



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

Diagnóstico genético de hipoacusia hereditaria mediante la  
aplicación de estrategias genómicas

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: Luengo Rodriguez, Ester

Tutor/a: Murguía Ibáñez, José Ramón

Cotutor/a externo: Aller Mañas, Elena

Director/a Experimental: García García, Gema

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



**Título:** Diagnóstico genético de hipoacusia hereditaria mediante la aplicación de estrategias genómicas.

**Title:** Genetic diagnosis of hereditary hearing impairment through the application of genomic strategies,

**Títol:** Diagnòstic genètic de hipoacúsia hereditari mitjançant l'aplicació d'estratègies genòmiques.

**Resumen:** Las hipoacusias (HL) son un trastorno sensorial muy prevalente que aumenta con la edad. 196 millones de personas en Europa tienen algún grado de pérdida auditiva, de los cuales aproximadamente la mitad se piensa que son de etiología genética. La hipoacusia hereditaria tiene una alta heterogeneidad tanto clínica como genética. Hasta la fecha se han descrito más de 200 genes diferentes y más de 400 síndromes asociados a HL, lo que dificulta el diagnóstico genético de este trastorno sensorial. Por ello, las técnicas de secuenciación masiva han supuesto un gran avance en este ámbito.

En este trabajo se plantea el análisis genético de pacientes diagnosticados de hipoacusia con sospecha de origen genético utilizando dos estrategias: por un lado, mediante un panel de genes enriquecido (59 genes) con el que se estudiaron 12 casos; y por otro lado, con un exoma clínico dirigido a un panel virtual de 209 genes asociados a HL.

El propósito del trabajo es establecer el diagnóstico genético de ambas cohortes de pacientes. Con el exoma clínico, al ampliar el número de genes analizados, se espera encontrar una mayor tasa de diagnósticos. Con el panel de genes se identificó la causa genética en 1 paciente (8,33%), siendo el gen causante del paciente del panel de genes *WFS1*, de herencia dominante. Con el exoma clínico se resolvieron 21 casos (46,67%), de los cuales se encontraron variantes patogénicas en: 13 genes de herencia recesiva, 7 genes de herencia dominante y 1 gen de herencia ligada al cromosoma X. En total, se han encontrado 9 variantes nuevas cuya patogenicidad ha sido analizada mediante el uso de herramientas *in silico*. Además, se realizó un estudio de segregación familiar cuando fuese posible en aquellos casos donde las variantes fuesen de significado incierto o probablemente patogénicas, especialmente las de herencia dominante. Asimismo, las herramientas *in silico* predecían un efecto patogénico en una de las variantes encontradas, concretamente c.-22-18T>A en *GJB2*.

La implementación de las NGS en el diagnóstico genético de hipoacusias hereditarias ha incrementado la tasa de diagnósticos, mejorando así la exactitud pronóstica y el consejo genético y reproductivo.

**Palabras clave:** hipoacusia hereditaria; diagnóstico genético; análisis variantes; panel de genes; exoma clínico.

**Abstract:** Hearing impairment (HI) is a sensorial, highly prevalent disorder that increases with age. About 196 million people have some degree of hearing loss in Europe, of which over half of them are estimated to have a genetic cause. Hereditary hearing impairment has a high clinical and genetic heterogeneity. To date, there has been over 200 genes and over 400 syndromes associated to HL, which hampers patient's genetic diagnosis. Therefore, next generation sequencing has been a great progress in this field.

In this thesis, we tackle genetic diagnosis of a cohort of patients diagnosed with sensorineural hearing loss with suspected genetic origin by using two strategies: on one hand, an enriched gene panel (59 genes) with which 12 cases were studied; and on the other hand, a clinical exome targeting a virtual panel of 209 genes associated to HL, with which 45 patients were analyzed.

The purpose of this theses is to stablish the genetic diagnosis of both patient cohorts. With the clinical exome, by increasing of the number of analysed genes, it is expected to have a higher diagnostic rate.

The gene panel strategy could find the genetic cause in 1 patient (8,33%), with the causative gene being *WFS1* with a dominant heritance. With the clinical exome, 21 cases were solved (46,67%), of which 13 had an autosomal recessive pattern of inheritance, 7 had an autosomal dominant pattern of inheritance and 1 had an X-linked pattern of inheritance. 9 of the variants detected in this study were novel and its pathogenicity was evaluated with *in silico* tools. In addition, a family segregation study was performed when possible in those cases where the variants were of uncertain significance or likely pathogenic, specially those with an autosomal dominant pattern of inheritance. Furthermore, the *in silico* tools predicted a pathogenic effect in one of the found variants, specifically c.-22-18T>A in *GJB2*.

The implementation of NGS in the genetic diagnostic of hereditary hearing loss has incremented the diagnostic rate, improving pronostic accuracy as well as genetic and reproductive counseling.

**Key words:** hereditary hearing loss; genetic diagnosis; variant analysis; gene panel; clinical exome.

**Autora:** Ester Luengo Rodríguez

**Tutor UPV:** José Ramón Murguía Ibáñez

**Tutoras externas:** Dra. Gema García García y Dra. Elena Aller Mañas

Valencia, septiembre de 2024

# ÍNDICE

1. Introducción .....	7
1.1 La audición .....	7
1.2 La hipoacusia.....	8
1.3 Hipoacusias hereditarias .....	9
1.4 Diagnóstico genético de la hipoacusia .....	12
2. Objetivos .....	13
3. Materiales y métodos .....	13
3.1 Cohorte de pacientes y extracción de ADN.....	13
3.2 Panel de genes y exoma clínico.....	14
3.3 Preparación de librerías y secuenciación.....	15
3.4 Análisis de datos .....	16
3.5. Validación de variantes.....	17
3.7 Análisis de la estructura proteica .....	18
4. Resultados .....	18
4.1 Panel de genes .....	18
4.2 Exoma clínico.....	21
Casos con hipoacusia AR .....	23
Casos con hipoacusia AD .....	27
Casos de hipoacusia ligada al cromosoma X .....	27
Casos no concluyentes.....	30
4.3 Análisis <i>in silico</i> de la variante en <i>GJB2</i> : c.-22-18T>A .....	30
4.4 Visualización de variantes a nivel de proteína en PyMOL.....	32
Paciente 78425.....	32
Paciente 79834.....	34
Paciente 84190.....	35
5. Discusión de los resultados .....	36
5.1 Pacientes del panel de genes.....	37

5.2 Pacientes del exoma clínico.....	39
Casos no resueltos .....	46
Variantes noveles detectadas en este estudio.....	47
6. Conclusiones .....	48
7. Referencias bibliográficas .....	48
Anejos .....	52
Anejo 1. Ciclo estándar utilizado para el protocolo de PCR.....	52
Anejo 2. Mix y ciclo de PCR para la polimerasa <i>Phussion</i> .....	52
Anejo 3. Mix y ciclo de PCR para la digestión enzimática con XbaI y NdeI. ....	52
Anexo I. Relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible de la Agenda 2030.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Lista de genes empleados en el panel de genes. ....	14
<b>Tabla 2.</b> Lista de genes de hipoacusia para el análisis por exoma clínico.....	15
<b>Tabla 3.</b> Variantes en heterocigosis encontradas como LP en los pacientes analizados con el panel de genes, así como su diagnóstico.....	20
<b>Tabla 4.</b> Variantes posiblemente patológicas detectadas con el exoma clínico en pacientes con un diagnóstico genético ya realizado con anterioridad mediante panel de genes, así como el diagnóstico clínico (Grupo Control). ....	21
<b>Tabla 5.</b> Lista de variantes detectadas como causa genética de hipoacusia y datos clínicos de los pacientes. ....	24
<b>Tabla 6.</b> Clasificación de variantes noveles encontradas en este estudio. ....	28
<b>Tabla 7.</b> Pacientes con un diagnóstico no concluyente. ....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del oído humano. <b>A.</b> El oído se divide en oído externo, medio e interno. <b>B.</b> Corte transversal del conducto coclear, lleno de fluidos especializados, donde se aprecia la placa tectoria (TM) y el órgano de Corti sobre la membrana basilar. <b>C.</b> Ampliación del órgano de Corti, donde aparecen las células ciliadas y de sostén. <b>D.</b> Representación de las células ciliadas con su conjunto de estereocilios (Dror & Avraham, 2010).....	7
--	---

<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de la apertura de un canal de mecanotransducción de una célula ciliada mediante una estimulación auditiva. <b>A.</b> Situación de reposo. <b>B.</b> Situación de estimulación auditiva. <b>C.</b> El canal de potasio se ha abierto y ha permitido la entrada de $K^+$ (Saroul et al., 2016).....	8
<b>Figura 3.</b> Localización cromosómica de algunos genes asociados a hipoacusia (Dror & Avraham, 2010). .....	10
<b>Figura 4.</b> Criterios aplicados para el filtrado de variantes en la plataforma Alissa.....	16
<b>Figura 5.</b> Representación gráfica de los resultados obtenidos con el exoma clínico de una cohorte de 45 pacientes. ....	22
<b>Figura 6.</b> Representación gráfica de los tipos de variantes encontradas en el exoma clínico según el tipo de mutación en el ADN. ....	22
<b>Figura 7.</b> Representación gráfica de la región STRC-CATSPER2-OTOA analizada por MLPA recogida del software Coffalyser.Net™. ....	23
<b>Figura 8.</b> Análisis del efecto de splicing de c.-22-18T>A en NNSplice. <b>A.</b> Aceptores y score de la secuencia WT. <b>B.</b> Aceptores y score de la secuencia mutante. ....	30
<b>Figura 9.</b> Secuencia del único intrón y del exón 2 de GJB2. ....	32
<b>Figura 10.</b> Imagen esquemática de la proteína WFS1 junto con la variante detectada en la paciente 78425 representada con un punto rojo. Figura creada con BioRender .....	33
<b>Figura 11.</b> Imagen molecular de la variante p. Ser446Asn en WFS1 destacada en fucsia en el visor molecular PyMOL. <b>A)</b> Imagen general de la variante, donde se observa formando parte de una alfa-hélice. <b>B)</b> Imagen ampliada del residuo de serina. <b>C)</b> Cambio del residuo de serina por la asparagina, destacada en fucsia. Además, se destaca una fenilalanina en 367 representada con su estructura molecular en forma de palos. <b>D)</b> Imagen de los residuos de asparagina y fenilalanina en forma de esferas.....	34
<b>Figura 12.</b> Imagen molecular de la variante p.Ser46Pro en TECTA destacada en fucsia en el visor molecular PyMOL. <b>A)</b> Imagen general de la variante, donde se observa formando parte de una lámina-beta no predicha por el modelo 3D. <b>B)</b> Imagen ampliada del residuo de serina. <b>C)</b> Cambio del residuo de serina por la prolina, destacada en fucsia. Además, se destaca una valina en 67 representada con su estructura molecular en forma de palos. <b>D)</b> Imagen de los residuos de serina y valina en forma de esferas. ....	35
<b>Figura 13.</b> Imagen molecular de la variante p.Cys677Trp en TECTA destacada en fucsia en el visor molecular PyMOL. <b>A)</b> Imagen general de la variante, donde se observa formando parte de una lámina-beta. <b>B)</b> Imagen ampliada del residuo de cisteína formando un puente disulfuro	

indicado en amarillo con otra cisteína en la posición 652 representada con palos. C) Cambio del residuo de cisteína por triptófano, destacado en fucsia.....	36
<b>Figura 14.</b> Audiograma de la paciente 78425 de ambos oídos. Se observa una hipoacusia severa en frecuencias bajas y moderada en frecuencias altas.....	38
<b>Figura 15.</b> Audiograma del paciente 79834 de ambos oídos. Se muestra una hipoacusia asimétrica: en el oído derecho, de tipo ski-slope que llega a hipoacusia severa en las frecuencias altas; y en el oído izquierdo, moderada.....	41
<b>Figura 16.</b> Audiograma del paciente 84190, que indica una hipoacusia moderada tipo U.....	42
<b>Figura 17.</b> Resultado del estudio de segregación familiar del paciente 84190. A) Árbol genealógico. B) Secuenciación por Sanger de los padres de 84190. ....	42
<b>Figura 18.</b> Audiograma del paciente 85707. Se observa una hipoacusia moderada en frecuencias agudas.....	43
<b>Figura 19.</b> Resultado del estudio de segregación familiar del paciente 85707. A) Árbol genealógico del paciente. B) Secuenciación por Sanger de los familiares afectados de 85707. .	44



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AD	Autosómico dominante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AR	Autosómico recesivo
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CNV	Variación en el número de copias
DFNA	Hipoacusia con un patrón de herencia dominante
DFNB	Hipoacusia con un patrón de herencia recesivo
DVD	Deafness Variation Database
ExAC	Exome Aggregation Consortium
gnomAD	Genome Aggregation Database
HGMD	Human Genome Mutation Database
HL	Hipoacusia
LB	Probablemente benigna
LP	Probablemente patogénica
MAF	Frecuencia alélica poblacional
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
mut	Mutante
NGS	Secuenciación de nueva generación
NSHL	Hipoacusia no sindrómica
OD	Oído derecho
OI	Oído izquierdo
P	Patogénica
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
RP	Retinosis Pigmentaria
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SHL	Hipoacusia sindrómica

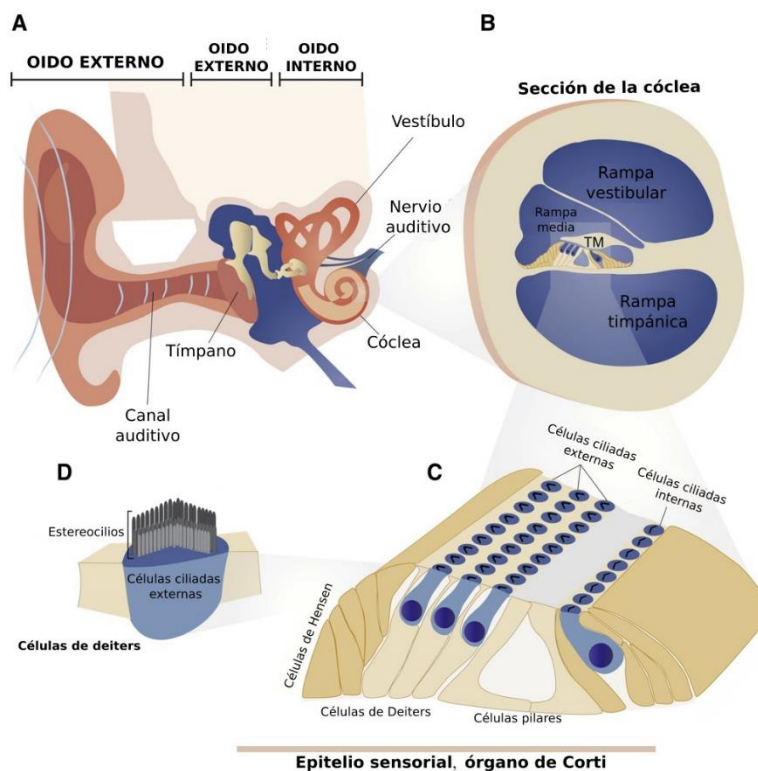
SNV	Variante de nucleótido única
USH	Síndrome de Usher
VOUS	Variante de significado incierto
WES	Secuenciación de exoma completo
WGS	Secuenciación de genoma completo
WS	Síndrome de Waardenburg
wt	<i>Wild Type</i> (tipo salvaje)
XL	Ligado al cromosoma X
XLR	Herencia recesiva ligada al cromosoma X

# 1. Introducción

## 1.1 La audición

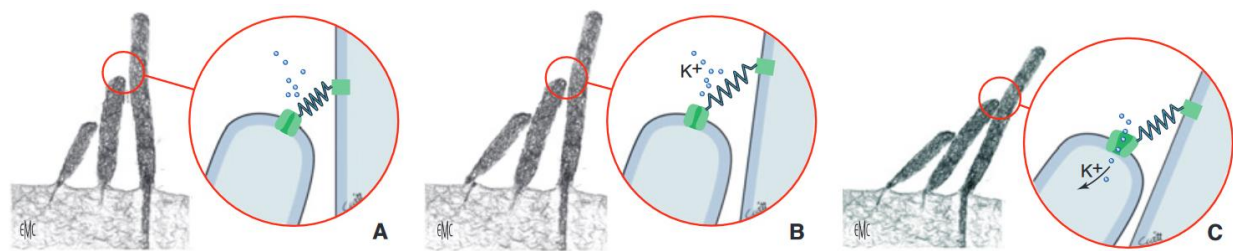
El oído es el órgano responsable de la audición y su función es convertir la energía mecánica vibratoria del sonido en señales eléctricas a través del nervio auditivo hasta el cerebro. Se trata de un proceso muy complejo en el que participan numerosos componentes. En primer lugar, la onda sonora llega a través del conducto auditivo externo al tímpano, donde se transmite vía vibración por los tres huesecillos, que son martillo, yunque y estribo, hasta la cóclea, generando el movimiento de la endolinfa, un fluido con una concentración muy alta en potasio y baja en sodio (Figura 1A).

Dentro de la cóclea encontramos la membrana basilar (Figura 1B), sobre la que se extiende el órgano de Corti, formado por la placa tectoria y las células ciliadas y de sostén (Figura 1C). Las células ciliadas poseen estereocilios en el polo apical, que se encuentra en contacto con la endolinfa y la placa tectoria (Figura 1D).



**Figura 1.** Representación esquemática del oído humano. **A.** El oído se divide en oído externo, medio e interno. **B.** Corte transversal del conducto coclear, lleno de fluidos especializados, donde se aprecia la placa tectoria (TM) y el órgano de Corti sobre la membrana basilar. **C.** Ampliación del órgano de Corti, donde aparecen las células ciliadas y de sostén. **D.** Representación de las células ciliadas con su conjunto de estereocilios (Dror & Avraham, 2010).

Una vez llega la vibración acústica a través de la endolinfa, la placa tectoria se desplaza y, consecuentemente, los esterocilios de las células ciliadas, provocando la apertura de canales de entrada de  $K^+$  (Figura 2A–C). Esto provoca una despolarización de la membrana que producirá la liberación de neurotransmisores en el polo basal de la célula ciliada, transmitiéndose así la señal a través del nervio coclear hasta el sistema nervioso central (Dror & Avraham, 2010; Saroul et al., 2016). De esta forma, en la base de la cóclea, las células ciliadas son más cortas y rígidas y detectan frecuencias agudas, mientras que en el ápice son más largas y flexibles y analizan las frecuencias graves.



