL NM_173591.3	AR Heterocigoto	c.833C>T	p.Ser278Leu	9		
38802	USH2A NM_206933.2	AR Heterocigoto	c.4996C>G	p.Gln1666Glu	25	Hipoacusia	No
	WFS1 NM_006005.3	AD/AR Heterocigoto	c.2267G>A	p.Arg756His	8		
	MYO6 NM_004999.3	AD/AR Heterocigoto	c.814C>T	p.Arg272Trp	9		
		AD/AR Heterocigoto	c.985T>C	p.Leu329=	11		
	MYO7A NM_000260.3	AD/AR Heterocigoto	c.3607G>A	p.Ala1203Thr	28		
	OTOGL NM_173591.3	AR Heterocigoto	c.2762+5G>A		24		
	PTPRQ NM_00114502 6.1	AD/AR Heterocigoto	c.1891A>C	p.Lys631Gln	13		
AD/AR Heterocigoto		c.4758C>A	p.Ser1586=	28			
38923	TRIOBP NM_00103914 1.2	AR Heterocigoto	c.3662G>A	p.Arg1221Gln	7	Hipoacusia	No
		AR Heterocigoto	c.3942G>C	p.Glu1314Asp	7		
	OTOF NM_194248.2	AR Heterocigoto	c.4463A>T	p.Asp1488Val	36		
39185	PTPRQ NM_00114502 6.1	AD/AR Heterocigoto	c.3679C>A	p.Leu1227Ile	22	Hipoacusia Postlingual con Involución en el Desarrollo del Habla	No
	CDH23 NM_022124.5	AR Heterocigoto	c.6050-10C>T		47		
		AR Heterocigoto	c.209-8C>T		5		
	OTOGL NM_173591.3	AR Heterocigoto	c.676T>C	p.Trp226Arg	8		
SIX5 NM_175875.4	AD Heterocigoto	c.2016C>T	p.Ser672=	3			
MYH14 NM_00114580 9.1	AD Heterocigoto	c.4438C>T	p.Arg1480Cys	33			
39195	PTPRQ NM_00114502 6.1	AD/AR Heterocigoto	c.6164C>T	p.Ser2055Leu	39	Hipoacusia	Sí
39252	WFS1 NM_006005.3	AD/AR Heterocigoto	c.951C>T	p.Thr317=	8	Hipoacusia	Sordera familiar vía materna (AD)
	PCDH15 NM_00114277 1.1	AR Heterocigoto	c.1498G>A	p.Val500Ile	14		
		AD/AR Heterocigoto	c.6397T>C	p.Trp2133Arg	23		
	OTOA NM_144672.3	AR Heterocigoto	c.2672G>A	p.Arg891His	23		
AR Heterocigoto		c.2774A>T	p.Gln925Leu	23			
39461	STRC NM_153700.2	AR Heterocigoto	c.2640G>T	p.Glu880Asp	8	Hipoacusia	Sí
	CDH23 NM_022124.5	AR Heterocigoto	c.2875G>A	p.Ala959Thr	25		
		AR Heterocigoto	c.7468G>A	p.Glu2490Lys	53		
	TECTA NM_005422.2	AD/AR Heterocigoto	c.4205G>C	p.Cys1402Ser	12		
OTOGL NM_173591.3	AR Heterocigoto	c.1775G>T	p.Arg592Ile	17			
39508	MYO15A NM_016239.3	AR Heterocigoto	c.581G>A	p.Arg194His	2	Hipoacusia	No
	MYH9 NM_002473.5	AD Heterocigoto	c.2341G>A	p.Asp781Asn	19		
39870	USH2A NM_206933.2	AR Heterocigoto	c.11732A>T	p.Glu3911Val	61	Hipoacusia + Retraso psicomotor	No
	OTOA NM_144672.3	AR Heterocigoto	c.2672G>A	p.Arg891His	23		
AR		c.2774A>T	p.Gln925Leu	23			

		Heterocigoto					
40055	MYO15A NM_016239.3	AR Heterocigoto	c.574C>T	p.Arg192Cys	2	Hipoacusia + Consanguinidad	Sí
		AR Heterocigoto	c.9401G>A	p.Arg3134Gln	57		
	KCNQ1 NM_144612.2	AR Heterocigoto	c.721G>A	p.Val241Ile	5		
	LOXHD1 NM_000218.2	AR Heterocigoto	c.166G>A	p.Gly56Ser	2		
40193	DFNB59 NM_001042702.3	AR Heterocigoto	c.216T>C	p.Ile72=	3	Hipoacusia	Sordera familiar vía materna (AD)
40339	OTOA NM_144672.3	AR Heterocigoto	c.3044G>A	p.Gly1015Glu	25	Hipoacusia	No
	CEP250 NM_007186.5	AR Heterocigoto	c.4275C>G	p.Leu1425=	30		

¹. AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva.

Los pacientes 39252 y 39870 también presentaban una mutación posiblemente patológica en el gen *OTOA* (Tabla 16). El primero en un 12% de lecturas (Figura 14) y el segundo en un 17% (Figura 15). Tras realizar la técnica de secuenciación Sanger se concluyó que esas mutaciones estaban presentes en el pseudogen *OTAP1*, descartándose por lo tanto su posible carácter patológico.

Tabla 16. Pacientes con variante localizada en el pseudogen *OTOAP1*.

PACIENTE	GEN	CAMBIO A NIVEL DE cDNA	CAMBIO A NIVEL PROTEICO	EXÓN	CLASIFICACIÓN
39252	OTOA NM_144672.3	c.2359G>T	p.Glu787*	21	Posibl. Patogénica
39870	OTOA NM_144672.3	c.2359G>T	p.Glu787*	21	Posibl. Patogénica

¹. AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva.

