



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**SECUENCIACIÓN DE EXOMA COMPLETO EN UN GRUPO DE CASOS FAMILIARES  
MEXICANOS CON HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

ENY PAOLA LINARES MENDOZA

TUTORA:

DRA. MARÍA DE LA LUZ ARENAS SORDO  
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

CO-TUTORES:

DRA. ANA LILIA RODRÍGUEZ VENTURA  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

DR. JESÚS KAZUO YAMAMOTO FURUSHO

INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICIÓN Y CIENCIAS MÉDICAS SALVADOR ZUBIRÁN

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## INDICE

<b>Marco teórico</b>	4
Embriología del oído	5
Anatomía del oído	8
Fisiología de la cóclea	12
Hipoacusia	20
Epidemiología	20
Epidemiología de la hipoacusia en México	23
Clasificación de la hipoacusia	24
Secuenciación de Exoma Completo	33
Interpretación de variantes	35
Criterios propuestos para la interpretación de variantes	41
Secuenciación de nueva generación en la hipoacusia	48
Estudios sobre hipoacusia realizados en pacientes mexicanos	49
<b>Planteamiento del problema</b>	51
<b>Justificación</b>	52
<b>Pregunta de investigación</b>	52
<b>Objetivo general</b>	53
<b>Objetivos específicos</b>	53
<b>Material y métodos</b>	54
Tipo de estudio	54
Descripción del universo de trabajo	54
Criterios de inclusión	54
Criterios de exclusión	54
Tamaño de muestra	55
Variables	55
Descripción de los procedimientos	56
<b>Resultados</b>	58
<b>Discusión</b>	79
<b>Aspectos éticos y de bioseguridad</b>	83
<b>Bibliografía</b>	84

# SECUENCIACIÓN DE EXOMA COMPLETO EN UN GRUPO DE CASOS FAMILIARES MEXICANOS CON HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL

## 1.MARCO TEÓRICO:

### Embriología del oído

El oído externo y medio se originan del aparato branquial. La cavidad del oído medio se deriva a partir del endodermo de la primera hendidura braquial. El oído interno se desarrolla a partir de la placoda ótica. Del primer arco o cartílago de Meckel contribuye al martillo y al yunque. El músculo tensor del tímpano deriva del primer arco branquial y es inervado por el nervio del primer arco branquial el cual es rama del nervio trigémino. El segundo arco branquial o cartílago de Reichert contribuye a la supraestructura del estribo. El músculo del estribo es inervado por el nervio facial el cual es rama del nervio facial (nervio del segundo arco), se une el primer nervio del arco al nervio lingual mandibular. La base del estribo es derivado de la capsula ótica (1).

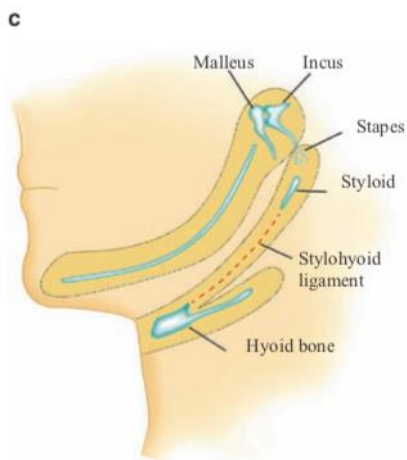


Figura 1. Embriología del oído

## Embriología del oído interno

En el sistema auditivo, el oído interno se desarrolla más temprano. Un engrosamiento en la superficie del ectodermo en cada lado de la región del rombencéfalo (la parte caudal del cerebro posterior) de los pliegues neurales en el día embrionario 22 o 23 anuncia el desarrollo del pabellón auricular. La formación de este engrosamiento ectodérmico, la placoda ótica, es inducida mediante la señalización del mesodermo paraxial y la notocorda. El crecimiento de la cabeza transloca caudalmente la placoda ótica al nivel de la región del segundo arco branquial. Durante la cuarta semana, la placoda ótica se invagina profundamente hacia el ectodermo en la superficie del mesénquima subyacente, formando la fosa ótica. Los márgenes de cada fosa ótica se fusionan posteriormente para formar la vesícula ótica (otocisto), el primordio del laberinto membranoso. Se distinguen dos regiones de la vesícula ótica: una porción ventral que da lugar al sáculo y el ducto coclear (pars inferior), y una porción dorsal que forma el utrículo y los canales semicirculares (pars superior) y el conducto endolinfático (figura 1).(2)

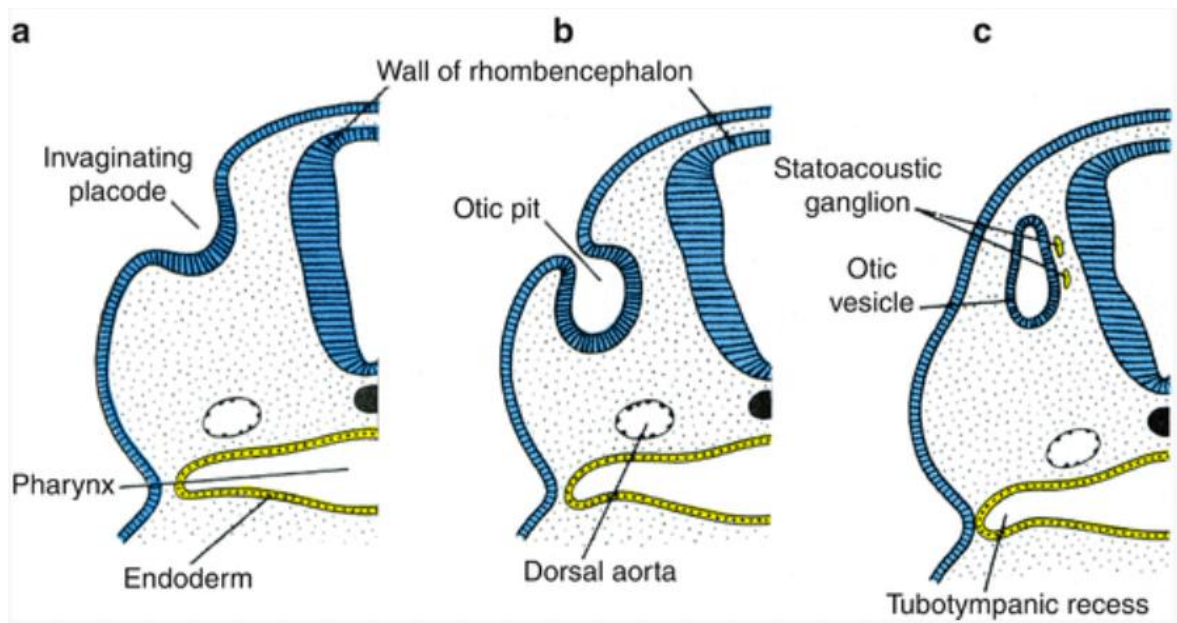


Figura 2. Corte transversal a través del rombencéfalo que muestra la formación de las vesículas óticas a) 24 días, b) 27 días, c) 4.5 semanas

## **Embriología del sáculo, Cóclea y Órgano de Corti**

Aproximadamente en el día 26 en la cuarta semana, la vesícula ótica ventral se diferencia dentro del sáculo. Durante la quinta semana el polo inferior del sáculo comienza a alargarse y enroscarse. Esta proyección, el ducto coclear, penetra alrededor del mesénquima en forma espiral. Para completar la octava semana, el ducto ha realizado 2.5 vueltas. El desarrollo de la cóclea membranosa y el sáculo mantienen su conexión a través del ducto reuniens.

Durante la séptima semana, las células del ducto coclear epitelial se diferencian para formar el Órgano de Corti. Inicialmente, estas células epiteliales son similares, pero dentro de poco formarán dos crestas, una interna (el futuro limbus espiral) y una cresta externa. La cresta externa forma una hilera de células sensoriales auditivas internas (células pilosas) y 3-4 hileras fuera de las células pilosas. Los estereocilios de las células pilosas se conectan a través de la membrana tectorial, la cual se une al limbus espiral. Las células pilosas, sus células de soporte y la membrana tectorial juntas constituyen al Órgano de Corti. Las células ganglionares espirales también se diferencian de las células en la pared del ducto coclear para formar el ganglio espiral. Las proyecciones neuronales se extienden del ganglio espiral al órgano de Corti, terminando al lado del cáliz adyacente en las células pilosas individuales. Las células del ganglio espiral conservan su carácter embrionario bipolar.

El mesénquima que rodea al conducto coclear pronto se diferenciara en cartílago. Durante la novena semana estos tejidos cartilaginosos se someten a vacuolización y forman los dos espacios perilinfáticos: la escala vestibular y la escala timpánica. La membrana vestibular (de Reissner) separa al conducto coclear de la escala vestibular y la membrana basilar separa al ducto coclear de la escala timpánica. La pared lateral del ducto coclear permanece unida al cartílago circundante por el ligamento espiral, mientras su aspecto medial está sustentado por el modiollo cartilaginoso, que posteriormente sirve como el eje óseo de la cóclea. La cóclea se desarrolla estructuralmente por la semana 26 (figura 3).

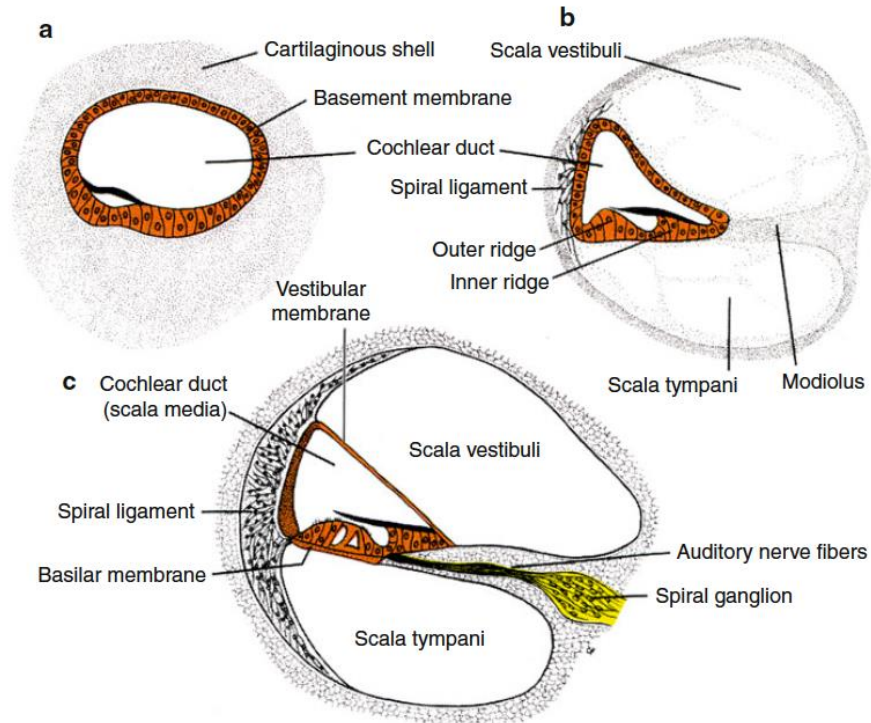


Figura 3. Desarrollo de la escala timpani y de la escala vestibuli. A) El conducto coclear es rodeado por una capa cartilaginosa. B) Durante la semana 10, aparecen vacuolas alargadas en la capa cartilaginosa. C) El conducto coclear (escala media) se separa de la escala timpani y de la escala vestibuli por las membranas basilar y vestibular respectivamente.



## Anatomía del oído

El oído se divide en tres componentes: externo, medio e interno (figura 4). El pabellón auricular se compone de cartílago cubierto de piel. La forma del cartílago es muy importante, debido a que le confiere la estructura al pabellón auricular. El canal auditivo externo mide aproximadamente 2.5 cm. El tercio externo es cartilaginoso y el tercio interno es óseo. La piel de la parte ósea es muy delgada y se extiende sobre el periostio y no contiene glándulas, folículos pilosos ni estructuras anexas. La trompa de Eustaquio conecta el oído medio con la nasofaringe. El tercio posterior de la trompa de Eustaquio del adulto es de conformación ósea y termina dentro de la porción petrosa del hueso temporal. Los dos tercios anteriores son cartilagosos. En adultos la tuba forma un ángulo de  $45^{\circ}$  en relación al plano horizontal, mientras que esta inclinación es de solo  $10^{\circ}$  en los niños (1).

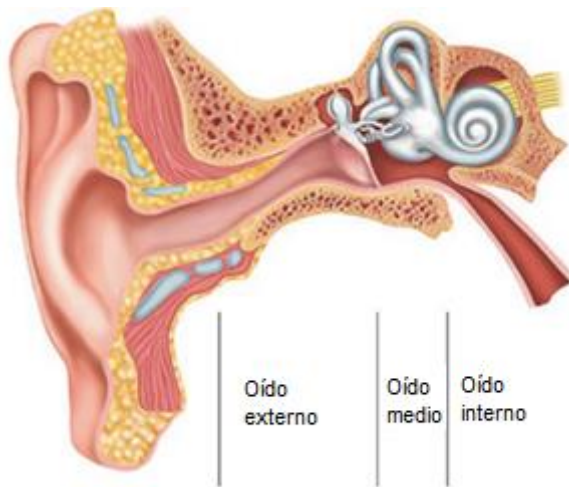


Figura 4. División esquemática del oído

La membrana timpánica comunica el oído externo con el medio, tiene una forma elíptica y ligeramente cónica. La punta de este cono, el umbo, marca la parte inferior del manubrio. El diámetro de la membrana timpánica mide aproximadamente 9 mm (9-10 vertical; 8-9 horizontal). El área de superficie es de 85-90 mm<sup>2</sup>. La membrana timpánica se compone de tres capas, la capa epidérmica externa, una capa mucosa interna, y una capa fibrosa media. El área

por encima del proceso pequeño del martillo se conoce como pars flácida y el área debajo como pars tensa. La pars flácida no tiene la capa fibrosa media, por esa razón es flácida. La pars tensa se engrosa periféricamente formando el anillo timpánico. El anillo timpánico no existe superiormente rodeando la pars flácida. Hay un triángulo de luz en el cuadrante ínfero anterior de la membrana timpánica. La posición de este triángulo cambia superiormente y comienza a ser más pequeño cuando la membrana timpánica se retrae. (1)

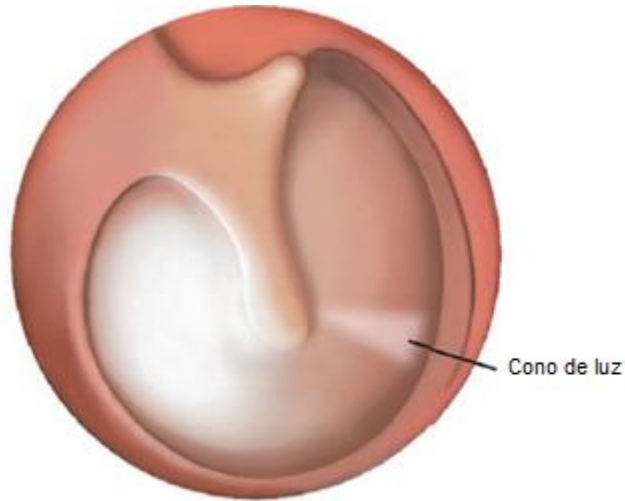


Figura 5. Membrana timpánica

### **Cadena osicular**

El martillo, yunque y estribo constituyen los tres huesos de la cadena osicular. Estos huesos sirven para conducir el sonido de la membrana timpánica hacia la cóclea. El martillo es el hueso más lateral y conecta directamente con la membrana timpánica. Este tiene cabeza manubrio, cuello y un proceso anterior y otro lateral. El proceso lateral está directamente conectado a la pars flácida de la membrana timpánica, el umbo. Un ligamento anterior se conecta al proceso anterior que pasa a través de la fisura petrotimpánica y en asociación con el ligamento incudal posterior, crea el eje de rotación osicular. El proceso lateral del martillo está localizado en la parte supero lateral del martillo y está muy próximo a los canales semicirculares laterales. La cabeza del martillo está localizada en el techo, un lugar donde frecuentemente se forman colesteatomas. El músculo

tensor del tímpano, une a la parte medial del martillo y se tensa en respuesta al sonido, esta tensión transmite el sonido a la cóclea.

El martillo es el más grande de los tres y se compone por el cuerpo y tres procesos: anterior, largo y lenticular. El cuerpo anterior del yunque se articula con la cabeza del martillo en el epitímpano mientras que el proceso lenticular se articula con la cabeza del estribo. El ligamento incudal posterior suspende el proceso corto del yunque en la fosa incudal.

El estribo es el más pequeño de los tres huesos y es el más pequeño del cuerpo humano. Lo componen cabeza, cuello, cruz anterior, cruz posterior y base. La base se asienta en la ventana oval, la cual conecta al vestíbulo. El ligamento anular está conectado al tejido conectivo que se encuentra entre la ventana oval y la base. (3)

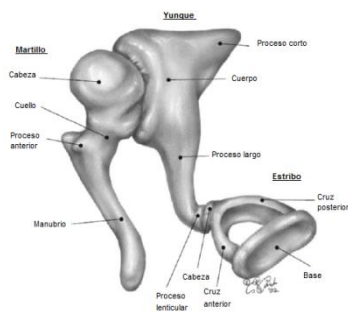


Figura 6. Cadena osicular

## Oído interno

El oído interno en los mamíferos consiste en cóclea, vestíbulo y tres canales semicirculares. Debido a su compleja anatomía, el oído interno es referido como un laberinto. El oído interno tiene una doble pared en su estructura. La pared externa es un hueso llamado capsula ótica. El lumen de la cápsula ótica se llama laberinto óseo. La pared membranosa interna del laberinto se llama espacio perilinfático y está lleno de perilinfa. Dentro del laberinto membranoso se llama espacio endolinfático y está lleno con endolinfa. La perilinfa es rica en sodio y su composición es similar al fluido cerebroespinal. La endolinfa es rica en potasio y muy diferente a la de otros fluidos corporales.

El oído interno está acompañado por muchas estructuras vitales. El oído interno se conecta al tronco encefálico con el nervio auditivo a través del canal auditivo interno. El nervio facial pasa superiormente (porción laberíntica y timpánica) y posteriormente (porción mastoidea) a la cóclea y lateralmente (una unión entre la porción timpánica y la porción mastoidea del nervio facial) hacia el vestíbulo. Ventralmente a la cóclea, la arteria carótida interna forma un acodamiento. El bulbo de la vena yugular está localizado inferior a la cóclea.

### **La cóclea**

La cóclea es un órgano de la audición. La cóclea en los mamíferos tiene la característica forma enrollada, en los humanos la conforman 2.75 vueltas. El epitelio sensorial de la cóclea es el órgano de Corti, en el cual las células pilosas sensoriales forman filas (4). En la figura 4 se muestra un corte del oído humano mostrando el órgano de Corti (órgano espiral). Arriba a la derecha se pueden ver las cuatro filas de células pilosas, que tienen como base las células de Dieter silimares a pilares. Cada célula pilosa contiene más de 100 cabellos individuales (individual hairs). Los cabellos traducen el movimiento mecánico ocasionado por el desplazamiento de las ondas sonoras a impulsos nerviosos, los cuales son transmitidos al cerebro a través del nervio coclear. (1)



Figura 7. Organo de Corti

### **Fisiología de la cóclea.**

La cóclea convierte las oscilaciones de la base del estribo en potenciales de acción de frecuencia específica en el nervio auditivo. Este mecanismo es llamado proceso de transducción mecano-eléctrico, y se realiza en varios pasos que pueden subdividirse en:

- Fragmentación de frecuencia específica pasiva de la señal de sonido
- Potenciación frecuencia específica activa de la energía acústica
- Conversión de la energía mecánica en potenciales de acción en el nervio.

Anatómicamente, la cóclea se puede subdividir en tres compartimientos fluidos: la escala timpani, la escala vestibular que contiene perilinfa rica en sodio y la escala media (conducto coclear) que contiene endolinfa rica en potasio. Este gradiente de potasio es producido por la estría vascular del ligamento espiral. Esta estructura recibe la mayor parte del suministro de sangre coclear. Por lo tanto, los transportadores de iones que se encuentran en la estría vascular son los mismos que se encuentran en el riñón. Esto parece ser la causa de la ototoxicidad de muchos fármacos y agentes nefrotóxicos.