**Figura 2.** Representación esquemática de la apertura de un canal de mecanotransducción de una célula ciliada mediante una estimulación auditiva. **A.** Situación de reposo. **B.** Situación de estimulación auditiva. **C.** El canal de potasio se ha abierto y ha permitido la entrada de  $K^+$  (Saroul et al., 2016).

El trabajo en conjunto de todo este sistema auditivo es clave para un funcionamiento correcto de la audición y, por tanto, cualquier variación en este órgano, sea de origen genético o adquirido, puede generar una pérdida auditiva, conocida como hipoacusia.

## 1.2 La hipoacusia

La hipoacusia es el trastorno sensorial más prevalente: se estima que más del 5% de la población mundial –430 millones de personas– tiene algún grado de pérdida auditiva según la Organización Mundial de Salud (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>). Su prevalencia aumenta con la edad y su incidencia en países europeos se encuentra en 1–2 casos por 1000 nacidos, habiéndose implementado un cribado neonatal de hipoacusias en la mayoría de países europeos (Del Castillo et al., 2021).

La etiología de la hipoacusia es muy variada, causándose tanto por factores ambientales como genéticos. Se estima que aproximadamente dos tercios de los casos de hipoacusias congénitas o en edad infantil tienen una base genética y serían, por tanto, hereditarias. El resto de casos estarían relacionados con factores ambientales, como por ejemplo, una exposición prolongada a sonidos de intensidad alta, diferentes infecciones virales como el citomegalovirus o el uso de

medicamentos ototóxicos como los aminoglucósidos, entre otros. Este tipo de factores ambientales, especialmente en países desarrollados, están cada vez mejor controlados, por lo que aquellos casos de causa genética con el tiempo se están convirtiendo en una mayor proporción (Del Castillo et al., 2021; Dror & Avraham, 2010).

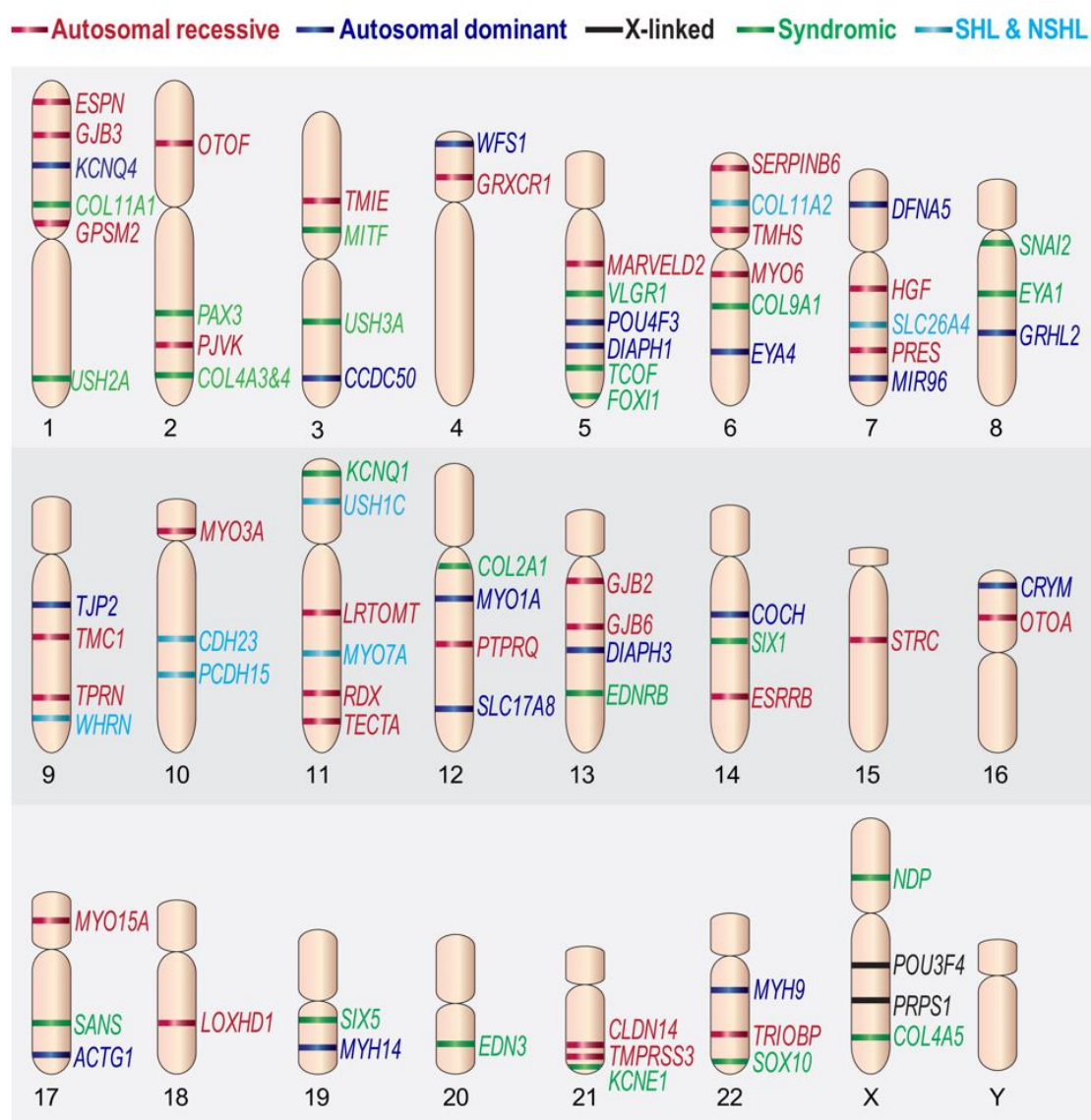
Existen muchos criterios a la hora de clasificar las hipoacusias hereditarias:

- Según el grado de pérdida auditiva: leve (21 – 40 dB), moderada (41 – 70 dB), severa (70 – 90 dB), profunda (91 – 119 dB) y total o cofosis (>120 dB).
- Según la configuración del audiograma: si afecta más a ciertas frecuencias o si es plano.
- Según la localización de la lesión: oído externo o medio (hipoacusia de conducción o transmisión), en el oído interno (hipoacusia neurosensorial), tanto en el oído medio como en el interno (hipoacusia mixta), o en el nervio auditivo (neuropatía auditiva).
- Según la etiología, pueden ser ambientales o genéticas, como se ha mencionado antes.
- Según la edad de aparición: congénita, si está presente desde el nacimiento, o tardía, si se desarrolla a lo largo de la vida.
- Según su relación con la adquisición del lenguaje: prelingual (< 2 años), perilingual (2 – 5 años), poslingual (>5 años) (García Díaz, 2023).
- Según si este trastorno se da de forma aislada o no: hipoacusias no sindrómicas (non-syndromic hearing loss, NSHL) o sindrómicas (syndromic hearing loss, SHL) cuando está asociada a otros signos clínicos en órganos diferentes. Se estima que, en países desarrollados, un 70% de los casos de hipoacusia son NSHL (Del Castillo et al., 2021; Shearer & Smith, 2015).

### **1.3 Hipoacusias hereditarias**

Si nos centramos en las hipoacusias hereditarias, una de las características que mejor las definen es la gran heterogeneidad genética. Actualmente, hay más de 200 genes asociados a NSHL (Figura 3) y a más de 400 síndromes, lo que dificulta en gran medida su diagnóstico genético (García-García et al., 2020; Van Heurck et al., 2021). La hipoacusia puede seguir diferentes patrones de herencia en función del gen causante: autosómico recesivo (AR), que suponen el 80% de los casos, autosómico dominante (AD), un 15–20%, y ligado al cromosoma X, un 1–2% (Del Castillo et al., 2021). Asimismo, un pequeño porcentaje de los casos también puede presentar herencia mitocondrial.

Las hipoacusias con un patrón de herencia recesivo (DFNB) suelen aparecer de forma congénita o prelingual y presentar un grado severo, mientras que las hipoacusias con un patrón de herencia dominante (DFNA) suelen ser postlinguales y progresivas (Dodson & Dominguez, 2012). Sumándose a esto, variantes en el mismo gen pueden resultar en signos clínicos diferentes, como por ejemplo mutaciones en *SLC26A4*, un transportador de cloruro y yoduro que ayuda a mantener la homeostasis de la endolinfa, están asociadas a NSHL o al síndrome de Pendred, que además de la hipoacusia presenta un agrandamiento de la glándula tiroides, también conocido como bocio.



**Figura 3.** Localización cromosómica de algunos genes asociados a hipoacusia. En rojo se indican aquellos clasificados como NSHL AR, en azul como NSHL AD, en negro NSHL XL y en verde aquellos asociados a SHL (Dror & Avraham, 2010).

Otra dificultad que presenta el diagnóstico genético de las hipoacusias hereditarias es debido a que un mismo gen puede presentar diferentes patrones de herencia. Un ejemplo es el gen *TECTA*, la alfa-tectorina, un componente de la membrana tectorial, asociado a una hipoacusia no sindrómica de herencia tanto dominante como recesiva. En estos casos, es común que el fenotipo cambie según el tipo de patrón. Tomando como ejemplo *TECTA*, la hipoacusia recesiva se caracteriza por ser más profunda y de inicio más temprano que la hipoacusia de herencia dominante, pero en ambas, generalmente, se da un audiograma en forma de U.

En cuanto a las hipoacusias no sindrómicas recesivas, en más del 50% de pacientes de Europa y Estados Unidos, la causa es una mutación en el gen *GJB2*, que codifica para la Conexina 26, ya sea en homocigosis o en heterocigosis compuesta (Korver et al., 2017). Mutaciones en este gen suelen causar una hipoacusia de carácter grave-profundo y abarcan tanto variaciones únicas de nucleótido como deleciones y variaciones en el splicing, aunque la más prevalente en población española es c.35delG. Además, en ocasiones podemos encontrar una mutación en heterocigosis de *GJB2* en combinación con una deleción en heterocigosis de *GJB6* que producen el mismo tipo de hipoacusia (DFNB1), siendo especialmente frecuente la deleción de 309 kb denominada del(GJB6-D13S1830) (Gallo-Terán et al., 2005).

Otro de los genes en los que más se encuentran alteraciones es *STRC*, siendo la causa más frecuente de hipoacusia autosómica recesiva de grado leve-moderado. *STRC*, junto con otros tres genes, forman una duplicación segmentaria que ha originado la aparición de cuatro pseudogenes muy cercanos a sus genes, de forma que las variaciones son frecuentes en esta región, siendo las deleciones en homocigosis la causa más común de hipoacusia en este gen (DFNB16) (Del Castillo et al., 2021).

Asimismo, es de especial interés en población española la mutación c.2485C>T/p.Gln829\* en *OTOF*, tercera causa de hipoacusia no sindrómica recesiva identificada en un 3% de pacientes con este fenotipo, seguida de la variante mitocondrial m.1555A>G en *MT-RNR1*, la subunidad 12S del ARNr (Gallo-Terán et al., 2005; Migliosi et al., 2002).

Por otro lado, en aquellos casos de hipoacusia no sindrómica de herencia dominante, destacan los genes *MYO6* y *TECTA*. En menor frecuencia también se han reportado variantes en *WFS1* y *ACTG1* (Del Castillo et al., 2021; García Díaz, 2023).

#### **1.4 Diagnóstico genético de la hipoacusia**

El diagnóstico genético es esencial para proporcionar información fiable a los pacientes en cuanto a heredabilidad genética y a pronóstico, especialmente en aquellos casos sindrómicos

mímicos, donde a priori puede parecer una NSHL porque la hipoacusia se presenta antes que otros signos clínicos del síndrome. Un claro ejemplo es el Síndrome de Usher, donde la Retinosis Pigmentaria aparece más tarde que la pérdida auditiva, en la etapa peri o postpuberal. Además, se evitan las pruebas innecesarias y el precio que conllevan (Shearer & Smith, 2015; Sloan-Heggen et al., 2016).

Asimismo, es necesario para predecir el éxito de diferentes tratamientos, como podrían ser las prótesis auditivas, el implante coclear en caso de que la hipoacusia sea más grave y no afecte al nervio auditivo, o terapias génicas en un futuro. Actualmente, se está desarrollando un ensayo clínico de una terapia génica para el gen *OTOF* que ya ha sido probado en humanos con éxito y sin efectos adversos (Lv et al., 2024). También destacan el diseño de oligonucleótidos antisentido para la variante c.216G>A de *USH1C*, de un ARN de interferencia y una edición por CRISPR/Cas9 para *TMCI*, aunque estos tratamientos únicamente se han probado en ratones (Omichi et al., 2019).

Sin embargo, conseguir un diagnóstico es complejo debido esta gran heterogeneidad genética. Anteriormente, la única estrategia a seguir era la secuenciación por Sanger, pero debido tanto al gran número de genes asociados a hipoacusias como al número elevado de exones de estos genes, esta técnica no era efectiva en cuanto a costes y rendimiento. Aparte, la búsqueda de otros genes además del primero asociado a NSHL, *GJB2*, se hacía en asociación a fenotipos (por ejemplo, *SLC26A4* en pacientes con un acueducto vestibular dilatado) o por análisis de haplotipos en familias pequeñas con NSHL AR, por lo que era un proceso lento y laborioso. En 2010, con el desarrollo de las técnicas de secuenciación masivas, esta situación cambió drásticamente, posibilitando el análisis de un grupo grande de genes de forma simultánea. De esta forma, en los últimos años, el número de genes asociados a hipoacusia ha ido aumentando (Del Castillo et al., 2021). Este tipo de secuenciación se puede estudiar desde un panel de genes personalizado, el exoma (*whole exome sequencing*, WES) o el genoma completo (*whole genome sequencing*, WGS) (García-García et al., 2020; Shearer & Smith, 2015). Con esta estrategia genómica se encuentran muchas más variantes, ya que se analizan una mayor cantidad de genes, que deben clasificarse según su patogenicidad siguiendo los criterios descritos por la ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*) (Richards et al., 2015).

Actualmente, en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe, se sigue un protocolo rutinario de secuenciación mediante un panel de genes específicos de hipoacusia de 59 genes (Tabla 1) mediante el que se consigue identificar la causa genética en un 40–60% de los casos (García Díaz,



2023; García-García et al., 2020; Sloan-Heggen et al., 2016). En comparación con la secuenciación Sanger de las variantes patogénicas más frecuentes en población que se realizaba anteriormente, se consiguió mejorar el rendimiento diagnóstico, pero muchos casos quedan sin resolver (García-García et al., 2020).

Con la implementación de un exoma clínico, compuesto por el conjunto de exones de genes asociados a enfermedades, se espera aumentar el porcentaje de casos resueltos, ya que se ha observado una mejor tasa, de un 50–60% (Van Heurck et al., 2021).

## **2. Objetivos**

El diagnóstico genético de la hipoacusia, por su heterogeneidad clínica y genética, supone un gran reto. Con la llegada de las técnicas de secuenciación masiva, se ha conseguido analizar un número sustancialmente mayor de genes, por lo que el consecuente incremento de variantes identificadas añade otro escalón de dificultad al diagnóstico. Para afrontar estos retos y mejorar el diagnóstico de las hipoacusias hereditarias, se establecen los siguientes objetivos:

- Estudio de una cohorte de pacientes con sospecha de hipoacusia hereditaria mediante una estrategia de secuenciación masiva basada tanto en un panel de genes como en un exoma clínico.
- Evaluar la patogenicidad de las variantes encontradas a través de herramientas bioinformáticas, así como bibliografía y estudios de segregación.
- Determinar el rendimiento de diagnóstico genético del exoma clínico.

## **3. Materiales y métodos**

### **3.1 Cohorte de pacientes y extracción de ADN**

En este estudio se incluyeron aquellos pacientes diagnosticados con hipoacusia neurosensorial tanto sindrómica como no sindrómica por el departamento de Otorrinolaringología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe con sospecha de causa genética. Es un grupo heterogéneo conformado por pacientes, tanto recién nacidos que no han pasado un screening auditivo realizado tras el nacimiento, como en edad adulta. Además de la anamnesis, se recogieron los árboles genealógicos, así como los resultados de pruebas auditivas, tales como audiogramas, para poder caracterizar el tipo de hipoacusia y poder realizar un análisis de correspondencia genotipo-fenotipo. Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (CEIm La Fe).

Para el panel de genes se seleccionaron 12 pacientes, todos diagnosticados de hipoacusia neurosensorial excepto uno que padece neuropatía auditiva, mientras que para el análisis de exoma clínico se eligieron 45 pacientes diagnosticados con hipoacusia neurosensorial, incluyendo uno con sospecha clínica de síndrome de Waardenburg y 3 diagnosticados de síndrome de Usher. Además, para el exoma clínico se analizaron 5 pacientes con un diagnóstico genético obtenido previamente (Grupo Control) para evaluar la sensibilidad de la secuenciación en la detección de variantes en regiones críticas, como no codificantes o de alta homología a pseudogenes.

El ADN de los pacientes se extrajo a partir de sangre periférica mediante un proceso automático empleando el extractor de ADN QIAsymphony (QIAGEN, Düsseldorf, Alemania) de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. La concentración de las muestras de ADN se ha medido utilizando el dispositivo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

### 3.2 Panel de genes y exoma clínico

En el Departamento de Genética del Hospital La Fe emplean un panel de genes personalizado que incluye 59 genes: 35 asociados a NSHL y 24 a SHL (Tabla 1). Se incluye la región codificante de estos genes y sus regiones intrónicas flanqueantes ( $\pm 25$  pb). Además, cubre cinco regiones intrónicas profundas del gen *USH2A* donde se han descrito variantes anteriormente y se han diseñado sondas adicionales para los genes *ESPN* y *OTOA* para poder diferenciarlos de sus pseudogenes (García-García et al., 2020).