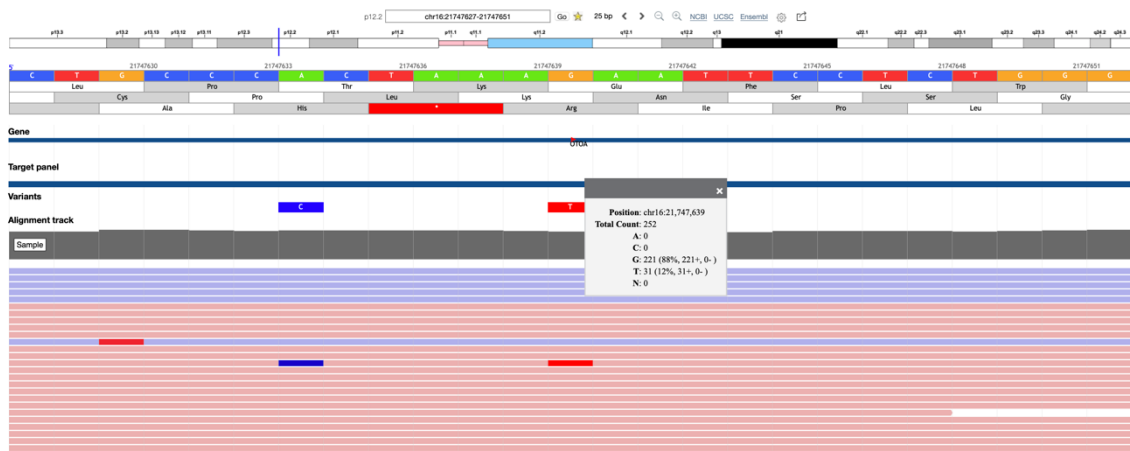


Figura 14. Visualización de las secuencias de ADN de un paciente en el programa IGV. En este caso observamos la mutación c.2359G>T en el gen *OTOA* del paciente 39252. En el visor vemos en color rojo el cambio nucleotídico. En este caso el nucleótido mutado está representado en un 12% de las secuencias.

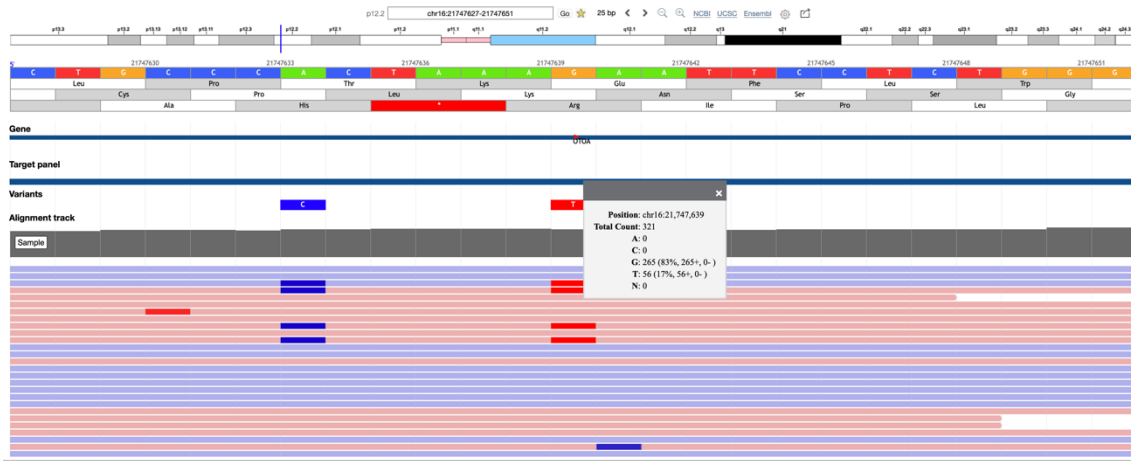


Figura 15. Visualización de las secuencias de ADN de un paciente en el programa IGV. En este caso observamos la mutación $c.2359G>T$ en el gen *OTOA* del paciente 39870. En el visor vemos en color rojo el cambio nucleotídico. En este caso el nucleótido mutado está representado en un 17% de las secuencias.

4.4. PACIENTES CON DIAGNÓSTICO NEGATIVO

Los pacientes que no presentaron ninguna mutación patológica o posiblemente patológica, ni tampoco ninguna *VOUS*, se les asignó la etiqueta de resultado negativo.

Fue el caso de los pacientes 39268 y 39926. Ninguno de los dos presentaba antecedentes familiares.

5. DISCUSIÓN

La hipoacusia es una disminución de la capacidad auditiva que padecen alrededor de 360 millones de personas (OMS, 2013). Esta patología puede deberse a factores ambientales, genéticos, o incluso una combinación de ambos tipos. La hipoacusia hereditaria se puede clasificar como sindrómica y no-sindrómica (esta última constituye el 70% de los casos) (Shearer *et al.*, 1993; Van Camp & Smith, 2006). La hipoacusia hereditaria es una enfermedad genéticamente muy heterogénea, habiendo más de 100 genes identificados y más de mil mutaciones implicadas, reflejo de la enorme complejidad de la estructura y el funcionamiento del oído interno (Van Camp & Smith, 2006). Además, esta puede tener un tipo de herencia dominante, recesiva, ligada al cromosoma X o mitocondrial. E incluso, algunos genes, presentan un patrón de herencia dominante y recesivo (Hilgert *et al.*, 2009).

Otra característica que complica los estudios genéticos de hipoacusia de origen genético es la presencia de pseudogenes, como es en el caso de los genes *OTOA*, *STRC* y *ESPN*, incluidos en este panel de secuenciación NGS. Las sondas hibridan tanto en los genes de interés como en las regiones homólogas de los pseudogenes, de manera que, al visualizar las variantes anotadas, en ocasiones, no se puede distinguir si se encuentran en el gen o en el pseudogen. Por ello es necesario confirmar la presencia de dichas variantes en el gen correspondiente mediante la técnica de secuenciación Sanger. Para ello se diseñan unos primers específicos que amplifican la región del gen, donde se localiza la variante objetivo, y no del pseudogen.

Actualmente, es posible analizar simultáneamente multitud de genes relacionados con hipoacusia gracias al desarrollo de la NGS. Sin embargo, el rendimiento mediante los paneles de secuenciación NGS en pacientes con hipoacusia se sitúa alrededor del 40-50% (Shearer *et al.*, 2013; Shearer & Smith, 2015; Tekin *et al.*, 2016), aunque este resultado puede variar en función de muchos factores: el tipo de hipoacusia, la edad de inicio, la existencia de antecedentes familiares, el origen étnico, el número de genes que contiene el panel de secuenciación NGS...

En este estudio, la tasa de eficacia diagnóstica fue del 52,78%. similar a la de otros trabajos. Los pacientes con diagnóstico genético positivo (Tablas 12 y 13) son, la mitad de ellos, casos familiares.

Los genes con mutaciones responsables de hipoacusia en los pacientes con diagnóstico positivo se representan en la Figura 16, detallando además el número de casos.

En hipoacusia recesiva, el gen *GJB2*, es responsable de la hipoacusia en 3 de los pacientes diagnosticados de 3 familias distintas; seguido por los genes *MYO7A*, *OTOF*, *TECTA* y *TMPRSS3* responsables, cada uno de ellos, de la hipoacusia en 1 paciente. Al igual que en este trabajo, en la mayoría de las poblaciones, el gen más prevalente en hipoacusias de herencia recesiva es *GJB2* (Bazazzadegan *et al.*, 2012; Domínguez-Ruiz *et al.*, 2015; Xiang *et al.*, 2019).

