

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	2
Contexto actual del diagnóstico de la hipoacusia congénita.	4
Importancia del estudio genético en la hipoacusia infantil.	4
Metodología diagnóstica en la hipoacusia infantil.	5
OBJETIVOS	7
PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	8
Estudio de una muestra.	8
Preparación del ADN genómico y cuantificación.	9
Análisis de mutaciones en los genes.	9
Análisis estadístico.	9
Revisión bibliográfica.	10
Estrategia de búsqueda y Extracción de datos.	10
RESULTADOS	11
DISCUSIÓN Y PROPUESTAS	13
Propuesta de panel.	14
Propuesta de protocolo de diagnóstico etiológico de las hipoacusias congénitas.	17
CONCLUSIÓN	19
BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

La hipoacusia tiene una incidencia de 1 a 3/1000 recién nacidos, y la mayoría son de causa genética. Las de herencia autosómica recesiva (AR) son las más frecuentes y, dentro de estas, la mutación 35delG es la principal implicada en la sordera congénita entre los europeos. La mutación A1555G mitocondrial es la causa más frecuente en sorderas postlinguales de causa genética. Ante una hipoacusia infantil de causa desconocida la prueba diagnóstica con un mayor rendimiento es el estudio genético.

Entre los objetivos de este trabajo se encuentran: proponer un panel de genes para el diagnóstico etiológico de las hipoacusias neurosensoriales no sindrómicas (HNSNS) de causa desconocida; identificar el espectro de mutaciones causantes de hipoacusia bilateral en la población de Castilla y León; y proponer un protocolo de diagnóstico etiológico integral de las hipoacusias congénitas. Para ello se hizo un estudio observacional descriptivo de tipo transversal con 128 pacientes de Castilla y León con diagnóstico de HNSNS y una revisión sistemática.

En el total de hipoacusias estudiadas, la frecuencia de homocigotos para la mutación 35delG fue 6,3%, y 7,8% de heterocigotos. El 17,2% presentaron la mutación A1555G. Finalmente se propone el panel de genes y el protocolo mencionados.

INTRODUCCIÓN

La hipoacusia es el desorden sensorial más frecuente al nacimiento, con una incidencia de 1 a 3/1000 recién nacidos (RN) y una prevalencia más del doble que cualquiera de las enfermedades y síndromes que se rastrean habitualmente al nacer. Entre otras, estas razones han hecho que los programas de cribado auditivo neonatal se hayan implementado en el mundo (1).

En los países desarrollados, más del 60% de las hipoacusias tienen una base genética, con una incidencia global de aproximadamente 1 de cada 2.000 nacimientos. En el 30% de estos casos, la hipoacusia está asociada a otros

signos clínicos (hipoacusias sindrómicas). En el 70% restante, la hipoacusia se presenta aislada (hipoacusias no sindrómicas).

Las hipoacusias hereditarias se deben generalmente a mutaciones en un único gen, pudiendo presentar todos los patrones de herencia conocidos. La herencia autosómica recesiva es la más frecuente, observándose aproximadamente en el 80% de los casos (2); por ello la mayor parte de los niños con hipoacusia congénita profunda no sindrómica tienen padres normoyentes.

Más del 50% de las hipoacusias prelinguales no sindrómicas autosómicas recesivas son debidas a la mutación del gen GJB2 que codifica la proteína conexina 26 (1). Aunque se han descrito más de 100 mutaciones de este gen, la mutación 35delG se presenta en el 70% de las encontradas entre los europeos (3), siendo la causa del 13 al 20% de las sorderas congénitas de origen genético (4). El 2-3% de la población es portadora de alguna mutación recesiva en GJB2 (4).

Una mutación en el gen GJB6 (conexina 30) es la 2ª mutación más frecuente en las sorderas prelocutivas. El locus DFNB1 contiene los genes GJB2 y GJB6. Una sordera originada en el locus DFNB1 puede deberse a una mutación del GJB2 en un alelo y de una delección del GJB6 en el otro, o a una delección bilateral del GJB6 (5), por lo que se aconseja el estudio genético conjunto de ambos genes GJB2/GJB6 (3,6,7).

En nuestro país, hasta un 15-20% de las hipoacusias no sindrómicas son debidas a la mutación A1555G en el gen mitocondrial MTRNR1 (12srRNA), manifestándose como una hipoacusia neurosensorial postlingual aislada o inducida por tratamiento aminoglucósido (6).

Finalmente, si la evaluación electrofisiológica de un niño que NO PASA el cribado, concluye que se trata de una neuropatía auditiva congénita ("PASA" Otoemisiones Acústicas - OEA y "NO PASA" Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral - PEATC), la alteración del gen OTOF es la causa genética más frecuente (5,8), destacando por su frecuencia en la población española la mutación Q829X (9,10).

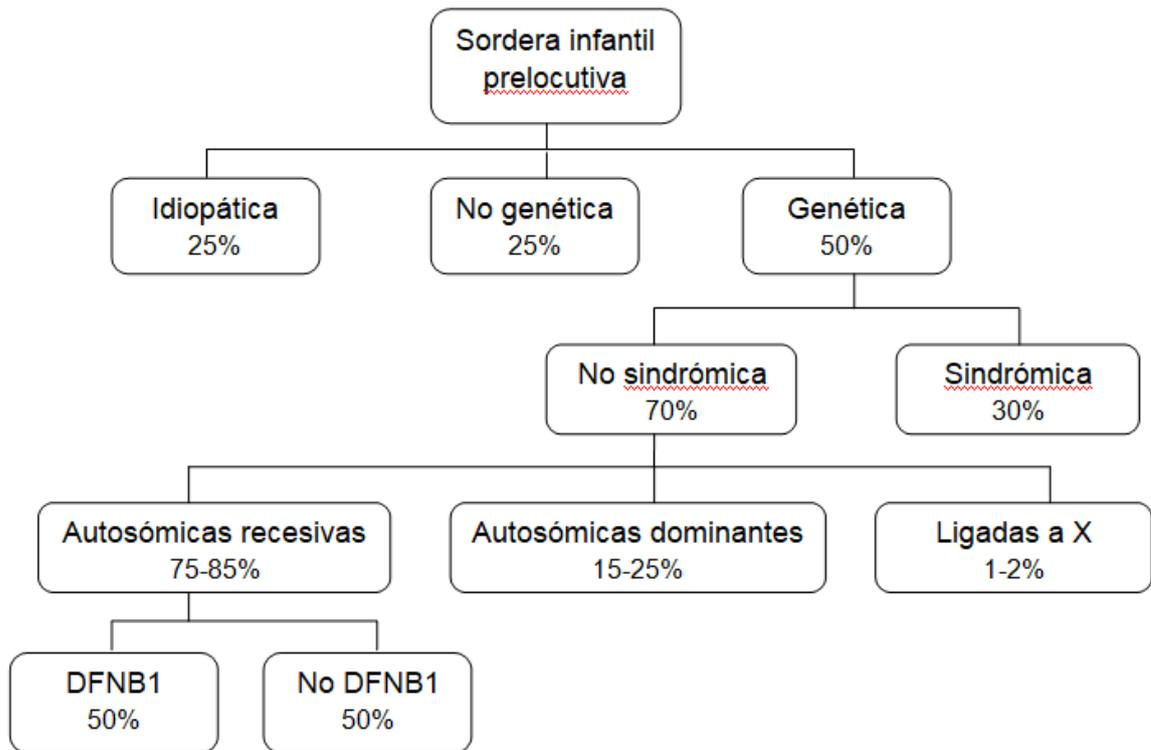


Ilustración 1. Etiología de la sordera infantil prelocutiva.