Este gradiente de iones se denomina potencial endococlear y es fundamental para el buen funcionamiento de la cóclea. La avascularidad de la estría vascular y la atrofia general de esta estructura se han asociado con hipoacusia neurosensorial y presbiacusia. Específicamente, la correlación clínica y patológica sugiere una hipoacusia de frecuencia plana debido a la degeneración estrial. Por supuesto la pérdida de las células pilosas externas seguido por la pérdida de las células pilosas internas se ha visto que es la causa más frecuente de hipoacusia neurosensorial, afectando primeramente a las regiones de alta frecuencia.

### **Fragmentación pasiva de la onda viajera**

Como se describió anteriormente, cada señal acústica se transmite al oído interno a través de la base del estribo dentro de la ventana oval. Cualquier desplazamiento de la ventana oval es seguido por una onda viajera a lo largo de la membrana basilar. En la ventana oval, se produce un desplazamiento antitróxico como resultado del movimiento de la membrana basilar. Por lo tanto, la energía acústica que ingresa a la cóclea a través de la ventana oval se desvía a través de la cóclea en lugar de hacerlo a través del aparato vestibular. En los casos de una tercera ventana, como en el caso del síndrome de dehiscencia del canal superior, una parte de la energía se desvía a través de partes del sistema vestibular, lo que causa una hipoacusia pseudoconductiva, el fenómeno de Tullio y problemas de equilibrio (figura 8).

Es importante destacar que la onda que viaja dentro de la cóclea no está viajando continuamente, sino que alcanza su punto máximo en una posición bien definida dependiendo de la frecuencia del sonido. Específicamente, las ondas de alta frecuencia alcanzan su punto máximo más cerca de la ventana oval y redonda, y las ondas viajeras de baja frecuencia alcanzan un punto apical cerca del helicotrema. Por lo tanto, todo el espectro de frecuencias audibles se mapea a lo largo de la membrana basilar, y cada frecuencia se correlaciona con un lugar en la membrana basilar. Este es el primer principio esencial para la percepción del tono

y se llama tonotopía. De esta forma, cualquier sonido se divide en sus porciones espectrales.

### **Potenciación activa de la onda viajera**

Los datos experimentales han demostrado que el pico de la onda viajera es mucho más agudo de lo que se esperaría solo con los mecanismos pasivos. Entonces se descubrió que este mecanismo dependiente de la energía producido por la activación local de células altamente especializadas, las células ciliadas externas.

El órgano de Corti está localizado dentro de la escala media y tiene dos tipos diferentes de células receptoras, ambas sensibles al movimiento: de tres a cinco filas de células ciliadas externas y una fila de células ciliadas internas orientadas a lo largo de los giros de la cóclea. Las células pilosas están cubiertas de haces de estereocilios especialmente alineados en su membrana apical. Todos los estereocilios están conectados a través de estructuras mecánicas denominadas enlaces de punta (tip links).

Ambos tipos de células ciliadas están embebidas en las células de soporte y residen en la membrana basilar. Están cubiertas por una estructura de glicoproteína gelatinosa - la membrana tectorial. Se cree que los estereocilios más altos encontrados en las células ciliadas externas están incrustados dentro de la membrana tectorial. Sin embargo, los estereocilios de las células ciliadas internas no lo están y, por lo tanto, flotan libremente dentro del espacio subtectorial.

Debido a los diferentes puntos de apoyo de la membrana basilar y de la membrana tectorial, el desplazamiento de la membrana basilar producido por una onda viajera ocasiona un movimiento de cizallamiento y se desvían los estereocilios de las células ciliadas externas. Esto abre canales de potasio mecanosensibles cerca de los enlaces de punta de los estereocilios, lo que resulta en la entrada de potasio a la célula. La entrada posterior de calcio despolariza la

célula. La desviación de los estereocilios en la dirección opuesta cierra los canales y la célula se repolariza de nuevo.

Las células ciliadas externas poseen una proteína motora en sus membranas laterales llamada prestina. Es sensible al voltaje y acorta la longitud de las células ciliadas externas en microsegundos. Pueden cambiar la longitud (altura) de la célula hasta un 5% cuando se despolariza. Usando este mecanismo, las células ciliadas externas oscilan dentro de la frecuencia del ciclo despolarización-repolarización y mejoran la onda viajera a nivel local, lo que lleva a un pico agudo en un área definida del órgano de Corti. Específicamente, este pico mejorado y dependiente de la energía es mucho más agudo que el generado solo a través de la energía mecánica.

### **Conversión de la onda viajera en potenciales de acción**

Las células ciliadas internas junto con las cintas sinápticas de sus fibras nerviosas aferentes son capaces de convertir la onda viajera en potenciales de acción nerviosos. Los estereocilios de las células pilosas internas (CPI) se desvían como resultado del flujo de endolinfa hacia abajo de la membrana tectorial. De nuevo, los canales de potasio mecanosensibles se abren y la célula se despolariza. La endolinfa rica en potasio proporciona el combustible para este proceso. La despolarización a su vez conduce a una activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L dependientes de voltaje. La afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo tanto, conduce a una exocitosis muy rápida de las vesículas de glutamato que se agrupan en un grupo de vesículas que fácilmente son liberadas. El glutamato luego se une a un receptor AMPA de la membrana postsináptica, y se genera una corriente postsináptica excitadora. Se cree que el transmisor proporcionado por una vesícula podría activar suficiente corriente para despolarizar la fibra nerviosa aferente hasta su umbral.



Normalmente, las excitaciones de las fibras nerviosas se correlacionan con la fase real del ciclo de las señales de sonido. Esto se denomina bloqueo de fase de la fibra nerviosa y es el segundo mecanismo esencial para la percepción del tono. Se puede encontrar bloqueo de fase para señales de hasta 5 kHz, lo que demuestra el procesamiento extremadamente rápido en el sistema auditivo.

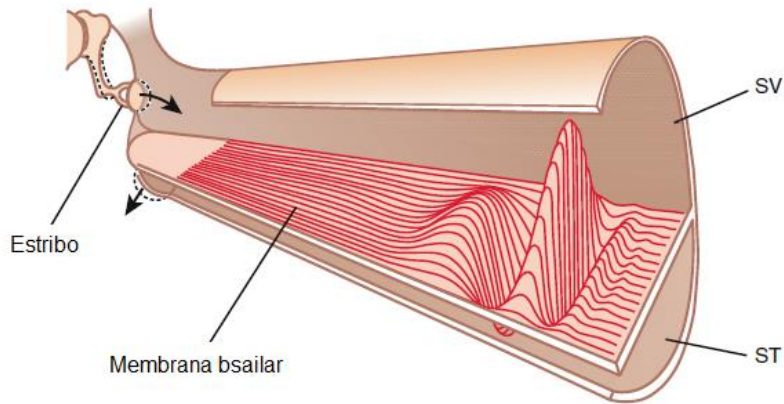


Figura 8. La onda viajera representada dentro de la cóclea desenrollada

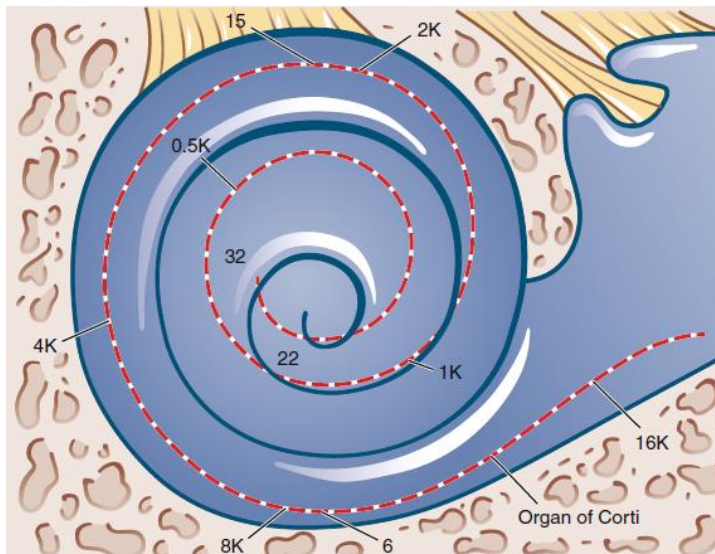


Figura 9. Arreglo de la frecuencia tonotópica dentro de la cóclea. Las partes cocleares correspondientes a los estímulos de alta frecuencia están localizadas basalmente, mientras que las áreas que responden a bajas frecuencias están ubicadas hacia el ápice de la cóclea.

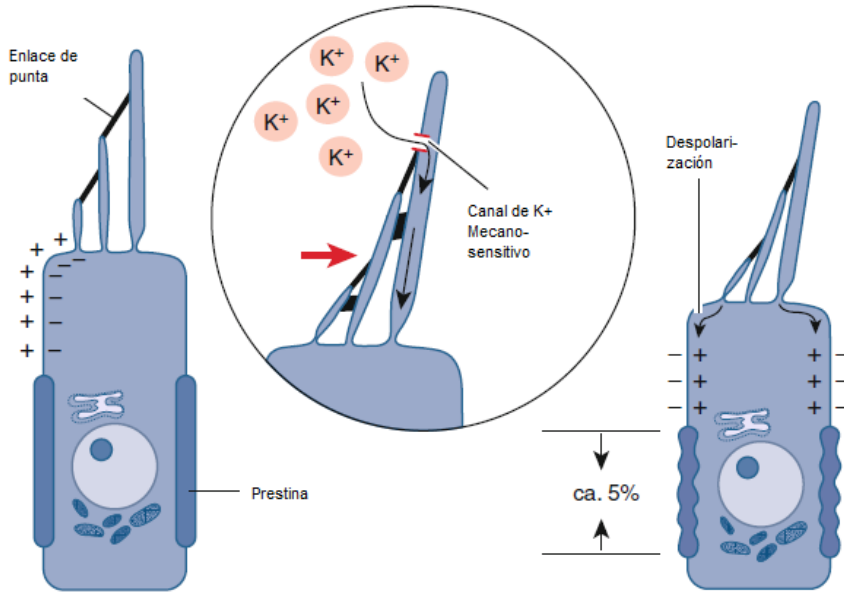


Figura 10. Despolarización de las células pilosas. La fuerza de cizallamiento se transforma en un potencial de acción por medio de la entrada de potasio desde el espacio endolinfático.

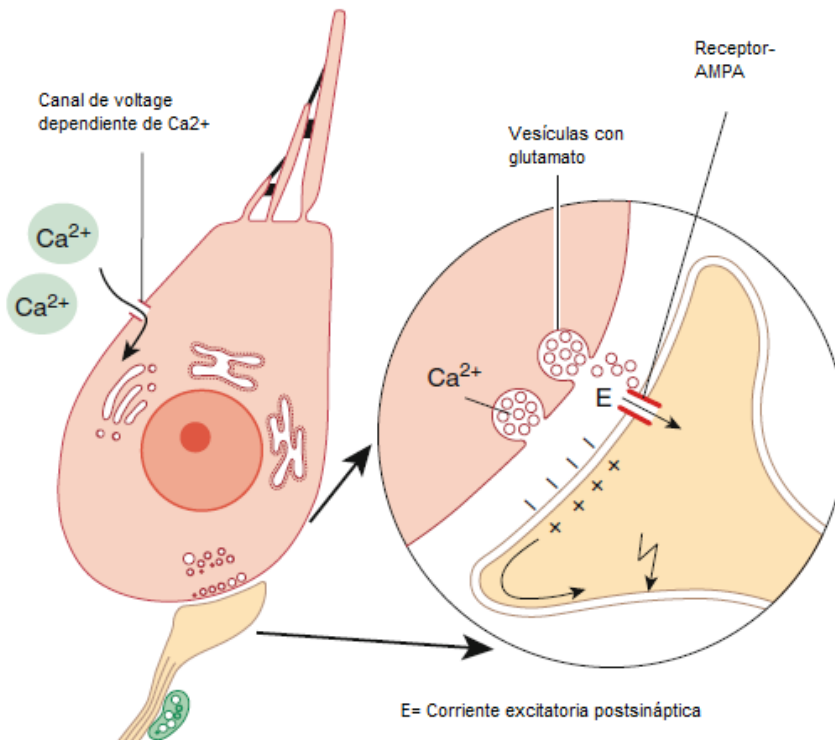


Figura 11. Primera sinapsis auditiva en las vesículas de glutamato del espacio presináptico.

## **Arquitectura del Ganglio Espiral**

Las células ganglionares espirales están alineadas en grupos dentro del modiollo óseo. La gran mayoría de las células ganglionares espirales son células de tipo I, que degeneran rápidamente después de la lesión de la dendrita. Por otro lado, alrededor del 5% de las células ganglionares espirales son células de tipo II, que son más pequeñas y no mielinizadas. Las dendritas de las células de tipo II forman haces espirales ubicados entre las células de Deiter, donde discurren apicalmente y luego inervan varias células ciliadas externas. Por lo general, una célula ganglionar espiral tipo II es más resistente a las lesiones.

Los axones de las células ganglionares espirales se proyectan al núcleo coclear. El núcleo coclear se subdivide en anteroventral, posteroventral y dorsal. Cada axón se divide para proyectar a varias porciones del núcleo coclear. Específicamente, cada neurona apical tipo I se proyecta hacia la porción medial del núcleo. Las neuronas de alta frecuencia de giro basal se proyectan hacia la porción lateral del núcleo coclear. De este modo, hasta cierto punto la frecuencia tonotópica permanece algo conservada en el núcleo coclear, debido a la disposición de la cóclea. Los implantes auditivos del tronco encefálico intentan utilizar esta organización para la estimulación específica de frecuencia del núcleo coclear.

## **Fisiología eferente**

Las fibras más eferentes que se proyectan hacia la cóclea se originan en el complejo olivar superior. Los haces olivococleares ipsilaterales y contralaterales conectan estas fibras a la cóclea. Específicamente, el haz contralateral transporta las fibras mayoritarias o eferentes a las células ciliadas externas del órgano de Corti. Las fibras eferentes predominantemente inervan las células ciliadas externas, la densidad de la fibra es mayor en el giro coclear basal. Hacia el ápice, las células ciliadas externas se inervan menos densamente. Como se mencionó anteriormente, se cree que las células ciliadas externas agudizan la onda viajera y sus propiedades contráctiles parecen ser responsables de la presencia y la utilidad diagnóstica de las emisiones otoacústicas (5).

## **HIPOACUSIA**

La hipoacusia se define como la pérdida total o parcial de la audición y se considera discapacitante, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) si el umbral está por encima de 40 dB (considerando el mejor oído) en el adulto y de 30 dB en niños(6). La hipoacusia puede afectar a todos los grupos de edad desde recién nacidos hasta ancianos, afectando el desarrollo del habla y el lenguaje en los niños y ocasionando problemas sociales y de incorporación a la vida laboral en los adultos. La hipoacusia puede surgir desde cualquier parte de la vía auditiva, incluido el canal auditivo externo (CAE), el mecanismo de transmisión del sonido, la cóclea, el nervio auditivo y las vías auditivas centrales.

### **Epidemiología**

La hipoacusia es el déficit sensorial más prevalente en los seres humanos (7). Según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente 360 millones de personas en todo el mundo o aproximadamente el 5% de la población mundial tienen una forma discapacitante de hipoacusia (8). Las formas congénitas afectan a 1 de cada 1000 recién nacidos vivos, pero también se ha informado con una prevalencia tan alta como es de 5 a 7 por cada 1000 recién nacidos vivos (9). Estos niños se enfrentan a desafíos en el desarrollo del lenguaje, el habla y la educación, la hipoacusia disminuye las oportunidades y representa una carga potencial para la sociedad. A los 60 años el 40-50% de los adultos tendrán hipoacusia como resultado de factores ambientales y/o genéticos específicos, lo que resulta en aislamiento social y disminución del ingreso familiar (10).

Aproximadamente el 3% de los niños y adolescentes caucásicos presentan hipoacusia y las estimaciones son más altas entre algunas minorías y en los niños con nivel socioeconómico bajo. La hipoacusia infantil se detecta frecuentemente cuando un padre informa que su bebé o niño no responde a su voz, cuando hay retraso en el habla o el lenguaje, o cuando el rendimiento escolar es deficiente. La

sospecha del cuidador por hipoacusia debe hacer que un médico investigue más a fondo el caso. Los factores de riesgo adicionales para la hipoacusia que pueden incitar la evaluación se muestran en el siguiente cuadro:

<b>Cuadro 1. Factores de riesgo de hipoacusia</b>
---

Sospecha del cuidador con respecto a baja audición.
---

Historia familiar de hipoacusia
---------------------------------

Estancia en la unidad de cuidados intensivos de más de 5 días
---

Infecciones in útero incluyendo:
----------------------------------

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Citomegalovirus</li><li>• Herpes</li><li>• Rubeola</li><li>• Sífilis</li><li>• Toxoplasmosis</li></ul> |
|--|

Exposición in útero a:
------------------------

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Diabetes materna</li><li>• Ingestión de alcohol o drogas por la madre</li></ul> |
|---|

Cuidado prenatal deficiente
-----------------------------

Gestas múltiples
------------------

Exposición neonatal a:
------------------------

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Oxigenación membranar extracorpórea</li><li>• Ventilación asistida</li><li>• Medicamentos ototóxicos (gentamicina, tobramicina)</li><li>• Diuréticos de asa</li><li>• Exsanguíno transfusión debido a hiperbilirrubinemia</li><li>• Aspiración de meconio</li></ul> |
|---|

Examen físico en el que se encuentre:
---------------------------------------

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Malformaciones de pabellón auricular</li><li>• Malformación del canal auditivo</li><li>• Apéndices preauriculares</li></ul> |
|---|

- Hoyuelos auriculares

Alteraciones en el hueso temporal

Evidencia de historia familiar de síndromes genéticos conocidos

La prevalencia de hipoacusia en adultos aumenta con la edad. La hipoacusia en adultos a menudo se presenta a través de quejas de los familiares al médico o al afectado, lo que ocasiona que se aíse y se retire de su vida social. Se estima que 28 millones de adultos en los Estados Unidos tienen algún grado de discapacidad auditiva (11)

## **Epidemiología de la hipoacusia en México**

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) y el Consejo Nacional de Población (CONAPO) realizaron en el 2014 la Encuesta Nacional de la Dinámica Demográfica (ENADID) 2014. La Encuesta recabó información de una muestra nacional conformada por 101,389 viviendas distribuidas en todo el territorio nacional. De acuerdo con los resultados de los 119.9 millones de personas que habitan el país, 6% (7.2 millones) tienen discapacidad, y de éstas el 33.5% (2.4 millones) corresponde a discapacidad auditiva.

Las causas de sordera en el país son: 28.9% por enfermedad, 49.6% por edad avanzada, 9.3% por nacimiento, 6.3% por accidente, 0.8% por violencia y 5.1% por otras causas.

Del total de personas con discapacidad auditiva, el 13.4% (320,000) tiene entre 0-14 años de edad, es decir, están en edad escolar. Sin embargo sólo el 14% de las personas con discapacidad auditiva, entre 3 y 29 años de edad, van a la escuela(12).



## **Clasificación de la hipoacusia**

Ésta puede clasificarse en forma inicial en conductiva, sensorial y mixta (13) ) y por su etiología en genética o no genética. Asimismo la genética puede ser sindrómica o no sindrómica, si es que existen o no manifestaciones clínicas extras a la hipoacusia (14)

## **Etiología no genética**

### **Alteraciones del desarrollo embrionario**

Las anomalías externas del oído a menudo se manifiestan como microtia, anotia o atresia del CAE, a menudo se asocian con otros síndromes craneofaciales, y generalmente dan lugar a una hipoacusia conductiva. Las anomalías del oído interno, por otro lado, se producen durante el desarrollo embrionario del hueso temporal, se pueden asociar con Síndromes genéticos o anomalías craneofaciales, y pueden resultar en hipoacusia conductiva, neurosensorial o mixta. Las malformaciones del oído interno se clasifican como: (1) Michel, (2) Mondini, (3) Scheibe y (4) Alexander. El grado de severidad de la hipoacusia varía ampliamente entre los pacientes.

### **Infecciones**

La otitis media aguda (OMA) y la otitis media con derrame (OMD) son las causas más frecuentes de hipoacusia conductiva en los niños. El líquido acumulado en el oído medio previene la vibración normal de la membrana timpánica produciendo la hipoacusia.