En hipoacusia dominante encontramos mutaciones de carácter patológico en el gen *TECTA*, en 2 pacientes de la misma familia, seguido por el gen *MITF*, responsable de hipoacusia en 2 pacientes de distinta familia. También encontramos mutaciones en los genes *EYA1*, *EYA4*, *COL11A2*, *ESPN*, *WFS1*, *MYO6*, *COCH* y *ACTG1* causa, cada uno de ellos, de la hipoacusia en 1 paciente.

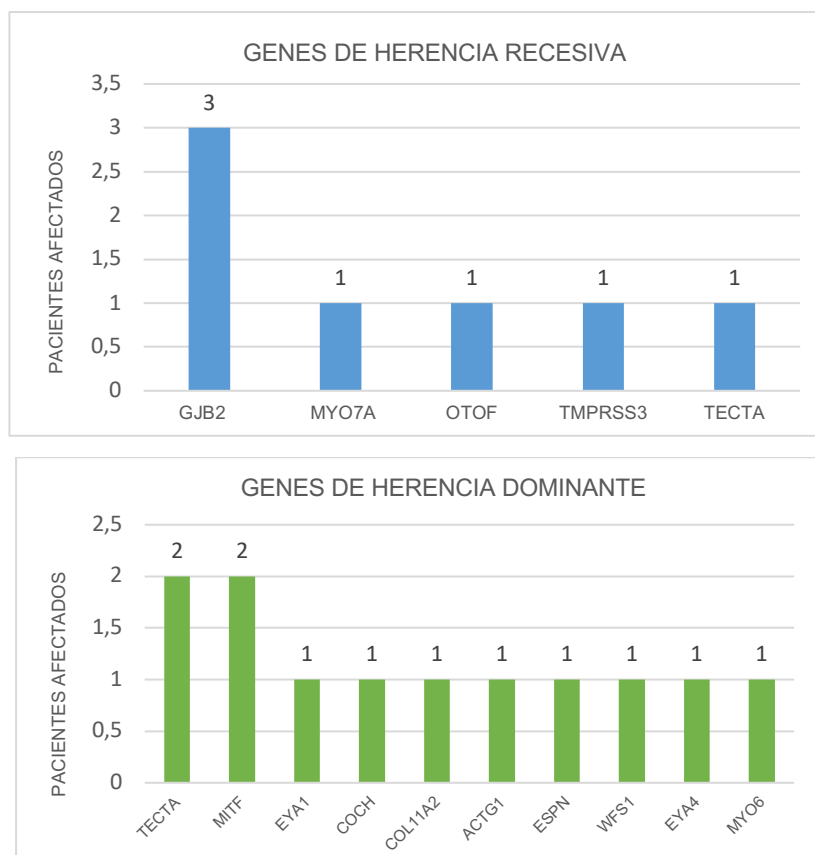


Figura 16. Representación de los genes causantes de hipoacusia, además del número de pacientes afectados por los mismos.

Tres de los pacientes de herencia dominante corresponden a casos sindrómicos:

- Es el caso del paciente 40057, al cual se le detectó una delección completa del gen *MITF* en heterocigosis, presentaba una clínica de posible Síndrome de Waardenburg, lo cual concuerda con los resultados, puesto que el gen *MITF*, es responsable del Síndrome de Waardenburg de tipo II, de herencia dominante (Tabla 1).
- Lo mismo ocurre con el paciente 12227, el cual presentaba una clínica de posible Síndrome de Waardenburg/hipoacusia. En este caso, también se detectó una mutación en heterocigosis en el gen *MITF* (c.943C>T).
- El paciente 37350 se diagnosticó clínicamente como posible Síndrome de BOR, lo que concuerda con la mutación encontrada en el gen *EYA1* (c.1540_15 42delCTG). El gen *EYA1* es una causa de este síndrome, con herencia de carácter dominante (Tabla 1).

El gen *TECTA* se ha asociado a hipoacusia de carácter dominante (Moreno-Pelayo *et al.*, 2001) y recesivo (Naz *et al.*, 2003). En este estudio, hemos encontrado dos pacientes de una misma familia (38971 y 39927), con una mutación en el gen *TECTA* en heterocigosis de carácter dominante y previamente descrita como patológica (Legan *et al.*, 2014). En otro paciente (39949) se ha visto una mutación en este gen, presente en homocigosis y de carácter recesivo, además, de ser también descrita previamente como patológica (Hutchin *et al.*, 2005). Este último paciente también presentaba una mutación en heterocigosis en el gen *MYO7A* (c.5648G>A), descrita como patológica (Ouyang *et al.*, 2005), asociado a síndrome de Usher tipo 1 de herencia recesiva (Tabla 1). Esta mutación, no podría considerarse como responsable de la enfermedad, ya que sería necesario otra mutación en el mismo gen, además, el paciente presenta únicamente una clínica de hipoacusia no-sindrómica.

El paciente 4293, también presentaba mutaciones en heterocigosis en 2 genes distintos: *COL11A2* (c.1748G> A) y *GJB2* (c.35delG). Sus antecedentes familiares (sordera familiar vía paterna: su padre sordo presenta la misma mutación en el gen *COL11A2*), apuntarían a una hipoacusia de carácter aparentemente dominante, siendo esta la posible causa de la enfermedad. Por lo cual, la mutación en heterocigosis en el

gen *GJB2* (c.35delG) no sería la causa de la hipoacusia, ya que haría falta una segunda mutación en este gen, debido a su carácter recesivo.

Entre los pacientes con resultado no concluyente (Tabla 14) encontramos 3 que presentan solo una mutación en heterocigosis en genes recesivos. Para conseguir un diagnóstico genético concluyente, se debería encontrar una segunda mutación en ese mismo gen (en el segundo alelo). En este panel no se han incluido las regiones promotoras ni las regiones intrónicas profundas de los 61 genes analizados, por lo que puede que la segunda mutación se encuentre en dichas regiones.

El desarrollo de la secuenciación de nueva generación (NGS) ha revolucionado el campo del diagnóstico genético, especialmente en las enfermedades como la hipoacusia, la cual es genéticamente muy heterogénea. Sin embargo, como se ve en los resultados obtenidos en el presente estudio, se detectaron muchas variantes de significado clínico incierto (VOUS) (Tabla 15).

Las variantes que dan lugar a mutaciones *nonsense* (codones de stop directo) y *frameshift* (cambios en la pauta de lectura de las proteínas que codifican), se clasifican directamente como patológicas o probablemente patológicas. También se consideran claramente patológicas las variantes localizadas en los sitios canónicos de *splicing* (posiciones +/-1 y +/-2 de los intrones).