**Tabla 1.** Lista de genes empleados en el panel de genes.

<i>ACTG1</i>	<i>ADGRV1</i>	<i>CDH23</i>	<i>CEP250</i>	<i>CHD7</i>	<i>CIB2</i>	<i>CISD2</i>
<i>CLDN14</i>	<i>CLRN1</i>	<i>COCH</i>	<i>COL11A2</i>	<i>EDN3</i>	<i>EDNRB</i>	<i>ESPN</i>
<i>EYA1</i>	<i>EYA4</i>	<i>GJB2</i>	<i>GJB6</i>	<i>GSDME</i>	<i>KCNE1</i>	<i>KCNQ1</i>
<i>KCNQ4</i>	<i>LHFPL5</i>	<i>LOXHD1</i>	<i>LRTOMT</i>	<i>MITF</i>	<i>MYH14</i>	<i>MYH9</i>
<i>MYO15A</i>	<i>MYO6</i>	<i>MYO7A</i>	<i>OTOA</i>	<i>OTOF</i>	<i>OTOG</i>	<i>OTOGL</i>
<i>PAX3</i>	<i>PCDH15</i>	<i>PJKK</i>	<i>POU3F4</i>	<i>PTPRQ</i>	<i>SEMA3E</i>	<i>SIX1</i>
<i>SIX5</i>	<i>SLC26A4</i>	<i>SMPX</i>	<i>SNAI2</i>	<i>SOX10</i>	<i>STRC</i>	<i>TECTA</i>
<i>TIMM8A</i>	<i>TMC1</i>	<i>TMEM126A</i>	<i>TMPRSS3</i>	<i>TPRN</i>	<i>TRIOBP</i>	<i>USH1C</i>
<i>USH1G</i>	<i>USH2A</i>	<i>WFS1</i>	<i>WHRN</i>			

Para el estudio del exoma clínico se ha usado el CFE\_S33984022 (Clinical Focused Exome) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), con un diseño específico que permite el análisis de genes asociados a enfermedades, incluyendo promotores y regiones intrónicas

profundas en las que se ha descrito la existencia de mutaciones patológicas. Del listado de genes dentro del exoma clínico, se analizarían aquellos genes asociados a hipoacusia (Tabla 2).

**Tabla 2.** Lista de genes de hipoacusia para el análisis por exoma clínico.

<i>ABHD12</i>	<i>ACTB</i>	<i>ACTG1</i>	<i>ADCY1</i>	<i>ADGRV1</i>	<i>AIFM1</i>	<i>ALMS1</i>
<i>AMMECR1</i>	<i>ANKH</i>	<i>ATP2B2</i>	<i>ATP6V0A4</i>	<i>ATP6V1B1</i>	<i>ATP6V1B2</i>	<i>BCSIL</i>
<i>BDP1</i>	<i>BSND</i>	<i>BTD</i>	<i>CABP2</i>	<i>CACNA1D</i>	<i>CCDC50</i>	<i>CD164</i>
<i>CDC14A</i>	<i>CDH23</i>	<i>CEACAM16</i>	<i>CEP78</i>	<i>CHD7</i>	<i>CHSY1</i>	<i>CIB2</i>
<i>CISD2</i>	<i>CLDN14</i>	<i>CLDN9</i>	<i>CLIC5</i>	<i>CLPP</i>	<i>CLRN1</i>	<i>COCH</i>
<i>COL11A1</i>	<i>COL11A2</i>	<i>COL2A1</i>	<i>COL4A3</i>	<i>COL4A4</i>	<i>COL4A5</i>	<i>COL4A6</i>
<i>COL9A1</i>	<i>COL9A2</i>	<i>COL9A3</i>	<i>CRYM</i>	<i>DCAF17</i>	<i>DCDC2</i>	<i>DIABLO</i>
<i>DIAPH1</i>	<i>DIAPH3</i>	<i>DLX5</i>	<i>DMXL2</i>	<i>DNMT1</i>	<i>DSPP</i>	<i>EDN3</i>
<i>EDNRB</i>	<i>ELMOD3</i>	<i>EPS8</i>	<i>EPS8L2</i>	<i>ERAL1</i>	<i>ESPN</i>	<i>ESRRB</i>
<i>EYA1</i>	<i>EYA4</i>	<i>FDXR</i>	<i>FGF3</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>FGFR3</i>
<i>FITM2</i>	<i>FOXI1</i>	<i>GATA3</i>	<i>GIPC3</i>	<i>GJB2</i>	<i>GJB3</i>	<i>GJB6</i>
<i>GPSM2</i>	<i>GREB1L</i>	<i>GRHL2</i>	<i>GRXCR1</i>	<i>GRXCR2</i>	<i>GSDME</i>	<i>HARS2</i>
<i>HGF</i>	<i>HOMER2</i>	<i>HOXA2</i>	<i>HOXB1</i>	<i>HSD17B4</i>	<i>ILDRI</i>	<i>KARS1</i>
<i>KCNE1</i>	<i>KCNJ10</i>	<i>KCNQ1</i>	<i>KCNQ4</i>	<i>KITLG</i>	<i>KMT2D</i>	<i>LARS2</i>
<i>LHFPL5</i>	<i>LHX3</i>	<i>LMX1A</i>	<i>LOXHD1</i>	<i>LOXL3</i>	<i>LRP2</i>	<i>LRTOMT</i>
<i>MAN2B1</i>	<i>MANBA</i>	<i>MARVELD2</i>	<i>MASP1</i>	<i>MET</i>	<i>MGP</i>	<i>MIR96</i>
<i>MITF</i>	<i>MPZL2</i>	<i>MSRB3</i>	<i>MYH14</i>	<i>MYH9</i>	<i>MYO15A</i>	<i>MYO3A</i>
<i>MYO6</i>	<i>MYO7A</i>	<i>NARS2</i>	<i>NDP</i>	<i>NEFL</i>	<i>NF2</i>	<i>NLRP3</i>
<i>NOG</i>	<i>NR2F1</i>	<i>OPA1</i>	<i>OSBPL2</i>	<i>OTOA</i>	<i>OTOF</i>	<i>OTOG</i>
<i>OTOGL</i>	<i>P2RX2</i>	<i>PAX1</i>	<i>PAX3</i>	<i>PCDH15</i>	<i>PDE1C</i>	<i>PDZD7</i>
<i>PEX1</i>	<i>PEX26</i>	<i>PEX6</i>	<i>PJVK</i>	<i>PLS1</i>	<i>PNPT1</i>	<i>POLR1B</i>
<i>POLR1C</i>	<i>POLR1D</i>	<i>POU3F4</i>	<i>POU4F3</i>	<i>PPIP5K2</i>	<i>PRPS1</i>	<i>PTPRQ</i>
<i>RAI1</i>	<i>RDX</i>	<i>REST</i>	<i>RIPOR2</i>	<i>ROR1</i>	<i>S1PR2</i>	<i>SEMA3E</i>
<i>SERPINB6</i>	<i>SIX1</i>	<i>SIX2</i>	<i>SIX5</i>	<i>SLC17A8</i>	<i>SLC19A2</i>	<i>SLC22A4</i>
<i>SLC26A4</i>	<i>SLC26A5</i>	<i>SLC33A1</i>	<i>SLC4A11</i>	<i>SLC52A2</i>	<i>SLC52A3</i>	<i>SLITRK6</i>
<i>SMPX</i>	<i>SNAI2</i>	<i>SOX10</i>	<i>SPATA5</i>	<i>SPNS2</i>	<i>STRC</i>	<i>SUCLA2</i>
<i>SYNE4</i>	<i>TBC1D24</i>	<i>TBL1X</i>	<i>TBX1</i>	<i>TCOF1</i>	<i>TECTA</i>	<i>TFAP2A</i>
<i>TIMM8A</i>	<i>TJP2</i>	<i>TMCI</i>	<i>TMEM126A</i>	<i>TMEM132E</i>	<i>TMIE</i>	<i>TMPRSS3</i>
<i>TNC</i>	<i>TPRN</i>	<i>TRIOBP</i>	<i>TRRAP</i>	<i>TSPEAR</i>	<i>TUBB4B</i>	<i>TWNK</i>
<i>USH1C</i>	<i>USH1G</i>	<i>USH2A</i>	<i>WBP2</i>	<i>WFS1</i>	<i>WHRN</i>	

### 3.3 Preparación de librerías y secuenciación

La preparación de librerías se realizó tanto para el panel de genes como para el exoma clínico de forma automatizada utilizando un robot MAGNIS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) y siguiendo el protocolo establecido para NGS SureSelectQXT Automated Target Enrichment para Illumina Multiplexed Sequencing. La secuenciación de las librerías se ha hecho en tandas secuenciales de 16 pacientes. Las librerías del panel de genes se han secuenciado en un aparato MiSeq con el kit MiSeq v2 300 cycle reagent kit (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.).

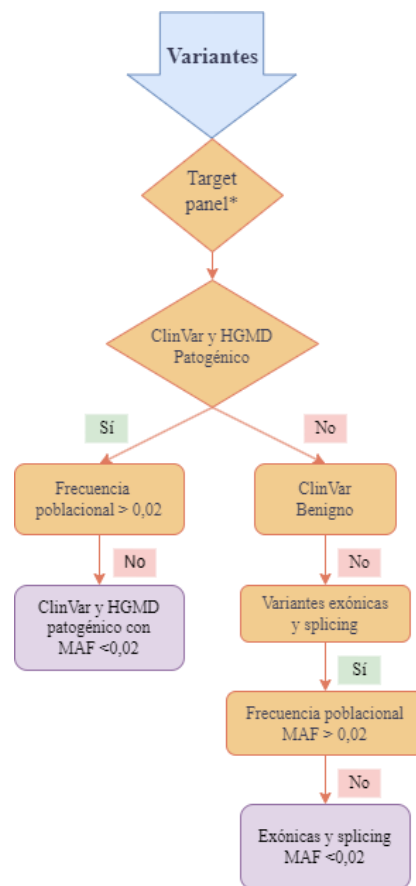
Las librerías del exoma clínico se han secuenciado en el instrumento NextSeq 500/550 (Illumina, San Diego, CA, EE. UU), también en tandas de 16 pacientes.

### 3.4 Análisis de datos

Tras la secuenciación, los archivos fastaq se cargaron a la plataforma Alissa Reporter (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) para el mapeo de las secuencias y su posterior anotación de variantes en comparación con el genoma de referencia GRCh37/hg19. A partir de este último paso, se obtiene un archivo “variant call format” (vcf) y otro archivo con posibles variantes de tipo número de copia (CNV), los cuales se pasan a analizar en el software Alissa Interpreter. Se debe crear un archivo para analizar las variantes encontradas, las cuales se filtran siguiendo una serie de criterios (Figura 4).

En primer lugar, se descartan todas aquellas variantes que se encuentren en genes que no están asociados a hipoacusias. Para ello, se crea un target panel con una lista de genes cuyo contenido dependerá de si se analiza con el panel de genes o con el exoma clínico. Para el primer caso, sencillamente se incluyen todos los genes del panel enriquecido (59 genes), mientras que, en el segundo caso, se hizo una búsqueda bibliográfica en la base de datos de variantes asociadas a hipoacusias Deafness Variation Database (DVD, <https://deafnessvariationdatabase.org>) para crear una lista con estos genes (Tabla 2), cuyo número asciende a 209, más del doble que del panel de genes.

Otro criterio elegido es una frecuencia alélica poblacional (MAF) menor a 0,02 según las bases de datos gnomAD (Genome Aggregation Database, <https://gnomad.broadinstitute.org>), ExAC (Exome Aggregation Consortium), y 1000 Genomes Project (<https://www.internationalgenome.org>). También se incluyen aquellas que han sido clasificadas como patológicas en las bases de datos de variantes ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) y HGMD (Human Genome Mutation Database, <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), mientras que las variantes restantes pasan otro filtro



**Figura 4.** Criterios aplicados para el filtrado de variantes en la plataforma Alissa. **MAF:** Menor frecuencia alélica.

para descartar las variantes intrónicas profundas, de manera que se analizan las exónicas y aquellas que se encuentran en una región de  $\pm 25$  pares de bases.

Una vez obtenidas las variantes, su clasificación se realizó siguiendo los criterios de la *American College of Medical Genetics* (ACMG) (Richards et al., 2015). Para ello, se ha hecho una búsqueda en las bases de datos anteriormente mencionadas: ClinVar, HGMD, DVD, y además en la Leiden Open Variation Database (<https://www.lovd.nl>). Asimismo, se utilizaron los predictores *in silico* de patogenicidad Varsome (<https://varsome.com>), Franklin Genoox (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>) y MobiDetails (<https://mobidetails.iurc.montp.inserm.fr/MD/>) para aquellas variantes no descritas.

### 3.5 Validación de variantes

Aquellas variantes de cambio de un nucleótido o pequeñas inserciones o deleciones (*indels*) clasificadas como patogénicas (P, *pathogenic*) o probablemente patogénicas (LP, *likely pathogenic*) fueron validadas mediante secuenciación Sanger.

En primer lugar, se debe amplificar una región de 200–300 pb aguasarriba y aguasabajo de la variante. Para ello, se diseñan primers para amplificar la variante de interés mediante el software Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) o de forma manual y se comprueba su especificidad a dicha región con la herramienta SNPCheck (GENETOOLS, <https://genetools.org/SNPCheck/snpcheck.htm>). Una vez obtenidos, se realiza una PCR con la polimerasa FIREPol DNA polymerase (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) siguiendo el siguiente protocolo por cada muestra: 24  $\mu$ l de mix (16,5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O miliQ, 2,5  $\mu$ l de Buffer, 3  $\mu$ l de dNTP, 1,25  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l de cada primer, directo y reverso, y 0,25  $\mu$ l de FIREPol) y 1  $\mu$ l de ADN de la muestra a amplificar según un programa estándar de PCR ([Anejo 1](#)). Para comprobar el resultado de la PCR y que la banda tiene el tamaño esperado, se corre en un gel de agarosa al 1%. Una vez comprobado, se purifica enzimáticamente el producto de PCR con la solución illustra™ ExoProStar™ (Avantor delivered by VWR, Radnor, PA, EE. UU.) y seguidamente se envían a secuenciar por Sanger a la empresa externa STABVida (<https://www.stabvida.com/es>, Caparica, Portugal). Por último, se identifican las variantes en los archivos resultantes con el programa de visualización de secuencias Chromas (<https://technelysium.com.au/wp/>).

Para validar las variantes de único nucleótido en *STRC*, es necesario asegurarse de no amplificar la secuencia del pseudogen (*STRCP1*). Para ello, se realizó una Long-Range PCR con primers específicos de regiones no complementarias al pseudogen consultados en bibliografía usando la polimerasa *High Fidelity Phussion polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) ([Anejo 2](#)). Una vez obtenido el fragmento de *STRC* que comprende los exones 18–

29, se hace una dilución 1:20 para descartar cualquier resto de pseudogen y se realiza una PCR como la descrita anteriormente utilizando primers específicos de cada exón indicados en la bibliografía (Domínguez-Ruiz et al., 2023; Vona et al., 2015).

Por otro lado, las variantes de número de copia (CNVs) se han validado mediante la técnica MLPA<sup>®</sup> (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) según las indicaciones del proveedor (MRC-Holland, Ámsterdam, Países Bajos). En función de la región a estudiar, se han utilizado diferentes kits SALSA<sup>®</sup>: P-461 (región *STRC-CATSPER2-OTOA*) y P-163 (región *GJB2-GJB3-GJB6-WFS1-POU3F4*). Para el análisis de los resultados, se hizo uso del software Coffalyser.Net<sup>™</sup> (MRC-Holland, Ámsterdam, Países Bajos).

Para el estudio de segregación familiar de las variantes identificadas en el caso índice, se hizo uso de un kit de extracción de saliva de DanaGen (DanaGen-Bioted, Barcelona, España). Tras la obtención del ADN a través del servicio de extracción del grupo del Biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, se analizó mediante secuenciación por Sanger el ADN del paciente.

### **3.6 Análisis de la estructura proteica**

Se empleó el visor molecular PyMOL para valorar el cambio a nivel proteico de una selección de variantes missense no descritas y poder afinar su clasificación. El primer paso consiste en obtener el modelo proteico de la base de datos PDB (<https://www.rcsb.org>). Tras abrir el archivo .pdb obtenido con el programa PyMOL, se busca la posición del residuo afectado y se evalúa si la estructura en la que se encuentra forma parte de algún posible dominio o de una estructura secundaria. Para poder visualizar el cambio de aminoácido correspondiente, en el apartado Wizard > Mutagenesis se selecciona la posición y se introduce el cambio. Se consideran factores tales como un posible efecto estérico y la pérdida de enlaces postraduccionales esenciales para la función o estructura de la proteína.

## **4. Resultados**

### **4.1 Panel de genes**

De la cohorte de 12 pacientes secuenciados con el panel de genes, únicamente se ha podido resolver un caso de NSHL con una variante en el gen *WFS1* (8,33%). La variante encontrada en el gen *WFS1* (c.1337G>A/p.Ser446Asn) se ha descrito por primera vez en este trabajo, por lo que su patogenicidad se evaluó con predictores *in silico*, además del programa de visualización molecular PyMOL. La mayoría de predictores clasificaron este cambio como LP. Mediante el

análisis del cambio mediante PyMOL, se comprobó que el efecto era patogénico (Figura 12, [Apartado 4.4, Paciente 78425](#)).

No se pudo detectar ninguna variante patogénica en el resto de la cohorte (41,67%).

En uno de los pacientes, se identificó una variante en heterocigosis en el gen *MYO15A* que se clasificó como probablemente patogénica (*likely pathogenic*, LP). Sin embargo, este gen tiene una herencia AR y no se pudo detectar una segunda variante.

En cuanto a las variantes mitocondriales, este panel de genes no abarca genes mitocondriales, por lo que hay que hacer una evaluación individual y comprobarlo mediante secuenciación por Sanger.

Concretamente, la paciente 42756 tuvo un diagnóstico negativo mediante la estrategia de secuenciación con el panel de genes. Es una mujer de 59 años que padece una hipoacusia bilateral, con cofosis en el oído derecho y severa en el oído izquierdo, además de que su madre, primos y sobrinos maternos también padecen hipoacusia. Debido a este patrón de herencia, se sospechó que la causa podría ser mitocondrial. Se analizó la presencia de la variante m.1555A>G en el gen mitocondrial *MT-RNR1*, que tras una secuenciación por Sanger se detectó en homoplasmia.

**Tabla 3.** Variantes en heterocigosis encontradas como LP en los pacientes analizados con el panel de genes, así como su diagnóstico.

Pacientes del panel de genes								
Número	Sexo	Edad	Diagnóstico	Gen	Herencia	Variante (en heterocigosis)	Fenotipo	Clasificación de patogenicidad
79797	M	45	NSHL	<i>MYO15A</i> NM_016239.3	AR	c.6004delG/p.Glu2002Argfs*27	NSHL inicio 20 años, bilateral, severa	LP/P
78425	M	45	NSHL	<i>WFS1</i> NM_006005.3	AD	<b>c.1337G&gt;A/p.Ser446Asn</b>	NSHL bilateral, afectada en graves	LP (según predictores)

Aquellas variantes **en negrita** son noveles.