Contexto actual del diagnóstico de la hipoacusia congénita

Desde hace años existe screening universal auditivo en Castilla y León para detectar hipoacusias en el recién nacido. Sin embargo, no existe un protocolo de actuación para el diagnóstico etiológico.

Importancia del estudio genético en la hipoacusia infantil

Ante una hipoacusia neurosensorial congénita severa/profunda, la exploración con un mayor rendimiento es el análisis genético, por lo que debe formar parte del proceso diagnóstico en un programa de cribado auditivo neonatal (11).

El diagnóstico molecular influirá en las decisiones que se adopten en relación al paciente y a su familia (12). Responde a la pregunta que se hacen los padres ante la sordera de su hijo, resolviendo aquellas preocupaciones derivadas de supuestas responsabilidades (13) y permite comprender la causa a través del consejo genético (12). Pero además, ofrece información sobre el curso del proceso (estable, progresivo...), desvela la posibilidad de otras

condiciones patológicas coexistentes (afectación de la visión, defectos de conducción cardíaca, desórdenes hormonales, renales...) y repercute en el pronóstico y en la toma de decisiones terapéuticas (buena respuesta al implante coclear) (13,14). El interés general de las familias por este tipo de pruebas es alto, incluso aunque no exista un tratamiento efectivo (16).

El paciente y su familia muestran diversas actitudes respecto al estudio genético de la sordera, con diferentes expectativas en relación a los resultados, por lo que es necesaria la consulta a un especialista en esta materia, que aconseje e informe de la importancia y consecuencias que se derivan de la realización de estas pruebas (1). El diagnóstico y el consejo genético ofrecen:

- La posibilidad de conocer la forma de prevenir algunas hipoacusias (susceptibilidad a los ototóxicos en la mutación mitocondrial A1555G...) (5).
- Explica a los padres el patrón de herencia familiar y el riesgo de tener otros hijos con sordera (1).
- El diagnóstico molecular es el prerrequisito para establecer un posible tratamiento etiológico que permita el desarrollo de terapias específicas, no solamente dirigidas hacia el defecto genético (terapia génica o interferencia de la expresión génica), sino también a corregir los efectos fisiológicos derivados de la alteración (terapia farmacológica) (2,15).
- Finalmente, la detección de una mutación genética, elimina innecesarias y a veces invasivas exploraciones realizadas con fines diagnósticos (8).

Metodología diagnóstica en la hipoacusia infantil

Estudios previos, han investigado estrategias para obtener la mejor relación coste/efectividad en el diagnóstico de la hipoacusia congénita de origen genético (17–20). De Leenheer et al (2011) (21), proponen un árbol de decisiones para abordar el diagnóstico etiológico de la hipoacusia neurosensorial congénita de causa desconocida (ilustración 2).

Preguntar si existen factores de riesgo de hipoacusia.
Evaluación oftalmológica, con reevaluación a los 3-6 y 12 años.

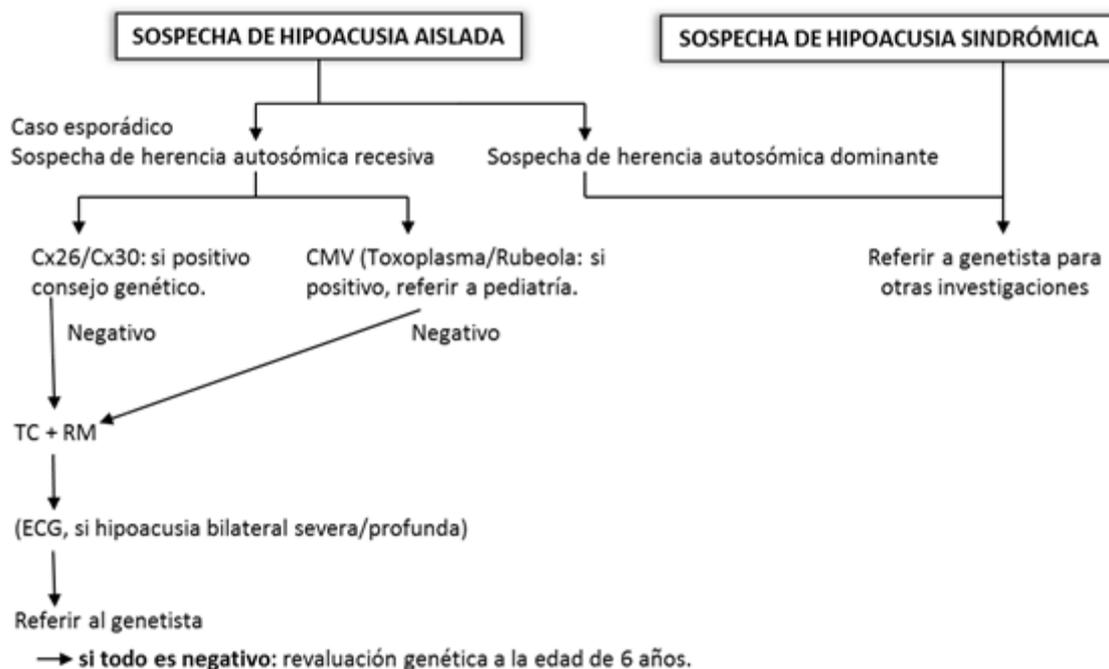


Ilustración 2. Diagnóstico etiológico de la hipoacusia neurosensorial congénita de causa desconocida (modificado de Leenheer et al, 2011 (21)).

En resumen, Leenheer et al proponen analizar de entrada los genes GJB2/GJB6 (DFNB1) y en caso de negatividad, tras los estudios de imagen, referir al genetista para planificar otros análisis.

Del mismo modo lo elaboran Cohen y Phillips (2012) (22), quienes de entrada consideran estudiar los genes GJB2/GJB6 y/o mutación mitocondrial (en relación a los antecedentes), y en función de los resultados obtenidos con la evaluación clínica, efectuar otros estudios genéticos, guiados por el consejo del especialista en genética (ilustración 3).

La BAPA (Asociación Británica de Audiólogos Pediátricos) establece 2 niveles de evaluación en los niños que nacen con hipoacusia severa/profunda, uni o bilateral, donde las pruebas genéticas y el consejo genético son parte fundamental (23).

Aunque muchos de los casos de la HNS congénita parecen ser de herencia recesiva, la naturaleza de los casos esporádicos o aislados es desconocida, esto dificulta el diagnóstico y el consejo genético (24).