El colesteatoma es un crecimiento de epitelio descamado que se forma dentro de una bolsa de retracción como resultado de la disfunción de la trompa de Eustaquio, traumatismos en la membrana timpánica e inflamación. El

colesteatoma también puede ser congénito y expandirse hacia el oído medio y los espacios mastoideos ocasionando una hemorragia crónica, presentándose hipoacusia y destrucción local. Las secuelas del colesteatoma pueden incluir aparte de la hipoacusia, síntomas vestibulares, parálisis del nervio facial, absceso subperióstico, meningitis, sepsis, trombosis del seno lateral, absceso cerebral e incluso la muerte. La hipoacusia también puede deberse a infecciones maternas a las que un niño está expuesto durante el período perinatal. El daño a la cóclea en desarrollo puede ocurrir debido a hepatitis, rubéola, toxoplasmosis, VIH, sífilis y citomegalovirus. El citomegalovirus ha demostrado un aumento de 10 veces la prevalencia de infección congénita en niños con pérdida auditiva.

### **Exposición al ruido**

La exposición al ruido a lo largo del tiempo provoca hipoacusia por daño mecánico directo a las estructuras cocleares y la sobrecarga metabólica ocasionado por el óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno a las células pilosas cocleares. Las recomendaciones de la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional de los Estados Unidos hacen hincapié en protección auditiva cuando se alcanza una exposición promedio de 85 dB. El ruido de una cortadora de césped eléctrica es de 90 dB. Además, las explosiones cortas de ruido de 120 a 155 dB pueden causar dolor y causar graves daños neurosensoriales. La protección auditiva y evitar la exposición pueden prevenir la hipoacusia inducida por el ruido.

### **Otosclerosis**

La otosclerosis es la causa principal de pérdida de audición en adultos que no tienen antecedentes de derrame u otitis media. La pérdida progresiva de audición conductiva o mixta ocurre cuando la base del estribo se osifica con la ventana oval impidiendo su movimiento normal. La hipoacusia puede tratarse con auxiliares auditivos o estapedectomía.

## **Trauma**

La hipoacusia conductiva debida a un traumatismo a la membrana timpánica es frecuente como resultado de un cuerpo extraño dentro del oído. Las perforaciones pequeñas en la parte antero inferior de la membrana timpánica causan un déficit mínimo, pero las perforaciones más grandes en otras regiones pueden causar una pérdida auditiva significativa. La interrupción de la cadena osicular con hipoacusia conductiva o mixta siempre debe tenerse en consideración con lesiones penetrantes (11)

## **Etiología genética**

Se sospecha etiología genética en el 50-70% de los casos de hipoacusia congénita. De este porcentaje la hipoacusia sindrómica es la responsable de aproximadamente del 30% de los casos como parte de una constelación de múltiples hallazgos clínicos en otros órganos. Existen al menos 400 formas clínicamente distintas de sordera sindrómica en el catálogo OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). La hipoacusia no sindrómica constituye la mayor fracción de las hipoacusias, comprende el otro 70% de los casos y se pueden clasificar por el modo de herencia. La herencia autosómica recesiva (abreviado DFNB por sus siglas en inglés) es responsable del 80% de los casos, el 20% es autosómico dominante (DFNA) y las formas mitocondrial y ligada al X (DFN) corresponden al 1% de los casos. Hasta la fecha, más de 140 loci se han asociado con hipoacusia genética, con algunos loci que contienen más de un gen y otros que contienen genes actualmente no identificados (15). Los genes asociados con muchas formas de hipoacusia aún no se han descubierto.

En 1994, Guilford y cols. mapearon el primer locus para hipoacusia neurosensorial autosómica recesiva en el cromosoma 13q12-13 y lo denominó DFNB1, hipoacusia y sordera no sindrómica (Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM, base de datos en línea] # 220290). Tres años más tarde, el gen causante en ese loci fue identificado como *GJB2*. Las mutaciones en *GJB2* son causales en hasta el 50% de los pacientes con hipoacusia neurosensorial autosómica recesiva congénita de severa a profunda en varias poblaciones mundiales. Ningún otro gen constituye una proporción tan significativa de la hipoacusia genética. Desde el descubrimiento de la hipoacusia relacionada con *GJB2*, nuestra comprensión de la biología del oído y la hipoacusia ha avanzado tremendamente a través de la identificación de patologías genéticas que conducen a la hipoacusia en modelos animales y en humanos. Se han identificado mutaciones que afectan casi todas las partes del órgano de Corti: el citoesqueleto celular, incluyendo actinas (*ACTG1*) y genes asociados a actina (*TRIOBP* y *RDX*); miosinas (*MYO7A*,

*MYO15A*, *MYO6*, *MYO1A*, *MYH9*, *MYH14*); uniones célula-célula (*OTOA*, *CLDN14*); accesorios célula-célula (*CDH23*, *PCDH15*); intersecciones (*GJB2*, *GJB6*); transportadores (*SLC26A4*); y canales iónicos (*KCNQ4*) (Shearer, Eppsteiner, & Smith, 2016)(16)

## ***GJB2***

*GJB2* (DFNB1) (gap junction protein beta 2) es un gen localizado en el cromosoma 17p11.2 que está involucrado en la homeostasis coclear. El gen *GJB2* codifica para la proteína Conexina 26 que forma parte de la familia de las conexinas o de unión gap que se caracterizan por ser estructuras especializadas en las membranas plasmáticas de las células adherentes. Estas estructuras consisten en canales que unen una a otra célula facilitando la transferencia de iones y pequeñas moléculas entre ellas (17), está formado por 2 exones y tiene aproximadamente 23 dominios en el Homo Sapiens, es una proteína de unión de brecha.

El gen *GJB2* es responsable de la Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, y fue por primera vez descubierto en 1996 en familias consanguíneas de Pakistán (18). La mayoría de la hipoacusia no sindrómica (~50%) en niños está ocasionada por mutaciones en el gen *GJB2* (19). La mutación 35delG en el gen *GJB2* es responsable de la mayoría de la discapacidad auditiva. Al menos 100 mutaciones diferentes se han documentado en el gen *GJB2* que ocasionan hipoacusia en diferentes poblaciones.

Este gen es responsable de una fracción desproporcionada de hipoacusia autosómica recesiva, y sus mutaciones parecen ser fuertemente dependientes de la población. Las revisiones sistemáticas han reportado una prevalencia mundial del 17,3%, con los porcentajes más altos de hipoacusia asociados a *GJB2* observados en Europa (27,1%). Este hallazgo contrasta con las poblaciones subsaharianas de África que típicamente presentan una fracción considerablemente reducida (5,6%) de hipoacusia debido a mutaciones patogénicas en *GJB2* (20). A nivel mundial el alelo c.35delG, representa el 57% de

los alelos patogénicos en los pacientes con DFNB1. La mayoría de estos alelos (82.4%) se explican por la mutación homocigótica c.35delG y el resto (17.6%) se observa como heterocigoto compuesto con otros alelos patogénicos. El papel de los efectos fundadores en el origen y la distribución de varias mutaciones en *GJB2* está bien establecidos (7,21).

### ***GJB6***

El gen *GJB6* se localiza en el cromosoma 13q12, contiene 7 exones, codifica para la proteína Conexina 30 (Cx30) la cual forma parte de las proteínas de unión de brecha en la cóclea en el oído interno. Cx30 consiste en 261 aminoácidos, las mutaciones en este gen son también responsables de un elevado número de casos de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, pero también es responsable de casos de hipoacusia autosómica dominante en varias poblaciones. Las proteínas de unión de brecha Cx26 y Cx30 se expresan fuertemente en la cóclea en el oído interno y juegan un papel vital en el mantenimiento del ion potasio y en la homeostasis de la cóclea. La delección de 342 kb es considerada el tipo de mutación más frecuente en este gen, si se presenta de forma homocigota o en transposición con una mutación en *GJB2* recesiva también es causa de hipoacusia. Aproximadamente 20 variantes patogénicas con Del(GJB6-D13S1830) y Del(GJB6-D13S1854) se han identificado como causa de hipoacusia neurosensorial.

### ***GJB3***

El gen *GJB3* (DFNA2B) codifica para la proteína Conexina 31 (Cx31), se localiza en el cromosoma 1p34.3, se compone por 2 exones en el humano. Se involucra generalmente en la hipoacusia autosómica dominante y recesiva. La mutación en el gen *GJB3* fue por primera vez identificada en una familia China con hipoacusia autosómica dominante.

### **CLDN14**

*CLDN14* (DFNB29) es un gen que codifica para la proteína claudin-14. Este gen se localiza en el cromosoma 21q22.3 y contiene 7 exones en el Homo Sapiens. Pertenece a las proteínas de uniones estrechas, que normalmente muestra adhesión célula a célula en el endotelio y en las células epiteliales, forma sellos regulares alrededor de las células y sirve como barrera física para evitar que varios solutos y agua entren directamente a través del espacio celular. Las mutaciones en este gen ocasionan hipoacusia autosómica recesiva no sindrómica. *CLDN14* se expresa en la mayoría de las células de la cóclea, hígado y riñón donde ayuda en la formación de uniones estrechas

### **MYO7A**

*MYO7A* (DFNB2) es un gen localizado en el cromosoma 11q13.5 y consiste de 55 exones. Codifica para proteínas miosinas no convencionales (VIIA) que consiste en 2215 aminoácidos. Miosina VIIA se expresa generalmente en el epitelio de tejidos de la retina y del oído interno. Las células pilosas y los estereocilios del oído interno contienen principalmente la proteína Miosina VIIA. Cualquier variación en el gen *MYO7A* es responsable del 50% de los diferentes tipos de Síndrome de Usher. Mutaciones en el gen *MYO7A* también ocasionan hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva en humanos. Además, se han reportado heterocigotos compuestos o mutaciones homocigotas relacionadas con este gen en familias de Pakistán, Palestina, Turquía e Irán

### **MYO15A**

*MYO15A* (DFNB3) se localiza en el cromosoma 17p11.2 en humanos, consiste de 66 exones con 71,097 pb. *MYO15A* codifica para la proteína miosina XVA, consta de 3530 aminoácidos y 39.5 KDa. *MYO15A* juega un papel importante en la elongación y desarrollo de los estereocilios y en los filamentos de actina. La cohesión de los estereocilios es producida por la interacción de whirlina y el gen *MYO15A*. En el Homo Sapiens la mutación en el gen *MYO7A* fue por primera vez aislada en familias de Indonesia, donde cerca del 2% de la población padece de

hipoacusia. Al menos 43 mutaciones en este gen se han reportado que ocurren en el dominio motor. Este tipo de mutaciones es generalmente responsable de hipoacusia autosómica recesiva.

### ***SLC26A4***

*SLC26A4* (DFNB4) es un gen localizado en el cromosoma 7q31 tiene 23 exones en humanos; codifica para una proteína transmembrana la Pendrina cuya función principal es el transporte de aniones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{I}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ ) en las membranas celulares. La Pendrina se expresa abundantemente en el oído interno, tiroides y riñón. Mutaciones en el gen *SLC26A4* es responsable de la hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, también en el alargamiento del acueducto vestibular y el Síndrome de Pendred caracterizado por hipoacusia neurosensorial autosómica recesiva relacionada con alteraciones cocleares, ocasionado por mutaciones alélicas en este gen

### ***TMC1***

*TMC1* (DFNB12) es un gen localizado en el cromosoma 9q21.12, codifica para una proteína similar a un canal transmembrana, consta de 25 exones y de 300kb. *TMC1* se expresa en las células pilosas de la cóclea y juega un papel importante en la función de dichas células. Más de 35 mutaciones homocigotas en este gen han sido identificadas en 60 familias diferentes alrededor del mundo con hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva con un fenotipo caracterizado por hipoacusia prelingual de seria a extrema, La mutación frecuente es p.R34X, mutación sin sentido que se encuentra en población del Norte de África y de Asia.

### ***TMIE***

*TMIE* (DFNB6) es un gen transmembranal del oído interno, se encuentra en el cromosoma 3p21, contiene 4 exones, codifica para una proteína transmembrana de 154 aminoácidos y solo tiene un dominio transmembrana. Variantes en el gen *TMIE* es responsable de hipoacusia autosómica recesiva no sindrómica, encontrado frecuentemente en población de Pakistán. Mutaciones en el gen *TMIE*



ocasiona defectos de las células sensoriales del oído interno y problemas en los nervios auditivos

### ***OTOF***

*OTOF* (DFNB9) es un gen localizado en 2p23.1, consta de 48 exones codificantes y de 90 kb, codifica para la proteína otoferlina y se expresa generalmente en las células ciliadas de la cóclea y del cerebro. Mutaciones homocigotas en este gen son responsables de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, al menos 93 mutaciones se han identificado en este gen (14)

## **SECUENCIACIÓN DEL EXOMA COMPLETO**

La secuenciación completa del exoma (SEC) permite realizar un estudio completo de las regiones codificantes de un genoma para identificar cambios en las bases, y también se puede usar para identificar alteraciones en el número de copias. Debido a que se selecciona durante la construcción de la biblioteca ubicaciones genómicas específicas utilizando sondas prediseñadas, también se pueden evaluar objetivos de interés, como son sitios de empalme, regiones no traducidas (UTR), promotores e intrones. La secuenciación del exoma completo se ha adoptado ampliamente en la comunidad de investigación biomédica. Los esfuerzos pioneros tanto en la investigación como en la genética médica encabezaron en gran medida la aceptación generalizada de esta tecnología. Como resultado se han desarrollado numerosos paneles de secuenciación dirigidos, disponibles comercialmente, que proporcionan un enfoque más rentable para evaluar genes y mutaciones específicas. (22)

La secuenciación del exoma se dirige al 1 a 2% del genoma (22 000 genes) codificantes de proteínas (figura 12).

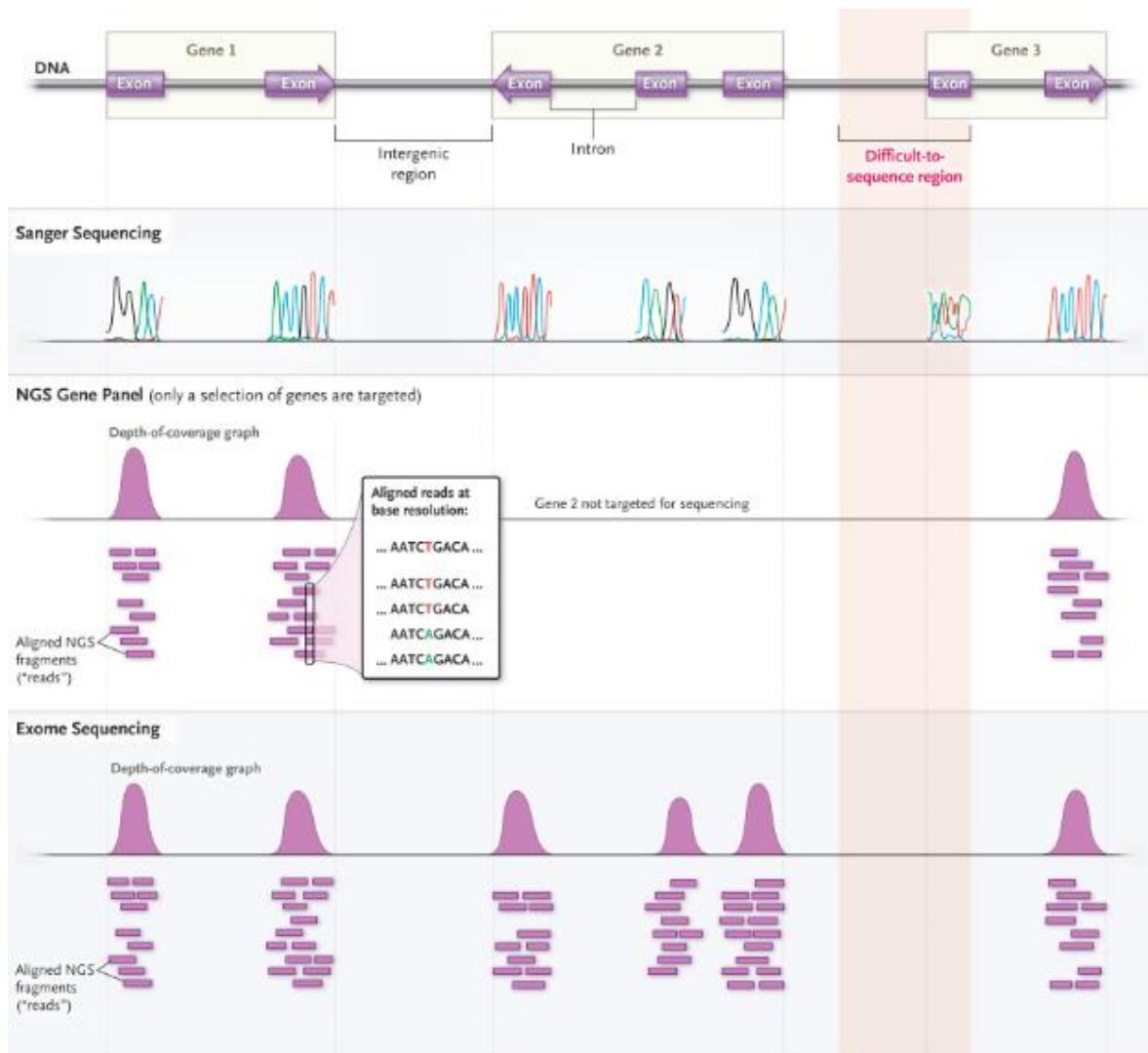


Figura 12. Tipos de pruebas de secuenciación de nueva generación (NGS).

El objetivo principal de cualquier prueba genética de diagnóstico es la identificación de variantes en la secuencia de ADN que puedan asociarse con los signos y síntomas que presentan el paciente. Otros resultados de la prueba pueden identificar posibles variantes de riesgo para la enfermedad genética que está ausente o no se ha diagnosticado en el momento de la prueba; estos resultados se conocen como hallazgos secundarios, incidentales o médicamente relevantes. Los pacientes con estas variantes de riesgo pueden beneficiarse de los esfuerzos de detección y manejo tempranos. Se han publicado pautas para el reporte clínico de las variantes identificadas (23)

## **Interpretación de variantes, recomendaciones del colegio americano de genética médica y genómica y de la asociación de Patología molecular.**

Una mutación se define como un cambio permanente en la secuencia de un nucleótido, mientras que un polimorfismo se define como una variante con una frecuencia de por lo menos en el 1% de la población general. Los términos “mutación” y “polimorfismo”, aunque han sido usados ampliamente ocasionan confusión por las incorrectas interpretaciones de patogenicidad y efectos benignos respectivamente. Por lo tanto, se recomienda que ambos términos sean reemplazados por los términos “variante” con las siguientes modificaciones:

- i. Patogénica
- ii. Probablemente patogénica
- iii. Significado incierto
- iv. Probablemente benigna
- v. Benigna

Aunque en estas modificaciones tal vez no clasifican todos los fenotipos humanos, comprenden un sistema de cinco categorías de clasificación para las variantes relevantes en enfermedades humanas.

### **Literatura y uso de bases de datos**

Un gran número de bases de datos contienen un número creciente de variantes que se descubren continuamente en el genoma humano. Cuando se clasifica y reporta una variante, se busca información en las bases de datos así como en la literatura pública. Las bases de datos de secuencias pueden también ser usadas para identificar apropiadamente secuencias de referencia. Las bases de datos pueden ser muy útiles para obtener información, pero deben de ser usadas con precaución.

Las bases de datos poblacionales (tabla 1) son útiles para obtener las frecuencias de variantes en poblaciones grandes. Con las bases de datos poblacionales no se debe de asumir que incluyen solo individuos sanos y se debe conocer que

contienen variantes patogénicas. Estas bases de datos poblacionales no contienen información extensa de los efectos funcionales de estas variantes u otros posibles fenotipos asociados. Cuando se utilizan bases de datos poblacionales, se debe de determinar si se utilizaron cohortes sanas o con enfermedad, y si es posible si se incluyó más de un individuo de una familia, así como también el rango de edad de los sujetos.