**M:** mujer; **H:** hombre; **AR:** autosómica recesiva; **AD:** autosómica dominante; **WS:** síndrome de Waardenburg; **NSHL:** hipoacusia no sindrómica; **USH:** síndrome de Usher.



## 4.2 Exoma clínico

En total se analizó una cohorte de 45 pacientes, además del Grupo Control, en el cual se consiguió detectar en el 80% de las variantes previamente identificadas (8/10), siendo las excepciones una CNV en el gen *GJB6* y una SNV en el gen *STRC* (Tabla 4). Por ello, se hizo una MLPA utilizando la SALSA P-163 (MRC Holland, Ámsterdam, Países Bajos), que incluye sondas para DFNB1, en todos aquellos pacientes en los que no se ha encontrado encontró ninguna variante causal tras el análisis mediante exoma clínico. No obstante, no se detectaron CNVs en este locus en ningún paciente.

**Tabla 4.** Variantes posiblemente patológicas detectadas con el exoma clínico en pacientes con un diagnóstico genético ya realizado con anterioridad mediante panel de genes, así como el diagnóstico clínico (Grupo Control).

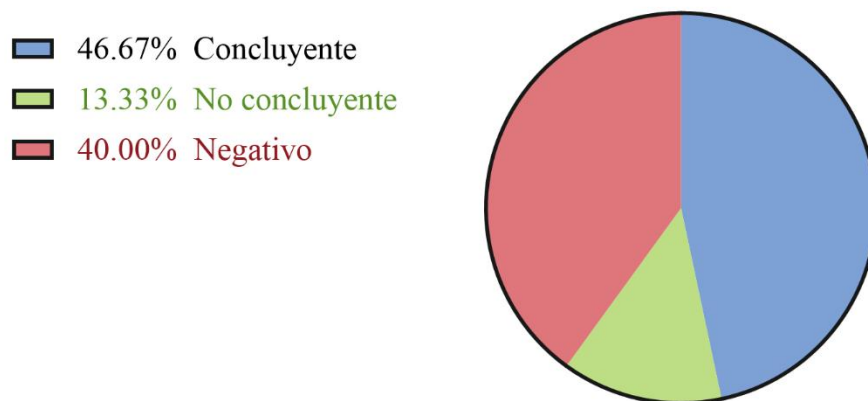
Número	Sexo	Diagnóstico	Gen	Alelo 1	Alelo 2	Detectada
33492	M	NSHL	<i>GJB2</i> NM_004004.6	c.71G>A/ p.Trp24*	c.-22-18T>A	SÍ
42714	M	NSHL	<i>GJB2</i> NM_004004.6	c.269dupT	c.-23+1G>A	SÍ
37468	H	NSHL	<i>GJB2</i> NM_004004.6	c.617A > G/ p.Asn206Ser		SÍ
			<b><i>GJB6</i></b> <b>NM_001110219.2</b>		<b>del(<i>GJB6</i>- <i>D13S1830</i>)</b>	<b>NO</b>
37412	H	NSHL	<b><i>STRC</i></b> <b>NM_153700.2</b>	Delección STRC	<b>c.4057C &gt; T/ p.Q1353*</b>	<b>SNV NO DETECTADA</b>
63425	H	USH	<i>USH2A</i> NM_206933.2	c.7595- 2144A>G	c.841A>C	SÍ

Aquellas variantes en negrita son las que la estrategia del exoma clínico no ha conseguido detectar.

**M:** mujer; **H:** hombre; **NSHL:** hipoacusia no sindrómica; **USH:** síndrome de Usher.

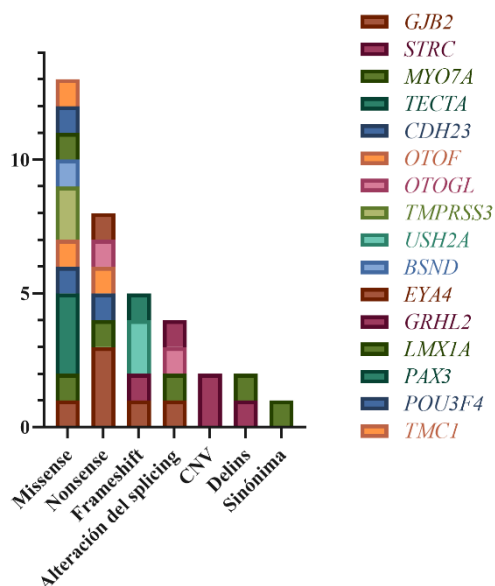
Respecto a los 45 pacientes sin diagnóstico genético previo, con esta estrategia se ha conseguido un resultado concluyente en el 46,67% de los casos. En un 40% de la cohorte de pacientes no se encontró ninguna variante que pudiera explicar el cuadro clínico, y el resto (13,33%) correspondería a aquellos en los que se ha encontrado una variante potencialmente patogénica en heterocigosis en un gen de herencia AR (Figura 5, casos no concluyentes).

Las variantes patogénicas causantes de la hipoacusia se encuentran en varios genes: trece siguen un patrón de herencia autosómico recesivo, siete son de herencia dominante y una de herencia ligada al cromosoma X.



**Figura 5.** Representación gráfica de los resultados obtenidos con el exoma clínico de una cohorte de 45 pacientes.

Si clasificamos estas variantes según el tipo de cambio que producen, aquellas más frecuentes son las missense (13), seguidas de las nonsense (8), frameshift (5), aquellas que causan cambios en el splicing (4), CNVs (2), indel (inserción-delección) (2) y, por último, las sinónimas (1) (Figura 6).



**Figura 6.** Representación gráfica de los tipos de variantes encontradas en el exoma clínico según el tipo de mutación en el ADN.

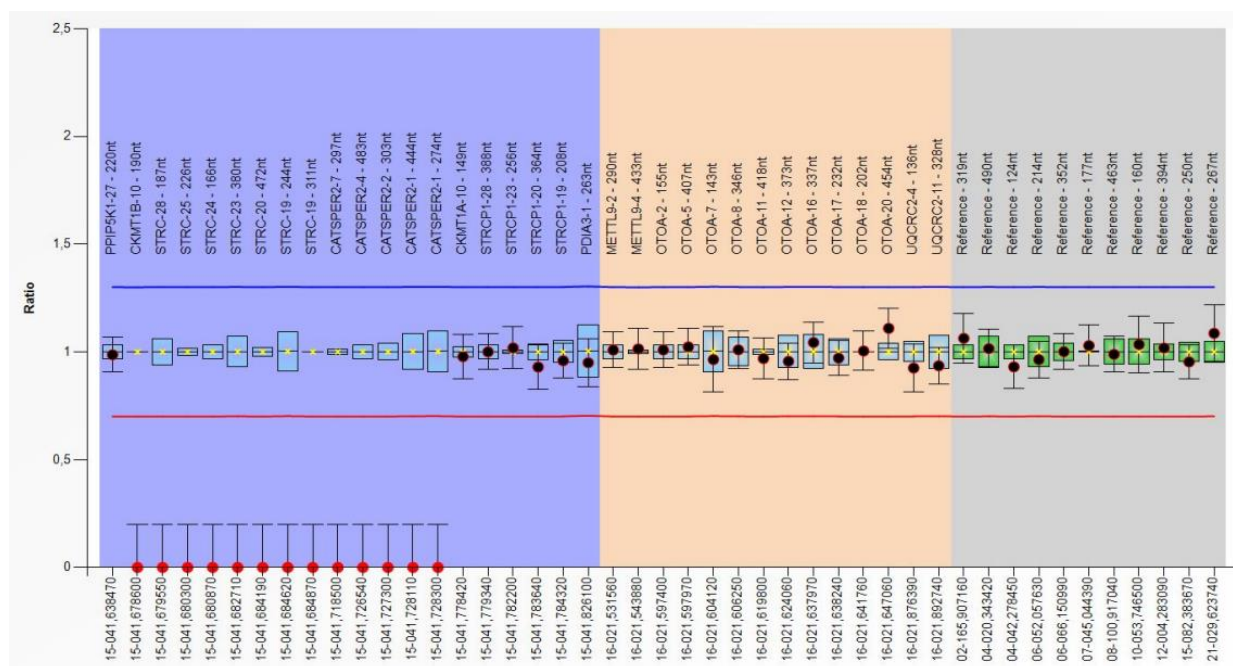
## Casos con hipoacusia AR

En 13 de los 21 pacientes resueltos (63%) se ha identificado la causa genética en un gen con herencia recesiva (Tabla 5A). Los más prevalentes son *GJB2* y *STRC*, donde se detectaron variantes patogénicas en tres casos en cada gen.

La variante más común es c.71G>A/p.Trp24\* (en el gen *GJB2*), que se ha encontrado en homocigosis en un paciente y en heterocigosis compuesta junto con c.-22-18T>A en otro. Esta variante se encuentra en el único intrón del gen y ha sido descrita como VOUS tanto en DVD como en ClinVar debido a que los predictores establecen un efecto dañino, pero este cambio no ha sido valorado en un modelo funcional. Para esclarecer su patogenicidad, se realizó un análisis bioinformático.

En cuanto a *STRC*, dos de los casos presentaban CNVs. Destacar que, además, en uno de ellos (82039) se observó una delección contigua a *STRC* afectando al gen *CASTPER2* en homocigosis (Figura 7), compatible con un caso de síndrome de sordera-infertilidad masculina (DIS). En el caso restante, se identificó una delección (c.4794\_4795delCT/p.Cys1599Trpfs\*31) y una indel (c.4917\_4918delinsCT/p.Leu1640Phe) previamente descritas como patogénicas.

En el caso restante se identificó una delección (c.4794\_4795delCT/p.Cys1599Trpfs\*31) y una indel (c.4917\_4918delinsCT/p.Leu1640Phe) previamente descritas como patogénicas.



**Figura 7.** Representación gráfica de la región *STRC-CATSPER2-OTOA* analizada por MLPA recogida del software *Coffalyser.Net*<sup>TM</sup>. Los puntos que corresponden a los exones 1-7 de *CASTPER2* y 19-28 de *STRC* presentan un ratio de 0, indicando una delección en homocigosis en estos dos genes.

**Tabla 5.** Lista de variantes detectadas como causa genética de hipoacusia mediante exoma clínico y datos clínicos de los pacientes.

<b>(A) Pacientes diagnosticados con hipoacusia AR</b>							
Paciente	Sexo	Edad	Diagnóstico	Gen	Alelo 1	Alelo 2	Fenotipo
80790	M	6	NSHL	<i>GJB2</i> NM_004004.6	c.35delG/ p.(Gly12Valfs*2)	c.550C>T/ p.(Arg184Trp)	NSHL bilateral, progresiva, prelingual
84156	M	30	NSHL	<i>GJB2</i> NM_004004.6	c.71G>A/ p.(Trp24*)	c.-22-18T>A/ splicing?	NSHL bilateral, progresiva, profunda
				<i>TSPEAR</i> NM_001272037.2	c.1666G>T/ p.Glu556*		
85308	H	2	NSHL	<i>GJB2</i> NM_004004.6	c.71G>A/ p.Trp24*	c.71G>A/ p.Trp24*	NSHL bilateral, profunda, congénita
82039	H	4	NSHL	<i>STRC</i> NM_153700.2	Delección <i>STRC</i> + <i>CATSPER2</i>	Delección <i>STRC</i> + <i>CATSPER2</i>	NSHL moderada, congénita
84646	H	7	NSHL	<i>STRC</i> NM_153700.2	c.4794_4795delCT/ p.Cys1599Trpfs*31	c.4917_4918delinsCT/ p.Leu1640Phe	NSHL inicio 3 años, leve-moderada, audiograma forma U
				<i>BSND</i> NM_057176.3	c.139G>A/ p.Gly47Arg		
				<i>LMX1A</i> NM_177398.4	c.1103C>A/ p.Pro368His		
88489	H	4	NSHL	<i>STRC</i> NM_153700.2	Delección 11kb	Delección 11kb	NSHL bilateral, moderada, congénita
90524	H	10	USH	<i>MYO7A</i> NM_000260.4	c.1344-1G>A/ splicing	c.5856G>A/ p.Lys1952=	Hipoacusia profunda, congénita. RP
90755	M	30	USH	<i>MYO7A</i> NM_000260.4	c.2425C>T/ p.Gln809*	c.6079_6081delCAC/ p.His2027del	Hipoacusia severo- profunda, congénita. RP

81740	M	7	NSHL	<i>CDH23</i> NM_022124.6	<b>c.3384C&gt;G/ p.Asp1128Glu</b>	c.8383C>T/ p.Arg2795*	NSHL prelingual, bilateral: profunda OD, moderada-severa OI
89754	M	48	NSHL	<i>OTOF</i> NM_194248.3	c.2485C>T/ p.Gln829*	<b>c.4739T&gt;G/ p.Leu1580Arg</b>	NSHL
80491	H	1	NSHL	<i>OTOGL</i> NM_001368062.3	c.4218G>A/ p.Trp1406*	<b>c.3198+1G&gt;A/ splicing</b>	NSHL bilateral, moderada, prelingual
83623	M	17	NSHL	<i>TMPRSS3</i> NM_024022.4	c.413C>/A p.Ala138Glu	c.346G>A p.Val116Met	NSHL bilateral, moderada
				<i>MYO7A</i> NM_000260.4	c.3979G>A/ p.Glu1327Lys		
90775	M	23	USH	<i>USH2A</i> NM_206933.4	<b>c.6931delG/ p.Ala2311Profs*15</b>	c.6283delA/ p.Arg2095Glyfs*2	Hipoacusia inicio infancia. RP inicio 23 años

**(B) Pacientes diagnosticados con hipoacusia AD**

Paciente	Sexo	Edad	Diagnóstico	Gen	Alelo 1	Alelo 2	Fenotipo
79834	H	48	NSHL	<i>TECTA</i> NM_005422.4	<b>c.136T&gt;C/ p.Ser46Pro</b>		NSHL inicio 3ª década, bilateral, progresiva
83911	M	46	NSHL	<i>TECTA</i> NM_005422.4	c.3107G>A/ p.Cys1036Tyr		NSHL bilateral, progresiva
84190	H	7	NSHL	<i>TECTA</i> NM_005422.4	<b>c.2031C&gt;G/ p.Cys677Trp</b>		NSHL bilateral, moderada
87335	M	32	NSHL	<i>EYA4</i> NM_001301013.2	<b>c.1295T&gt;G/ p.Leu432*</b>		NSHL inicio 20 años, bilateral, audiograma ski-slope
85844	H	6	NSHL	<i>GRHL2</i> NM_001330593.2	<b>c.1469+1G&gt;T/ splicing</b>		NSHL bilateral, congénita

82169	M	37	WS	<i>PAX3</i> NM_181458.4	<b>c.394delG/ p.Glu132Lysfs*20</b>	Hipoacusia bilateral, profunda, prelingual con rasgos de Waardenburg
85707	H	10	NSHL	<i>TMC1</i> NM_138691.3	c.932T>A/ p.Phe311Tyr	NSHL moderada

**(C) Pacientes diagnosticados con hipoacusia ligada al cromosoma X**

Paciente	Sexo	Edad	Diagnóstico	Gen	Alelo 1	Alelo 2	Fenotipo
85453	H	2	NSHL	<i>POU3F4 (XLR)</i> NM_000307.5	c.967C>T/ p.Arg323Cys		NSHL bilateral, moderada, congénita

Aquellas variantes **en negrita** son noveles y aquellas en cursiva son variantes detectadas como LP no causantes de la hipoacusia, y a aquellos casos señalados en azul se les ha realizado un estudio de segregación familiar.

**H:** hombre; **M:** mujer; **NSHL:** hipoacusia no sindrómica; **USH:** síndrome de Usher; **WS:** síndrome de Waardenburg; **RP:** Retinosis Pigmentaria. **XLR:** herencia recesiva ligada al cromosoma X; **OD:** oído derecho; **OI:** oído izquierdo.

En dos pacientes con sospecha de síndrome de Usher se han identificado variantes en el gen *MYO7A*, que explican la causa genética de esta patología. Otro caso con sospecha de este mismo síndrome se ha confirmado con dos variantes frameshift en heterocigosis, una de ellas novel (Tabla 6), en *USH2A*. El resto de casos de NSHL se han diagnosticado por variantes en diversos genes: *CDH23*, *OTOF*, *OTOGL* y *TMPRSS3*.

Además, en tres de los pacientes se ha detectado una única variante LP/P en genes de herencia recesiva: *TSPEAR* en 84156, *BSND* y *LMX1A*, en 84646, y *MYO7A* en 83623 (Tabla 5).

De todas las variantes encontradas, seis son noveles, las cuales han sido evaluadas empleando la herramienta de análisis MobiDetails (Tabla 6). Las variantes que causan una pérdida de función (un codón de parada prematuro en *PAX3* y un efecto en el splicing en *MYO7A*, *OTOGL* y *GRHL2*) se han clasificado como patogénicas o LP, y el resto de variantes, VOUS o VOUS/LP.

### **Casos con hipoacusia AD**

Asimismo, en otros siete pacientes (33%) se han identificado variantes en genes con un patrón de herencia autosómico dominante (Tabla 5B). Uno de ellos (82169), además de la hipoacusia, se caracteriza por tener rasgos clínicos típicos de Waardenburg. Gracias a este estudio, se ha podido confirmar que la causa genética de este paciente es una delección de un nucleótido (c.394delG/p.Glu132Lysfs\*20) en el gen *PAX3* que generaría un codón de parada prematuro en la proteína. Los cinco pacientes restantes diagnosticados presentaban NSHL, y en tres de ellos se han identificado variantes en el gen *TECTA*, de las cuales c.136T>C/p.Ser46Pro y c.2031C>G/p.Cys677Trp no han sido descritas anteriormente. De los otros tres pacientes, uno de ellos tiene una variante novel LP en *EYA4* (c.1295T>G/p.Leu432\*), otro de ellos, una variante P/LP en *GHRL2* (c.1469+1G>T), novel también, y el último, una en *TMCI* (c.932T>A/p.Phe311Tyr). Aquellas variantes noveles han sido evaluadas con la herramienta MobiDetails (Tabla 6). En los casos 84190 y 85707 fue posible realizar un estudio de segregación familiar, con el cual se pudo confirmar una variante *de novo* en el primero y en el segundo la segregación de la variante con la enfermedad en los familiares afectados.