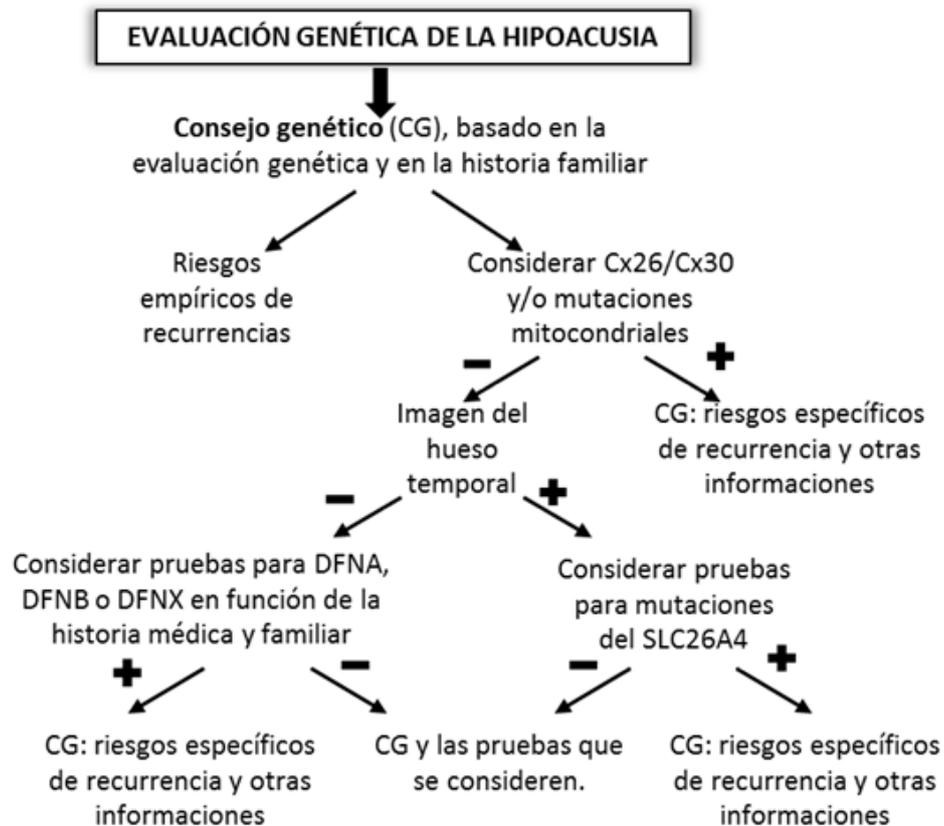


Ilustración 3. Diagnóstico etiológico de la hipoacusia neurosensorial congénita de causa desconocida (modificado de Cohen y Phillips, 2012 (22)).

Si las pruebas genéticas son negativas no significa que la sordera no sea de causa genética (5) y se debe realizar una evaluación familiar lo más completa posible a fin de poder relacionar en un futuro las características fenotípicas con un posible genotipo. Por tal motivo, las pruebas negativas deben ser almacenadas en un “centro especializado” que permita estudios ulteriores.

OBJETIVOS

- Identificar el espectro de mutaciones causantes de hipoacusia bilateral en la población de Castilla y León.
- Propuesta de un panel de genes que permita el estudio de las HNSNS de causa desconocida en Castilla y León, bien sea en recién nacidos que no superen el screening auditivo neonatal, o bien en personas cuya hipoacusia sea diagnosticada posteriormente mediante otras pruebas.

- Con los datos obtenidos y la bibliografía disponible proponer un protocolo de diagnóstico etiológico integral (tanto para el paciente como para la familia) de las hipoacusias congénitas en Castilla y León.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

Por un lado, se realizó un estudio observacional descriptivo de tipo transversal y, por otro, se hizo una revisión sistemática con el objetivo de diseñar el panel.

Estudio de una muestra

Se utilizaron los datos recogidos por el laboratorio de genética del IBGM (Instituto de Biología y Genética Molecular) desde el año 2002 hasta el año 2017. La muestra se extrajo de los pacientes del servicio de ORL del Hospital Clínico Universitario de Valladolid que cumplieron los criterios de inclusión. Se incluyeron a los pacientes con diagnóstico de HNS no sindrómica. Se excluyeron aquellas familias con diagnóstico etiológico ya conocido o con patrón de herencia autosómica dominante. Se obtuvo consentimiento informado para participar en el estudio por parte de todos los pacientes. Estudio Aprobado por el comité de ética y de investigación del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV).

Se estudió un total de 128 pacientes con diagnóstico de HNSNS. Los pacientes eran tanto casos esporádicos como familiares. Se estudiaron las mutaciones 35delG (gen GJB2), del (GJB6-D13S1830) (gen GJB6), del (GJB6-D13S1854) (gen GJB6), Q829X (gen OTOF), P1825A (gen OTOF) y A1555G (gen MTRNR1 de ADN mitocondrial). Si durante el análisis se encontró una mutación en homocigosis o la presencia de una mutación mitocondrial que explicara la HNS, el resto de mutaciones que aún no se habían analizado se dejaron sin estudiar. En los pacientes que no mostraron ninguna de estas mutaciones o que la presentaron en heterocigosis se analizó también el gen GJB2 completo.

La mutación A7445G (gen tRNAS1 de ADN mitocondrial) se estudió en los primeros 79 pacientes. Al no encontrarse ningún portador y dado que la

frecuencia reportada en nuestra población es muy baja, este estudio no se incorporó en el análisis de los 49 individuos restantes.

Preparación del ADN genómico y cuantificación

Se extrajeron muestras de 2 ml de sangre total en tubos con recubrimiento de ácido etilendiaminotetraacético mediante punción venosa periférica. Se extrajo el ADN genómico de las muestras de sangre total con el uso del MagNAPure Compact NucleicAcidIsolation Kit I (Roche; Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis de mutaciones en los genes

Las mutaciones específicas de GJB2, OTOF y mitocondrial se genotipificaron mediante análisis de restricción tras amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se realizaron 35 ciclos de PCR en termociclador (GeneAmp9700, Perkin-Elmer Cetus; Norwalk, Connecticut, Estados Unidos). La reacción de PCR consistió en 50 ng de ADN, 10 pm de cada cebador, 10 ml de mezcla maestra de PCR (Promega; Madison, Wisconsin, Estados Unidos) y 20 ml de agua. Para detectar la mutación en GJB6 fue necesario solamente PCR. Para secuenciar el gen GJB2 completo se utilizó secuenciación sanger; los primers que se usaron fueron:

- GJB2-1F (PCR y F-seq): GTGTTGTGTGCATTCGTCTTTC
- GJB2-2R (PCR y R-seq): CTCATCCCTCTCTCATGCTGTCTA
- GJB2-4F (F-seqintna.): GGAAGTTCATCAAGGGGGAGATA
- GJB2-3R (R-seqintna.): ACCTTCTGGGTTTTGATCTCCTC

Análisis estadístico

Se elaboró un archivo Excel con los datos codificados. Sobre la muestra, que incluía individuos con HNS tanto prelocutiva como postlocutiva, se realizó un análisis estadístico descriptivo e inferencial (con intervalo de confianza del 95%) para las frecuencias de distintos valores de las variables mediante el software IBM SPSS Statistics 23.0. Las variables que se analizaron fueron cada una de las mutaciones estudiadas.