**Tabla 1. Bases de datos de secuencias poblacionales y enfermedad-específica.**

Bases de datos poblacionales	
Exome Aggregation Consortium <a href="http://exac.broadinstitute.org/">http://exac.broadinstitute.org/</a>	Bases de datos de variantes encontradas durante la secuenciación de exoma de 61,486 individuos no relacionados como parte de varios estudios de enfermedades específicas y estudios genéticos de poblaciones. Sujetos con enfermedades pediátricas, así como individuos relacionados fueron excluidos.
Exome Variant Server <a href="http://evs.gs.washington.edu/EVS">http://evs.gs.washington.edu/EVS</a>	Base de datos encontradas durante a secuenciación de exoma de grandes cohortes de individuos de ancestría europea y Afro Americana. Incluye datos de cobertura para informar ausencia de variación.
1000 Genomes Project <a href="http://browser.1000genomes.org">http://browser.1000genomes.org</a>	Base de datos de variantes encontradas durante la secuenciación de baja cobertura y alta cobertura de 26 poblaciones. Provee mayor diversidad comparando el servidor variante del exoma (Exome Variant Server) pero

	también contiene datos de baja calidad, y algunas cohortes contienen individuos relacionados.
dbSNP <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp</a>	Base de datos de variaciones genéticas cortas (frecuentemente $\leq 50$ pb) originadas de varias fuentes. Pueden carecer de detalles del origen del estudio y pueden contener variantes patogénicas.
dbVar <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar</a>	Base de datos de variación estructural (frecuentemente $>50$ pb ) originadas de varias fuentes.
<b>Bases de datos de enfermedad</b>	
ClinVar <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar</a>	Base de datos de afirmaciones sobre el significado clínico y la relación fenotípica de las variantes genéticas humanas.
OMIM <a href="http://www.omim.org">http://www.omim.org</a>	Base de datos de genes humanos y condiciones genéticas que también contiene una muestra representativa de variantes genéticas asociadas con enfermedad.
Base de datos de mutaciones en genes humanos <a href="http://www.hgmd.org">http://www.hgmd.org</a>	Base de datos de anotaciones de variantes publicadas en la literatura. Requiere suscripción para acceder a mucho de su contenido.
Locus/disease/ethnic/other-specific databases Human Genome Variation Society <a href="http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html">http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html</a> Base de datos de variantes de acceso	La sociedad de variación del genoma humano es un sitio desarrollado con una lista de miles de bases de datos que proveen anotaciones de las variantes con sus subtipos específicos.

abierto de Leiden <a href="http://www.lovd.nl">http://www.lovd.nl</a>	Un gran porcentaje de las bases de datos están construidas sobre la base de datos del sistema de acceso abierto de Leiden.
DECIPHER <a href="http://decipher.sanger.ac.uk">http://decipher.sanger.ac.uk</a>	Base de datos de citogenética molecular para clínicos e investigadores ligados a microarreglos genómicos con fenotipo usando el explorador del genoma ensamblado.
Bases de datos de secuencias NCBI Genome <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome</a>	Fuente de todas las secuencias de referencia del genoma humano completo.
RefSeqGene <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg</a> Locus Reference Genomic (LRG) <a href="http://www.lrg-sequence.org">http://www.lrg-sequence.org</a>	Recurso de secuencia de referencia de genes médicamente relevantes.
MitoMap <a href="http://www.mitomap.org/MITOMAP/">http://www.mitomap.org/MITOMAP/</a> HumanMitoSeq	Secuencia de referencia revisada de Cambridge del DNA mitocondrial humano.

### **Bases de datos de enfermedad**

Contienen principalmente variantes encontradas en pacientes enfermos y con variantes valoradas en enfermedad. Bases de datos gen-específicas y de enfermedad que usualmente contiene variantes que están clasificadas incorrectamente, incluyendo las que están publicadas de manera errónea en la literatura revisada por pares, debido a que muchas bases de datos no se desarrollan con evidencia primaria revisada. Cuando se utilizan bases de datos de enfermedad, es importante considerar que pacientes se evaluaron, como se describe abajo.

Cuando se utilizan bases de datos se debe:

- Determinar qué tan frecuentemente se actualizan las bases de datos, si la curación tiene mantenimiento, y que métodos fueron utilizados para la curación.
- Confirmar el uso de la nomenclatura HGVS y determinar la versión del genoma y el transcrito de referencia usado para nombrar las variantes.
- Determinar el grado de validación de los datos para el análisis, por ejemplo, la valoración de las variantes encontradas con NGS y aquellas validadas con secuenciación Sanger, además de la evaluación de la calidad métrica que se provee, los cuales muchas veces requieren publicaciones asociadas.
- Determinar la fuente y la independencia del listado de las observaciones.
- La evaluación de las variantes también incluye búsqueda de literatura médica y científica. La literatura que utiliza nomenclatura vieja y clasificaciones con base en una sola observación deben utilizarse con precaución.

### **Herramientas de predicción computacional (in silico)**

Existe una variedad de herramientas in silico, públicas y comerciales que tienen el propósito de interpretar variantes. Los algoritmos usados por cada herramienta pueden diferir, pero incluyen determinación del efecto de la variante en el nucleótido y a nivel de amino ácido, determinación del efecto de la variante en el transcrito primario y alternativo, otros elementos genómicos, así como su impacto en la proteína. Las dos categorías principales de estas herramientas incluyen aquellas que predicen si un cambio de un solo nucleótido es dañino para la función de la proteína o su estructura y aquellas que predicen si existe efecto en el corte y empalme (tabla 2).

El impacto del cambio de un solo nucleótido depende de criterios como son si se trata de aminoácidos o nucleótidos conservados evolutivamente, la localización y el contexto dentro de la secuencia de la proteína, y la consecuencia bioquímica de la sustitución del amino ácido. La medición de uno o de la combinación de estos



criterios se utiliza en varios de los algoritmos in silico como los que valoran el impacto del cambio de un nucleótido. En general la mayoría de los algoritmos de predicción para las variantes del cambio de un solo nucleótido tienen del 65-80% de precisión cuando se evalúan variantes que ocasionan enfermedad. La mayoría de las herramientas tienden a tener baja especificidad, ocasionando sobrepredicción de los cambios de un solo nucleótido como deletéreos y no son tan confiables para predecir efectos más leves de las variantes de un solo nucleótido. Las herramientas in silico que se utilizan frecuentemente en los laboratorios clínicos para la interpretación de las variantes de un solo nucleótido son PolyPhen2, SIFT y Mutation Taster.

Se han desarrollado varios programas computacionales para predecir el corte y empalme a nivel exónico o intrónico. En general las herramientas de predicción tienen alta sensibilidad (90-100%) y especificidad del 60-80% para predecir las alteraciones en el sitio de corte y empalme. Algunas de las herramientas in silico frecuentemente utilizadas se enlistan en la tabla 2.

**Tabla 2 Algoritmos de predicción in silico**

<b>Categoría</b>	<b>Nombre</b>	<b>Sitio web</b>	<b>Bases</b>
Predicción de los cambios de un solo nucleótido	ConSurf	<a href="http://consurftest.tau.ac.il">http://consurftest.tau.ac.il</a>	Conservación evolutiva
	FATHMM	<a href="http://fathmm.biocompute.org.uk">http://fathmm.biocompute.org.uk</a>	Conservación evolutiva
	MutationAssessor	<a href="http://mutationassessor.org">http://mutationassessor.org</a>	Conservación evolutiva
	PANTHER	<a href="http://www.pantherdb.org/tools/csnpscorm.jsp">http://www.pantherdb.org/tools/csnpscorm.jsp</a>	Conservación evolutiva
	PhD-SNP	<a href="http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html">http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html</a>	Conservación evolutiva
	SIFT	<a href="http://sift.jcvi.org">http://sift.jcvi.org</a>	Conservación evolutiva
	SNPs&GO	<a href="http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-andgo">http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-andgo</a>	Función y estructura proteica

## CRITERIOS PROPUESTOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE VARIANTES

Los siguientes criterios se utilizan para evaluar la evidencia de una variante observada en pacientes con sospecha de enfermedades hereditarias (principalmente mendelianas).

Se clasifican de la manera siguiente:

Una clasificación para las variantes patogénicas o probablemente patogénicas (tabla 3), y otra clasificación para las variantes benignas o probablemente benignas (tabla 4). Cada criterio patogénico se pondera como muy fuerte (PVS1 por sus siglas en inglés), fuerte (PS1-4); moderado (PM1-6), o de soporte (PP1-5). Y cada criterio benigno se pondera como único (BA1), fuerte (BS1-4), o de soporte (BP1-6).

La numeración dentro de cada categoría no transmite ninguna diferencia de peso y está meramente etiquetada para ayudar a referirse a los diferentes criterios. Para una variante dada, se seleccionan los criterios basados en la evidencia observada para dicha variante. Luego, los criterios se combinan de acuerdo con las reglas de puntuación de la Tabla 5 para elegir una clasificación del sistema de cinco niveles. Las reglas se aplican a todos los datos disponibles de una variante, ya sea que se recopilen del caso actual en investigación o de datos bien publicados que hayan sido previamente evaluados. Los datos de casos no publicados también se pueden obtener a través de recursos públicos (por ejemplo, ClinVar o bases de datos específicas de locus) y de una base de datos propia del laboratorio.

Para proporcionar flexibilidad crítica a la clasificación de variantes, algunos criterios enumerados con un peso se pueden mover a otro peso utilizando el juicio profesional, dependiendo de la evidencia recopilada.

Por ejemplo, la regla PM3 podría reclasificarse a fuerte si hubiera múltiples observaciones de detección de la variante en *trans* (en cromosomas opuestos) con otras variantes patógenas. Por el contrario, en situaciones en las cuales los datos no son fuertes, se debe considerar de bajo nivel. Si la variante no llena por completo los criterios usando cualquiera de estas clasificaciones (patogénica o benigna), o la evidencia para benigna y patogénica están en conflicto, la variante se clasifica como de significado incierto. Se debe de aplicar el juicio experto cuando se evalúa el cuerpo completo de la evidencia para tener en cuenta las diferencias en la fuerza de la evidencia para la variante.

### Variantes nulas PVS1

Ciertos tipos de variantes (p.e. sin sentido, desplazamiento del marco de lectura, canónicos  $\pm 1$  o 2 sitios de corte y empalme, codón de inicio, delección de un solo exón o multiexon) puede usualmente asumirse la alteración de la función del gen ocasionando una ausencia completa del producto génico por pérdida de la transcripción o decaimiento de un transcrito alterado.

**Tabla 3. Criterios para clasificar variantes patogénicas.**

Evidencia de patogenicidad	Categoría
Muy fuerte	<p>Variantes nulas PVS1 (sin sentido, desplazamiento del marco de lectura, canónico <math>\pm 1</math> o 2 sitios de corte y empalme, codón de inicio, delección de un solo exón o multiexonico) en un gen donde la pérdida de función es un mecanismo de enfermedad.</p> <p>Precaución:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Con los genes donde la pérdida de la función no es un mecanismo de enfermedad conocido (p.e. GFAP, MYH7)</li> <li>-En la interpretación de variantes con pérdida de función en el final del extremo 3' de un gen.</li> <li>-Con las variantes en sitios de corte y empalme que predicen</li> </ul>

	<p>perdida de exones, pero mantienen la proteína intacta</p> <p>-En la presencia de múltiples transcritos.</p>
Fuerte	<p>PS1 El mismo cambio de aminoácido que una variante patógena establecida previamente, independientemente del cambio de nucleótido.</p> <p>Ejemplo: Val →Leu ocasionado por cualquiera de las variantes G&gt;C o G&gt;T en el mismo codón</p> <p>Precaución con las variantes que afectan el corte y empalme en lugar de los aminoácidos o las proteínas.</p> <p>PS2 de novo (con maternidad y paternidad confirmadas) en un paciente con enfermedad y sin historia familiar.</p> <p>Nota: Confirmación de la paternidad solo si es insuficiente. Donación de óvulo, maternidad subrogada, errores en la transferencia de embriones.</p> <p>PS3 Estudios funcionales bien establecidos in vitro o in vivo de efecto dañino en el gen o producto génico.</p> <p>Nota: Los estudios funcionales que han sido validados y que se han demostrado que son reproducibles y robustos en un entorno de laboratorio de diagnóstico clínico se consideran los mejor establecidos.</p> <p>PS4 La prevalencia de una variante en individuos afectados incrementada significativamente comparada con la prevalencia en los controles.</p> <p>Nota1: Riesgo relativo u OR, como lo obtenido en estudios de casos y controles, que sea &gt;5.0 y un intervalo de confianza alrededor del estimado o del riesgo relativo o un OR que no incluya 1.0.</p> <p>Nota 2. En casos poco frecuentes donde los estudios de casos y</p>

	<p>controles no muestran significancia estadística, la observación de la variante en múltiples pacientes no relacionados con el mismo fenotipo y su ausencia en los controles, puede ser usado como evidencia moderada o de bajo nivel.</p>
Moderado	<p>PM1 localizada en un sitio caliente o crítico o en un dominio bien establecido como funcional (p.e. sitio activo de una enzima) sin variación benigna.</p> <p>PM2 Ausencia de los controles (o una frecuencia extremadamente baja en los recesivos) en el proyecto de secuenciación de exoma, el proyecto de los 1000 genomas o el Consorcio de Agregación del Exoma</p> <p>Precaución: datos poblacionales de las inserciones/deleciones pueden ser pobremente utilizados para la secuenciación de nueva generación.</p> <p>PM3 Para enfermedades recesivas, detectadas en <i>trans</i> con una variante patogénica.</p> <p>Nota: esto requiere examen de los padres (o de su descendencia) en determinada fase.</p> <p>PM4 Cambios en el tamaño de la proteína como resultado de una deleción/inserción en el marco de lectura en una región no repetida de variantes de paro.</p> <p>PM5 Cambios de un solo nucleótido en un aminoácido donde se ha visto antes diferentes cambios determinados como patogénicos.</p> <p>Ejemplo: Arg156His es patogénico; y usted observa Arg156Cys</p> <p>Precaución: con los cambios que afectan el corte y empalme, pero no al aminoácido o proteína.</p> <p>PM6 Considerada de novo, pero sin confirmación de paternidad y maternidad.</p>

De soporte	<p>PP1 Co-segregación con enfermedad en múltiples miembros afectados de una familia, de un gen conocido que causa enfermedad.</p> <p>Nota: puede ser usado como evidencia fuerte con incremento de los datos de segregación.</p> <p>PP2 Variante de un solo nucleótido en un gen que tiene una tasa baja de cambio de un solo nucleótido benigno y en el que las variantes de un solo nucleótido son un mecanismo frecuente de enfermedad.</p> <p>PP3 Múltiples líneas de evidencia computacional de soporte como efecto deletéreo en un gen o producto génico (conservación, evolución, impacto en el corte y empalme, etc.)</p> <p>Precaución: debido a que muchos de los algoritmos in silico utilizan la misma o similar base para sus predicciones, no se debe considerar cada algoritmo como un criterio independiente.</p> <p>PP3 puede ser utilizado solo una vez en la evaluación de una variante.</p> <p>PP4 Fenotipo de un paciente o historia familiar que es altamente específica para una enfermedad con etiología monogénica.</p> <p>PP5 Variante reportada recientemente como patogénica, pero la evidencia no está disponible para el laboratorio y poder desarrollar una evaluación independiente.</p>
------------	--

## CRITERIOS PARA CLASIFICAR VARIANTES BENIGNAS

Evidencia de impacto benigno	Categoría
Único	BA1 Frecuencia alélica >5% en el Proyecto de Secuenciación de Exoma, Proyecto de los 1000 genomas, o en el Consorcio de Agregación del Exoma.
Fuerte	<p>BS1 Frecuencia alélica más elevada que la esperada para la enfermedad.</p> <p>BS2 Observada en un adulto sano para una enfermedad recesiva (homocigoto), dominante (heterocigoto) o ligada al X (hemicigoto), con penetrancia completa a una edad temprana.</p> <p>BS3 Estudios funcionales in vitro o in vivo bien establecidos que muestran un efecto no dañino en la función de la proteína o en el corte y empalme.</p> <p>BS4 Ausencia de segregación en miembros afectados de la familia.</p> <p>Precaución: la presencia de fenocopias para fenotipos frecuentes (p.e. cáncer, epilepsia) pueden simular ausencia de segregación en individuos afectados. También, las familias pueden tener más de una variante patogénica contribuyendo a una enfermedad autosómica dominante, confundiendo aún más una aparente falta de segregación.</p>
De soporte	<p>BP1 Variante de cambio de un solo nucleótido en un gen para el cual las variantes truncas son conocidas que causan enfermedad.</p> <p>BP2 Variante en <i>trans</i> con una variante patogénica para un gen dominante o de penetrancia completa u observado en <i>cis</i> con una variante patogénica en cualquier patrón de herencia.</p> <p>BP3 En inserciones/deleciones dentro del marco de lectura en una región repetitiva sin función conocida.</p>

	<p>BP4 Múltiples líneas de evidencia computacional sugieren ausencia de impacto en el gen o en el producto génico (conservado evolutivamente, impacto en el corte y empalme, etc.).</p> <p>Precaución: debido a que muchos algoritmos in silico utilizan el mismo o similar bases en sus predicciones, cada algoritmo no se debe contar como un criterio independiente. BP4 puedes ser utilizado solo una vez en la valoración de una variante.</p> <p>BP5 Variante encontrada en un caso con una base molecular alternativa para la enfermedad.</p> <p>BP6 Recurso recientemente reportado como variante benigna, pero la evidencia no está disponible en el laboratorio para desarrollar una evaluación independiente.</p> <p>BP7 Una variante sinónima (silenciosa) para la cual los algoritmos de predicción de corte y empalme no predicen ningún impacto en la secuencia consenso. Y el nucleótido no está altamente conservado.</p>
--	--

Los criterios después son combinados de acuerdo a las reglas de la tabla 5 para elegir una clasificación del sistema de cinco niveles. Las reglas se aplican a todos los datos disponibles de una variante, ya sea que se recopilen del caso actual en investigación o de datos bien publicados que hayan sido previamente evaluados. Los datos de casos no publicados también se pueden obtener a través de recursos públicos (por ejemplo, ClinVar o bases de datos específicas de locus) y de una base de datos propia del laboratorio.

Para proporcionar flexibilidad crítica a la clasificación de variantes, algunos criterios enumerados como un peso se pueden mover a otro peso utilizando el juicio profesional, dependiendo de la evidencia recopilada.



Por ejemplo, la regla PM3 podría actualizarse a fuerte si hubiera múltiples observaciones de detección de la variante en *trans* (en cromosomas opuestos) con otras variantes patogénicas.