### **Casos de hipoacusia ligada al cromosoma X**

En este estudio solo se ha encontrado un caso de hipoacusia ligada al cromosoma X (4%) en el paciente 85453, en el que se detectó un cambio de aminoácido (c.967C>T/p.Arg323Cys) en el gen *POU3F4* (Tabla 5C). Esta variante se ha descrito como VOUS en DVD y como VOUS/LP en ClinVar.

**Tabla 6.** Clasificación de variantes novedales encontradas en este estudio.

Gen	Variante	Clasificación según predictores	gnomAD Genomes	Predicción del impacto en la proteína				Predicción del efecto de splicing
				Valor MPA	CADD raw	SIFT	AlphaMissense	SpliceAI
<i>WFS1</i> NM_006005.3	c.1337G>A/ p.Ser446Asn	VOUS/LP	NE	8	3.26	Tolerado	LP	NA
<i>LMX1A</i> NM_177398.4	c.1103C>A/ p.Pro368His	VOUS/LP	NE	10	3.96	Dañino	LP	NA
<i>OTOF</i> NM_194248.3	c.4739T>G/ p.Leu1580Arg	VOUS/LP	NE	10	4.27	Dañino	LP	NA
<i>OTOGL</i> NM_001368062.3	c.3198+1G>A/ <i>splicing</i>	LP	NE	10	5.37	NA	NA	DL 0.99
<i>TECTA</i> NM_005422.4	c.136T>C/ p.Ser46Pro	VOUS/LP	NE	8	4.18	Dañino	LP	NA
<i>TECTA</i> NM_005422.4	c.2031C>G/ p.Cys677Trp	VOUS/LP	NE	6	2.02	Dañino	LP	NA
<i>GRHL2</i> NM_001330593.2	c.1469+1G>T/ <i>splicing</i>	P	NE	10	5.73	NA	NA	DL 0.94
<i>PAX3</i> NM_181458.4	c.394delG/ p.Glu132Lysfs*20	P	NE	10	NE	NE	NE	NA
<i>CDH23</i> NM_022124.6	c.3384C>G/ p.Asp1128Glu	VOUS/LP	NE	4.29	1.52	NE	LP	NA

El valor de las herramientas MPA y CADD raw indican el impacto que va a tener sobre la función de la proteína en una escala de 0–10 y de -6.41–35.5, respectivamente. El predictor SpliceAI determina el valor de probabilidad de que una variante cause un splicing anómalo en un rango de 0–1.



**VOUS:** variante de significado incierto; **LP:** probablemente patogénica; **P:** patogénica; **LB:** probablemente benigna; **NE:** no encontrado; **NA:** no aplicable; **AL:** pérdida del aceptor de splicing; **DL:** pérdida del dador de splicing.

### Casos no concluyentes

Se han clasificado un total de seis casos como no concluyentes (Tabla 7). Este grupo incluye aquellos casos en los que se han identificado variantes en heterocigosis en genes asociados a herencia autosómica recesiva, y aquellos en los que la patogenicidad de la variante es incierta y necesita esclarecerse mediante algún ensayo funcional.

#### 4.3 Análisis *in silico* de la variante en *GJB2*: c.-22-18T>A

Esta variante fue encontrada en heterocigosis compuesta junto con la variante c.71G>A en dos pacientes: 84156 y el control 33492.

El análisis *in silico* de su patogenicidad con SpliceAI expone una pérdida del sitio aceptor natural (puntuación de 0.66). Con la herramienta NNSplice es posible predecir el sitio aceptor alternativo (Figura 8). Nos indica que el sitio aceptor canónico pierde fuerza, bajando su score de un 0.88 a un 0.81. De esta forma, el aceptor alternativo, 39 pb aguasarriba, sería el que mayor fuerza de aceptor tiene y se predice que es donde ocurrirá el splicing.

A)

Start	End	Score	Intron	Exon	
661	701	0.82	agtctccctggttctgtcct	agctagtgattcctgtggttg	
699	739	0.88	gtgtgcattcgtcttttcc	agagcaaaccgccagagtaga	Aceptor canónico

B)

Start	End	Score	Intron	Exon	
661	701	0.82	agtctccctggttctgtcct	agctagtgattcctgtggttg	Aceptor alternativo 1
699	739	0.81	gtgagcattcgtcttttcc	agagcaaaccgccagagtaga	Aceptor canónico

**Figura 8.** Análisis del efecto de splicing de c.-22-18T>A en NNSplice. **A.** Aceptores y score de la secuencia WT. **B.** Aceptores y score de la secuencia mutante.

**Tabla 7.** Pacientes con un diagnóstico no concluyente.

Paciente	Sexo	Edad	Diagnóstico	Gen	Alelo 1	Fenotipo	Clasificación de patogenicidad
80631	H	74	NSHL	<i>GJB2</i> (AR) NM_004004.6	c.617A>G/ p.Asn206Ser	NSHL inicio 26 años, bilateral, profunda.	P
				<i>CDH23</i> (AR) NM_022124.6	c.3178C>T/ p.Arg1060Trp		P
81247	M	1	NSHL	<i>SLC26A4</i> (AR) NM_000441.2	c.296C>A/ p.Thr99Lys	NSHL congénita, bilateral, moderada-severa. Dilatación de acueductos vestibulares	VOUS/LP
85030	H	9	NSHL	<i>SLC26A4</i> (AR) NM_000441.2	c.1001+1G>A/ splicing	NSHL inicio 6 años, asimétrica: cofosis OD, leve-moderada OI. Conducto auditivo alterado	P
87631	M	15	NSHL	<i>ESPN</i> (AR) NM_031475.3	c.337C>T/ p.Arg113Cys	NSHL OD, mareos, vértigos.	LP
					c.1547C>T/ p.Thr516Met		VOUS
89179	M	29	NSHL	<i>WFS1</i> (AD/AR) NM_006005.3	c.2589C>G/ p.Ile863Met	NSHL inicio 26 años, en OD, progresiva, audiograma ski- slope	VOUS/LP
89388	H	64	NSHL	<i>PLS1</i> (AD) NM_001172312.2	c.812T>C/ p.Leu271Ser	NSHL inicio adultez, bilateral, severa, progresiva, audiograma ski-slope	VOUS/LP

**H:** hombre; **M:** mujer; **NSHL:** hipoacusia no sindrómica; **OD:** oído derecho; **OI:** oído izquierdo.

Asimismo, se activaría un sitio dador de splicing alternativo dentro de la secuencia exónica, perdiéndose 231 pb.

```

taagagttggtgtttgctcaggaagagatttaagcatgcttgcttaccagactcagaga
agtcctccctgttctgtcctAA1agctAA2agtgattcctgtgttgtgtgcattcgtcttttccACag
AGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGT
GAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCAT

```

**Figura 9.** Secuencia del único intrón y del exón 2 de *GJB2*. La secuencia exónica se muestra en mayúsculas y la intrónica, en cursiva y minúscula. Los tres sitios aceptores de splicing están indicados en negrita y delimitados por cuadrados negros: **AC**: sitio aceptor canónico; **AA1**: sitio aceptor alternativo 1; **AA2**: sitio aceptor alternativo 2. El codón de inicio ATG del exón 2 aparece en negrita. La variante intrónica a estudiar se destaca en negrita con una flecha.

Este efecto ha sido descrito anteriormente en la mutación ya descrita como patogénica c.-22-2A>C (Gandía et al., 2013). En este cambio de nucleótido ganan fuerza dos posibles sitios aceptores: uno 39 pb (AA1) y otro 35 pb (AA2) aguasarriba del sitio aceptor canónico (Figura 9), aunque en el análisis con NNSplice el segundo sitio aceptor no aparece como posible candidato.

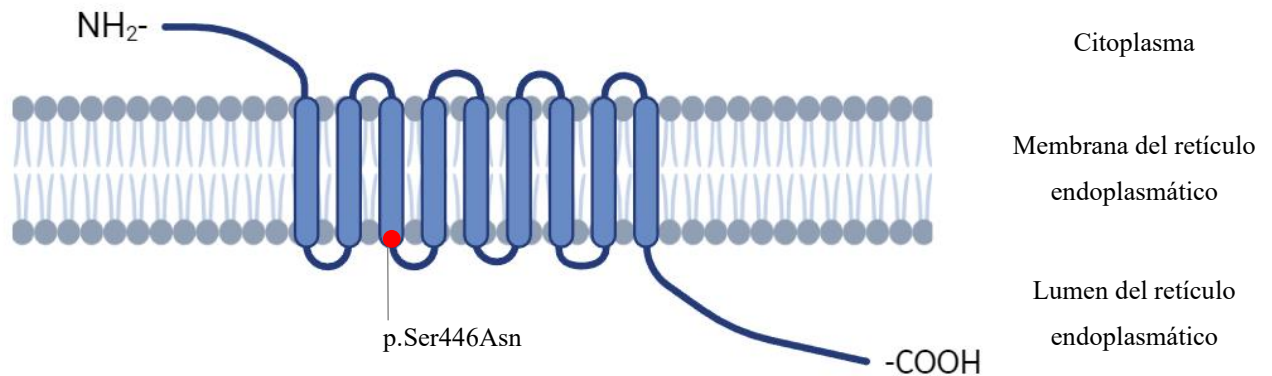
No obstante, es necesario validar este análisis mediante un ensayo funcional para poder asegurar el efecto predicho por este análisis *in silico*. Se llevó a cabo un ensayo de minigenes para esta variante que no pudo ser finalizado por falta de tiempo.

#### 4.4 Visualización de variantes a nivel de proteína en PyMOL

En aquellas variantes missense, noveles y de herencia autosómico-dominante, para aportar más evidencia de que se trata de una variante con un efecto probablemente patogénico, se hizo uso del visor molecular PyMOL para las variantes en *WFS1* (c.1337G>A/p.Ser446Asn) y en *TECTA* (c.136T>C/ p.Ser46Pro y c.2031C>G/ p.Cys677Trp).

#### Paciente 78425

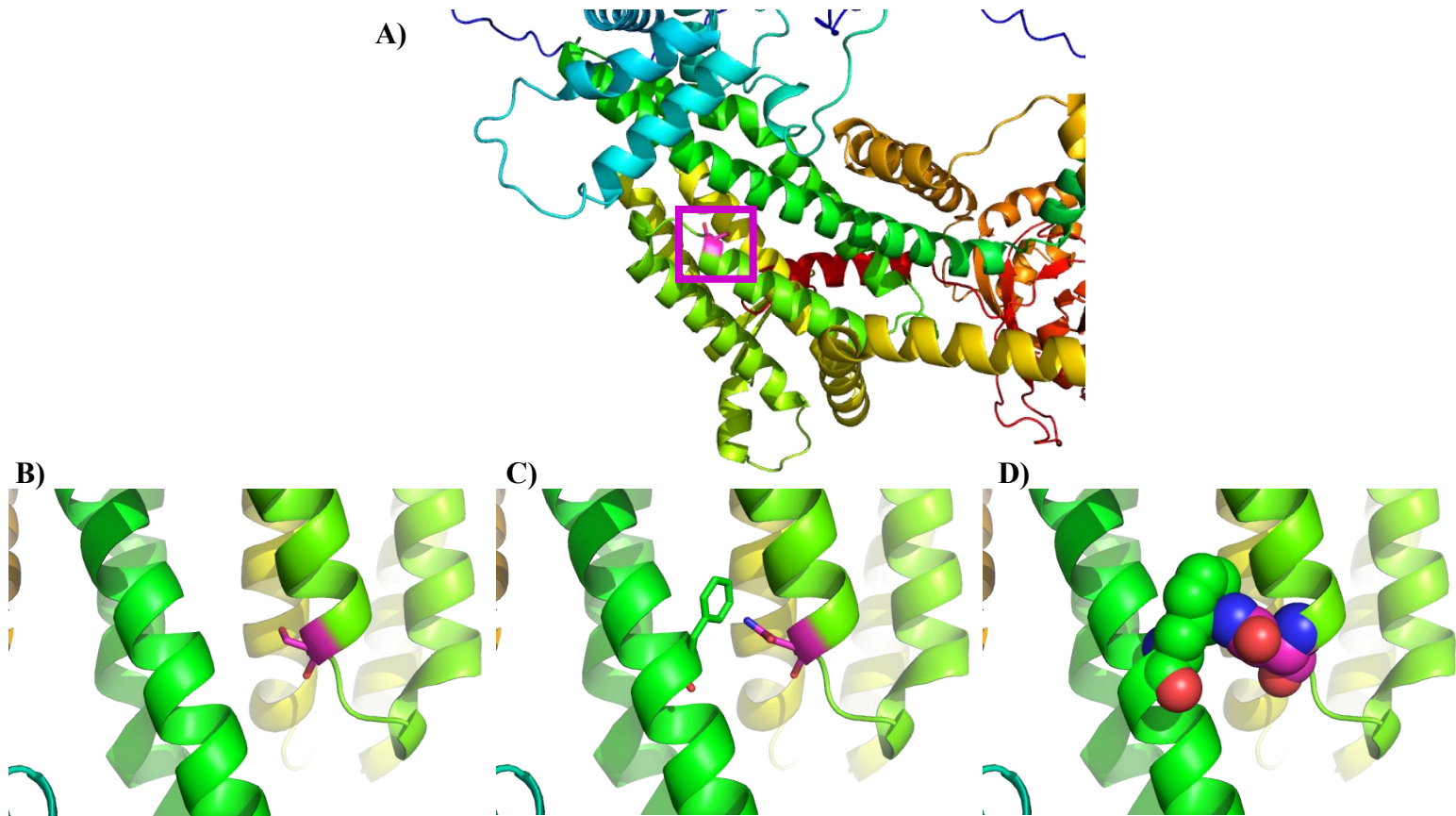
La proteína multipaso que genera *WFS1* se encuentra formando parte de la membrana del retículo endoplasmático, teniendo 9 regiones transmembrana compuestas por alfa-hélices (Figura 10). El residuo de serina en la posición 446 forma parte de uno de ellos.



**Figura 10.** Imagen esquemática de la proteína *WFS1* junto con la variante detectada en la paciente 78425 representada con un punto rojo. Figura creada con BioRender.

En la figura 11A se visualiza el residuo de serina formando parte de una de estas alfa-hélices que conforman la estructura transmembrana helicoidal.

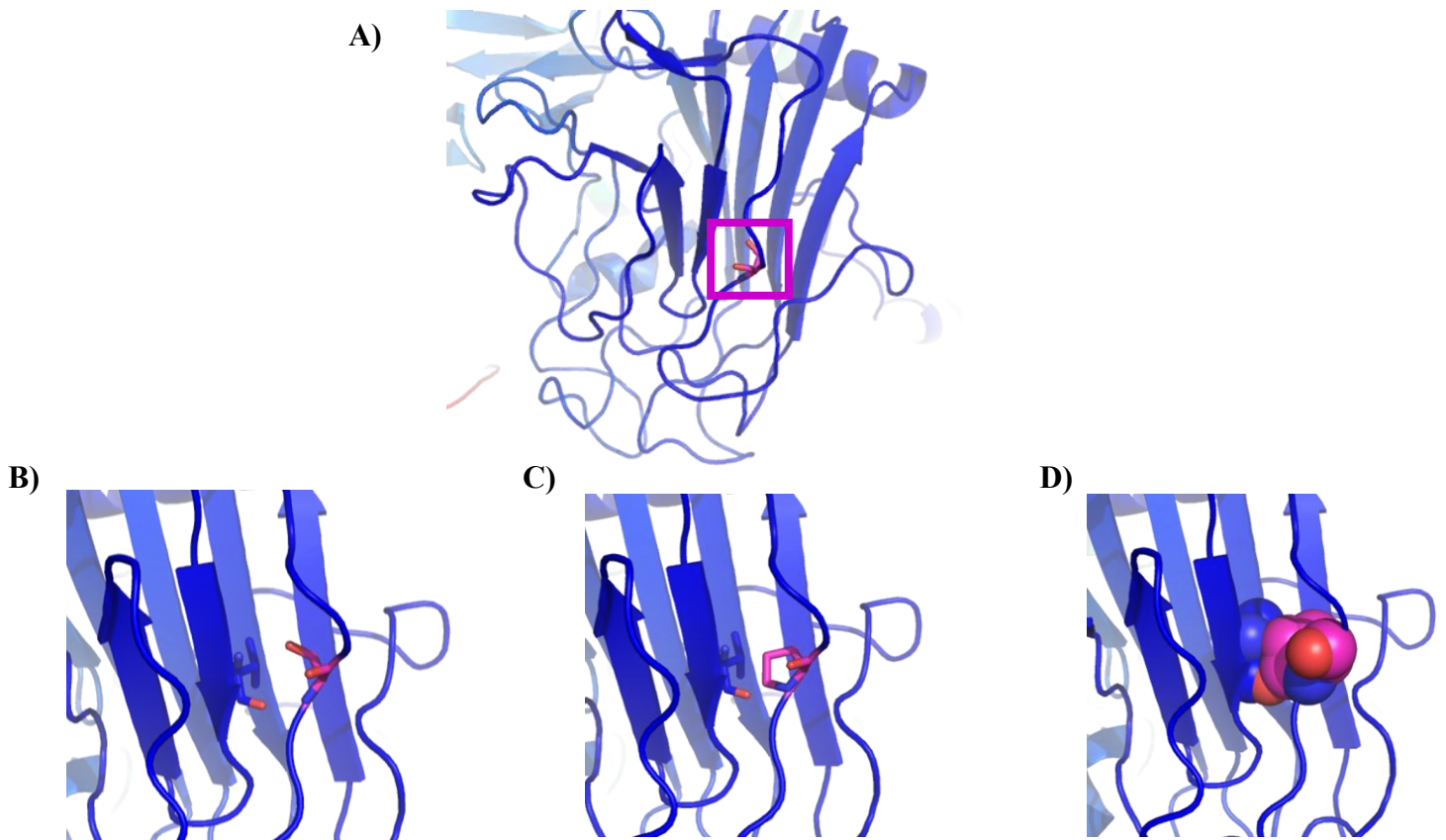
La variante  $\text{c.1337G>A/p.Ser446Asn}$  produce un cambio de aminoácido de la serina por una asparagina (Figuras 11B y 11C), un aminoácido más voluminoso y que, por tanto, causaría choques con otros aminoácidos cercanos, concretamente, con el residuo de fenilalanina en la posición 367, ya que las nubes electrónicas de estos dos aminoácidos, representadas con esferas en la Figura 11D, se superponen. Se puede establecer que esta variante produce un alejamiento en la posición de las alfa-hélices de la estructura transmembrana, causando un efecto en el dominio transmembrana de la proteína y consecuentemente en su función.