Revisión bibliográfica

El panel debe permitir el estudio de HNSNS de causa desconocida tanto en recién nacidos (desde el programa de screening neonatal) como en pacientes que desarrollan la hipoacusia posteriormente. Por ello, se buscaron aquellos genes que hasta el momento se habían relacionado con HNSNS tanto prelocutiva como postlocutiva en nuestro medio.

Solo se buscaron aquellas mutaciones cuyo patrón de herencia fuera autosómico recesivo, ligado a X o de herencia mitocondrial. El estudio de las sorderas con patrón de herencia dominante se enfocaría en otra dirección.

Para encontrar los posibles genes candidatos a formar parte del panel se seleccionaron publicaciones sobre todo en relación a población española, aunque también en italiana y francesa, en las que se habían identificado otras mutaciones a parte de las ya analizadas en la muestra.

En Segovia (provincia situada en Castilla y León) el 30% de los partos son de madres de otra nacionalidad diferente a la española; y dentro de éstas aproximadamente el 30% son de origen marroquí, el 22% de origen búlgaro y el 12% de origen rumano (datos de comunicación personal). Aun sabiendo que la población de Segovia no es del todo representativa de la de Castilla y León, sí que nos permite ver la alta prevalencia de estas etnias en la población de interés. Por esta razón también se incluyeron éstas en la investigación.

Estrategia de búsqueda y Extracción de datos.

Se llevó a cabo una búsqueda de publicaciones de la literatura científica en distintas bases de datos electrónicas (PubMed, Ovid, Web Of Science, Scopus). Ésta se hizo tanto en español como en inglés mediante la ecuación de búsqueda: *deafness AND genetic AND Spain*, sin límite de fecha.

Se localizaron 295 estudios, aunque se excluyeron 281 que no fueron relevantes para el objetivo de esta revisión. Para proceder a la selección se revisaron los títulos y los abstracts y, en caso necesario, los artículos completos con el fin de decidir si la información que contenían estaba o no relacionada con nuestro objetivo (ilustración 4).

Posteriormente se realizó una búsqueda similar (en las mismas bases de datos) en población italiana y francesa con las siguientes ecuaciones: *deafness AND genetic AND “non-syndromic” AND Italy*; y *deafness AND genetic AND “non-syndromic” AND France*. Se revisaron los títulos y los abstracts y se seleccionaron únicamente aquellas publicaciones que aportaban nuevos genes que no habíamos encontrado en población española (anexo). Como resultado, se obtuvieron cuatro artículos más en población italiana y uno en francesa.

Por último, se investigaron de forma similar cuáles eran las mutaciones más frecuentes en población marroquí, rumana y búlgara (anexo).

RESULTADOS

De 128 pacientes, 8 (6,3%) fueron homocigotos para la mutación 35delG, y 22 (17,2%) presentaron la mutación A1555G. Del resto de mutaciones no se encontró ningún caso en homocigosis, tampoco hubo individuos heterocigotos compuestos.

En el resto de sujetos, 98 de 128 (76,5%), 10 individuos (10,20 %) eran heterocigotos para la mutación 35delG, 2 individuos (2,04%) eran heterocigotos para la mutación Q829X y 3 individuos (3,06 %) eran heterocigotos para la mutación W24X. En los 83 restantes (84,69%) no se encontró ninguna de las mutaciones estudiadas (tabla 1).

MUTACIÓN	Nº INDIVIDUOS
A1555G	22
35delG/wt	10
35delG/35delG	8
W24X/wt	3
Q829X/wt	2
Ninguna mutación	83
Total	128

Tabla 1. Distribución de las mutaciones encontradas en la muestra.

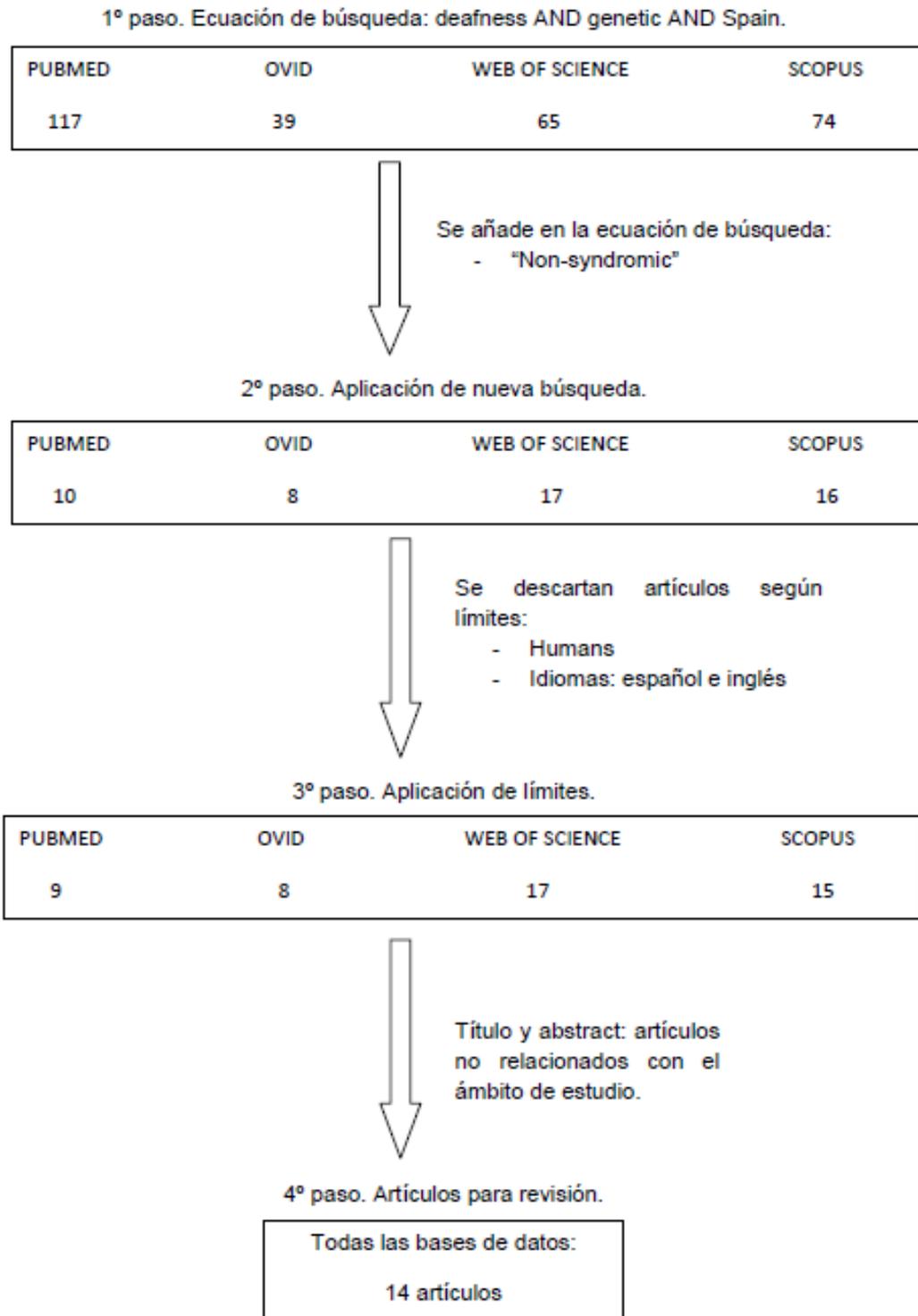


Ilustración 4. Estrategia de búsqueda bibliográfica en población española.