Pero otro tipo de mutaciones como son las *missense* (cambio de aminoácido), isocodificantes (que no alteran la secuencia aminoacídica) y las localizadas en regiones promotoras o regiones intrónicas profundas, se clasifican, a priori, como VOUS. Por lo que, en estos casos, se requeriría de estudios complementarios como lo son la segregación familiar, los estudios funcionales, el análisis a nivel de ARN, para poder determinar el carácter patológico o benigno de estas variantes.

Es posible que, en un futuro, si se llevan a cabo todos estos estudios complementarios, algunas variantes clasificadas como posiblemente patológicas, de las cuales no hay estudios, sean reclasificadas como benignas, o que algunas variantes etiquetadas como VOUS, se puedan clasificar como patológica o no patológica, dilucidando así aun más los resultados.

Aunque también puede suceder que la causa de pérdida auditiva sea por mutaciones en algún gen que no se ha incluido en el panel, ya que solo se han tenido en cuenta los 61 más prevalentes en nuestra población. Además, la hipoacusia puede originarse por factores externos como lo es la exposición al ruido, traumatismos, infecciones... o puede estar ligada a la edad, por lo que no siempre son de origen genético.

6. CONCLUSIONES

- El panel *NGS* diseñado en este trabajo ha presentado una eficacia diagnóstica del 52,78%, siendo diagnosticados 19 pacientes de un total de 37 con hipoacusia neurosensorial del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia) recopilados a lo largo del 2019.
- Los genes *GJB2* y *TECTA*, han sido los que han presentado una mayor tasa mutacional en pacientes con diagnóstico positivo, siendo también dos de los genes más prevalentes en la población con pérdida auditiva no-sindrómica, como se describe en otros trabajos.
- Las pruebas genéticas juegan un papel importante en el diagnóstico de hipoacusia de origen genético. A corto plazo, el método de secuenciación Sanger continuará utilizándose como una estrategia complementaria para validar mutaciones detectadas con el panel de secuenciación *NGS*
- Los paneles *NGS* tienen un gran potencial puesto que nos permiten estudiar muchos genes simultáneamente en un gran número de pacientes. Sin embargo, al llevar al cabo el análisis de las variantes se obtienen muchas de significado incierto (*VOUS*). Por ello, para aumentar la tasa de diagnóstico se requiere de estudios complementarios que permitan obtener más información sobre la patogenicidad de las variantes y su modo de herencia. Estos estudios complementarios pueden ser estudios de segregación familiar, estudios funcionales y análisis a nivel de ARN.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Allan J. Richards, John R. W. Yates, Rebecca Williams, Stewart J. Payne, F. Michael Pope, John D. Scott, Martin P. Snead (1996). A Family with Stickler Syndrome Type 2 Has a Mutation in the COL11A1 Gene Resulting in the Substitution of Glycine 97 by Valine in $\alpha 1(XI)$ Collagen. *Human Molecular Genetics*, 5(9):1339-43. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.9.1339>
- Ammar-Khodja, F., Bonnet, C., Dahmani, M., Ouhab, S., Lefevre, G. M., Ibrahim, H., Hardelin, J. P., Weil, D., Louha, M., & Petit, C. (2015). Diversity of the causal genes in hearing impaired algerian individuals identified by whole exome sequencing. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 3(3), 189–196. <https://doi.org/10.1002/mgg3.131>
- Azadegan-Dehkordi, F., Ahmadi, R., Koohiyan, M., & Hashemzadeh-Chaleshtori, M. (2019). Update of spectrum c.35delG and c.-23+1G>A mutations on the GJB2 gene in individuals with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. In *Annals of Human Genetics* (Vol. 83, Issue 1, pp. 1–10). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ahg.12284>
- Azaiez, H., Booth, K. T., Ephraim, S. S., Crone, B., Black-Ziegelbein, E. A., Marini, R. J., Shearer, A. E., Sloan-Heggen, C. M., Kolbe, D., Casavant, T., Schnieders, M. J., Nishimura, C., Braun, T., & Smith, R. J. H. (2018). Genomic Landscape and Mutational Signatures of Deafness-Associated Genes. *American Journal of Human Genetics*, 103(4), 484–497. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.08.006>
- Back, D., Shehata-Dieler, W., Vona, B., Hofrichter, M. A. H., Schroeder, J., Haaf, T., Rahne, T., Hagen, R., & Schraven, S. P. (2019). Phenotypic Characterization of DFNB16-associated Hearing Loss. *Otology and Neurotology*, 40(1), E48–E55. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000002059>
- Bakhchane, A., Charif, M., Bousfiha, A., Boulouiz, R., Nahili, H., Rouba, H., Charoute, H., Lenaers, G., & Barakat, A. (2017). Novel compound heterozygous MYO7A mutations in Moroccan families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *PLoS ONE*, 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176516>
- Bazazzadegan, N., Nikzat, N., Fattahi, Z., Nishimura, C., Meyer, N., Sahraian, S., Jamali, P., Babanejad, M., Kashef, A., Yazdan, H., Sabbagh Kermani, F., Taghdiri, M., Azadeh, B., Mojahedi, F., Khoshaeen, A., Habibi, H., Reyhanifar, F., Nouri, N., Smith, R. J. H., ... Najmabadi, H. (2012). The spectrum of GJB2 mutations in the Iranian population with non-syndromic hearing loss-A twelve year study. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 76(8), 1164–1174. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2012.04.026>

- Billington, N., Wang, A., Mao, J., Adelstein, R. S., & Sellers, J. R. (2013). Characterization of three full-length human nonmuscle myosin II paralogs. *Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 33398–33410. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499848>
- Bonne-Tamir, B., DeStefano, A. L., Briggs, C. E., Adair, R., Franklyn, B., Weiss, S., Korostishevsky, M., Frydman, M., Baldwin, C. T., & Farrer, L. A. (1996). Linkage of congenital recessive deafness (gene DFNB10) to chromosome 21q22.3. *American Journal of Human Genetics*, 58(6), 1254–1259.
- Bryan, K. E., Wen, K. K., Zhu, M., Rendtorff, N. D., Feldkamp, M., Tranebjaerg, L., Friderici, K. H., & Rubenstein, P. A. (2006). Effects of human deafness γ -actin mutations (DFNA20/26) on actin function. *Journal of Biological Chemistry*, 281(29), 20129–20139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601514200>
- de Kok, Y. J. M., van der Maarel, S. M., Bitner-Glindzicz, M., Huber, I., Monaco, A. P., Malcolm, S., Pembrey, M. E., Ropers, H. H., & Cremers, F. P. M. (1995). Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science*, 267(5198), 685–688. <https://doi.org/10.1126/science.7839145>
- del Castillo, F. J., Rodríguez-Ballesteros, M., Álvarez, A., Hutchin, T., Leonardi, E., de Oliveira, C. A., Azaiez, H., Brownstein, Z., Avenarius, M. R., Marlin, S., Pandya, A., Shahin, H., Siemering, Weil, D., Wuyts, W., Aguirre, L. A., Marlín, Y., Moreno-Pelayo, M. A., Villamar, M., ... del Castillo, I. (2005). A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *Journal of Medical Genetics*, 42(7), 588–594. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.028324>
- del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M. A., del Castillo, F. J., Álvarez, A., Tellería, D., Menéndez, I., & Moreno, F. (2002). A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *New England Journal of Medicine*, 346(4), 243–249. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012052>
- Denoyelle, F., Mariin, S., Weil, D., Moatti, L., Chauvin, P., Garabédian, É. N., & Petit, C. (1999). Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: Implications for genetic counselling. *Lancet*, 353(9161), 1298–1303. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)11071-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)11071-1)
- Desmet, F. O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod- Beroud, G., Claustres, M., & Beroud, C. (2009). Human Splicing Finder: An online bioinformatic tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research*, 37(9), e67. doi: 10.1093/nar/gkp215.
- Domínguez Ruiz, M. (2015). *Estudio Molecular de Genes Implicados en Hipoacusia No Síndromica Autosómica Recesiva Mediante Secuenciación Sanger y de Nueva Generación* (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid.