## REGLAS PARA COMBINAR CRITERIOS EN LA CLASIFICACIÓN DE VARIANTES

Patogénica	<p>(i) 1 Muy fuerte (PVS1) Y</p> <p>(a) <math>\geq 1</math> Fuerte (PS1–PS4) O</p> <p>(b) <math>\geq 2</math> Moderado (PM1–PM6) O</p> <p>(c) 1 Moderado (PM1–PM6) y 1 de soporte (PP1–PP5) O</p> <p>(d) <math>\geq 2</math> De soporte (PP1–PP5)</p> <p>(ii) <math>\geq 2</math> Fuerte (PS1–PS4) O</p> <p>(iii) 1 Fuerte (PS1–PS4) Y</p> <p>(a) <math>\geq 3</math> Moderado (PM1–PM6) O</p> <p>(b) 2 Moderado (PM1–PM6) Y <math>\geq 2</math> de soporte (PP1–PP5) O</p> <p>(c) 1 Moderado (PM1–PM6) Y <math>\geq 4</math> de soporte (PP1–PP5)</p>
Probablemente patogénica	<p>(i) 1 Muy fuerte (PVS1) Y 1 moderado (PM1–PM6) O</p> <p>(ii) 1 Fuerte (PS1–PS4) Y 1–2 moderado (PM1–PM6) O</p> <p>(iii) 1 Fuerte (PS1–PS4) Y <math>\geq 2</math> de soporte (PP1–PP5) O</p> <p>(iv) <math>\geq 3</math> Moderado (PM1–PM6) O</p> <p>(v) 2 Moderado (PM1–PM6) Y <math>\geq 2</math> de soporte (PP1–PP5) O</p> <p>(vi) 1 Moderado (PM1–PM6) Y <math>\geq 4</math> de soporte (PP1–PP5)</p>
Benigna	<p>(i) 1 Única (BA1) O</p> <p>(ii) <math>\geq 2</math> Fuertes (BS1–BS4)</p>
Probablemente benigna	<p>(i) 1 Fuerte (BS1–BS4) Y 1 de soporte (BP1–BP7) O</p> <p>(ii) <math>\geq 2</math> de soporte (BP1–BP7)</p>
Significado incierto	<p>(i) No cumple con los criterios mostrados arriba O</p> <p>(ii) Los criterios para benigno y patogénico son contradictorios.</p>

## SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN EN LA HIPOACUSIA

El advenimiento de la secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) ha abierto nuevas posibilidades tanto en relación con la detección de genes conocidos, como con la identificación de nuevos genes candidatos en la hipoacusia. Varios estudios recientes han evaluado el espectro mutacional en grandes cohortes multiétnicas; un estudio en particular evaluó 342 familias con mutaciones negativas en *GJB2* de Asia, África, Europa, América Latina y Oriente Medio. La tasa de diagnóstico fue del 15% (53/342) y para los diferentes grupos fue del 0% (0/7, Guatemala), 4% (4/91, África del Sur), 4% (4/90, Nigeria), 17% (9/53, Florida del Sur), 26% (10/38, Túnez), 26% (6/23, India), 42% (8/19, Turquía) y 57% (12/21 Irán). Las variantes causales fueron detectadas en el 7% (13/185) de las familias sencillas y en el 25% (40/157) de las familias múltiples. Y entre los genes se incluye a *MYO15A* (MIM 602666) (13 %; 7/53), *SLC26A4* (MIM 605646) (9 %; 5/53), *USH2A* (MIM 608400) (9 %; 5/53), *MYO7A* (MIM 276903) (8 %; 4/53), *TRIOBP* (MIM 609761) (6 %; 3/53), y *MYO6* (MIM 600970) (6 %; 3/53) (24). Esto no es inesperado porque en los últimos años se ha identificado un número creciente de genes asociados a hipoacusia mediante secuenciación de alto rendimiento en poblaciones consanguíneas de Irán, Pakistán, etcétera (25), por ejemplo en un estudio de Sloan-Heggen y cols. donde se les realizó NGS a 1119 pacientes con hipoacusia se encontró tasas de diagnóstico en caucásicos de 38%, asiáticos 63% y del medio este 72% y se encontró más baja en Afroamericanos con un 26% (7,26). Tales tasas de resolución basadas en la población se han replicado recientemente y casi siempre carecen de un gran grupo hispano cuando se incluye como en el estudio de Bademci y cols. donde se realizó secuenciación de exoma completo a 160 familias con hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva encontrado mutaciones causales en 90 familias (56%) y 54% de las mutaciones no habían reportadas previamente, pero cabe destacar el número de familias para cada nacionalidad 101 familias de Turquía, 54 de Irán, 2 para Ecuador, 1 de Puerto Rico y tan solo 2 para México y para este último país no se encontraron las mutaciones causales (27)

## **Estudios sobre hipoacusia realizados en pacientes mexicanos**

Se dispone de información limitada sobre las mutaciones de *GJB2* en pacientes mexicanos con hipoacusia; Arenas-Sordo y cols.(28) describieron a *GJB2* como causante de hipoacusia en el 10.6% de pacientes no relacionados en el centro de México, Hernández-Juárez y cols.(29) reportaron una prevalencia del 3,8% en los pacientes del norte de México y Loeza-Becerra y cols.(30) reportaron solo el 2.14% en pacientes del oeste y noreste. Es importante destacar que el bajo rendimiento diagnóstico atribuido a las mutaciones en *GJB2* deja abierta la posibilidad de otras alteraciones genéticas en un gran porcentaje de estos pacientes.

En el 2015 Martínez-Saucedo y cols., encontraron en dos familias mexicanas la presencia de dos trimutaciones en el gen *GJB2* por medio de secuenciación directa en todos los miembros de las familias y en 100 controles sanos, encontrando en la familia 1 la trimutación p.S19R/p.R32S/p.E47\*, mientras que los miembros afectados de la familia 2 muestran la trimutación p.F31I/p.W44\*/p.V84M, los padres de ambas familias fueron heterocigotos para las mutaciones con audición normal (31), en otro estudio realizado por la misma autora se encontró a los hijos afectados de una familia mexicana con Hipoacusia Neurosensorial no Síndromica utilizando secuenciación de exoma completo la mutación homocigota c.del35G en el gen *GJB2*, los padres fueron heterocigotos con audición normal (32).

## 2. Planteamiento del problema:

La Hipoacusia es un problema de salud pública mundial, en más del 50% de los casos la hipoacusia es de tipo congénita o prelingual y de origen genético con un patrón autosómico recesivo, es decir existe el 25% de riesgo por embarazo de tener un hijo afectado. Lo que se conoce acerca de los genes causales de la enfermedad es con base en la literatura mundial donde el gen *GJB2* es responsable de casi el 20% de las hipoacusias congénitas. El estudio de esta patología altamente discapacitante en México se encuentra rezagado, y en los estudios realizados hasta el momento el gen *GJB2* presenta tasas de diagnóstico bajas (3-11%) que no concuerdan con la tasa mundial, ya que mutaciones en cerca de otros 200 genes han sido asociados con diferentes formas de hipoacusia y depende del grupo étnico estudiado. En el de Arenas-sordo y cols también se estudiaron las 2 delecciones más frecuentes de *GJB6* y la mutación mitocondrial A1555G del gen *MTRNR1*. En ningún caso se encontraron presentes. Además del estudio realizado por Martínez y cols. ya mencionado previamente donde se encontró la trimutación en el gen *GJB2*, también poco frecuente en México.

Estudios actuales de secuenciación de nueva generación en poblaciones con hipoacusia alrededor del mundo tienen una tasa de diagnóstico de más del 40%, proporcionando información acerca de la heterogeneidad genética extrema, lo que sugiere que la mayoría de los genes de hipoacusia aún no se han descubierto. Se han identificado muchos genes nuevos en familias consanguíneas de Pakistán e Irán, mientras que la población mexicana necesita evaluar con mayor frecuencia a la hipoacusia con estas nuevas tecnologías.

Durante muchos años, la prueba de exclusión rutinaria de *GJB2* fue la única opción disponible para las pruebas genéticas moleculares en pacientes con hipoacusia. A menos que los síntomas clínicos adicionales sugiera genes específicos, la mayoría de los probandos sin mutaciones en *GJB2* permanece sin diagnóstico molecular, limitando el asesoramiento genético adecuado (24,33)

### **3. Justificación:**

En el estudio de los pacientes mexicanos con hipoacusia se necesita utilizar la técnica molecular de secuenciación de exoma completo para disminuir el conocimiento parcial de la genética molecular en esta población. Asimismo, no han sido descritos genes nuevos de hipoacusia en pacientes mexicanos. La identificación de nuevos genes aportará tanto a la investigación básica como a la clínica, ya que se podrá otorgar un adecuado asesoramiento genético a los pacientes afectados, dando más certidumbre sobre los riesgos para su descendencia, con el objetivo último de explorar el desarrollo de nuevas terapias, además de comenzar a dar pautas para la realización de paneles moleculares donde se estudien a los genes más frecuentes disminuyendo el costo del diagnóstico genético, lo que a su vez mejorará el cuidado de los pacientes con hipoacusia (33,34).

Además, el conocimiento del espectro de mutaciones en México, puede permitir a los médicos tomar decisiones basadas en la evidencia, proporcionando así una mejor y más rentable atención al paciente. Por ejemplo, informes anteriores han encontrado una asociación entre pacientes con mutaciones en los genes *GJB2* y *SLC26A4* con un mejor resultado en el tratamiento de la hipoacusia con el implante coclear (35).

Una característica común entre los estudios recientes con NGS es que la tasa de casos resueltos (con mutaciones en genes de hipoacusia conocidos) depende en gran medida de la población por lo que en México falta realizar este tipo de estudios para condicionar el manejo de esta patología a las características propias de nuestra población.

#### **4. Pregunta de investigación:**

¿Qué variantes genéticas se encontrarán mediante secuenciación de exoma completo en un grupo de casos familiares mexicanos con hipoacusia neurosensorial?

#### **5. Objetivo general:**

Identificar variantes genéticas que pudieran ser la causa de hipoacusia neurosensorial mediante la realización de secuenciación de exoma completo a un grupo de casos familiares con hipoacusia de probable etiología genética.

#### **6. Objetivos específicos:**

- Realizar la secuenciación Sanger de *GJB2* en los probandos y de resultar positivos realizar el análisis de segregación en la familia.
- Identificar las variantes obtenidas mediante NGS ya reportadas causantes de Hipoacusia con base en los criterios propuestos de la ACMG con ayuda de las bases de datos:
  - Exome Aggregation Consortium
  - GenomAD
  - Deafness Variation Database (DVD)
  - Human Gene Mutation Database
  - ClinVar
  - OMIM
- Utilizar algoritmos de predicción in silico que predicen el impacto de las variantes encontradas
  - SIFT
  - MutationTaster
  - PolyPhen-2
  - VarSome
- A las variantes identificadas se les realizará análisis de segregación (diseño de primers y secuenciación Sanger) a toda la familia para confirmar o descartar patogenicidad.

## **7. Material y métodos:**

### **7.1. Tipo de estudio:**

Se realizará un estudio descriptivo, transversal y analítico

### **7.2. Descripción del universo de trabajo:**

Pacientes de Genética del INR con hipoacusia neurosensorial. Anualmente se reclutan alrededor de 50 nuevos casos, de los cuales aproximadamente entre el 10 y el 15% son casos familiares

### **7.3. Criterios de inclusión:**

- Pacientes con Hipoacusia Neurosensorial bilateral de severa a profunda con al menos un familiar afectado.
- De cualquier sexo, edad o edad de inicio de la hipoacusia
- Que cuente con al menos dos audiometrías
- Que cuente con tomografía computada de oídos

### **7.4. Criterios de exclusión:**

- Cualquier otro tipo de Hipoacusia en el que se sospeche etiología no genética (infecciosa, traumática, ototoxicidad, etc.)
- Que no cuenten con al menos tres generaciones nacidas en México

### **7.5. Tamaño de muestra:**

Se utilizó la fórmula para calcular el tamaño de muestra en estudios descriptivos para cuando la variable principal es de tipo cualitativo y la población es finita:

$$n = \frac{N Z^2 pq}{d^2 (N - 1) + Z^2 pq}$$

Obteniendo un resultado de 21 pacientes, pero debido a que el proyecto no contó con financiamiento, solo se analizaron 10 casos familiares, con ayuda del Dr. Haaf del laboratorio Biozentrum de la Universidad de Wurzburg

### **7.6. Variables:**

Independientes: variantes génicas

Dependientes: Hipoacusia, inicio, tipos de hipoacusia, lateralidad

Posibles confusores: infecciones perinatales y traumas que condicionen hipoacusia, que se pretenden controlar con un adecuado interrogatorio.

Hipoacusia sindrómica que se controla al realizar una correcta exploración física.



## **7.7. Descripción de los procedimientos:**

### **7.7.1 Recolección de las muestras:**

Previo consentimiento informado y una adecuada caracterización clínica de los pacientes se les realizó toma de muestra de sangre periférica (probando, padres y el segundo afectado).

### **7.7.2. Extracción de DNA:**

Se realizó la extracción de DNA mediante la técnica salina

### **7.7.3. Secuenciación Sanger de *GJB2*:**

Se realizó la PCR y secuenciación automatizada del gen *GJB2* para determinar la presencia o no de variantes patogénicas en estado homocigoto o heterocigoto en los casos índice. En caso de encontrar una variante patogénica se realizó el análisis de segregación en la familia completa (Anexo 1).

### **7.7.4. Secuenciación de exoma completo y análisis bioinformático:**

El protocolo se realizó en el Biozentrum de la Universidad de Wurzburg, Alemania.

El enriquecimiento del exoma dirigido se realizó con el Kit TruSeq Rapid Exome, (Illumina, anexo 2) mediante la hibridación de todos los exones y las secuencias intrónicas que los flanquean. Posteriormente se utilizó el Kit NextSeq Reactivo v2 con el secuenciador NextSeq 500 (Illumina). Por experimento, se permite la secuenciación de 12 individuos con lecturas “paired-end” de 2x76 pb.

En la Universidad de Wurzburg se estableció el análisis del exoma completo mediante módulos específicos para hipoacusia incluyendo la integración de la copia local de la Deafness Variation Database (DVD), que actualmente comprende más de 7000 variantes patogénicas o probablemente patogénicas (21). Adicionalmente han realizado base de datos de pacientes con descendencia alemana y del medio este con una amplia diversidad de enfermedades genéticas. Los datos clínicos de estos pacientes han

permitido establecer que su audición es normal, haciendo el uso de su exoma apropiado como un filtro.

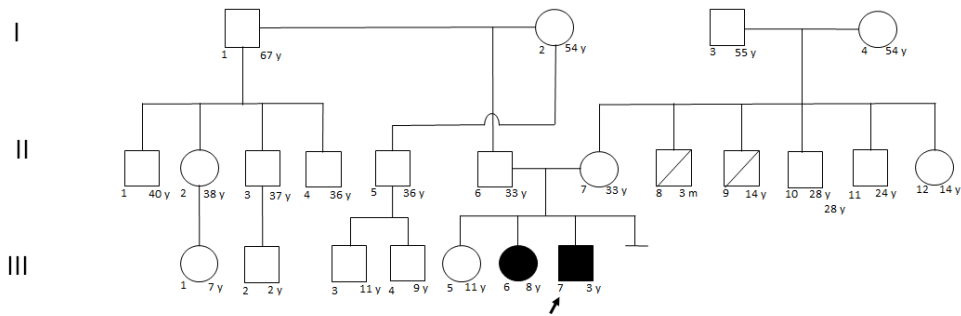
Las variantes identificadas se analizaron utilizando el software GenSearch NGS y Alamut. La predicción in silico del impacto de las variantes se realizó con los algoritmos SIFT, MutationTaster y PolyPhen 2. Se utilizó el genoma de referencia humano NCBI GRCh37p10. Se utilizaron como condiciones del filtrado las que tuvieran una frecuencia mayor al 20% y una Frecuencia de Alelo Menor (MAF) <1%. Todas las variantes se analizaron para heterocigosidad, homocigosidad y heterocigoto compuesto.

Esta metodología no permite una evaluación fiable de las variantes en las áreas con secuencias muy repetitivas, así como de grandes duplicaciones/deleciones. No se evalúan la presencia de variantes en mosaico de bajo grado o en otros tejidos, en regiones reguladoras del gen y reordenamientos cromosómicos.

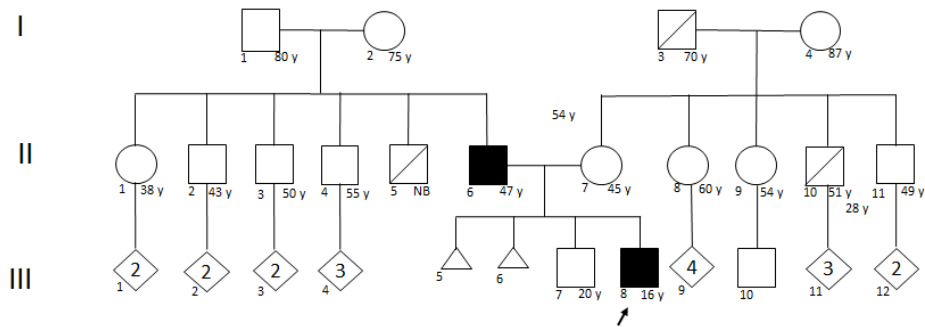
## RESULTADOS

Se analizaron 10 casos familiares con hipoacusia neurosensorial de probable etiología genética, todos los casos tenían por lo menos un familiar afectado, como se observa en los árboles genealógicos:

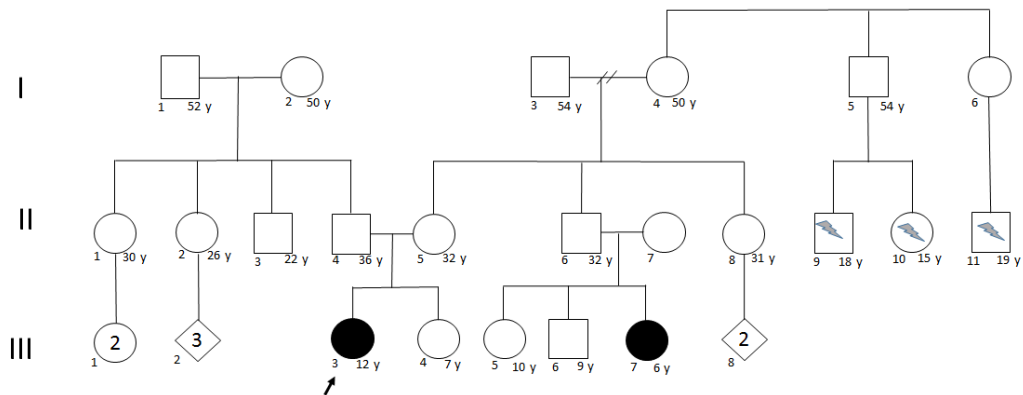
Familia 1



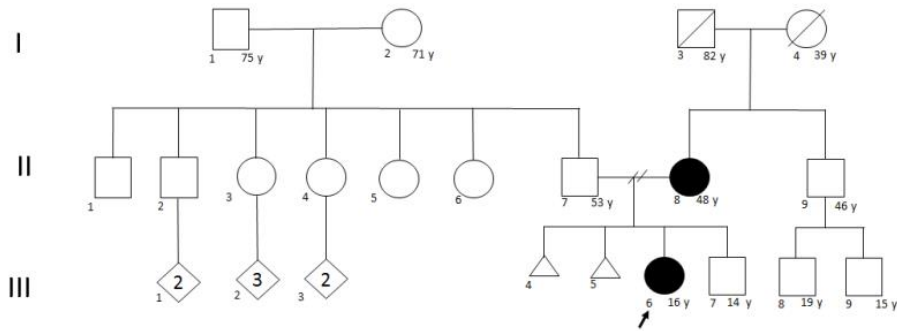
Familia 2



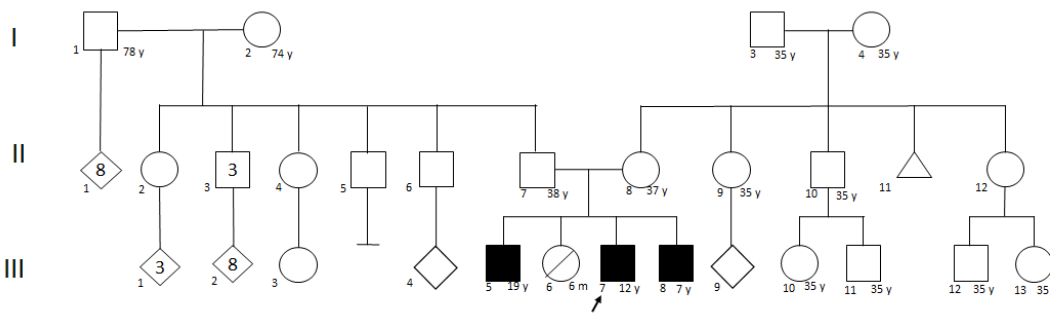
Familia 3



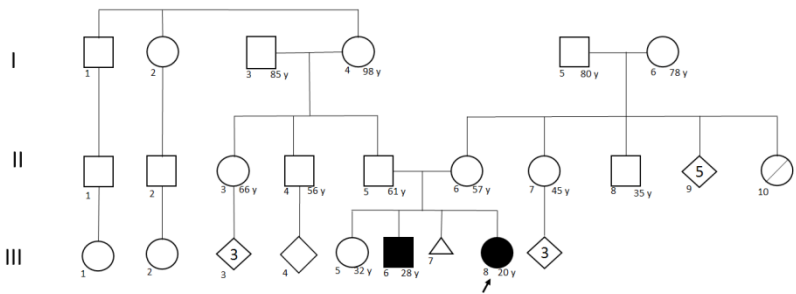
### Familia 4



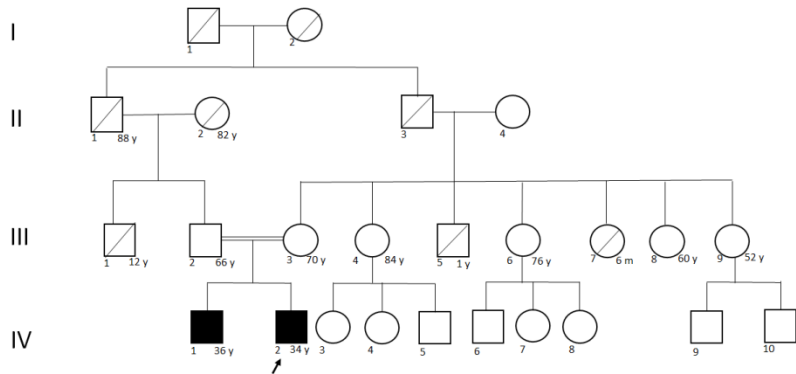
### Familia 5



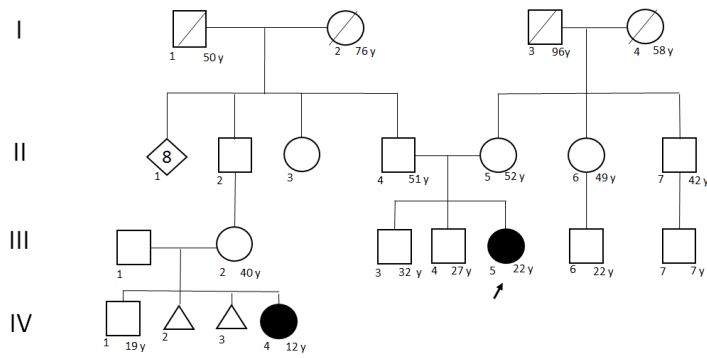
### Familia 6



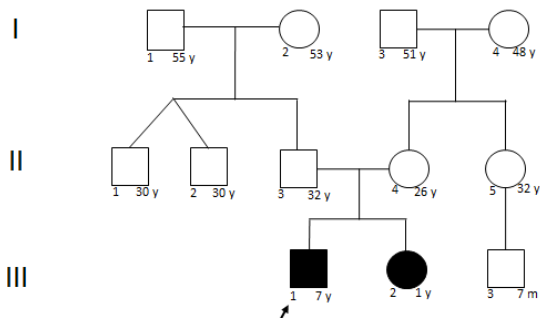
### Familia 7



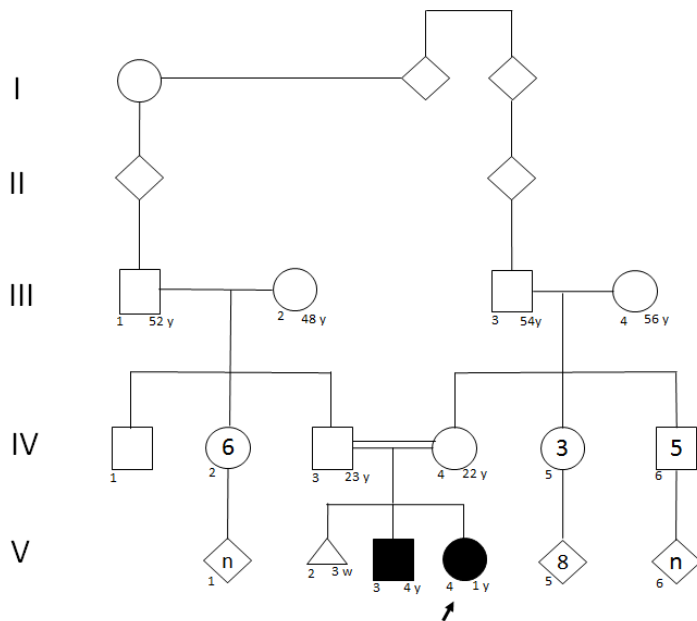
### Familia 8



### Familia 9



### Familia 10



Todos los probandos son originarios del centro de México, excepto el probando de la familia número 9 el cual es originario del Norte de México (Reynosa Tamaulipas). La edad de los pacientes se encuentra en el rango de 1 hasta 34 años, todos presentan hipoacusia neurosensorial, 8 casos son de presentación congénita, 2 casos de presentación poslingual. La severidad de la hipoacusia se encontró de moderada a profunda, siendo la profunda la más frecuente. Sólo en el caso HL-212 integrante de la familia 5 la hipoacusia es progresiva. El tono de frecuencia de la hipoacusia se encuentra en el rango de medio a alto, siendo el tono de frecuencia alta el que predomina. Dos probandos HL-138 y HL-392 presentan características dismórficas que no pueden ser atribuibles a síndromes conocidos.

El probando HL-138 integrante de la familia número 3 presenta además de la hipoacusia, déficit intelectual y dismorfias craneofaciales, como es cráneo braqui-plagiocéfalo, microsomnia hemifacial derecha, fisuras palpebrales ligeramente inclinadas hacia arriba, aparente telecanto, úvula pequeña, hiperlordosis lumbar, dedos de las manos con cojinetes e hipotrofia hipotenar bilateral, ligera limitación a la dorsiflexión de pie derecho, cuenta con resonancia de encéfalo donde se reporta gliosis inespecíficas de la sustancia blanca subcortical. Ventriculomegalia selectiva de los recesos temporales.

El probando HL-392 integrante de la familia número 10 presenta microsomnia hemifacial derecha y parálisis izquierda del VI par craneal

El probando HL-321 de 34 años integrante de la familia 7 presenta déficit intelectual, marcha atáxica y pies cavos.

Cuadro 2. Caracterización clínica de los probandos.

Familia	Probando	Edad	Tipo de hipoacusia	Edad de inicio	Severidad	Progresión	Tono de frecuencia	Sindrómico
<b>1. TC</b>	HL-85 (III.7)	3 años	NS	Congénita	Severa	No	Alto	No
<b>2. MM</b>	HL-96 (III.8)	16 años	NS	Congénita	Severa	No	Alto	No
<b>3. SC</b>	HL-138 (III.3)	6 años	NS	Congénita	OD: profunda, OI: moderada	No	Alto	Características dismórficas
<b>4. DD</b>	HL-174 (III.6)	16 años	NS	Congénita	Moderada	No	Medio	No
<b>5. VC</b>	HL-212 (III.7)	12 años	NS	Poslingual	OD: severa, OI: moderada	Si	Derecho: media, izquierdo: alto	No
<b>6. VH</b>	HL-272 (III.8)	20 años	NS	Poslingual	OD: severa, OI: moderada	No	Medio	No

<b>7. ZZ</b>	HL-321 (III.2)	34 años	NS	Congénita	Profunda	No	Alto	Déficit intelectual
<b>8. RH</b>	HL-69 (III.5)	22 años	NS	Congénita	OD: severa, OI: profunda	No	Alto	No
<b>9. DPA</b>	HL-367 (III.1)	7 años	NS	Congénita	Profunda	No	Alto	No
<b>10. GC</b>	HL-392 (V.4)	1 año	NS	Congénita	Profunda	No	Alto	Características dismórficas

NS= neurosensorial, OD= oído derecho, OI=oído izquierdo



**Resultados de la Secuenciación Sanger del gen *GJB2* en todos los probandos.**

Variantes encontradas:

Gen	Posición	Cromosoma	Exón	Tipo	Cigosidad
<i>GJB2</i>	c.79G>A	13	2	De sentido equivocado p.(Val27Ile)	Heterocigoto

Esta variante fue encontrada en cuatro probandos (familias número 1,3, 4 y 6), variante benigna frecuentemente encontrada en población mexicana.

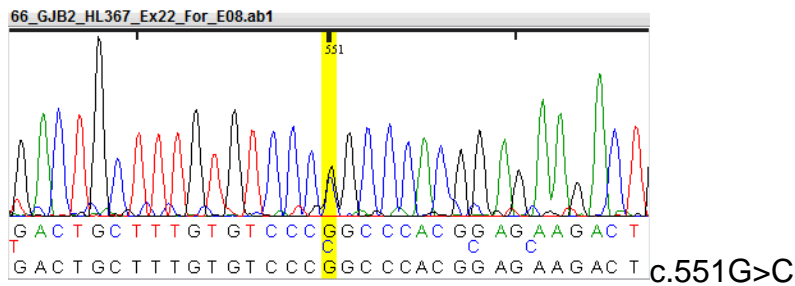
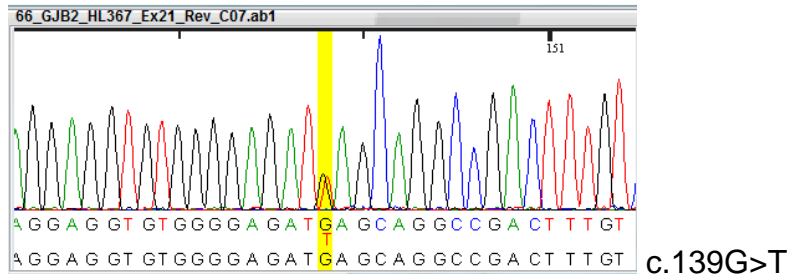
Gen	Posición	Cromosoma	Exón	Tipo	Cigosidad
<i>GJB2</i>	c.-22-12C>T	13	2	Substitución	Heterocigoto

Esta variante fue encontrada en el probando de la familia 7, las herramientas de predicción la consideran una variante benigna.

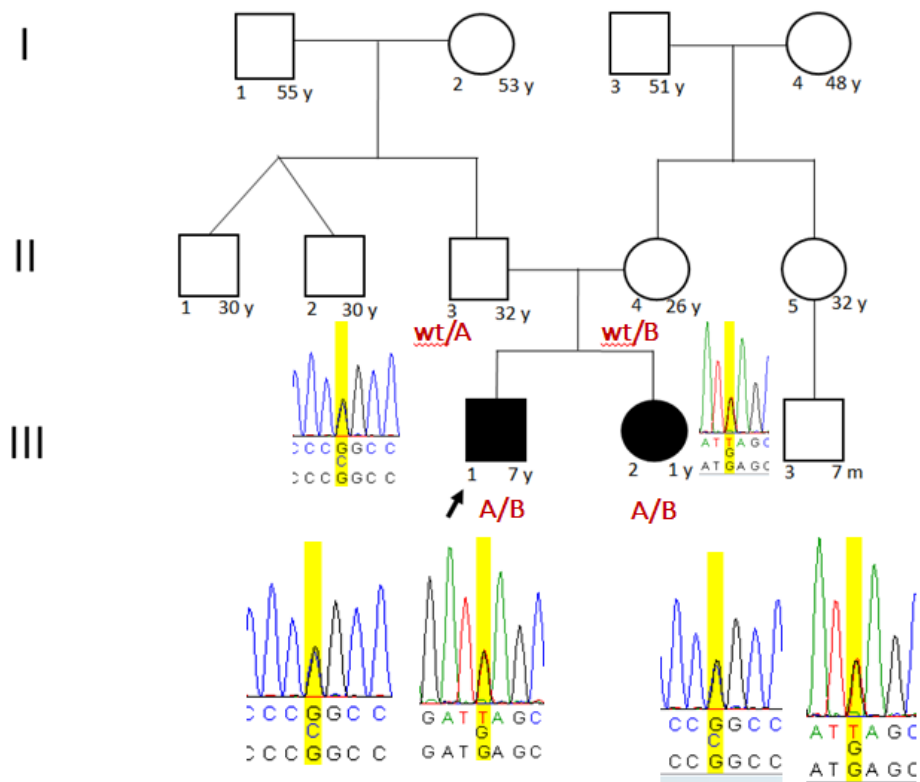
Gen	Posición	Cromosoma	Exón	Tipo	Cigosidad
<i>GJB2</i>	c.139G>T	13	2	Sin sentido p.(Glu47*)	Heterocigoto compuesto
	c.551G>C		2	De sentido equivocado p.(Arg184Pro)	

Estas dos variantes fueron encontradas en el probando de la familia número 9, las herramientas de predicción la consideran patogénica, además de que se encuentran reportadas en ClinVar.

Electroferogramas que muestran las variantes (c. [551G>C];[139G>T) en el gen *GJB2* encontradas en el probando HL-367 (familia 9)



Se realizó el análisis de segregación en el resto de la familia:



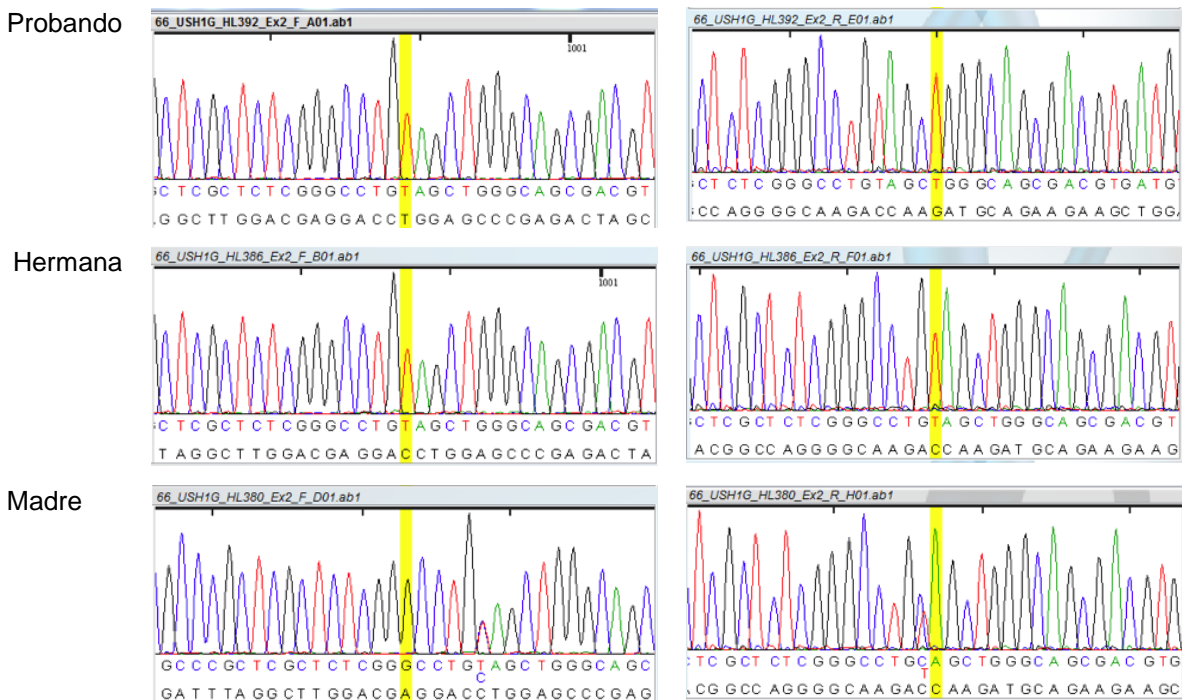
Confirmando que el individuo III.2 hermana del probando presenta las mismas variantes patogénicas que el hermano (c. [551G>C];[139G>T) , y la madre es portadora de la variante c.139G>T y el padre de la variante c.551G>C, por lo que se concluye que se trata de Hipoacusia autosómica recesiva tipo 1A (DFNB1A).

Al resto de los probandos se les realizó secuenciación de exoma completo.

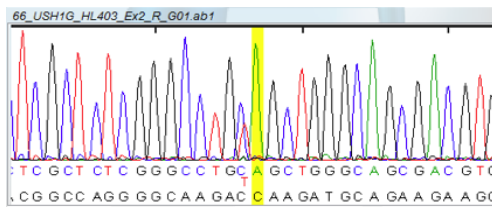
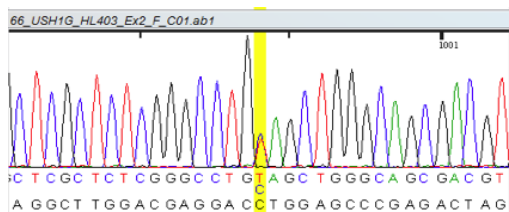
## Resultados de la secuenciación de exoma completo

Se encontró en el probando HL-392 integrante de la familia número 10, una variante patogénica de acuerdo a ClinVar, en el gen *USH1G* c.742C>T, p.(Gln248\*) en estado homocigoto, para lo cual se realizó el análisis de segregación de la familia y se confirmó en el probando y en su hermana la presencia de dicha variante, así como el estado de portador de ambos padres, lo que permite determinar que se trata de Síndrome de Usher tipo 1 G, enfermedad autosómica recesiva asociada con hipoacusia y retinitis pigmentosa. El síndrome es clínica y genéticamente heterogéneo, Bashir y cols. 2010 reportaron 4 miembros afectados de una familia pakistaní con Síndrome de Usher tipo 1G; los pacientes tenían una forma atípica de la enfermedad, con hipoacusia de moderada a severa, función vestibular normal y ausencia de problemas visuales. Aunque la funduscopía mostro síntomas leves de retinitis pigmentosa y disco óptico pálido en los pacientes a las edades de 13, 15 y 22 años de edad.

Electroferogramas de la familia número 10:



Padre

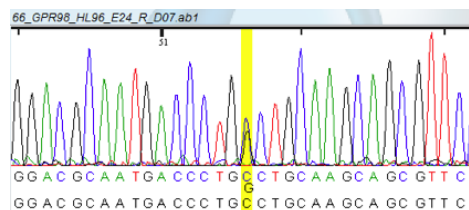
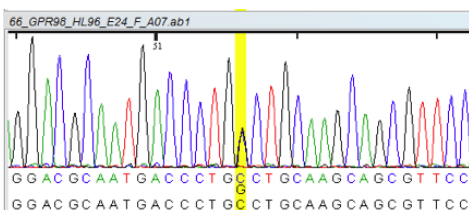


En el probando HL-96 (familia número 2) se encontraron las variantes que confirmadas con Sanger se trata de Síndrome de Usher tipo 2C: enfermedad autosómica recesiva genéticamente heterogénea caracterizada por hipoacusia al nacimiento y desarrollo posterior de retinitis pigmentosa progresiva (RP), esta es la causa más frecuente de hipoacusia y ceguera en adultos y afecta del 3-6% de niños que nacen con hipoacusia.