Con un IC 95% la frecuencia de homocigotos para la mutación 35delG en las personas con HNSNS de causa desconocida en Castilla y León es de 2% a 10,5%. Y, con un IC 95% la frecuencia de la mutación A1555G en las

personas con HNSNS de causa desconocida en Castilla y León es de 10,6% a 23,8%. (Ilustración 5).

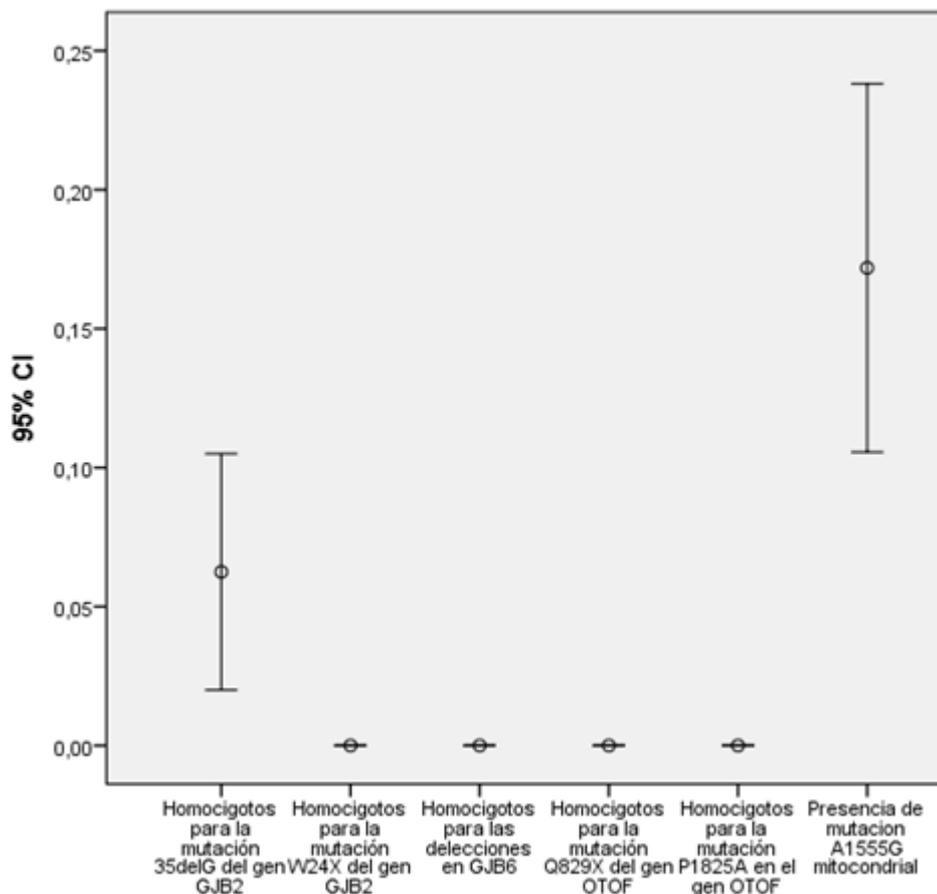


Ilustración 5. Diagrama de barras de error. Representación del porcentaje poblacional +/- 2 errores standar del porcentaje.

DISCUSIÓN Y PROPUESTAS

Se entiende como caso resuelto aquel cuya HNS es explicable mediante los resultados del análisis genético. En este caso, aquellos que presentan una mutación en homocigosis, los heterocigotos compuestos o los que presentan mutación en el ADN mitocondrial.

Mediante el análisis de las mutaciones 35delG, del (GJB6-D13S1830), del (GJB6-D13S1854), Q829X, P1825A, A1555G y gen GJB2 completo se resolvieron el 23,5% de los casos de una muestra de individuos con HNS de causa desconocida de Castilla y León. Todos los casos resueltos fueron debidos a las mutaciones 35delG (6,3%) o A1555G (23,5%). En definitiva, parece ser que, en Castilla y León, el análisis genético más rentable ante una

HNS de causa desconocida es el de las mutaciones 35delG y A1555G; y que la mutación A1555G es la principal responsable de las HNS de causa desconocida.

Sin embargo, de los casos no resueltos, aproximadamente el 10% eran portadores de la mutación 35delG, 3% de la mutación W24X y 2% de la mutación Q829X; posiblemente la causa de la HNS en estos individuos sea genética y existe otra mutación, probablemente en la región no codificante (y por tanto no secuenciada) en el mismo gen y que aún no se ha encontrado.

La mutación A1555G provoca una HNSNS postlocutiva, por lo tanto, en las sorderas congénitas la principal implicada es la mutación 35delG. Puesto que la causa más frecuente de HNS prelocutiva es genética y, dentro de ésta, la mutación 35delG, es la que debería estudiarse en primer lugar ante una sordera congénita de causa desconocida.

A pesar de que en este estudio no se encontró ningún heterocigoto compuesto, homocigoto o heterocigoto que implicara al gen GJB6, en otros estudios ha resultado el segundo en frecuencia en las HNS prelocutivas (6). Por ello, seguimos considerando necesario el estudio prioritario de este gen ante una sordera congénita de causa desconocida, hasta que existan más estudios que estimen su prevalencia real.

Propuesta de panel (ilustración 6).

Tras la revisión sistemática, todos los genes que han albergado variantes patológicas asociadas a HNSNS no autosómica dominante han sido incluidos en la propuesta de panel. Además, se tuvo en cuenta que ciertas HNS sindrómicas pueden debutar con HNS como único síntoma y, por lo tanto, simular una HNSNS.

El locus DFNB1, que incluye GJB2 y GJB6, es el principal implicado en la HNS congénita. Aunque la mutación 35delG sea la más destacable dentro del gen GJB2 se han detectado más mutaciones dentro del mismo (24). La mutación W24X en el gen GJB2 es la más frecuente entre la etnia gitana española, una población de más de 500.000 individuos distribuidos a lo largo de todo el país (26).

GEN	CROMOSOMA
GJB2 (*121011)	13
GJB6 (*604418)	13
OTOF (*603681)	2
MTRNR1 (*561000)	ADN mitocondrial
PRPS1 (*311850)	X
SMPX (*300226)	X
TMPRSS3 (*605511)	21
MTTS1 (*590080)	ADN mitocondrial
OTOA (*607038)	16
LRTOMT (*612414)	11
PEX6 (*601498)	6
MYO7A (*276903)	11
MYO15A (*602666)	17
USH1C (*605242)	11
CDH23 (*605516)	10
PCDH15 (*605514)	10
USH1G (*607696)	17
CIB2 (*605564)	15
USH2A (*608400)	1
ADGRV1 (*602851)	5
DFNB31 (#607084)	9
CLRN1 (*606397)	3
HARS (*142810)	5
PDZD7 (*612971)	10
VEZT	12

Ilustración 6. Genes propuestos para panel. Nomenclatura de genes: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.