- Donaudy, F., Snoeckx, R., Pfister, M., Zenner, H. P., Blin, N., di Stazio, M., Ferrara, A., Lanzara, C., Ficarella, R., Declau, F., Pusch, C. M., Nürnberg, P., Melchionda, S., Zelante, L., Ballana, E., Estivill, X., van Camp, G., Gasparini, P., & Savoia, A. (2004). Nonmuscle Myosin Heavy-Chain Gene MYH14 Is Expressed in Cochlea and Mutated in Patients Affected by Autosomal Dominant Hearing Impairment (DFNA4). *American Journal of Human Genetics*, 74(4), 770–776. <https://doi.org/10.1086/383285>
- Dossena, S., Bizhanova, A., Nofziger, C., Bernardinelli, E., Ramsauer, J., Kopp, P., & Paulmichl, M. (2011). Identification of allelic variants of pendrin (SLC26A4) with loss and gain of function. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28(3), 467–476. <https://doi.org/10.1159/000335108>
- Fokkema, I. F., Taschner, P. E., Schaafsma, G. C., Celli, J., Laros, J. F., & den Dunnen, J. T. (2011). LOVD v.2.0: The next generation in gene variant databases. *Human Mutation*, 32(5), 557–563. doi: 10.1002/humu.21438.
- Fowler, A., Mahamdallie, S., Ruark, E., Seal, S., Ramsay, E., Clarke, M., Uddin, I., Wylie, H., Strydom, A., Lunter, G., & Rahman, N. (2016). Accurate clinical detection of exon copy number variants in a targeted NGS panel using DECoN. *Wellcome Open Research*, 1, 20. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.10069.1>
- Gallo-Terán, J., Morales-Angulo, C., Sánchez, N., Manrique, M., Rodríguez-Ballesteros, M., & Moreno-Pelayo, M. *et al.* (2006). Neuropatía auditiva secundaria a la mutación Q829X en el gen de la otoferlina (OTOF) en un lactante sometido a screening neonatal de hipoacusia, 57(7):333-5. [https://doi.org/10.1016/S0001-6519\(06\)78722-2](https://doi.org/10.1016/S0001-6519(06)78722-2).
- Gaylor, J. M., Raman, G., Chung, M., Lee, J., Rao, M., Lau, J., & Poe, D. S. (2013). Cochlear implantation in adults: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 139(3), 265–272. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2013.1744>
- Golomb, E., Ma, X., Jana, S. S., Preston, Y. A., Kawamoto, S., Shoham, N. G., Goldin, E., Conti, M. A., Sellers, J. R., & Adelstein, R. S. (2004). Identification and Characterization of Nonmuscle Myosin II-C, a New Member of the Myosin II Family. *Journal of Biological Chemistry*, 279(4), 2800–2808. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309981200>
- Golub, J. S., Won, J. H., Drennan, W. R., Worman, T. D., & Rubinstein, J. T. (2012). Spectral and temporal measures in hybrid cochlear implant users: On the mechanism of electroacoustic hearing benefits. *Otology and Neurotology*, 33(2), 147–153. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e318241b6d3>
- González-del Pozo, M., Martín-Sánchez, M., Bravo-Gil, N., Méndez-Vidal, C., Chimenea, Á., Rodríguez-de la Rúa, E., Borrego, S., & Antiñolo, G. (2018). Searching the second hit in patients with inherited retinal dystrophies and monoallelic variants in ABCA4, USH2A

- and CEP290 by whole-gene targeted sequencing. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31511-5>
- Hilgert, N., Smith, R. J. H., & van Camp, G. (2009). Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? In *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (Vol. 681, Issues 2–3, pp. 189–196). <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.08.002>
- Hooper, J. D., Clements, J. A., Quigley, J. P., & Antalis, T. M. (2001). Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 276, Issue 2, pp. 857–860). <https://doi.org/10.1074/jbc.R000020200>
- Hutchin, T., Coy, N. N., Conlon, H., Telford, E., Bromelow, K., Blyndon, D., Taylor, G., Coghill, E., Brown, S., Trembath, R., Liu, X. Z., Bitner-Glindzicz, M., & Mueller, R. (2005). Assessment of the genetic causes of recessive childhood non-syndromic deafness in the UK - Implications for genetic testing. *Clinical Genetics*, 68(6), 506–512. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00539.x>
- Iwasa, Y. ichiro, Nishio, S. ya, Yoshimura, H., Kanda, Y., Kumakawa, K., Abe, S., Naito, Y., Nagai, K., & Usami, S. ichi. (2013). OTOF mutation screening in Japanese severe to profound recessive hearing loss patients. *BMC Medical Genetics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2350-14-95>
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., ... MacArthur, D. G. (2019). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *BioRxiv*, 531210. <https://doi.org/10.1101/531210>
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F., & Leigh, I. M. (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387(6628), 80–83. <https://doi.org/10.1038/387080a0>
- Kopanos, C., Tsiolkas, V., Kouris, A., Chap- ple, C. E., Albarca Aguilera, M., Meyer, R., & Massouras, A. (2019). VarSome: The hu- man genomic variant search engine. *Bioinformatics*, 35(11), 1978–1980. doi: 10.1093/ bioinformatics/bty897.
- Korver, A. M. H., Smith, R. J. H., van Camp, G., Schleiss, M. R., Bitner-Glindzicz, M. A. K., Lustig, L. R., Usami, S. I., & Boudewyns, A. N. (2017). Congenital hearing loss. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 16094. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.94>
- Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W, Karapetyan K, Katz K, Liu C, Maddipatla Z, Malheiro A, McDaniel K, Ovetsky