**Figura 11.** Imagen molecular de la variante p. Ser446Asn en *WFS1* destacada en fucsia en el visor molecular PyMOL. **A)** Imagen general de la variante, donde se observa formando parte de una alfa-hélice. **B)** Imagen ampliada del residuo de serina. **C)** Cambio del residuo de serina por la asparagina, destacada en fucsia. Además, se destaca una fenilalanina en 367 representada con su estructura molecular en forma de palos. **D)** Imagen de los residuos de asparagina y fenilalanina en forma de esferas.

### Paciente 79834

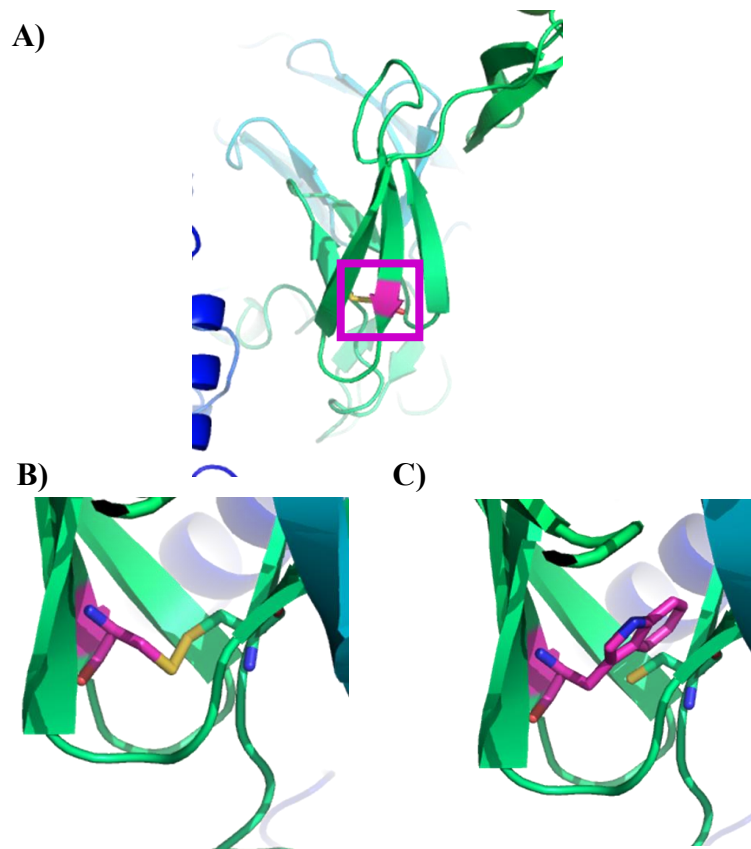
La siguiente variante que se visualizó fue c.136T>C/p.Ser46Pro en *TECTA*. La imagen de la proteína en el visor PyMOL se trata de un modelo 3D predicho por AlphaFold, de forma que, aunque en la imagen el residuo de serina no aparezca formando parte de una lámina-beta, por la posición paralela de esta hebra a otras láminas-beta podemos asumir que se trata de una (Figura 12A). Ésta se encuentra enfrentada a otra, probablemente formando un dominio funcional (Figura 12B). La variante da lugar a un cambio a la prolina, un aminoácido más voluminoso que la serina (Figura 12C). Uno de los aminoácidos afectados es la valina en la posición 67 (Figura 12D), dando lugar a un obstáculo estérico que afecta a la estructura formada por las láminas-beta y, consecuentemente, afectando a la función de la proteína.



**Figura 12.** Imagen molecular de la variante p.Ser46Pro en *TECTA* destacada en fucsia en el visor molecular PyMOL. **A)** Imagen general de la variante, donde se observa formando parte de una lámina-beta no predicha por el modelo 3D. **B)** Imagen amplificada del residuo de serina. **C)** Cambio del residuo de serina por la prolina, destacada en fucsia. Además, se destaca una valina en 67 representada con su estructura molecular en forma de palos. **D)** Imagen de los residuos de serina y valina en forma de esferas.

### Paciente 84190

La última variante, c.2031C>G/p.Cys677Trp en *TECTA*, forma parte de una lámina-beta (Figura 13A). La cisteína se encuentra formando un enlace con otra cisteína en la posición 652 (Figura 13B), posiblemente para mantener las láminas-beta juntas. Sin embargo, con el cambio a triptófano (Figura 13C) se perdería ese enlace, además de que la cadena lateral de este aminoácido es mucho más grande e inevitablemente estas láminas-beta se alejarían, perdiendo la funcionalidad de esta región de la proteína.



**Figura 13.** Imagen molecular de la variante p.Cys677Trp en *TECTA* destacada en fucsia en el visor molecular PyMOL. **A)** Imagen general de la variante, donde se observa formando parte de una lámina-beta. **B)** Imagen ampliada del residuo de cisteína formando un puente disulfuro indicado en amarillo con otra cisteína en la posición 652 representada con palos. **C)** Cambio del residuo de cisteína por triptófano, destacado en fucsia.

## 5. Discusión de los resultados

La hipoacusia se caracteriza por tener una alta heterogeneidad tanto clínica como genética, además de que en ocasiones se encuentran asociados a otros síntomas clínicos en órganos diferentes. Esta heterogeneidad es un reflejo de la complejidad estructural y fisiológica del oído. Por ello, el diagnóstico genético se complica, ya que hoy en día se conocen más de 200 genes asociados.

Con la técnica de secuenciación por Sanger de unos pocos genes asociados a hipoacusia solo se llegaba a diagnosticar genéticamente un 10 – 20% de los casos (Korver et al., 2017). Gracias a la implementación de técnicas de secuenciación NGS, el porcentaje de casos resueltos se ha incrementado considerablemente, pero aun así varía mucho en función de la cohorte de pacientes (Shearer & Smith, 2015). En pacientes con hipoacusia congénita o de inicio temprano con además antecedentes familiares el porcentaje de diagnóstico es mayor debido a que hay más posibilidad de que tenga un origen genético, mientras que en adultos aumenta la posibilidad de que la causa



de la hipoacusia sea ambiental. En los casos esporádicos también se ha descrito que hay menos posibilidades de encontrar la causa genética (Del Castillo et al., 2021; Shearer & Smith, 2015). Además, se ha de tener en cuenta otros factores como el número de pacientes, la severidad de la pérdida auditiva, etc. Hoy en día, se utiliza como práctica rutinaria en el diagnóstico genético de hipoacusias en el Hospital La Fe el estudio de un panel de genes personalizado. De acuerdo con varios estudios, el porcentaje promedio de diagnósticos realizados utilizando un panel de genes es de aproximadamente un 40% (Shearer & Smith, 2015; Sloan-Heggen et al., 2016).

Gracias al abaratamiento de costes de estrategias de secuenciación más a gran escala, tales como la secuenciación de exoma o genoma completo, se puede empezar a considerar su aplicación en clínica. De hecho, en trastornos con una gran heterogeneidad tanto clínica como genética, como es el caso de la hipoacusia, supone una buena alternativa (Sommen et al., 2017). Su tasa de diagnóstico varía según los estudios, al igual que con la estrategia del panel de genes, ya que no se tratan de causas intrínsecas a la técnica si no a la propia cohorte, pero se encuentra en torno al 50% (Bademci et al., 2016; Van Heurck et al., 2021).

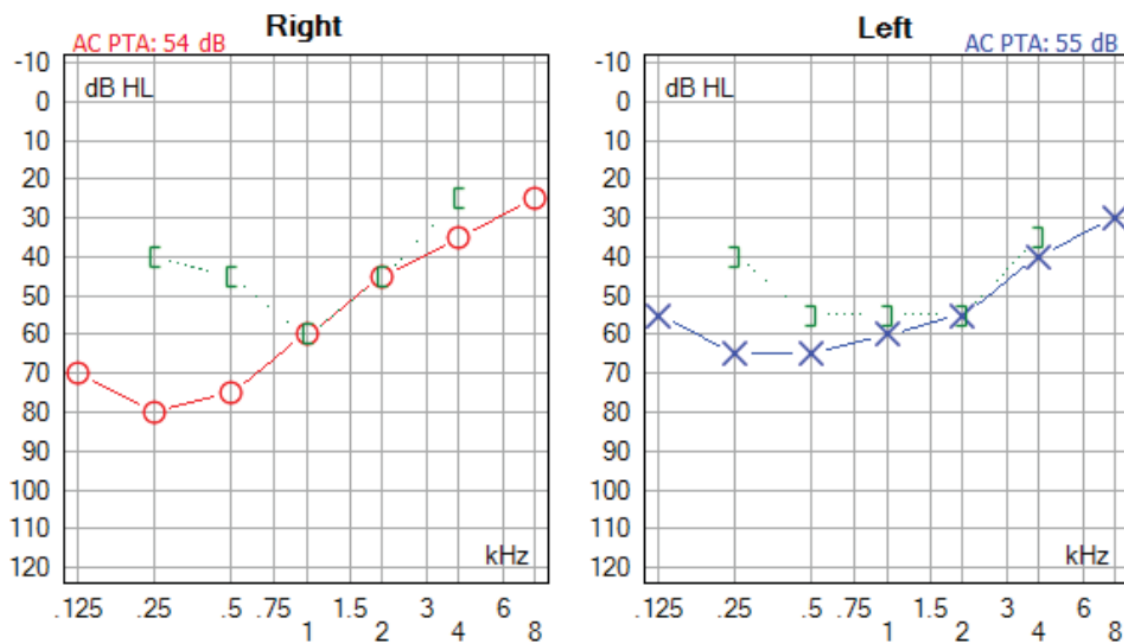
### **5.1 Pacientes del panel de genes**

Siguiendo la estrategia de secuenciación mediante un panel de genes enriquecido únicamente se ha podido esclarecer un caso. El porcentaje de casos resueltos es menor que en los observados en bibliografía, pero hay que tener en consideración que el tamaño de muestra es bastante pequeño, con un total de 12 pacientes. En otro estudio hecho por el grupo de investigación con una cohorte de estudio mucho más grande, el panel de genes consigue identificar la causa genética en un 40% de los casos (47/118 familias) (García-García et al., 2020), más acorde con lo visto en bibliografía.

En el caso resuelto (78425) se encontró una variante missense novel en *WFS1* (c.1337G>A/p.Ser446Asn) en el exón 8. Variantes en este gen dan lugar a NSHL de herencia dominante o al síndrome de Wolfram de herencia recesiva. Este síndrome se caracteriza por diabetes mellitus, diabetes insipidus y atrofia óptica, además de hipoacusia. Además, se ha observado que la mayoría de las variantes asociadas a NSHL de herencia dominante se encuentran en la región C-terminal, mientras que las descritas para Wolfram se extienden por todo el gen. Por otra parte, como regla general, aquellas variantes que inactivan al gen causan el síndrome de Wolfram, mientras que las missense causan NSHL (Sommen et al., 2017).

Este paciente no presenta síntomas más allá de la hipoacusia, además de que la variante se encuentra en heterocigosis, por lo que se descarta el síndrome de Wolfram como fenotipo asociado

a esta variante. En cuanto a NSHL, los pacientes con variantes en este gen presentan un audiograma muy característico: primero se ven afectadas las frecuencias graves y progresivamente, frecuencias más altas, de forma que con la edad se tiene un audiograma plano (Hilgert et al., 2009). Si analizamos el audiograma de esta paciente (Figura 14), se observa precisamente una pérdida en las frecuencias graves, la cual comenzó a los 18 años con más de 25 años de evolución. Clínicamente, cuadra con el tipo de hipoacusia causado por variantes en *WFS1*.



**Figura 14.** Audiograma de la paciente 78425 de ambos oídos. Se observa una hipoacusia severa en frecuencias bajas y moderada en frecuencias altas.

Los predictores bioinformáticos (Tabla 6) establecen un efecto LP/P, siendo únicamente SIFT la que describe un cambio que no afecta a la función de la proteína. En conjunto con el análisis con PyMOL (Figura 11), esta variante se ha clasificado como LP.

En cuanto al resto de pacientes, no se encontraron variantes patogénicas que pudiesen ser las causantes de la hipoacusia.

Las variantes mitocondriales están asociadas a un amplio espectro de síndromes heredados por vía materna, en concordancia con el hecho de que se expresan en todas las células. Sin embargo, las variantes en *MT-RNR1* están asociadas a NSHL por un mecanismo desconocido. Concretamente, la variante m.1555G>A es una causa bastante común de NSHL con un patrón materno de transmisión (Morales Angulo et al., 2011). En pacientes con esta variante, esta hipoacusia se desarrolla si ha sido expuesto a aminoglucósidos, especialmente la estreptomicina,

ya que son antibióticos ototóxicos. La NSHL causada por esta variante está caracterizada por ser bilateral y simétrica, sobre todo para frecuencias altas. Esta variante ha sido detectada con mucha más frecuencia en España o algunos países de Asia, como Japón, debido al uso indiscriminado de aminoglucósidos durante la década de los 70, que desencadenó la aparición de muchos casos de NSHL severa (Hilgert et al., 2009; Morales Angulo et al., 2011). La paciente refería antecedentes familiares de hipoacusia compatibles con un patrón de herencia materna, por ello, la paciente 42756 fue analizada para esta variante, con un resultado positivo en homoplasmia.

## 5.2 Pacientes del exoma clínico

Antes de llevar a cabo el análisis de variantes de pacientes, se quiso comprobar la sensibilidad del exoma clínico. Para ello, se analizaron cinco pacientes ya diagnosticados con anterioridad (Grupo Control). Dos de las diez variantes no pudieron ser detectadas. La CNV en *GJB6* no fue detectada debido al propio diseño del exoma clínico, ya que incluye sondas que cubren únicamente el exón 5 (único exón codificante). Las deleciones típicas en este gen suelen afectar a los tres primeros exones, como por ejemplo la del(*GJB6-D13S1830*). Se trata de una deleción de unas 309 kb que trunca a *GJB6* y que es bastante común en España (se ha detectado en el 5,9–9,7% de los casos donde el locus afectado es DFNB1) (Fj et al., 2005). Por esta razón, se realizó una MLPA utilizando la SALSA P-163 (MRC Holland, Ámsterdam, Países Bajos), que incluye sondas para DFNB1, en todos aquellos pacientes en los que no se encontró ninguna variante causal tras el análisis mediante exoma clínico.

En cuanto a *STRC*, se detectó la deleción en heterocigosis, pero no se detectó la mutación puntual (SNV). Esto es debido a una limitación del programa de análisis, Alissa Reporter, que no realiza ninguna anotación de variantes en regiones que presentan una alta homología con algún pseudogen (como es el caso de algunos exones de *STRC*).

Cabe destacar que el programa de análisis ha detectado varias CNVs en *STRC* que tras el análisis por MLPA se comprobaron que se trataban de artefactos, concretamente en tres de cinco casos. Es posible que sea debido a que el software durante el alineamiento de las lecturas cortas las clasifique como parte del pseudogen, *STRCPI*, ya que guarda un 100% de homología entre los exones 1–15 (Domínguez-Ruiz et al., 2023), y por ello descarte un número de lecturas proporcional a un alelo o a ambos, como ocurre con el control 37412. Por tanto, es necesario validar las CNVs detectadas en *STRC* con la técnica MLPA.

De los 45 pacientes sin diagnóstico previo, se ha conseguido obtener un diagnóstico concluyente en 21 de ellos (46,67%), resultado esperable según la bibliografía (Bademci et al., 2016; Van Heurck et al., 2021).

Los genes causantes de hipoacusia más frecuentes en este estudio son *GJB2* y *STRC*, lo que concuerda con lo descrito en la literatura (Del Castillo et al., 2021; Korver et al., 2017), además de *TECTA*, el gen de hipoacusia dominante más común en España (Hildebrand et al., 2011).

Asimismo, también se ha identificado en uno de los pacientes la tercera variante más frecuente en población española afectada de hipoacusia prelingual: c.2485C>T/p.(Gln829\*) en *OTOF* (Migliosi et al., 2002). Junto a esta variante, se ha detectado otra variante missense novel en *OTOF* (c.4739T>G/p.Leu1580Arg), para la cual los predictores bioinformáticos coinciden en que presenta un efecto dañino (Tabla 6).

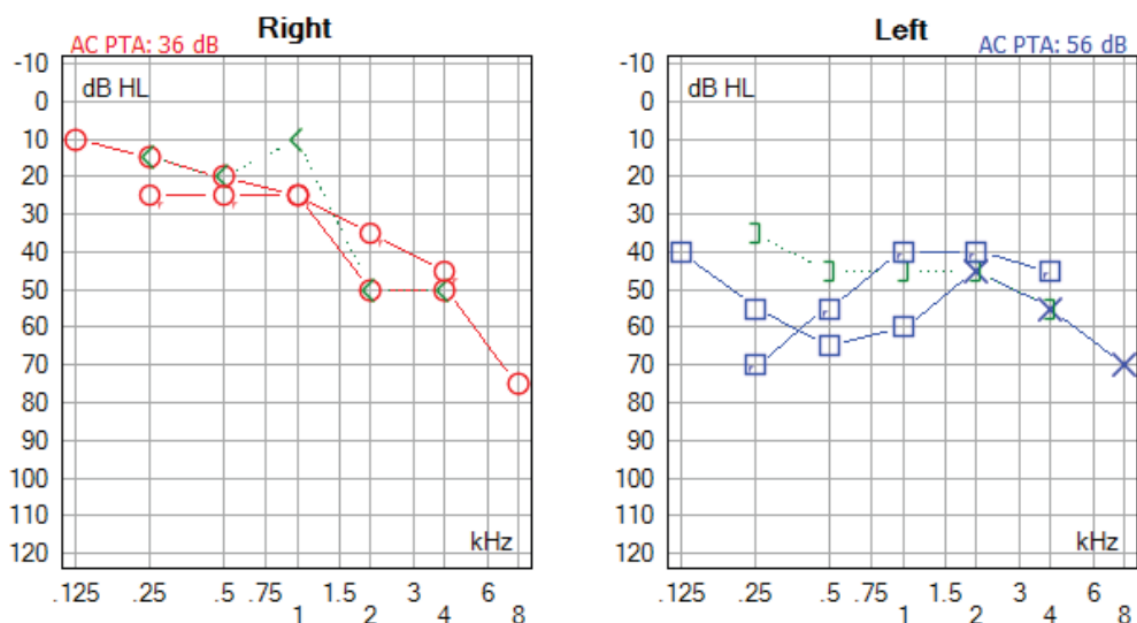
El exoma clínico abarca una cantidad de genes significativamente mayor que el panel de genes, lo que permite una mayor detección de variantes. Algunas de las variantes LP/P identificadas en esta cohorte de pacientes se hallan en genes que no incluye el panel de genes, destacando la importancia del exoma clínico para un análisis más exhaustivo. Concretamente, se han detectado variantes en *TSPEAR* (84156), en *LMX1A* (84646) y en *GRHL2* (85844).