De acuerdo con un estudio realizado en una cohorte española, las mutaciones en el gen OTOF podrían ser responsables de alrededor del 8% de los casos de HNS profunda, prelocutiva y autosómica recesiva. En el mismo

estudio se encontraron hasta ocho mutaciones diferentes de la Q829X en el gen OTOF (27).

Las mutaciones en el ADN mitocondrial que resultan en HNSNS están agrupadas en los genes que codifican el 12S rRNA y el tRNA ser (UCN) (28). En el gen MTRNR1 (que codifica el 12S rRNA) además de la mutación A1555G, se han encontrado otras mutaciones en población española, como la 1494c>t (28), y en población italiana, como la T1095C (29). En el gen MTTS1 (que codifica el tRNA ser (UCN)) se ha encontrado la mutación T7511C en un estudio realizado en población francesa (30).

Se han encontrado dos nuevas variantes de secuencia en el gen PRPS1 en dos familias españolas diferentes (c.824T>C y c.917GH>A), aunque esta última también incluye características sindrómicas en algunos pacientes (31).

En un estudio de una familia española en 1996 se definió el locus DFNX4 (DFN6), pero no se localizó el gen que albergaba la mutación en aquella familia que tenía varios miembros afectados de HNSNS. Gracias a un estudio alemán que encontró una mutación en el gen SMPX y que localizó este gen dentro del locus DFN6 se pudo hallar la mutación en la familia del primer estudio (c.175G>T) (32,33).

En población italiana, además de los ya comentados, se ha descrito una posible forma digénica de HNSNS afectando a los genes GJB2 y TMPRSS3. Debido a la alta prevalencia de portadores de mutaciones del gen GJB2 en HNSNS autosómica recesiva en población caucásica, se sugiere el screening de mutaciones en TMPRSS3 (34).

OTOA es un gen situado en el cromosoma 16 que se ha asociado a casos de HNS no sindrómica de herencia AR y prelocutiva, la mayoría de ellos por deleciones de todo el gen, aunque también se han descrito algunos casos de mutaciones puntuales. En dos hermanos de procedencia italiana se encontró una mutación puntual que parece ser la causante de su HNS. Esta mutación (c.1865 T>A) no ha sido reportada anteriormente y es la primera mutación puntual en OTOA observada en Europa (35).

En población marroquí el gen GJB2 es el principal implicado en la HNSNS autosómica recesiva (36–38). A pesar de ello, parece ser que mutaciones en el gen LRTOMT son la segunda causa más frecuente de HNS congénita (39). Por ello se ha considerado oportuno incluir este último gen en el panel.

En poblaciones rumana y búlgara el gen GJB2, que ya está incluido en el panel, sigue siendo la causa más frecuente de HNSNS congénita (40,41).

Los términos sindrómica y no sindrómica llevan a confusión puesto que, dependiendo del momento de la historia natural de la enfermedad, puede presentar o no otros síntomas, como sucede en el síndrome de Usher o en la mutación en el gen PEX6 (recientemente descrita pero aún pendiente de publicar). Puesto que ambos pueden simular una HNSNS se han incluido en el panel (draft de artículo pendiente de publicación).

Propuesta de protocolo de diagnóstico etiológico de las hipoacusias congénitas (ilustración 7).

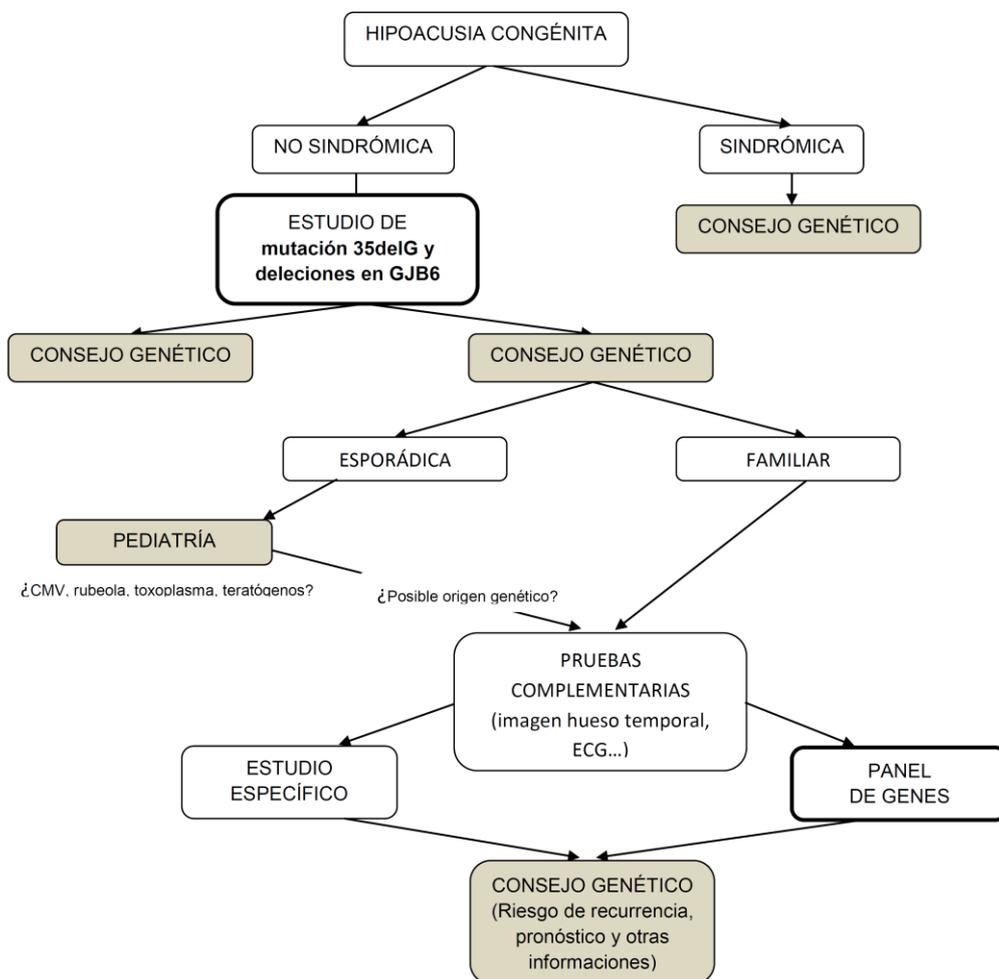
De acuerdo con la bibliografía presente sobre este tema, comentada en el apartado de introducción, se ha diseñado un protocolo de actuación para el diagnóstico etiológico de las hipoacusias congénitas de causa desconocida.

Como se ha comentado en el apartado de discusión se considera que la mutación 35delG debería ser la estudiada en primer lugar ante una sordera congénita y que las deleciones en GJB6, a pesar de los resultados de este estudio, también deben ser un estudio prioritario. Por esta razón en el protocolo propuesto estas dos mutaciones serían las dos primeras que habría que descartar.