- M, Riley G, Zhou G, Holmes JB, Kattman BL, Maglott DR.(2018). ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*, 46(D1):D1062-D1067. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153>
- Lee, H., Deignan, J. L., Dorrani, N., Strom, S. P., Kantarci, S., Quintero-Rivera, F., Das, K., Toy, T., Harry, B., Yourshaw, M., Fox, M., Fogel, B. L., Martinez-Agosto, J. A., Wong, D. A., Chang, V. Y., Shieh, P. B., Palmer, C. G. S., Dipple, K. M., Grody, W. W., ... Nelson, S. F. (2014). Clinical exome sequencing for genetic identification of rare mendelian disorders. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 312(18), 1880–1887. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.14604>
- Lee, Y. J., Park, D., Kim, S. Y., & Park, W. J. (2003). Pathogenic mutations but not polymorphisms in congenital and childhood onset autosomal recessive deafness disrupt the proteolytic activity of TMPRSS3. *Journal of Medical Genetics*, 40(8), 629–631. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.8.629>
- Legan, P., Goodyear, R., Morin, M., Mencia, A., Pollard, H., & Olavarrieta, L. *et al.* (2014). Three deaf mice: mouse models for TECTA-based human hereditary deafness reveal domain-specific structural phenotypes in the tectorial membrane, 15;23(10):2551-68. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt646>.
- Lucotte, G., & Mercier, G. (2001). Meta-analysis of GJB2 mutation 35delG frequencies in Europe. *Genetic Testing*, 5(2), 149–152. <https://doi.org/10.1089/109065701753145646>
- Mackenzie, I., & Smith, A. (2009). Deafness - The neglected and hidden disability. In *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* (Vol. 103, Issue 7, pp. 565–571). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1179/000349809X12459740922372>
- Marková, S. P., Brožková, D. Š., Laššuthová, P., Mészárosová, A., Krůtová, M., Neupauerová, J., Rašková, D., Trková, M., Staněk, D., & Seeman, P. (2018). *STRC* Gene Mutations, Mainly Large Deletions, are a Very Important Cause of Early-Onset Hereditary Hearing Loss in the Czech Population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 22(2), 127–134. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0155>
- Matsunaga, T., Mutai, H., Kunishima, S., Namba, K., Morimoto, N., Shinjo, Y., Arimoto, Y., Kataoka, Y., Shintani, T., Morita, N., Sugiuchi, T., Masuda, S., Nakano, A., Taiji, H., & Kaga, K. (2012). A prevalent founder mutation and genotype-phenotype correlations of OTOF in Japanese patients with auditory neuropathy. *Clinical Genetics*, 82(5), 425–432. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01897.x>
- McCreery, R. W., Venediktov, R. A., Coleman, J. J., & Leech, H. M. (2012). An evidence-based systematic review of amplitude compression in hearing aids for school-age children with hearing loss. *American Journal of Audiology*, 21(2), 269–294. [https://doi.org/10.1044/1059-0889\(2012/12-0013\)](https://doi.org/10.1044/1059-0889(2012/12-0013))

- McGuirt, W. T., Prasad, S. D., Griffith, A. J., Kunst, H. P. M., Green, G. E., Shpargel, K. B., Runge, C., Huybrechts, C., Mueller, R. F., Lynch, E., King, M. C., Brunner, H. G., Cremers, C. W. R. J., Takanosu, M., Li, S. W., Arita, M., Mayne, R., Prockop, D. J., van Camp, G., & Smith, R. J. H. (1999). Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nature Genetics*, 23(4), 413–419. <https://doi.org/10.1038/70516>
- McKusick, V.A., 2007. Mendelian Inheritance in Man and Its Online Version, OMIM. *American Journal of Human Genetics*, 80 (4), 588–604.
- Miyagawa, M., Nishio, S. Y., Ichinose, A., Iwasaki, S., Murata, T., Kitajiri, S. I., & Usami, S. I. (2015). Mutational Spectrum and Clinical Features of Patients with ACTG1 Mutations Identified by Massively Parallel DNA Sequencing. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 124(1_suppl), 84S-93S. <https://doi.org/10.1177/0003489415575057>
- Moreno-Pelayo, M. A., del Castillo, I., Villamar, M., Romero, L., Hernández-Calvín, F. J., Herraiz, C., Barberá, R., Navas, C., & Moreno, F. (2001). A cysteine substitution in the zona pellucida domain of alpha-tectorin results in autosomal dominant, postlingual, progressive, mid frequency hearing loss in a Spanish family. In *Journal of medical genetics* (Vol. 38, Issue 5). *J Med Genet*. <https://doi.org/10.1136/jmg.38.5.e13>
- Morín, M., Bryan, K., Mayo-Merino, F., Goodyear, R., Mencía, Á., & Modamio-Hoybjor, S. *et al.* (2009). *In vivo and in vitro effects of two novel gamma-actin (ACTG1) mutations that cause DFNA20/26 hearing impairment*, 18(16), 3075-3089. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp249>
- Naz, S., Alasti, F., Mowjoodi, A., Riazuddin, S., Sanati, M. H., Friedman, T. B., Griffith, A. J., Wilcox, E. R., & Riazuddin, S. (2003). Distinctive audiometric profile associated with DFNB21 alleles of TECTA. *Journal of Medical Genetics*, 40(5), 360–363. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.5.360>
- Naz, S., Griffith, A. J., Riazuddin, S., Hampton, L. L., Battey, J. F., Khan, S. N., Riazuddin, S., Wilcox, E. R., & Friedman, T. B. (2004). Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. *Journal of Medical Genetics*, 41(8), 591–595. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.018523>
- Oonk, A. M. M., Leijendeckers, J. M., Lammers, E. M., Weegerink, N. J. D., Oostrik, J., Beynon, A. J., Huygen, P. L. M., Kunst, H. P. M., Kremer, H., Snik, A. F. M., & Pennings, R. J. E. (2013). Progressive hereditary hearing impairment caused by a MYO6 mutation resembles presbycusis. *Hearing Research*, 299, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.12.015>
- Organization, W. H. (2013). "Millions of people in the world have hearing loss that can be treated or prevented." Geneva: WHO: 1-17.