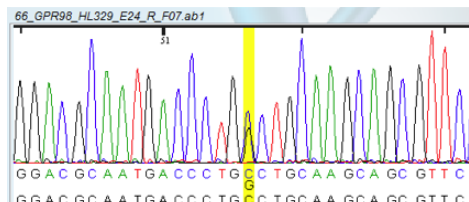
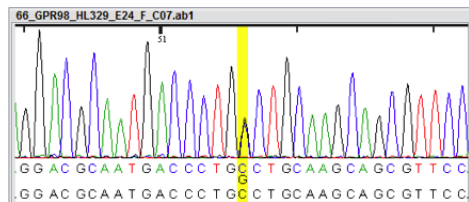
Gen	Posición	Cromosoma	Exón	Tipo	Cigalidad
<b>GPR98</b>	c.5167C>G	13	2	p.(Pro1723Ala)	Heterocigoto
<b>GPR98</b>	c.14939T>C		2	p.(Val4980Ala))	compuesto

Variante c.5167C>G en el gen *GPR98*:

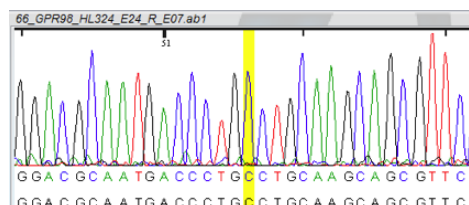
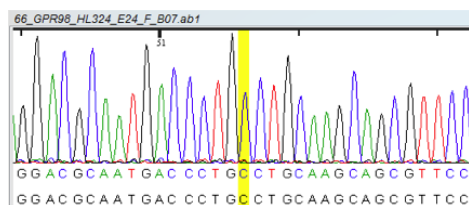
Probando



Padre

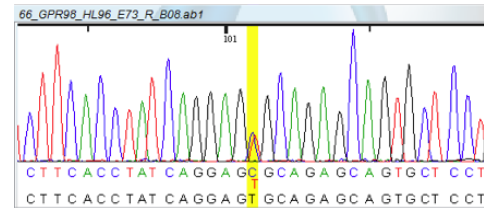
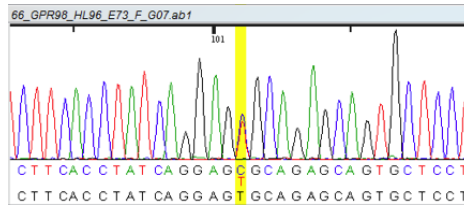


Madre

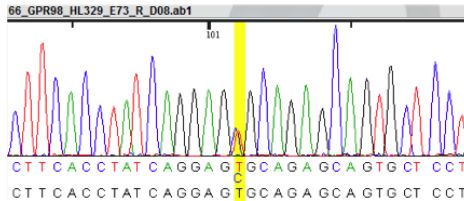


Variante c.14939T>C en el gen *GPR98*:

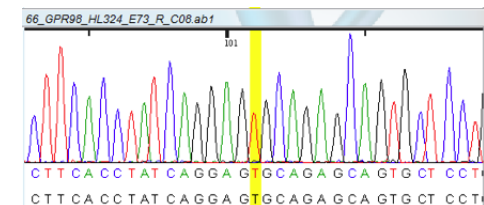
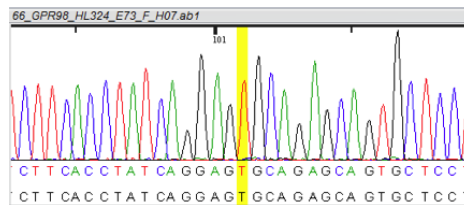
Probando



Padre



Madre

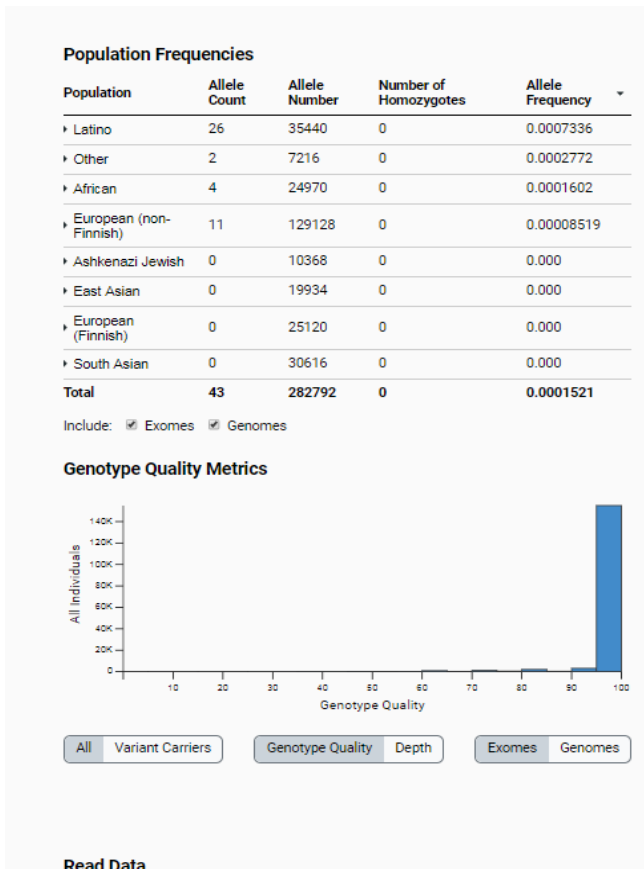


En el probando HL-212 se encontró la variante c.5317G>A en el gen *TNC*, la cual está registrada en ClinVar (Oct-2018): RCV000083259.2. Afecta a un nucleótido débilmente conservado y a un aminoácido moderadamente conservado (considerando 12 especies)

Se considera patogénica: hipoacusia autosómica dominante 56, las herramientas de predicción la evalúan como deletérea:

Gen	Posición	Cromosoma	Exón	Tipo	Cigosidad
<i>TNC</i>	g.117803295C>T	9	19	De sentido equivocado c.5317G>A	Heterocigoto

## Frecuencias poblacionales en GenomAD



**NM\_002160:p.Val1773Met**  
TNC  
NM\_002160:c.5317G>A

**INFORMATION**

Variante Locus	EXON19
PubMed ID	23936043 <sup>id</sup>
dbSNP ID	rs137933052 <sup>id</sup>

**CALL**

Variation	chr9:117803295:C>T
Pathogenicity	Pathogenic
Phenotype	Hearing loss, non-syndromic

**Interpretation**

*IN SILICO* COMPUTATIONAL

SIFT	Polyphen-2	LRT	MutationTaster	PhyloP	GERP++
Damaging	Possibly Damaging	Neutral	Polymorphism	Non-conserved	Conserved
0.097;0.092;0.087;0.026;0.027	0.782;0.128	0.469997	1	0.071	1.05

**VARIANT FREQUENCIES**

Hover or click a population to see its full name.

**OtoSCOPE™**

Unseen (0.000)	Unseen (0.000)	Unseen (0.000)	Unseen (0.000)	Unseen (0.000)	Unseen (0.000)	Unseen (0.000)
AJ	CO	JP	US	ES	TR	ALL

**Exome Variant Server**

1/6800 (0.000)	Unseen (0.000)	1/13005 (0.000)			
EA	AA	ALL			

**1000 Genomes**

Unseen (0.000)	Unseen (0.000)	1/714 (0.001)	Unseen (0.000)	Unseen (0.000)	1/5007 (0.000)
AFR	EUR	AMR	EAS	SAS	ALL

**ExAC**

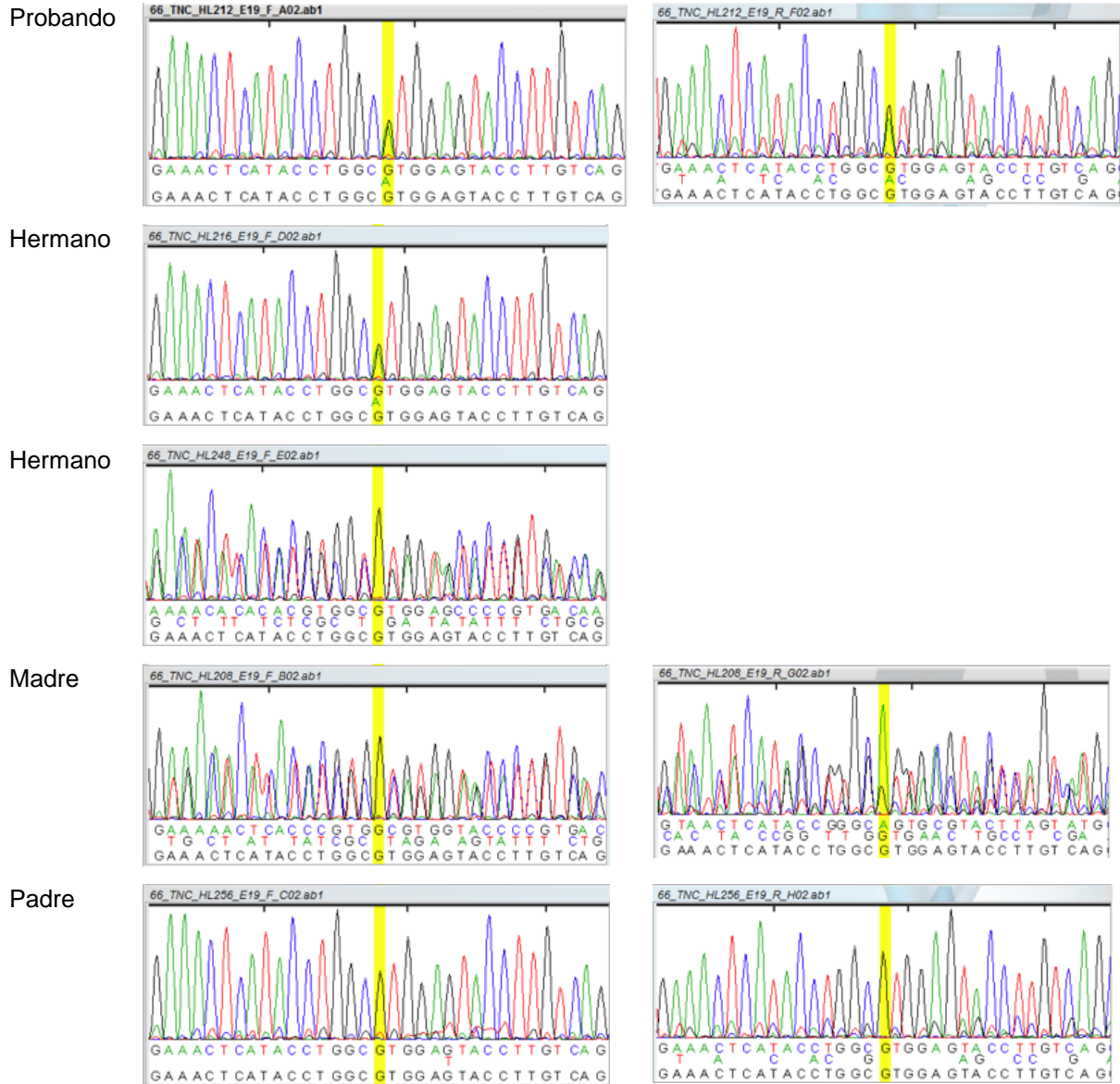
2/10405 (0.000)	5/11573 (0.000)	Unseen (0.000)	3/6888 (0.000)	Unseen (0.000)	Unseen (0.000)	Unseen (0.000)
AFR	AMR	FIN	NFE	EAS	SAS	OTH

10/121304

chr9:117803295:G>T Unknown significance

Esta variante es patogénica de acuerdo a la Deafness Variation Database

## Análisis de segregación en la familia mediante secuenciación Sanger.





En el probando HL321, integrante de la familia número 7 se encontró la variante:

Gen	Posición	Cromosoma	Intrón	Tipo	Cigalidad
<b>HK1</b>	<b>g.71075772T&gt;A</b>	10	1	Substitución en el sitio de splicing <b>p.?</b>	Homocigoto

Esta variante es una substitución en el sitio de corte y empalme, que está localizada en el sitio donador del corte y empalme en el intrón 1. La consecuencia de este cambio no se puede predecir, pero una delección del exon1 es muy probable.

Las herramientas de predicción la valoran como deletérea:

Variante nula (dentro de  $\pm 2$  sitios de corte y empalme canónicos) afectando al gen *HK1*.

En GenomAD hay un heterocigoto reportado y 0 homocigotos.

Fenotipos asociados con el gen *HK1* en OMIM:

## HEXOKINASE 1; HK1

*HGNC Approved Gene Symbol: HK1*

*Cytogenetic location: 10q22.1 Genomic coordinates (GRCh38): 10:69,269,990-69,401,881 (from NCBI)*

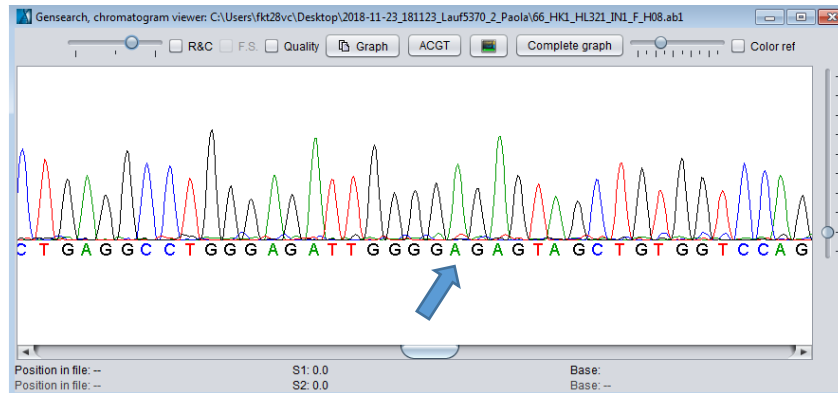
### Gene-Phenotype Relationships

[View clinical synopses as a table](#)

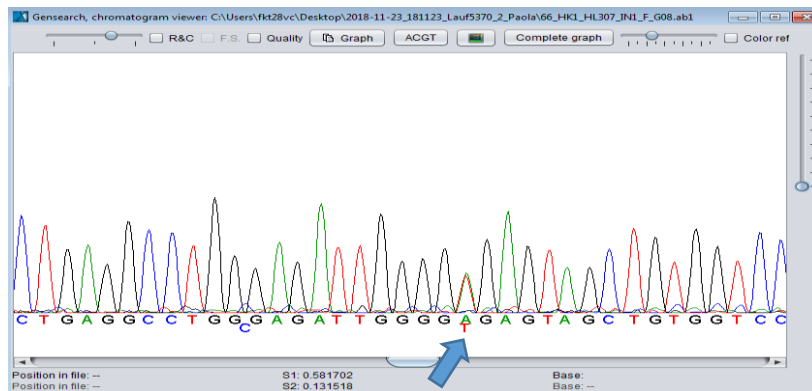
Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
10q22.1	Hemolytic anemia due to hexokinase deficiency	235700	AR	93
	Neuropathy, hereditary motor and sensory, Russe type	605285	AR	93
	Retinitis pigmentosa 79	617460	AD	93

Análisis de segregación de la familia número 7, el probando es homocigoto para la variante mientras que el resto de la familia son heterocigotos.

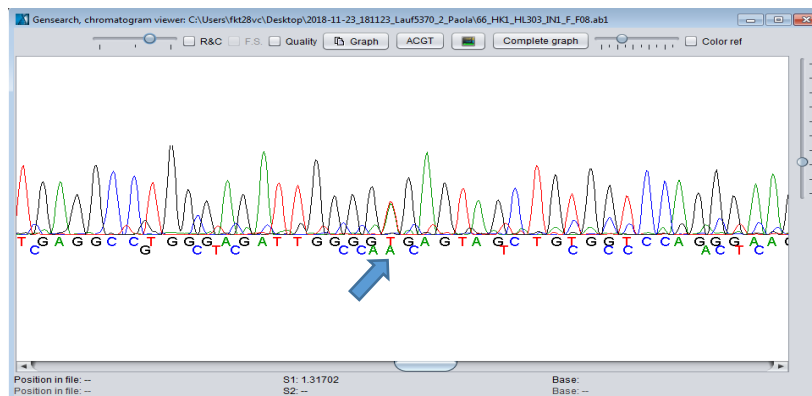
Probando



Hermano



Madre



Padre



En el probando HL-321, integrante de la familia número 3 se identificó la variante:

Gen	Posición	Cromosoma	Exón	Tipo	Cigosidad
<b>LRP5</b>	<b>c.442C&gt;T</b>	11	2	Substitución sin sentido <b>p.(Gln148*)</b>	Heterocigoto

Afecta al receptor relacionado con la lipoproteína de baja densidad número 5

GenomAD reporta 2 heterocigotos y 0 homocigotos.

Las herramientas de predicción consideran la variante como deletérea, se encuentra entre dos sitios calientes relacionados con mutación, uno con riesgo para masa ósea elevada y otro con Vitreoretinopatía exudativa tipo 4, como se muestra en la siguiente figura:



c.420 c.430 c.440 c.450 c.460 c.470  
 CATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGACCAGCCGAGGGCCATCGCCTTG  
 S R K V L F W Q D L D Q P R A I A L

15640 |68115650 |68115660 |68115670 |68115680 |68115690  
 CATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGACCAGCCGAGGGCCATCGCCTTG  
 ATAGGGCCCTCCACGAGAAGACCGTCTTGGAACTGGTCGGCTCCCGGTAGCGGAAC

GT+ T A T C T S C G C C T A A G T T C  
 CATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGACCAGCCGAGGGCCATCGCCTTG  
 S R K V L F W Q D L D Q P R A I A L

CATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGACCAGCCGAGGGCCATCGCCTTG  
 GTAC T I C C GC C TA G A C  
 T G I

S R K V L F W Q D L D Q P R A I A L  
 Exon 2 → F M ←

Vitreoretinopatía exudativa tipo 4

Riesgo de masa ósea elevada

CATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGACCAGCCGAGGGCCATCGCCTTG  
 S R K V L F W Q D L D Q P R A I A L

c.420 c.430 c.440 c.450 c.460 c.470  
 CATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGACCAGCCGAGGGCCATCGCCTTG  
 S R K V L F W Q D L D Q P R A I A L

CATCCCGGAAGGTGCTCTTCTGGCAGGACCTTGACCAGCCGAGGGCCATCGCCTTG  
 T A A C C

S R K V L F W Q D L D Q P R A I A L

S R K V L F W Q D L D Q P R A I A L  
 S R K V L F W Q D L D Q P R A I A L  
 S R K V L F W Q D L D Q P R A I A L  
 S R K V L F W Q D L D Q P R A I A L  
 S R K V L F W Q D L D Q P R A I A L

Dicha variante está relacionada con Osteopetrosis Autosómica Dominante tipo 1, como lo muestra OMIM:

# 607634

## OSTEOPETROSIS, AUTOSOMAL DOMINANT 1; OPTA1

*Alternative titles; symbols*

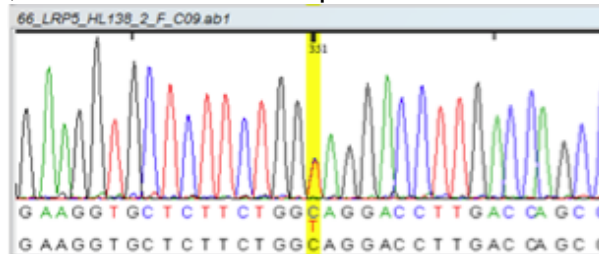
OSTEOPETROSIS, AUTOSOMAL DOMINANT, TYPE I

### Phenotype-Gene Relationships

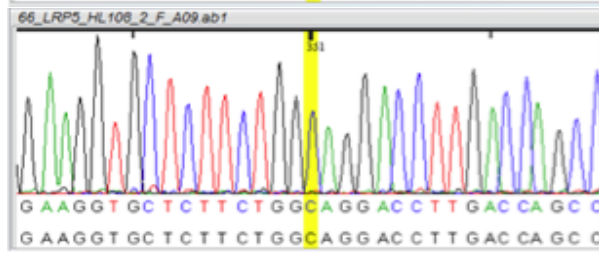
Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key	Gene/Locus	Gene/Locus MIM number
11q13.2	Osteopetrosis, autosomal dominant 1	607634	AD	3	LRP5	603506

Análisis de la secuenciación Sanger, donde se observa al probando y a su madre como heterocigotos, el resto de la familia presentan el alelo silvestre:

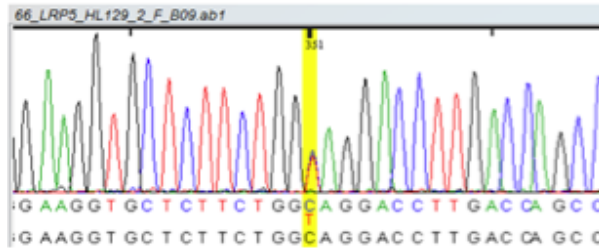
Probando



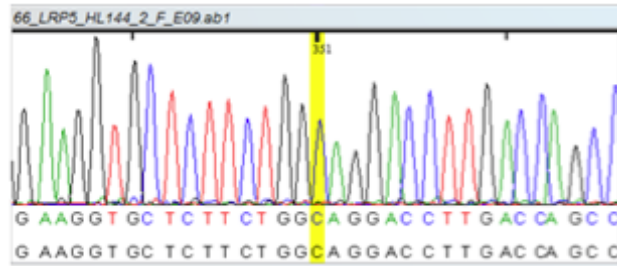
Padre



Madre



Prima



Madre de la prima

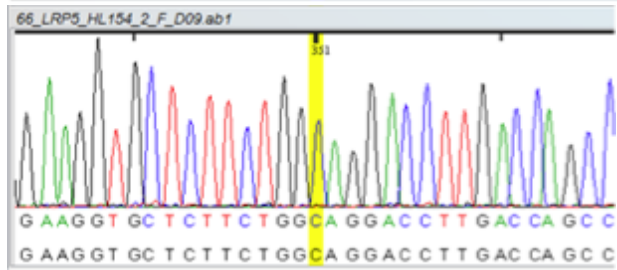


Tabla 2. Resumen de las variantes identificadas en los probandos mediante NGS

Familia	Probando	Genealogía	Parentesco	Gen	Variante	Proteína	Cigosidad	Patología relacionada
2	HL-96	III.8	Probando	<i>GPR98</i>	c.5167C>G	p.(Pro1723Ala)	Heterocigoto compuesto	Síndrome de Usher tipo 2C
				<i>GPR98</i>	c.14939T>C	p.(Val4980Ala)		Síndrome de Usher tipo 2C
3	HL-138	III.3	Probando	<i>LRP5</i>	c.442C>T	p.(Gln148*)	Heterocigoto	Osteopetrosis autosómica dominante 1
5	HL-212	III.7	Probando	<i>TNC</i>	c.5317G>A	p.(Val1773Met)	Heterocigoto	Hipoacusia autosómica dominante 56
7	HL-321	III.2	Probando	<i>HK1</i>	c.60+2T>A	p.?	Homocigoto	Neuropatía hereditaria motora y sensitiva (Tipo Russe)
10	HL-392	V.4	Probando	<i>USH1G</i>	c.742C>T	p.(Gln248*)	Homocigoto	Síndrome de Usher tipo 1G

## DISCUSIÓN

La hipoacusia neurosensorial (SNHL por sus siglas en inglés) es el deterioro sensorial más frecuente en seres humanos. La secuenciación de nueva generación (NGS) se ha convertido en el estándar para el diagnóstico etiológico de la SNHL de inicio temprano. En dos familias se encontró diagnóstico genético inesperado de Síndrome de Usher, el cual tiene una relevancia clínica importante ya que estos pacientes necesitarán un seguimiento cercano en caso de que se desarrollen características sindrómicas, ya en estudios previos de otras poblaciones donde se analizó SNHL aparentemente no sindrómica se habían reportado casos de Síndrome de Usher detectados mediante NGS (36), cabe destacar que en nuestra población esto se sospechaba pero no existe algún precedente de dicha asociación teniendo como punto de partida la hipoacusia neurosensorial, que en el caso de Síndrome de Usher (principal causa genética de sordera asociada con ceguera) es de máxima utilidad el diagnóstico genético ya que el progreso en la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que intervienen en el funcionamiento del oído interno ha ayudado a desarrollar terapia génica que consiste en la sustitución local de genes alterados endógenos, la cual ya se encuentra en pruebas en modelos murinos de síndrome de Usher, con resultados alentadores (37).