Posteriormente, tras descartar causas no genéticas, el estudio del panel de genes propuesto en este trabajo debería descartar la mayoría de las causas genéticas posibles conocidas hasta el momento.

A cada una de las personas a las que se solicitan las pruebas de hipoacusia (sea caso índice o familiar) se le realizarían las siguientes exploraciones:

- Breve historia clínica (a partir de la realizada en consulta ORL) respecto al momento de aparición, tipo, grado y evolución de la hipoacusia y un cuestionario, con datos de filiación y antecedentes generales, específicamente audiológicos y otológicos.
- Audiometría tonal liminal con vías aérea y ósea, en ocasiones complementada con la impedanciometría y el estudio de los reflejos de estribo. En ocasiones, si el niño es muy pequeño, el grado de pérdida auditiva que se refleja, es el obtenido en la exploración mediante pruebas electrofisiológicas objetivas.



*Si no se obtiene un diagnóstico, se realizará seguimiento con estudio ocular a los tres años y reevaluación final a los 6 años.

Ilustración 7. Protocolo de diagnóstico etiológico para la sordera congénita en Castilla y León.

- Extracción sanguínea. Se obtendrá consentimiento informado del paciente o de su tutor legal para la realización de las pruebas genéticas y se remitirá la muestra al laboratorio de análisis genético.
- Se solicitará interconsulta de consejo genético tres meses después de realizada la extracción.

CONCLUSIÓN

- Ante una hipoacusia infantil de causa desconocida la prueba diagnóstica con un mayor rendimiento es el estudio genético.
- Es esencial disponer de un panel de genes que permita sistematizar el estudio etiológico de las sorderas genéticas y un protocolo de actuación para aquellas que son congénitas.
- En Castilla y León las HNSNS están causadas mayoritariamente por la mutación A1555G del ADN mitocondrial.
- Sin embargo, las HNSNS congénitas están causadas mayoritariamente por la mutación 35delG del gen GJB2. Por ello, es la que debería estudiarse en primer lugar ante una sordera congénita de causa desconocida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jerry J, Oghalai JS. Towards an etiologic diagnosis: assessing the patient with hearing loss. *Adv Otorhinolaryngol.* 2011;70:28-36.
2. del Castillo I. Las sorderas hereditarias, un reto para la Biología Molecular [Internet]. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM); 2010 oct [citado 17 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/294-las-sorderas-hereditarias-un-reto-para-la-biologia-molecular>
3. Schimmenti LA, Martinez A, Fox M, Crandall B, Shapiro N, Telatar M, et al. Genetic testing as part of the early hearing detection and intervention

- (EHDI) process. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* diciembre de 2004;6(6):521-5.
4. Faundes V, Pardo RA, Castillo Taucher S. [Genetics of congenital deafness]. *Med Clin (Barc).* 20 de octubre de 2012;139(10):446-51.
 5. Paludetti G, Conti G, DI Nardo W, DE Corso E, Rolesi R, Picciotti PM, et al. Infant hearing loss: from diagnosis to therapy Official Report of XXI Conference of Italian Society of Pediatric Otorhinolaryngology. *Acta Otorhinolaryngol Ital Organo Uff Della Soc Ital Otorinolaringol E Chir Cerv-facc.* diciembre de 2012;32(6):347-70.
 6. del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Tellería D, et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med.* 24 de enero de 2002;346(4):243-9.
 7. del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira CA, et al. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet.* julio de 2005;42(7):588-94.
 8. Deltenre P, Van Maldergem L. Hearing loss and deafness in the pediatric population: causes, diagnosis, and rehabilitation. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1527-38.
 9. Rodríguez-Ballesteros M, del Castillo FJ, Martín Y, Moreno-Pelayo MA, Morera C, Prieto F, et al. Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (OTOF). *Hum Mutat.* diciembre de 2003;22(6):451-6.
 10. Migliosi V, Modamio-Hoybjor S, Moreno-Pelayo MA, Rodriguez-Ballesteros M, Villamar M, Telleria D, et al. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *J Med Genet.* julio de 2002;39(7):502-6.

11. Cabanillas Farpón R, Cadiñanos Bañales J. Hipoacusias hereditarias: asesoramiento genético. *Acta Otorrinolaringológica Esp.* 1 de mayo de 2012;63(3):218-29.
12. Rehm HL. A genetic approach to the child with sensorineural hearing loss. *Semin Perinatol.* junio de 2005;29(3):173-81.
13. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med.* 18 de mayo de 2006;354(20):2151-64.
14. M M. Profound deafness in childhood. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 10 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21288107>
15. Hildebrand MS, Newton SS, Gubbels SP, Sheffield AM, Kochhar A, de Silva MG, et al. Advances in molecular and cellular therapies for hearing loss. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* febrero de 2008;16(2):224-36.
16. al EH et. Interest in newborn genetic testing: a survey of prospective parents and the general public. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 10 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22103558>
17. al PD et. A diagnostic paradigm for childhood idiopathic sensorineural hearing loss. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 17 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A+diagnostic+paradigm+for+childhood+idiopathic+sensorineural+hearing+loss>
18. al MS et. Systematic review of the etiology of bilateral sensorineural hearing loss in children. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 17 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15302152>
19. Mahboubi H, Dwabe S, Fradkin M, Kimonis V, Djalilian HR. Genetics of hearing loss: where are we standing now? *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg.* julio de 2012;269(7):1733-45.

20. Ramos PZ, de Moraes VCS, Svidnicki M, Soki MN, Castilho AM, Sartorato EL. Etiologic and diagnostic evaluation: algorithm for severe to profound sensorineural hearing loss in Brazil. *Int J Audiol*. noviembre de 2013;52(11):746-52.
21. De Leenheer EMR, Janssens S, Padalko E, Loose D, Leroy BP, Dhooge IJ. Etiological diagnosis in the hearing impaired newborn: proposal of a flow chart. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. enero de 2011;75(1):27-32.
22. Cohen M, Phillips JA. Genetic approach to evaluation of hearing loss. *Otolaryngol Clin North Am*. febrero de 2012;45(1):25-39.
23. Ardle BM, Bitner-Glindzicz M. Investigation of the child with permanent hearing impairment. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. febrero de 2010;95(1):14-23.
24. Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet Lond Engl*. 7 de febrero de 1998;351(9100):394-8.
25. Morales Angulo C, Gallo-Terán J, Señaris B, Fontalva A, González-Aguado R, Fernández-Luna JL. [Prevalence of the A1555G MTDNA mutation in sporadic hearing-impaired patients without known history of aminoglycoside treatment]. *Acta Otorrinolaringol Esp*. abril de 2011;62(2):83-6.
26. Alvarez A, del Castillo I, Villamar M, Aguirre LA, González-Neira A, López-Nevot A, et al. High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet A*. 1 de septiembre de 2005;137A(3):255-8.
27. Rodríguez-Ballesteros M, Reynoso R, Olarte M, Villamar M, Morera C, Santarelli R, et al. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy. *Hum Mutat*. junio de 2008;29(6):823-31.