- Ouyang, X. M., Yan, D., Du, L. L., Hejtmancik, J. F., Jacobson, S. G., Nance, W. E., Li, A. R., Angeli, S., Kaiser, M., Newton, V., Brown, S. D. M., Balkany, T., & Liu, X. Z. (2005). Characterization of Usher syndrome type I gene mutations in an Usher syndrome patient population. *Human Genetics*, 116(4), 292–299. <https://doi.org/10.1007/s00439-004-1227-2>
- Pabst, R., Putz, R., & Sobotta, J. (2006). *Atlas de anatomía humana Sobotta*. Madrid: Medica Panamericana.
- Rehman, A. U., Friedman, T. B., & Griffith, A. J. (2017). Unresolved questions regarding human hereditary deafness. In *Oral Diseases* (Vol. 23, Issue 5, pp. 551–558). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/odi.12516>
- Rendtorff, N. D., Lodahl, M., Boulahbel, H., Johansen, I. R., Pandya, A., Welch, K. O., Norris, V. W., Arnos, K. S., Bitner-Glindzicz, M., Emery, S. B., Mets, M. B., Fagerheim, T., Eriksson, K., Hansen, L., Bruhn, H., Möller, C., Lindholm, S., Ensgaard, S., Lesperance, M. M., & Tranebjaerg, L. (2011). Identification of p.A684V missense mutation in the WFS1 gene as a frequent cause of autosomal dominant optic atrophy and hearing impairment. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 155(6), 1298–1313. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33970>
- Roland, J. T., Gantz, B. J., Waltzman, S. B., & Parkinson, A. J. (2016). United States multicenter clinical trial of the cochlear nucleus hybrid implant system. *Laryngoscope*, 126(1), 175–181. <https://doi.org/10.1002/lary.25451>
- Rose, P. S., Levy, H. P., Liberfarb, R. M., Davis, J., Szymko-Bennett, Y., Rubin, B. I., Tsilou, E., Griffith, A. J., & Francomano, C. A. (2005). Stickler syndrome: Clinical characteristics and diagnostic criteria. *American Journal of Medical Genetics*, 138 A(3), 199–207. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30955>
- Roux, I., Safieddine, S., Nouvian, R., Grati, M., Simmler, M. C., Bahloul, A., Perfettini, I., le Gall, M., Rostaing, P., Hamard, G., Triller, A., Avan, P., Moser, T., & Petit, C. (2006). Otoferlin, Defective in a Human Deafness Form, Is Essential for Exocytosis at the Auditory Ribbon Synapse. *Cell*, 127(2), 277–289. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.040>
- Royaux, I. E., Wall, S. M., Karniski, L. P., Everett, L. A., Suzuki, K., Knepper, M. A., & Green, E. D. (2001). Pendrin, encoded by the pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 4221–4226. <https://doi.org/10.1073/pnas.071516798>

- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schwager, K. (2007). Reconstruction of middle ear malformations. *GMS Current Topics in Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery*, 6, Doc01. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22073077>
- Shearer, A. E., & Smith, R. J. H. (2015). Massively Parallel Sequencing for Genetic Diagnosis of Hearing Loss: The New Standard of Care. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 153(2), 175–182. <https://doi.org/10.1177/0194599815591156>
- Shearer, A. E., Black-Ziegelbein, E. A., Hildebrand, M. S., Eppsteiner, R. W., Ravi, H., Joshi, S., Guiffre, A. C., Sloan, C. M., Happe, S., Howard, S. D., Novak, B., DeLuca, A. P., Taylor, K. R., Scheetz, T. E., Braun, T. A., Casavant, T. L., Kimberling, W. J., LeProust, E. M., & Smith, R. J. H. (2013). Advancing genetic testing for deafness with genomic technology. *Journal of Medical Genetics*, 50(9), 627–634. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101749>
- Shearer, A. E., Hildebrand, M. S., & Smith, R. (1993). Hereditary Hearing Loss and Deafness Overview. In M. P. Adam (Eds.) et. al., *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.
- Shearer, A. E., Kolbe, D. L., Azaiez, H., Sloan, C. M., Frees, K. L., Weaver, A. E., Clark, E. T., Nishimura, C. J., Black-Ziegelbein, E. A., & Smith, R. J. H. (2014). Copy number variants are a common cause of non-syndromic hearing loss. *Genome Medicine*, 6(5), 37. <https://doi.org/10.1186/gm554>
- Shearer, A. Eliot, & Smith, R. J. H. (2015). Massively Parallel Sequencing for Genetic Diagnosis of Hearing Loss: The New Standard of Care. In *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)* (Vol. 153, Issue 2, pp. 175–182). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/0194599815591156>
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jan 1;29(1):308-11.
- Sloan-Heggen, C. M., Bierer, A. O., Shearer, A. E., Kolbe, D. L., Nishimura, C. J., Frees, K. L., Ephraim, S. S., Shibata, S. B., Booth, K. T., Campbell, C. A., Ranum, P. T., Weaver, A. E., Black-Ziegelbein, E. A., Wang, D., Azaiez, H., & Smith, R. J. H. (2016). Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Human Genetics*, 135(4), 441–450. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1648-8>
- Smith, R. J. H., Bale, J. F., & White, K. R. (2005). Sensorineural hearing loss in children. *Lancet*, 365(9462), 879–890. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71047-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71047-3)

- Snoeckx, R. L., Huygen, P. L. M., Feldmann, D., Marlin, S., Denoyelle, F., Waligora, J., Mueller-Malesinska, M., Pollak, A., Ploski, R., Murgia, A., Orzan, E., Castorina, P., Ambrosetti, U., Nowakowska-Szyrwinska, E., Bal, J., Wiszniewski, W., Janecke, A. R., Nekahm-Heis, D., Seeman, P., ... van Camp, G. (2005). GJB2 mutations and degree of hearing loss: A multicenter study. *American Journal of Human Genetics*, 77(6), 945–957. <https://doi.org/10.1086/497996>
- Stenson, P. D., Ball, E. v., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A., Thomas, N. S. T., Abeyasinghe, S., Krawczak, M., & Cooper, D. N. (2003). Human Gene Mutation Database (HGMD®): 2003 Update. In *Human Mutation* (Vol. 21, Issue 6, pp. 577–581). Hum Mutat. <https://doi.org/10.1002/humu.10212>
- Suárez, C., Gil-Cardedo, L., Marco, J., Medina, J., Ortega, P., & Trinidad, J. (2007). *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello* (2nd ed.). Madrid: Medica Paraamericana.
- Szabo, R., Wu, Q., Dickson, R. B., Netzel-Arnett, S., Antalis, T. M., & Bugge, T. H. (2003). Type II transmembrane serine proteases. In *Thrombosis and Haemostasis* (Vol. 90, Issue 2, pp. 185–193). <https://doi.org/10.1160/th03-02-0071>
- Takeda, K. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Human Molecular Genetics*, 10(5), 477–484. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.5.477>
- Tekin, D., Yan, D., Bademci, G., Feng, Y., Guo, S., Foster, J., Blanton, S., Tekin, M., & Liu, X. (2016). A next-generation sequencing gene panel (MiamiOtoGenes) for comprehensive analysis of deafness genes. *Hearing Research*, 333, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.01.018>
- Van Camp G, Smith RJ (2006) Hereditary hearing loss homepage. <https://hereditaryhearingloss.org/> [Accessed 22 May 2020].
- Verhoeven, K., van Laer, L., Kirschhofer, K., Legan, P. K., Hughes, D. C., Schatteman, I., Verstreken, M., van Hauwe, P., Coucke, P., Chen, A., Smith, R. J. H., Somers, T., Offeciers, F. E., van de Heyning, P., Richardson, G. P., Wachtler, F., Kimberling, W. J., Willems, P. J., Govaerts, P. J., & van Camp, G. (1998). Mutations in the human α -tectorin gene cause autosomal dominant non- syndromic hearing impairment. *Nature Genetics*, 19(1), 60–62. <https://doi.org/10.1038/ng0598-60>
- Verpy, E., Leibovici, M., Michalski, N., Goodyear, R. J., Houdon, C., Weil, D., Richardson, G. P., & Petit, C. (2011). Stereocilin connects outer hair cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane. *The Journal of Comparative Neurology*, 519(2), 194–210. <https://doi.org/10.1002/cne.22509>