La hipoacusia genética es altamente heterogénea, especialmente la no sindrómica (38), encontramos una variante en el gen *LRP5*, el cual codifica para un receptor de lipoproteínas de baja densidad transmembrana que se une e internaliza los ligandos en el proceso de endocitosis mediada por receptores. Esta proteína juega un papel clave en la homeostasis esquelética y muchas enfermedades relacionadas con la densidad ósea son causadas por mutaciones en este gen. Las mutaciones en este gen también causan vitreorretinopatía exudativa familiar (RefSeq, mayo de 2014), la variante heterocigota c.442C>T está relacionada con Osteopetrosis autosómica dominante tipo 1 que de acuerdo a Van Hul y cols. (39) la Osteopetrosis tipo 1 autosómica dominante se caracteriza por la osteosclerosis generalizada más pronunciada en la bóveda craneal. Los pacientes a menudo son



asintomáticos, pero algunos sufren dolor e hipoacusia. Parece ser el único tipo de osteopetrosis que no se asocia con un aumento en la tasa de fracturas. Esta variante ya ha sido previamente reportada en población mexicana en estado homocigoto y está relacionada con Síndrome de Pseudoglioma-Osteopetrosis (40), el cual es un fenotipo mucho más agresivo (los pacientes presentan microftalmia y síntomas neurológicos) que si se presentara la variante en estado heterocigoto como en la paciente que se presenta en este estudio.

Otra variante encontrada relacionada también con un síndrome con hipoacusia, se encuentra en el gen *HK1*, que codifica para una hexocinasa. Las hexocinasas fosforilan la glucosa para producir glucosa-6-fosfato, el primer paso en la mayoría de las vías del metabolismo de la glucosa. Este gen codifica una forma ubicua de hexocinasa que se localiza en la membrana externa de las mitocondrias. Las mutaciones en este gen se han asociado con anemia hemolítica debido a deficiencia de hexocinasa, además de otros fenotipos relacionados con otras de sus isoformas que pueden ser tejido-específicas (RefSeq, abril de 2016). El paciente presenta la variante c.60+2T>A que muy probablemente ocasiona la delección del exón 1 de esta enzima, lo cual aunado a la sintomatología del paciente (pies cavos y marcha atáxica), hace sospechar fuertemente en el diagnóstico de Neuropatía hereditaria motora y sensitiva, tipo Russe que se presenta en estado homocigoto OMIM # 605285, sabemos de antemano que dentro del espectro de Charcot Marie Tooth, se reporta la hipoacusia en algunos de sus subtipos, pero en el tipo Russe no se encuentra reportada además de que el segundo hermano afectado con hipoacusia es heterocigoto para la variante por lo que faltó determinar si esta variante en estado homocigoto en el probando es la causante de la hipoacusia, ya que se necesitan estudios funcionales para determinar causalidad, ayudaría enormemente también la secuenciación del exoma del segundo hermano afectado y de los padres para descartar muchas variantes relacionadas específicamente con hipoacusia. Esto último no pudo realizarse como parte de este proyecto, por la falta de presupuesto para cubrir el

costo de la secuenciación del exoma de otros miembros de la familia que facilitaría el análisis de las variantes (41).

La única variante de hipoacusia no sindrómica que se encontró fue c.5317G>A que afecta al gen *TNC*, este gen codifica una proteína de matriz extracelular con una distribución tisular restringida espacial y temporalmente. Esta proteína es homohexamérica con subunidades unidas por disulfuro y contiene múltiples dominios tipo EGF y fibronectina tipo III. Está implicada en la guía de las neuronas migratorias, así como en los axones durante el desarrollo, la plasticidad sináptica y la regeneración neuronal. Esta variante se presentó en estado heterocigoto y está reportada como claramente patogénica de acuerdo a ClinVar y DVD como causante de la Hipoacusia Autosómica Dominante 56, pero en el análisis de segregación mediante la Secuenciación Sanger se encontró que el probando, uno de los hermanos afectados y la madre son heterocigotos, mientras que el tercer hermano afectado con el mismo fenotipo y el padre presentan el alelo silvestre; la presencia de la variante en la madre (la cual no se encuentra afectada) y la ausencia de la variante en el tercer hermano afectado (ya que presenta el mismo tipo de hipoacusia), aunado al hallazgo de 43 individuos heterocigotos sanos en GenomAD, nos hace concluir que esta variante no es la causante de la hipoacusia, por lo que se necesita continuar con el estudio de esta familia que presenta una genealogía altamente sugestiva de una hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, ya que presenta tres hijos afectados con el mismo fenotipo y dos padres sanos, en esta familia también sería útil la secuenciación del exoma del resto de la familia para lograr la identificación mediante estudios de homocigosidad incluso de genes candidatos(42).

La desventaja principal del presente estudio es la ausencia de la determinación de genes candidatos, ya que las variantes encontradas afectan a genes conocidos de enfermedad que están relacionados directa o indirectamente con hipoacusia, no se realizó la determinación de genes candidatos debido a la falta de tiempo y la ausencia de presupuesto para este proyecto; la secuenciación del exoma de los 9

probandos fue financiada completamente con recursos de la Universidad de Wurzburg, por lo que la secuenciación de otros integrantes de las familias no fue posible y con lo que se hubiera facilitado el análisis. Otras desventajas son las ya conocidas inherentes a la técnica de secuenciación de exoma completo como es que no abarca las regiones intrónicas o reguladoras, es difícil valorar regiones altamente repetitivas, además de que no identifica grandes rearrreglos (43)

La principal aportación de este estudio, es sentar un precedente más para futuros estudios donde se pueda evaluar a un número mayor de pacientes con NGS y así poder determinar la epidemiología molecular de la hipoacusia en México, y posiblemente realizar paneles dirigidos a los genes causantes de hipoacusia en nuestra población. Recordemos que en forma habitual solo se ofrece el estudio de algunos genes de conexinas, y al tratarse de una población tan heterogénea como la mexicana el uso de la NGS debería de considerarse dentro de los primeros pasos en el algoritmo diagnóstico del estudio de la hipoacusia, y poder ofrecer a los pacientes un asesoramiento genético más asertivo e incluso preventivo, al adelantarnos a las complicaciones y mejorar el seguimiento como en los casos positivos de Síndrome de Usher que fueron detectados, enfermedad en la que ya se encuentran estudios avanzados de terapia génica.

## CONCLUSIONES

- A pesar de la baja frecuencia de mutaciones en el gen *GJB2* encontradas en los estudios sobre hipoacusia en pacientes mexicanos, se debe de iniciar el análisis genético con la secuenciación Sanger del gen *GJB2*, dicha técnica sigue siendo el estándar de Oro de la Secuenciación de Nueva Generación. De 10 familias sometidas a esta primera prueba, dos pacientes afectados de una familia son heterocigotos compuestos para dos variantes patogénicas en el gen *GJB2*.
- La secuenciación de exoma completo, permitió el diagnóstico de Síndrome de Usher tipo 2C en una familia y el tipo 1G en otra. El Síndrome de Usher es la principal causa de hipoacusia asociada con ceguera, la implementación de la Secuenciación de Nueva Generación en el estudio de los pacientes con hipoacusia permite detectar entre otras muchas patologías, aquellas que nos permitan ofrecerle al paciente intervenciones oportunas para el desarrollo de una mejor calidad de vida a largo plazo, además de que ya se encuentra en estudios avanzados la terapia génica para el síndrome de sordo-ceguera.
- También se determinó el diagnóstico genético de hipoacusia relacionada con otros síndromes relacionados con déficit sensorial auditivo, como es la Osteopetrosis autosómica dominante 1.
- Se encontró una variante en una región intrónica en el gen *HK1*, el uso de estas nuevas tecnologías permitirá abrirnos el panorama hacia el papel que juegan las variantes en las regiones reguladoras. Para la variante encontrada en este gen las herramientas de predicción no permiten determinar su impacto y se necesitan de estudios funcionales futuros.
- Se encontró una variante en el gen *TNC* que se encuentra reportada como claramente patogénica en ClinVar y en la Deafness Variation Database, pero en la familia afectada el análisis de segregación descartó a esta variante como causa de enfermedad aunado a los hallazgos encontrados en GenomAD, lo que recalca la necesidad de valorar el origen de los datos que se encuentran asentados en las bases de datos utilizadas.

**Aspectos éticos y de bioseguridad:**

El presente estudio se apega a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud Art. 17: con riesgo mínimo “venopunción”, que se evita con compresión digital adecuada durante 3 minutos. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes de la investigación, se les otorgó toda la información necesaria para decidir su participación en la investigación, con el beneficio de obtener datos de los genes causales de patología que condiciona malformaciones, discapacidad y pueden heredarse. Se explicó que la persona responsable del proyecto estaría pendiente de la realización del estudio. Se explicó asimismo que debido a que son estudios de investigación, los resultados no deben utilizarse como diagnósticos clínicos, por lo que no se entregarían resultados por escrito, la parte de la investigación que pueda ser comunicada será a través de la comunicación directa con el sujeto de estudio, que se contactará vía telefónica para que acuda con el responsable de la investigación. Se les solicitó, al aceptar participar, que firmaran la carta de consentimiento informado, y se pidió a 2 testigos que también lo hicieran. Con el fin de respetar el derecho de confidencialidad de los participantes, toda la información individual se codificó.

## 10. Bibliografía

1. Önerci TM. Hearing Loss. In: Diagnosis in Otorhinolaryngology [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 45–7. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00499-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00499-5_10)
2. Ear C, Clinic H. Encyclopedia of Otolaryngology, Head and Neck Surgery [Internet]. 2013. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-23499-6>
3. Lm M, Woodson E. Encyclopedia of Otolaryngology, Head and Neck Surgery [Internet]. 2013. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-23499-6>
4. Ito J. Regenerative medicine for the inner ear. Regenerative Medicine for the Inner Ear. 2014. 1-321 p.
5. Cancer N, Pattani KM, Nathan CO, Oncology NS. Encyclopedia of Otolaryngology, Head and Neck Surgery [Internet]. 2013. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-23499-6>
6. WHO | Deafness and hearing loss. WHO [Internet]. 2017 [cited 2017 Sep 14]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>
7. Sloan-Heggen CM, Bierer AO, Shearer AE, Kolbe DL, Nishimura CJ, Frees KL, et al. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. Hum Genet. 2016;135(4):441–50.
8. Koffler T, Ushakov K, Avraham KB. Genetics of Hearing Loss: Syndromic. Otolaryngol Clin North Am [Internet]. 2015;48(6):1041–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otc.2015.07.007>
9. Lebeko K, Bosch J, Noubiap JJN, Dandara C, Wonkam A. Genetics of hearing loss in Africans: Use of next generation sequencing is the best way forward. Pan Afr Med J. 2015;20:1–14.
10. Mick P, Kawachi I, Lin FR. The Association between Hearing Loss and Social Isolation in Older Adults. Otolaryngol -- Head Neck Surg [Internet]. 2014;150(3):378–84. Available from: <http://oto.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/0194599813518021>
11. Lasak JM, Allen P, McVay T, Lewis D. Hearing loss: Diagnosis and

- management. *Prim Care - Clin Off Pract* [Internet]. 2014;41(1):19–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pop.2013.10.003>
12. INEGI. La discapacidad en México , datos al 2014. 2014;358. Available from: [http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva\\_estruc/702825090203.pdf](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825090203.pdf)
  13. Cunningham LL, Tucci DL. Hearing Loss in Adults. *N Engl J Med* [Internet]. 2017;377(25):2465–73. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1616601>
  14. Meena R, Ayub M. Genetics Of Human Hereditary Hearing Impairment. *J Ayub Med Coll Abbottabad* [Internet]. [cited 2018 Jan 24];29(4):671–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29331002>
  15. Guy Van Camp, Richard Smith. Hereditary Hearing Loss - Hereditary Hearing loss Homepage [Internet]. [cited 2017 Aug 29]. Available from: <http://hereditaryhearingloss.org/>
  16. Shearer A, Kolbe DL, Azaiez H, Sloan CM, Frees KL, Weaver AE, et al. Copy number variants are a common cause of non-syndromic hearing loss. *Genome Med* [Internet]. 2014;6(5):37. Available from: <http://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/gm554>
  17. No Title [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2706>
  18. Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A HuGE review. *Genet Med* [Internet]. 2002 Aug [cited 2018 Nov 27];4(4):258–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12172392>
  19. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1997 Nov [cited 2018 Nov 27];6(12):2173–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9336442>
  20. Chan DK, Chang KW. GJB2-associated hearing loss: Systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype. *Laryngoscope*. 2014;124(2):34–53.

21. Shearer AE, Eppsteiner RW, Booth KT, Ephraim SS, Gurrola J, Simpson A, et al. Utilizing ethnic-specific differences in minor allele frequency to recategorize reported pathogenic deafness variants. *Am J Hum Genet.* 2014;95(4):445–53.
22. Everman JL, Rios C, Seibold MA. Primary airway epithelial cell gene editing using CRISPR-Cas9. Vol. 1706, *Methods in Molecular Biology.* 2018. 267-292 p.
23. Article R. Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders. 2018;1353–62.
24. Yan D, Tekin D, Bademci G, Foster J, Cengiz FB, Kannan-Sundhari A, et al. Spectrum of DNA variants for non-syndromic deafness in a large cohort from multiple continents. *Hum Genet.* 2016;135(8):953–61.
25. Vona B, Lechno S, Hofrichter MAH, Hopf S, Läßig AK, Haaf T, et al. Confirmation of PDZD7 as a Nonsyndromic Hearing Loss Gene. *Ear Hear* [Internet]. 2016;0:1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26849169>
26. Bademci G, Foster J, Mahdieh N, Bonyadi M, Duman D, Cengiz FB, et al. Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive nonsyndromic deafness in a large multiethnic cohort. *Genet Med* [Internet]. 2016;18(4):364–71. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/gim.2015.89>
27. Beheshtian M, Babanejad M, Azaiez H, Bazazzadegan N, Kolbe D, Sloan-Heggen C, et al. Heterogeneity of Hereditary Hearing Loss in Iran: a Comprehensive Review [Internet]. Vol. 19. 2016 [cited 2017 Sep 14]. p. 720–8. Available from: <https://www-scopus-com.pbidi.unam.mx:2443/record/display.uri?eid=2-s2.0-85015594325&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&st1=hearing+loss&st2=review&nlo=&nlr=&nls=&sid=ece24ec993f305f9bccdb2248e23ac84&sot=b&sdt=b&sl=47&s=%28TITLE%28hearing+loss%29+AND+TITLE-ABS-KEY%28review%29%29&relpos=109&citeCnt=0&searchTerm=>



28. de la Luz Arenas-Sordo M, Menendez I, Hernández-Zamora E, Sirmaci A, Gutiérrez-Tinajero D, McGetrick M, et al. Unique spectrum of GJB2 mutations in Mexico. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012;76(11):1678–80.
29. Hernández-Juárez AA, Lugo-Trampe J de J, Campos-Acevedo LD, Lugo-Trampe A, Treviño-González JL, de-la-Cruz-Ávila I, et al. GJB2 and GJB6 mutations are an infrequent cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss in residents of Mexico. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2014;78(12):2107–12.
30. Loeza-Becerra F, Rivera-Vega M del R, Martínez-Saucedo M, Gonzalez-Huerta LM, Urueta-Cuellar H, Berruecos-Villalobos P, et al. Particular distribution of the GJB2/GJB6 gene mutations in Mexican population with hearing impairment. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2014;78(7):1057–60.
31. Martínez Saucedo M, Rivera Vega M del R, Gonzalez Huerta LM, Urueta Cuellar, Hector Toral López J, Cuevas Covarrubias S. Two novel compound heterozygous families with a trimutation in the GJB2 gene causing sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015;79(12):2295–9.
32. Martínez-Saucedo M, Rivera-Vega MR, Gonzalez-Huerta LM, Urueta-Cuellar H, Cuevas-Covarrubias SA. Exome sequencing analysis reveals homozygous GJB2 gene mutation in a Mexican family with profound hearing loss. *Rev Médica del Hosp Gen México [Internet]*. 2017;80(2):77–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0185106316300798>
33. Vona B, Nanda I, Hofrichter MAH, Shehata-Dieler W, Haaf T. Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future. *Mol Cell Probes [Internet]*. 2015;29(5):260–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2015.03.008>
34. Stelma F, Bhutta MF. Non-syndromic hereditary sensorineural hearing loss: review of the genes involved. *J Laryngol Otol [Internet]*. 2014;128(1):13–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24423691>
35. Wu CM, Ko HC, Tsou YT, Lin YH, Lin JL, Chen CK, et al. Long-term

- cochlear implant outcomes in children with GJB2 and SLC26A4 mutations. *PLoS One*. 2015;10(9):1–13.
36. Cabanillas R, Diñeiro M, Cifuentes GA, Castillo D, Pruneda PC, Álvarez R, et al. Comprehensive genomic diagnosis of non-syndromic and syndromic hereditary hearing loss in Spanish patients. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2018 Jul 9 [cited 2019 Jan 6];11(1):58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29986705>
  37. Calvet C, Lahlou G, Safieddine S. Progrès de la thérapie génique. *médecine/sciences* [Internet]. 2018 Oct 19 [cited 2019 Jan 6];34(10):842–8. Available from: <https://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/2018210>
  38. Carpena NT, Lee MY. Genetic Hearing Loss and Gene Therapy. 2018 [cited 2019 Jan 6]; Available from: <https://doi.org/10.5808/GI.2018.16.4.e20>
  39. Van Hul E, Gram J, Bollerslev J, Van Wesenbeeck L, Mathysen D, Andersen PE, et al. Localization of the Gene Causing Autosomal Dominant Osteopetrosis Type I to Chromosome 11q12-13. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2002 Jun 1 [cited 2019 Jan 6];17(6):1111–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1359/jbmr.2002.17.6.1111>
  40. Astiazarán MC, Cervantes-Sodi M, Rebolledo-Enríquez E, Chacón-Camacho O, Villegas V, Zenteno JC. Novel Homozygous LRP5 Mutations in Mexican Patients with Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers* [Internet]. 2017 Dec [cited 2019 Jan 6];21(12):742–6. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/gtmb.2017.0118>
  41. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S. ACMG Standards and Guidelines 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. 2015;17(5):405–24.
  42. Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nürnberg P. HomozygosityMapper - An interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(SUPPL. 2):593–9.
  43. Lin E, Chien J, Ong FS, Fan J. Challenges and opportunities for next-

generation sequencing in companion diagnostics. 2014;