28. Rodríguez-Ballesteros M, Olarte M, Aguirre LA, Galán F, Galán R, Vallejo LA, et al. Molecular and clinical characterisation of three Spanish families with maternally inherited non-syndromic hearing loss caused by the 1494C->T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. *J Med Genet.* noviembre de 2006;43(11):e54.
29. al TA et. Maternally inherited deafness associated with a T1095C mutation in the mDNA. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 7 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11313749>
30. Chapiro E, Feldmann D, Denoyelle F, Sternberg D, Jardel C, Eliot M-M, et al. Two large French pedigrees with non syndromic sensorineural deafness and the mitochondrial DNA T7511C mutation: evidence for a modulatory factor. *Eur J Hum Genet EJHG.* diciembre de 2002;10(12):851-6.
31. Gandia M, Fernandez-Toral J, Solanellas J, Dominguez-Ruiz M, Gomez-Rosas E, Del Castillo FJ, et al. Mutations in PRPS1 causing syndromic or nonsyndromic hearing impairment: intrafamilial phenotypic variation complicates genetic counseling. *Pediatr Res.* julio de 2015;78(1):97-102.
32. del Castillo I, Villamar M, Sarduy M, Romero L, Herraiz C, Hernández FJ, et al. A novel locus for non-syndromic sensorineural deafness (DFN6) maps to chromosome Xp22. *Hum Mol Genet.* septiembre de 1996;5(9):1383-7.
33. Huebner AK, Gandia M, Frommolt P, Maak A, Wicklein EM, Thiele H, et al. Nonsense mutations in SMPX, encoding a protein responsive to physical force, result in X-chromosomal hearing loss. *Am J Hum Genet.* 13 de mayo de 2011;88(5):621-7.
34. al LM et. Putative TMPRSS3/GJB2 digenic inheritance of hearing loss detected by targeted resequencing. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 14 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28263784>

35. Fontana P, Morgutti M, Pecile V, Lenarduzzi S, Cappellani S, Falco M, et al. A novel OTOA mutation in an Italian family with hearing loss. *Gene Rep.* 2017;9:111-4.
36. Bakhchane A, Bousfiha A, Charoute H, Salime S, Detsouli M, Snoussi K, et al. Update of the spectrum of GJB2 gene mutations in 152 Moroccan families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Eur J Med Genet.* junio de 2016;59(6-7):325-9.
37. Lazăr C, Popp R, Trifa A, Mocanu C, Mihut G, Al-Khzouz C, et al. Prevalence of the c.35delG and p.W24X mutations in the GJB2 gene in patients with nonsyndromic hearing loss from North-West Romania. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* abril de 2010;74(4):351-5.
38. Abidi O, Boulouiz R, Nahili H, Ridal M, Alami MN, Tlili A, et al. GJB2 (connexin 26) gene mutations in Moroccan patients with autosomal recessive non-syndromic hearing loss and carrier frequency of the common GJB2-35delG mutation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* agosto de 2007;71(8):1239-45.
39. Charif M, Bounaceur S, Abidi O, Nahili H, Rouba H, Kandil M, et al. The c.242G>A mutation in LRTOMT gene is responsible for a high prevalence of deafness in the Moroccan population. *Mol Biol Rep.* diciembre de 2012;39(12):11011-6.
40. Rădulescu L, Mârțu C, Birkenhäger R, Cozma S, Ungureanu L, Laszig R. Prevalence of mutations located at the dfnb1 locus in a population of cochlear implanted children in eastern Romania. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* enero de 2012;76(1):90-4.
41. Popova DP, Kaneva R, Varbanova S, Popov TM. Prevalence of GJB2 mutations in patients with severe to profound congenital nonsyndromic sensorineural hearing loss in Bulgarian population. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg.* junio de 2012;269(6):1589-92.

ANEXO

1º paso. Ecuación de búsqueda: deafness AND genetic AND France

PUBMED	OVID	WEB OF SCIENCE	SCOPUS
262	30	67	42



Se añade en la ecuación de búsqueda:
- "Non-syndromic"

2º paso. Aplicación de nueva búsqueda.

PUBMED	OVID	WEB OF SCIENCE	SCOPUS
30	8	9	9



Se descartan artículos según límites:
- Humans
- Idiomas: español e inglés

3º paso. Aplicación de límites.

PUBMED	OVID	WEB OF SCIENCE	SCOPUS
25	5	7	8



Título y abstract: artículos no relacionados con el ámbito de estudio.

4º paso. Artículos para revisión.

Todas las bases de datos: 1 artículo

1º paso. Ecuación de búsqueda: deafness AND genetic AND Italy

PUBMED	OVID	WEB OF SCIENCE	SCOPUS
208	33	94	88



Se añade en la ecuación de búsqueda:
- "Non-syndromic"

2º paso. Aplicación de nueva búsqueda.

PUBMED	OVID	WEB OF SCIENCE	SCOPUS
39	11	21	24



Se descartan artículos según límites:
- Humans
- Idiomas: español e inglés

3º paso. Aplicación de límites.

PUBMED	OVID	WEB OF SCIENCE	SCOPUS
35	10	20	23



Título y abstract: artículos no relacionados con el ámbito de estudio.

4º paso. Artículos para revisión.

Todas las bases de datos: 4 artículos
--

Estrategia de búsqueda bibliográfica en poblaciones francesa e italiana.

1º paso. Ecuación de búsqueda: deafness AND genetic AND "non syndromic" AND Moroccan

PUBMED	OVID	WEB OF SCIENCE	SCOPUS
11	11	15	12



Se descartan artículos según límites:

- Humans
- Idiomas: español e inglés

2º paso. Aplicación de límites.

PUBMED	OVID	WEB OF SCIENCE	SCOPUS
9	8	14	10



Título y abstract: artículos no relacionados con el ámbito de estudio.

3º paso. Artículos para revisión.

Todas las bases de datos:
5

1º paso. Ecuación de búsqueda: deafness AND genetic AND Bulgarian

PUBMED	OVID	WEB OF SCIENCE	SCOPUS
2	2	5	2



Se descartan artículos según límites:

- Humans
- Idiomas: español e inglés

2º paso. Aplicación de límites.

PUBMED	OVID	WEB OF SCIENCE	SCOPUS
2	2	5	2



Título y abstract: artículos no relacionados con el ámbito de estudio.

3º paso. Artículos para revisión.

Todas las bases de datos:
1

Estrategia de búsqueda bibliográfica en poblaciones marroquí y búlgara.

1º paso. Ecuación de búsqueda: deafness AND genetic AND romania

PUBMED	OVID	WEB OF SCIENCE	SCOPUS
5	3	5	5



Se descartan artículos según límites:
- Humans
- Idiomas: español e inglés

2º paso. Aplicación de límites.

PUBMED	OVID	WEB OF SCIENCE	SCOPUS
5	3	5	4



Título y abstract: artículos no relacionados con el ámbito de estudio.

3º paso. Artículos para revisión.

Todas las bases de datos:
2

Estrategia de búsqueda bibliográfica en población rumana.