- Vikkula, M., Madman, E. C. M., Lui, V. C. H., Zhidkova, N. I., Tiller, G. E., Goldring, M. B., van Beersum, S. E. C., de Waal Malefijt, M. C., van den Hoogen, F. H. J., Ropers, H. H., Mayne, R., Cheah, K. S. E., Olsen, B. R., Warman, M. L., & Brunner, H. G. (1995). Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with the COL11A2 locus. *Cell*, 80(3), 431–437. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90493-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90493-X)
- Vona, B., Hofrichter, M. A. H., Neuner, C., Schröder, J., Gehrig, A., Hennermann, J. B., Kraus, F., Shehata-Dieler, W., Klopocki, E., Nanda, I., & Haaf, T. (2015). DFNB16 is a frequent cause of congenital hearing impairment: implementation of *STRC* mutation analysis in routine diagnostics. *Clinical Genetics*, 87(1), 49–55. <https://doi.org/10.1111/cge.12332>
- Wang, A., Liang, Y., Fridell, R. A., Probst, F. J., Wilcox, E. R., Touchman, J. W., Morton, C. C., Morell, R. J., Noben-Trauth, K., Camper, S. A., & Friedman, T. B. (1998). Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science*, 280(5368), 1447–1451. <https://doi.org/10.1126/science.280.5368.1447>
- Weegerink, N. J. D., Schraders, M., Oostrik, J., Huygen, P. L. M., Strom, T. M., Granneman, S., Pennings, R. J. E., Venselaar, H., Hoefsloot, L. H., Elting, M., Cremers, C. W. R. J., Admiraal, R. J. C., Kremer, H., & Kunst, H. P. M. (2011). Genotype-phenotype correlation in DFNB8/10 families with TMPRSS3 mutations. *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 12(6), 753–766. <https://doi.org/10.1007/s10162-011-0282-3>
- Xiang, Y. bao, Tang, S. hua, Li, H. zheng, Xu, C. yang, Chen, C., Xu, Y. zhi, Ding, L. rong, & Xu, X. qin. (2019). Mutation analysis of common deafness-causing genes among 506 patients with nonsyndromic hearing loss from Wenzhou city, China. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 122, 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2019.04.024>
- Yan, D., Xiang, G., Chai, X., Qing, J., Shang, H., Mittal, B. Z. R., Shen, J., Smith, R. J. H., Fan, Y. S., Blanton, S. H., Tekin, M., Morton, C., Xing, W., Cheng, J., & Liu, X. Z. (2017). Screening of deafness-causing DNA variants that are common in patients of European ancestry using a microarray-based approach. *PLoS ONE*, 12(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169219>
- Yang, S., Dai, P., Liu, X., Kang, D., Zhang, X., Yang, W., Zhou, C., Yang, S., & Yuan, H. (2013). Genetic and Phenotypic Heterogeneity in Chinese Patients with Waardenburg Syndrome Type II. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077149>
- Yang, Y., Muzny, D. M., Reid, J. G., Bainbridge, M. N., Willis, A., Ward, P. A., Braxton, A., Beuten, J., Xia, F., Niu, Z., Hardison, M., Person, R., Bekheirnia, M. R., Leduc, M. S.,

- Kirby, A., Pham, P., Scull, J., Wang, M., Ding, Y., ... Eng, C. M. (2013). Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *New England Journal of Medicine*, 369(16), 1502–1511. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306555>
- Yang, Y., Muzny, D. M., Xia, F., Niu, Z., Person, R., Ding, Y., Ward, P., Braxton, A., Wang, M., Buhay, C., Veeraraghavan, N., Hawes, A., Chiang, T., Leduc, M., Beuten, J., Zhang, J., He, W., Scull, J., Willis, A., ... Eng, C. M. (2014). Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 312(18), 1870–1879. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.14601>
- Yates, A., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, J., Allen, J., & Alvarez-Jarreta, J. *et al.* (2020). *Ensembl 2020*, 8;48(D1):D682-D688. doi: 10.1093/nar/gkz966.
- Yilmaz, A. (2015). Bioinformatic Analysis of GJB2 Gene Missense Mutations. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 71(3), 1623–1642. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0385-7>
- Youssefian, L., Vahidnezhad, H., Saeidian, A. H., Mahmoudi, H., Karamzadeh, R., Kariminejad, A., Huang, J., Li, L., Jannace, T. F., Fortina, P., Zeinali, S., White, T. W., & Uitto, J. (2019). A novel autosomal recessive GJB2-associated disorder: Ichthyosis follicularis, bilateral severe sensorineural hearing loss, and punctate palmoplantar keratoderma. *Human Mutation*, 40(2), 217–229. <https://doi.org/10.1002/humu.23686>
- Zdebik, A. A., Wangemann, P., & Jentsch, T. J. (2009). Potassium ion movement in the inner ear: Insights from genetic disease and mouse models. In *Physiology* (Vol. 24, Issue 5, pp. 307–316). <https://doi.org/10.1152/physiol.00018.2009>
- Zhang, Q. J., Han, B., Lan, L., Zong, L., Shi, W., Wang, H. Y., Xie, L. Y., Wang, H., Zhao, C., Zhang, C., Yin, Z. F., Wang, D. Y., Petit, C., Guan, J., & Wang, Q. J. (2016). High frequency of OTOF mutations in Chinese infants with congenital auditory neuropathy spectrum disorder. *Clinical Genetics*, 90(3), 238–246. <https://doi.org/10.1111/cge.12744>