La mayoría de las variantes halladas en este estudio que siguen un patrón de herencia dominante son noveles (4/6).

En Europa, la mayoría de casos de NSHLAD estén causados por variantes en los genes *MYO6A* (21%) y *TECTA* (18%). En este estudio no se detectó ningún paciente con variante LP en *MYO6A*, pero, en el caso del gen *TECTA*, fue la causa genética en tres pacientes. Este gen sigue un modo de herencia tanto recesivo como dominante, aunque la mayoría de variantes están asociadas a AD. Este gen además, tiene una correlación entre genotipo y fenotipo, de forma que las variantes en el dominio de zona pelúcida (extremo C-terminal) y en el extremo N-terminal causan hipoacusia moderada en frecuencias medias, las variantes en la región de zonadhesina causan hipoacusia leve-moderada en frecuencias altas, y si el residuo afectado es una cisteína la hipoacusia es progresiva (Hildebrand et al., 2011).

En nuestra cohorte, el primer caso de *TECTA*, c.136T>C/p.Ser46Pro (dominio entactina, N-terminal), es una variante missense novel. Las características fenotípicas de la hipoacusia del paciente 79834 son: bilateral, progresiva y se inició en la 3ª década. Se trata de una hipoacusia asimétrica, donde únicamente el oído derecho se encuentra más afectado en frecuencias agudas, en línea con el audiograma asociado a *TECTA* (Figura 15). El estudio bioinformático realizado

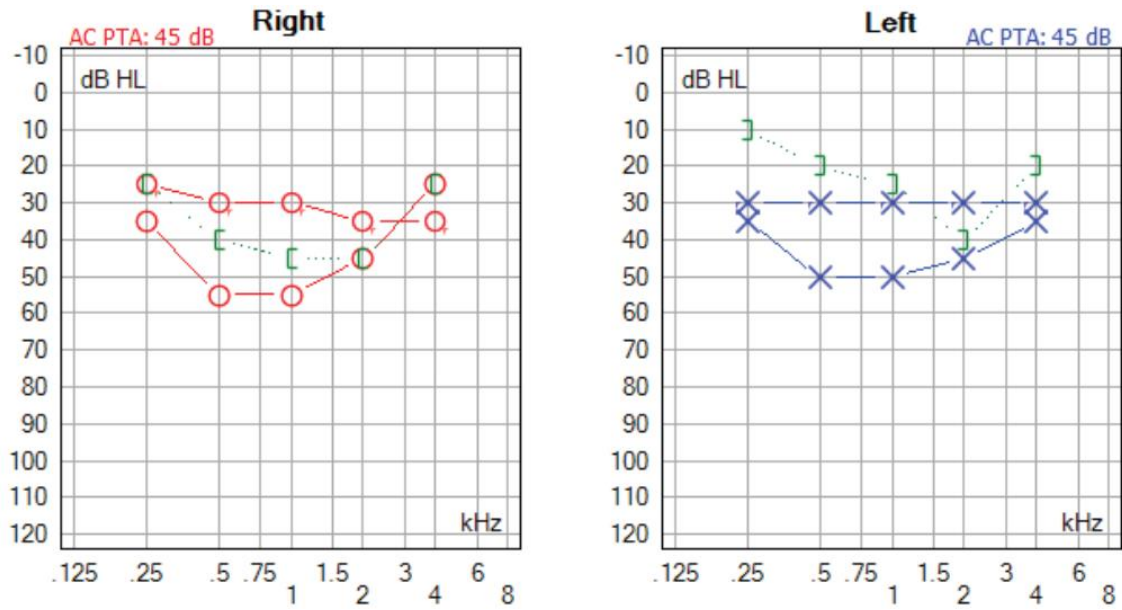
indica un posible efecto patogénico (Tabla 6), a lo que se le suma el estudio realizado con PyMOL (Figura 12).



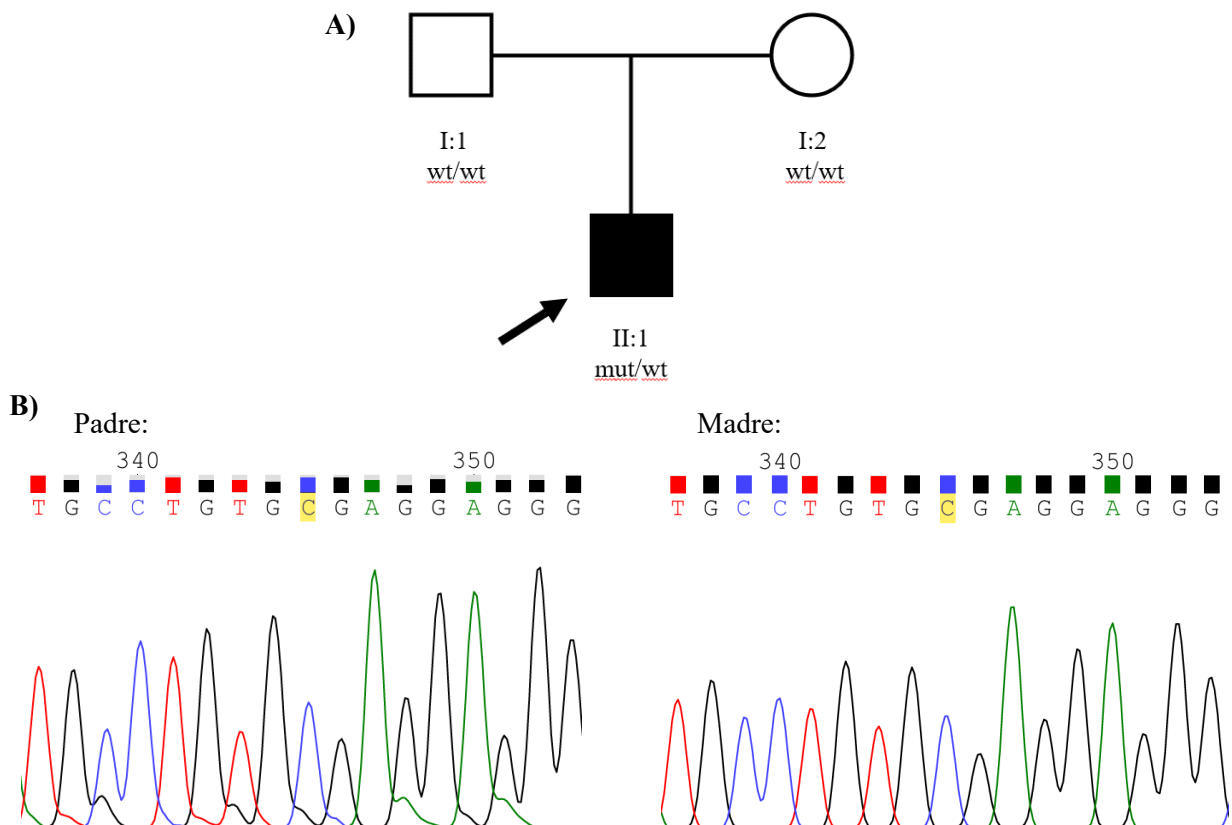
**Figura 15.** Audiograma del paciente 79834 de ambos oídos. Se muestra una hipoacusia asimétrica: en el oído derecho, de tipo ski-slope que llega a hipoacusia severa en las frecuencias altas; y en el oído izquierdo, moderada.

La siguiente variante en *TECTA* (c.3107G>A/ p.Cys1036Tyr) estaba previamente clasificada como patogénica por Hildebrand et al. para NSHL AD. La hipoacusia de la paciente que presenta esta variante, 83911 es progresiva. El aminoácido afectado es una cisteína, por lo que concuerda con la bibliografía. Además, presenta antecedentes familiares en su rama materna: madre, abuelo materno y tía abuela materna con todos sus hijos afectados. Todo esto apunta a que esta variante sea la causante de la hipoacusia tanto en la paciente como en el resto de familiares afectados, pero no pudo comprobarse por un estudio de segregación familiar por cuestión de tiempo.

En el último caso de *TECTA*, c.2031C>G/p.Cys677Trp, el paciente 84190 manifiesta una hipoacusia leve-moderada (Figura 16). Tanto los predictores *in silico* como el análisis realizado con PyMOL (Figura 13) establecen un posible efecto patogénico. Este paciente carece de antecedentes familiares, por lo que es posible que se tratara de una variante *de novo*. Tras un estudio de segregación familiar a sus padres, se constató que ninguno de ellos presenta esta variante, lo que indica que, efectivamente, es una variante *de novo* (Figura 17).



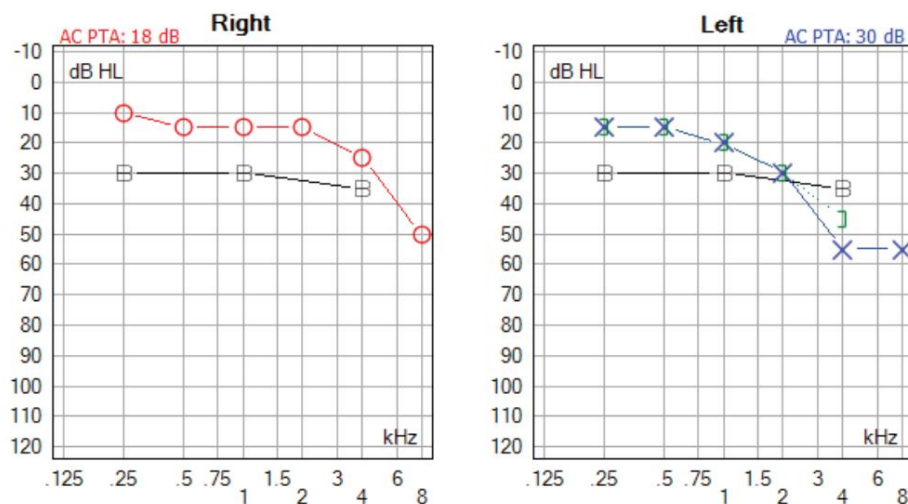
**Figura 16.** Audiograma del paciente 84190, que indica una hipoacusia moderada tipo U.



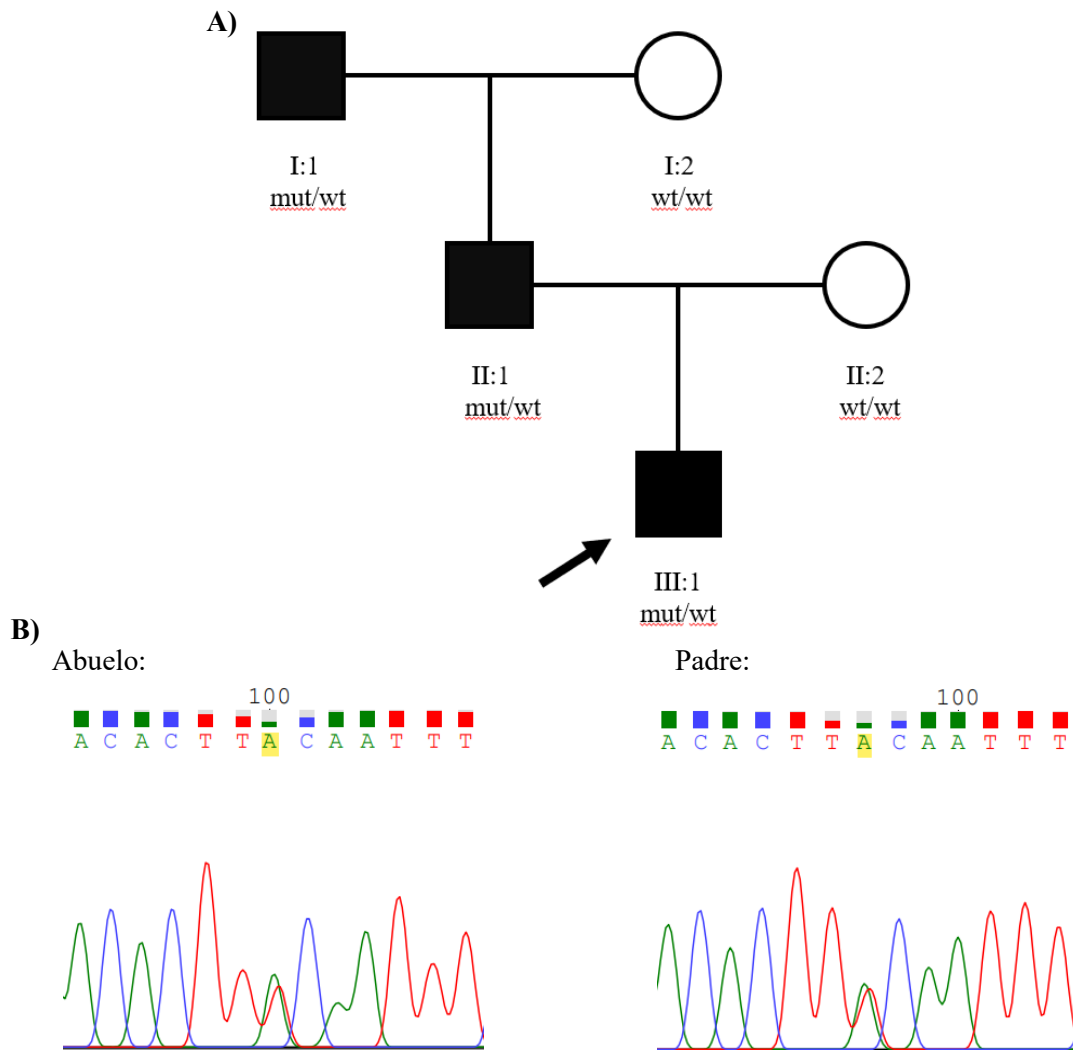
**Figura 17.** Resultado del estudio de segregación familiar del paciente 84190. **A)** Árbol genealógico. La flecha indica el caso índice, mut indica la variante patológica y wt, la secuencia de tipo salvaje. **B)** Secuenciación por Sanger de los padres de 84190. En amarillo se destaca el nucleótido afectado.

En el paciente 85844 se halló una variante que afecta al sitio canónico de splicing en *GRHL2* (c.1469+1G>T). Las variantes en este gen suelen tener un inicio variable, siendo el más temprano a los 7 años, con un grado de pérdida leve a moderada en todas las frecuencias. La hipoacusia del paciente se caracteriza por ser congénita y leve. No obstante, la rama materna del paciente tiene antecedentes de hipoacusia, por lo que se planteó un estudio de segregación familiar que no fue posible concluir por cuestiones de tiempo.

La variante en *TMCI* es la otra variante de herencia AD hallada en este estudio que ha sido descrita anteriormente, sin embargo, se encuentra clasificada como una VOUS tanto en ClinVar como en DVD. No está presente en bases de datos poblacionales, pero los predictores lo clasifican como un cambio tolerado, sin efecto patogénico. La hipoacusia caracterizada por *TMCI*, DFNA36, se caracteriza por tener afectadas las frecuencias agudas en una primera instancia, seguida por una pérdida en las frecuencias graves y, eventualmente, pérdida profunda en el resto. El paciente tiene una edad de 7 años, por lo que la progresión no ha podido suceder todavía, pero su audiograma indica una caída en frecuencias agudas (Figura 18), concordando con DFNA36. Además, el paciente tiene antecedentes familiares, su padre y su abuelo paterno, por lo que se hizo un estudio de segregación familiar para comprobar la causa genética. Se pudo encontrar esta misma variante en ambos familiares (Figura 19), de forma que se confirma la patogenicidad de esta variante.



**Figura 18.** Audiograma del paciente 85707. Se observa una hipoacusia moderada en frecuencias agudas.



**Figura 19.** Resultado del estudio de segregación familiar del paciente 85707. **A)** Árbol genealógico del paciente. La flecha indica el caso índice, mut indica la variante patogénica y wt, la secuencia de tipo salvaje. **B)** Secuenciación por Sanger de los familiares afectados de 85707. En amarillo se destaca el nucleótido afectado.

A la hora de clasificar variantes que no han sido descritas en bases de datos de variantes, existen una serie de complicaciones en aquellos casos en los que no está claro si la función de la proteína se ve perjudicada o no, como es el caso de variantes de cambio de aminoácido o a la hora de predecir el efecto del splicing en aquellas variantes que no afectan al sitio canónico. Por ello, es necesario asegurar la calidad de las predicciones al realizar estudios bioinformáticos. En caso de incertidumbre, se puede profundizar el análisis bioinformático utilizando herramientas como PyMOL o, si no es posible, llevar a cabo estudios funcionales. Este sería el caso de la variante c.-22-18T>A de *GJB2*, ya que es una variante que a priori afecta al splicing del ARNm. El efecto predicho es el mismo que aquel que se da en la variante patogénica c.-22-2A>C (Gandía et al., 2013). Por cuestión de tiempo, no se pudo finalizar, pero el cuadro clínico de la paciente 84156



es similar al de DFNB1 (hipoacusia neurosensorial, prelingual y profunda) (Tabla 5A), asociado a variantes en *GJB2*, lo que sugiere que podría ser una variante patogénica. Actualmente, se están realizando estudios a nivel de ARN para confirmar el efecto de las predicciones. Estos incluyen la extracción de ARN de saliva de la paciente portadora de la variante y estudios *in vitro* mediante minigen para verificar el impacto de la variante (Gaildrat et al., 2010).

Cabe destacar que el programa de análisis ha detectado varias CNVs en *STRC* que tras el análisis por MLPA se comprobaron que se trataban de artefactos, concretamente en tres de cinco casos del Grupo Problema. Es posible que sea debido a que el software durante el alineamiento de las lecturas cortas las clasifique como parte del pseudogen, *STRCP1*, ya que guarda un 100% de homología entre los exones 1–15 (Domínguez-Ruiz et al., 2023), y por ello descarte un número de lecturas proporcional a un alelo o a ambos, como ocurre con el control 37412. Por tanto, es necesario validar las CNVs detectadas en *STRC* con la técnica MLPA.

Existen varios pacientes en donde se han hallado algunas variantes en heterocigosis clasificadas como LP/P además de la causante de la hipoacusia (Tabla 5). Algunas de ellas se encuentran en genes asociados a NSHL o SHL de herencia tanto AR como AD. Es importante considerar las variantes patogénicas que puedan portar los pacientes para así poder dar un consejo genético reproductivo adecuado, en caso de que el paciente lo solicite.

Con respecto al paciente 84646, la variante LP/P identificada en *LMX1A* (c.1103C>A/p.Pro368His), relacionada con NSHL de herencia AD, no ha sido descrita anteriormente en una base de datos clínica, por lo que fue sometida a un análisis bioinformático (Tabla 6). Al estar ausente de bases de datos poblacionales y tener un efecto dañino predicho de forma unánime por los predictores de patogenicidad de la página MobiDetails, se presupone un efecto LP. Aun habiendo identificado una posible variante candidata para la causa genética en *LMX1A* para NSHL AD, también podrían ser responsables de la hipoacusia en este paciente las variantes halladas y validadas mediante secuenciación por Sanger en *STRC* como las causantes, ya que han sido identificadas anteriormente en pacientes con NSHL. Asimismo, las características clínicas del paciente son más similares a DFNB16 (inicio infancia, leve-moderada, audiograma cuesta abajo). Para este paciente sería conveniente realizar un estudio de segregación familiar de las variantes en *STRC* y en *LMX1A* para poder tener resultados más concluyentes, pero por falta de tiempo no se pudo desarrollar.

Otra complicación que conlleva el análisis de hipoacusia son aquellos genes asociados tanto a NSHL y SHL. En algunos casos se puede descartar la SHL debido a que, con la edad del paciente,

se esperaría que hubiese desarrollado el resto de síntomas característicos del síndrome. No obstante, es posible que el paciente no haya llegado a la edad de inicio de alguno de ellos, en cuyo caso es muy importante establecer un diagnóstico correcto. Un caso concreto es 81740, niño de 7 años, en el que se han detectado dos variantes LP en *CDH23* que no han sido reportadas en la bibliografía en ningún paciente con un trastorno asociado a *CDH23*. Este gen ha sido descrito tanto para NSHL como para el síndrome de Usher, en el cual la RP tiene lugar durante la adolescencia mientras que la hipoacusia es congénita. En general, las variantes que suponen una pérdida de función causan síndrome de Usher y aquellas missense, NSHL. Esto se debe a que en las variantes missense se espera que haya una cantidad residual de proteína, por lo que aún pueden realizar su función, aunque de forma parcial, a diferencia de las variantes truncantes, donde se considera que no hay ninguna cantidad de proteína. Aun así, dentro de las missense existen algunas con un impacto más grave, asociadas a la forma sindrómica de hipoacusia, y más moderado, las cuales pueden desempeñar una función residual y están asociadas a NSHL. Asimismo, se ha observado que una combinación de estos dos tipos de variantes resultan en NSHL, concretamente DFNB12 (hipoacusia neurosensorial, prelingual, profunda) (Usami et al., 2022). Atendiendo a este caso, a priori nos encontramos en esta situación. No obstante, no podemos asegurar que el alelo donde se encuentra la variante missense (c.3384C>G/p.Asp1128Glu) tenga función residual, ya que esta variante no está descrita ni asociada a un fenotipo en concreto y, por tanto, aunque sea esta la causa de la hipoacusia, no podemos confirmar su pronóstico. En este paciente también sería útil un estudio de segregación familiar para comprobar que estas variantes se encuentran en trans, es decir, en alelos distintos.

Aunque no se consiga identificar la causa genética en todos los pacientes, es importante considerar las variantes patogénicas que puedan portar los pacientes para así poder dar un consejo genético reproductivo adecuado, en caso de que el paciente lo solicite.

### **Casos no resueltos**

En un 55,56% de la cohorte no ha sido posible encontrar la causa genética. Esto puede deberse a varias razones. En pacientes adultos, es posible que el origen de la hipoacusia sea ambiental en lugar de genético, puesto que el paciente ha estado expuesto a factores externos durante un tiempo más prolongado que en pacientes más jóvenes. En algunos casos se ha identificado una única variante patogénica en heterocigosis descrita para genes de herencia AR. En estos pacientes es posible que no se haya encontrado una segunda variante debido a que se encuentre en una región

no codificante o una región que no abarque el exoma clínico, o puede que sean simplemente portadores de estas variantes y el gen causante de la hipoacusia sea otro.

Para los casos que permanecen sin un diagnóstico genético después de este estudio, sería interesante realizar un estudio de genoma completo para poder obtener posibles variantes en regiones no codificantes o en genes que aún no se han asociado a hipoacusia. Otra posible razón es que la variante encontrada no tenga suficiente evidencia para poder ser clasificada como patogénica y por tanto quede como VOUS, en cuyo caso sería necesario realizar ensayos funcionales para poder asegurar su patogenicidad.

### **Variantes novedades detectadas en este estudio**

Una de las consecuencias de las NGS es el incremento en el número de variantes causantes del trastorno. No obstante, debido a este gran volumen de información nueva, muchas de ellas no han sido descritas previamente y se desconoce su efecto. Para poder darles una significancia clínica, existen una serie de criterios a tener en cuenta que vienen recogidos en la guía del ACMG (Richards et al., 2015).

Normalmente, las variantes que introducen un codón de stop prematuro (nonsense), afectan a los sitios canónicos de splicing ( $\pm 1-2$  pb), producen una pérdida del codón de inicio (startloss) o producen un cambio en la pauta de lectura (frameshift) suelen ser clasificadas como patogénicas debido a su alto impacto en la función de la proteína. Por ello, las variantes c.3198+1G>A en *OTOGL* (80491), c.6931delG/p.Ala2311Profs\*15 en *USH2A* (90775), c.1469+1G>T en *GRHL2* (85844) y c.394delG/p.Glu132Lysfs\*20 en *PAX3* (82169) se han clasificado como tal. Asimismo, el paciente 90775, con sospecha del síndrome de Usher, presentaba otra variante ya descrita como patogénica para este síndrome. El paciente 82169 tenía sospecha de síndrome de Waardenburg, para el cual el gen *PAX3* sigue un patrón de herencia dominante y las variantes en este gen con pérdida de función suelen ser patogénicas (Pingault et al., 2010).

De las 11 variantes novedades identificadas, 6 son missense (Tabla 7). Su interpretación es más compleja y es necesario ampliar la evidencia evaluando predictores bioinformáticos de patogenicidad, frecuencias poblacionales, realizar estudios de segregación cuando sea posible y estudios funcionales para confirmar la clasificación.

## 6. Conclusiones

1. En el estudio de variantes genéticas mediante exoma clínico, se ha obtenido un diagnóstico completo en un 44,44% de la cohorte de pacientes estudiados, que coincide con lo descrito en la bibliografía. Aun así, este método tiene ciertas limitaciones a la hora de detectar ciertas CNVs en *GJB6* y *STRC*, además de SNVs en algunas regiones de *STRC*.
2. Se han identificado 40 variantes patogénicas en 19 genes diferentes, confirmando la elevada heterogeneidad genética que tienen las hipoacusias hereditarias.
3. En nuestra cohorte de pacientes se han identificado 9 variantes noveles. Tras realizar un análisis bioinformático para evaluar su posible impacto en la estructura y función de las proteínas correspondientes, así como su splicing, se ha determinado que estas variantes son potencialmente patogénicas. Este estudio refleja la complejidad que supone el análisis de las variantes y la necesidad de realizar estudios adicionales, *in silico* e *in vitro*, y segregaciones familiares para poder determinar su patogenicidad.
4. En un 53,33% de pacientes no se consiguió un diagnóstico concluyente. Estos pacientes quizás presenten alteraciones en genes no incluidos en el exoma clínico o en regiones no codificantes. Por ello, tanto en los pacientes donde se ha encontrado una única variante patogénica en genes de herencia recesiva, como en los pacientes sin variantes identificadas, se ampliará el estudio al genoma completo para conseguir detectar las causas genéticas de la enfermedad.

## 7. Referencias bibliográficas

- Bademci, G., Cengiz, F. B., Foster II, J., Duman, D., Sennaroglu, L., Diaz-Horta, O., Atik, T., Kirazli, T., Olgun, L., Alper, H., Menendez, I., Loclar, I., Sennaroglu, G., Tokgoz-Yilmaz, S., Guo, S., Olgun, Y., Mahdieh, N., Bonyadi, M., Bozan, N., ... Tekin, M. (2016). Variations in Multiple Syndromic Deafness Genes Mimic Non-syndromic Hearing Loss. *Scientific Reports*, 6(1), 31622. <https://doi.org/10.1038/srep31622>
- Del Castillo, I., Morín, M., Domínguez-Ruiz, M., & Moreno-Pelayo, M. A. (2021, diciembre). *Genetic etiology of non-syndromic hearing loss in Europe | Human Genetics*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00439-021-02425-6>
- Dodson, K. & Dominguez. (2012). Genetics of hearing loss: Focus on DFNA2. *The Application of Clinical Genetics*, 97. <https://doi.org/10.2147/TACG.S35525>
- Domínguez-Ruiz, M., Ruiz-Palmero, L., Buonfiglio, P. I., García-Vaquero, I., Gómez-Rosas, E., Goñi, M., Villamar, M., Morín, M., Moreno-Pelayo, M. A., Elgoyhen, A. B., Del Castillo, F. J., Dalamón, V., & Del Castillo, I. (2023). Novel Pathogenic Variants in the Gene Encoding Stereocilin (STRC) Causing Non-Syndromic Moderate Hearing Loss in Spanish and Argentinean Subjects. *Biomedicines*, 11(11), 2943. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112943>

- Dror, A. A., & Avraham, K. B. (2010). Hearing impairment: A panoply of genes and functions. *Neuron*, 68(2), 293-308. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.011>
- Fj, del C., M, R.-B., A, A., T, H., E, L., Ca, de O., H, A., Z, B., Mr, A., S, M., A, P., H, S., Kr, S., D, W., W, W., La, A., Y, M., Ma, M.-P., M, V., ... I, del C. (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). <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.028324>
- Gaildrat, P., Killian, A., Martins, A., Tournier, I., Frébourg, T., & Tosi, M. (2010). Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 653, 249-257. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-759-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-759-4_15)
- Gallo-Terán, J., Morales-Angulo, C., Rodríguez-Ballesteros, M., Moreno-Pelayo, M. A., del Castillo, I., & Moreno, F. (2005). Prevalencia de las mutaciones 35delG en el gen GJB2, del (GJB6-D13S1830) en el gen GJB6, Q829X en el gen OTOF y A1555G en el gen del ARNr 12S mitocondrial en sujetos con hipoacusia neurosensorial no sindrómica de inicio congénito o en la infancia. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 56(10), 463-468. [https://doi.org/10.1016/S0001-6519\(05\)78649-0](https://doi.org/10.1016/S0001-6519(05)78649-0)
- Gandía, M., Del Castillo, F. J., Rodríguez-Álvarez, F. J., Garrido, G., Villamar, M., Calderón, M., Moreno-Pelayo, M. A., Moreno, F., & del Castillo, I. (2013). A novel splice-site mutation in the GJB2 gene causing mild postlingual hearing impairment. *PloS One*, 8(9), e73566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073566>
- García Díaz, M. P. (2023). *Screening mutacional en pacientes con hipoacusia* [Tesis doctoral]. Universidad de Valencia.
- García-García, G., Berzal-Serrano, A., García-Díaz, P., Villanova-Aparisi, R., Juárez-Rodríguez, S., de Paula-Vernetta, C., Cavallé-Garrido, L., Jaijo, T., Armengot-Carceller, M., Millán, J. M., & Aller, E. (2020). Improving the Management of Patients with Hearing Loss by the Implementation of an NGS Panel in Clinical Practice. *Genes*, 11(12), 1467. <https://doi.org/10.3390/genes11121467>
- Hildebrand, M. S., Morín, M., Meyer, N. C., Mayo, F., Modamio-Hoybjor, S., Mencía, A., Olavarrieta, L., Morales-Angulo, C., Nishimura, C. J., Workman, H., DeLuca, A. P., del Castillo, I., Taylor, K. R., Tompkins, B., Goodman, C. W., Schrauwen, I., Van Wesemael, M., Lachlan, K., Shearer, A. E., ... Moreno-Pelayo, M. A. (2011). DFNA8/12 Caused byTECTA Mutations is the Most Identified Subtype of Non-syndromic Autosomal Dominant Hearing Loss. *Human Mutation*, 32(7), 825-834. <https://doi.org/10.1002/humu.21512>
- 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? *Mutation research*, 681(2-3), 189-196. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.08.002>
- 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>
- Lv, J., Wang, H., Cheng, X., Chen, Y., Wang, D., Zhang, L., Cao, Q., Tang, H., Hu, S., Gao, K., Xun, M., Wang, J., Wang, Z., Zhu, B., Cui, C., Gao, Z., Guo, L., Yu, S., Jiang, L., ... Shu, Y. (2024). AAV1-hOTOF gene therapy for autosomal recessive deafness 9: A single-arm

- trial. *Lancet (London, England)*, 403(10441), 2317-2325. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02874-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02874-X)
- Migliosi, V., Modamio-Høybjør, S., Moreno-Pelayo, M. A., Rodríguez-Ballesteros, M., Villamar, M., Tellería, D., Menéndez, I., Moreno, F., & Del Castillo, I. (2002). Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *Journal of Medical Genetics*, 39(7), 502-506. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.7.502>
- Morales Angulo, C., Gallo-Terán, J., Señaris, B., Fontalva, A., González-Aguado, R., & Fernández-Luna, J. L. (2011). Prevalencia de la mutación A1555G del gen MTRNR1 en pacientes con hipoacusia postlocutiva sin antecedentes familiares de sordera. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 62(2), 83-86. <https://doi.org/10.1016/j.otorri.2010.08.003>
- Omichi, R., Shibata, S. B., Morton, C. C., & Smith, R. J. H. (2019). Gene therapy for hearing loss. *Human Molecular Genetics*, 28(R1), R65-R79. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz129>
- Pingault, V., Ente, D., Dastot-Le Moal, F., Goossens, M., Marlin, S., & Bondurand, N. (2010). Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Human Mutation*, 31(4), 391-406. <https://doi.org/10.1002/humu.21211>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405-424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Saroul, N., Giraudet, F., Gilain, L., Mom, T., & Avan, P. (2016). Fisiología coclear: Bases anatómicas, celulares y electrofisiológicas. *EMC - Otorrinolaringología*, 45(1), 1-22. [https://doi.org/10.1016/S1632-3475\(16\)76072-3](https://doi.org/10.1016/S1632-3475(16)76072-3)
- Shearer, A. E., & Smith, R. J. H. (2015). Massively Parallel Sequencing for Genetic Diagnosis of Hearing Loss. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 153(2), 175-182. <https://doi.org/10.1177/0194599815591156>
- 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>
- Sommen, M., Wuyts, W., & Van Camp, G. (2017). Molecular diagnostics for hereditary hearing loss in children. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(8), 751-760. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1340834>
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), W71-74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
- Usami, S., Isaka, Y., Miyagawa, M., & Nishio, S. (2022). Variants in CDH23 cause a broad spectrum of hearing loss: From non-syndromic to syndromic hearing loss as well as from

- congenital to age-related hearing loss. *Human Genetics*, 141(3), 903-914. <https://doi.org/10.1007/s00439-022-02431-2>
- Van Heurck, R., Carminho-Rodrigues, M. T., Ranza, E., Stafuzza, C., Quteineh, L., Gehrig, C., Hammar, E., Guipponi, M., Abramowicz, M., Senn, P., Guinand, N., Cao-Van, H., & Paoloni-Giacobino, A. (2021, julio). *Benefits of Exome Sequencing in Children with Suspected Isolated Hearing Loss*. <https://www.mdpi.com/2073-4425/12/8/1277>
- Vona, B., Hofrichter, M., Neuner, C., Schröder, J., Gehrig, A., Hennermann, J., 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>

## ANEJOS

**Anejo 1.** Ciclo estándar utilizado para el protocolo de PCR.

98°C	5'	30 ciclos
98°C	30''	
Tm	30''	
72°C	30''	
4°C	∞	

Siendo Tm la temperatura de fusión dependiente de cada primer, calculada con la siguiente fórmula:

$$Tm = 2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (G + C)$$

**Anejo 2.** Mix y ciclo de PCR para la polimerasa *Phussion*.

H <sub>2</sub> O	30,5 µl	98°C	30''	35 ciclos
HF Buffer	10 µl	98°C	10''	
dNTPs	5 µl	60°C	15''	
Primer directo	1 µl	72°C	20''/kb	
Primer reverso	1 µl	10°C	∞	
Polimerasa	0,5 µl			
ADN	1 µl			

**Anejo 3.** Mix y ciclo de PCR para la digestión enzimática con *XbaI* y *NdeI*.

ADN (2500ng)	2500/[ADN]	98°C	30''	35 ciclos
Buffer FastDigest	10 µl	98°C	10''	
dNTPs	5 µl	60°C	10''	
Primer directo	1 µl	72°C	45''	
Primer reverso	1 µl	10°C	∞	
Polimerasa	0,5 µl			





**ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030**

**Anexo al Trabajo de Fin de Grado y Trabajo de Fin de Máster: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.**

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

<b>Objetivos de Desarrollo Sostenibles</b>	<b>Alto</b>	<b>Medio</b>	<b>Bajo</b>	<b>No Procede</b>
ODS 1. <b>Fin de la pobreza.</b>				
ODS 2. <b>Hambre cero.</b>				
ODS 3. <b>Salud y bienestar.</b>				
ODS 4. <b>Educación de calidad.</b>				
ODS 5. <b>Igualdad de género.</b>				
ODS 6. <b>Agua limpia y saneamiento.</b>				
ODS 7. <b>Energía asequible y no contaminante.</b>				
ODS 8. <b>Trabajo decente y crecimiento económico.</b>				
ODS 9. <b>Industria, innovación e infraestructuras.</b>				
ODS 10. <b>Reducción de las desigualdades.</b>				
ODS 11. <b>Ciudades y comunidades sostenibles.</b>				
ODS 12. <b>Producción y consumo responsables.</b>				
ODS 13. <b>Acción por el clima.</b>				
ODS 14. <b>Vida submarina.</b>				
ODS 15. <b>Vida de ecosistemas terrestres.</b>				
ODS 16. <b>Paz, justicia e instituciones sólidas.</b>				
ODS 17. <b>Alianzas para lograr objetivos.</b>				

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

\*\*\*Utilice tantas páginas como sea necesario.