

# ANÁLISIS DEL GENOMA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE MÉNIÈRE ESPORÁDICA DE INICIO PRECOZ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA (B11.56.1)



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA



**Autora:** María del Carmen Moleón González

**Directores:** José Antonio López Escámez y  
Álvaro Gallego Martínez

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: María del Carmen Moleón González  
ISBN: 978-84-1117-261-5  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/73617>



# Agradecimientos

Esta tesis doctoral no podría haberse realizado sin la ayuda de muchas personas.

En primer lugar, agradecer a los directores de esta tesis doctoral el Profesor José Antonio López Escámez y Dr. Álvaro Gallego Martínez. Gracias por vuestra paciencia y apoyo constante en este proyecto. La realización de esta tesis no hubiese sido posible sin vuestra dedicación y vuestro entusiasmo. Gracias igualmente por la confianza ofrecida desde que inicié esta tesis y gracias Álvaro por estar disponible las 24h del día para resolverme dudas a horas intempestivas.

En segundo lugar, gracias a mi familia, en especial a mis padres, sin su ayuda diaria y su paciencia infinita nada sería posible. Nunca estaré lo suficientemente agradecida por apoyarme en esta profesión, tan complicada a veces, y ayudarme a mirar siempre hacia adelante.

De igual manera, agradecer a mis amigos, a los de antes, a los de ahora y a los de siempre, porque unos cuantos kilómetros no son suficientes para distanciarnos. Gracias a mis compañeros de trabajo, y muchos, amigos, por vuestro apoyo, no solo durante la realización de esta tesis, sino, también, en los días de trabajo que hacían el mismo más ameno. Agradecer a todos los que fueron mis compañeros del Servicio de Otorrinolaringología del HUVN de Granada, cuya aportación personal y profesional me ha permitido realizar esta tesis. Gracias igualmente, a mis compañeros actuales del HGUUGCR por permitirme continuar en la andadura de formarme como medica especialista.

También agradecer a todos los compañeros del laboratorio con los que he tenido la suerte de compartir horas de trabajo y aprender de su experiencia, sin vosotros y vuestro trabajo no sería posible haber realizado esta tesis. Gracias Estrella, Marisa, Lidia y Andreina por ayudarme a escribir el artículo que da forma a esta tesis. Gracias por darle sentido a todo lo que hacéis, por estar siempre disponibles para recoger muestras, aportar datos y resolver dudas. Igualmente, gracias, Pablo y Alba por vuestros consejos y apoyo. Muchas gracias, Paula, por tu paciencia y trabajo en la revisión de esta tesis.

Tampoco puedo olvidarme de todos los médicos que han participado en este estudio, gracias, Juanma por tu gran ayuda. Igualmente, agradecer a Hortensia Sánchez-Gómez, María Alharilla Montilla, Emilio Domínguez-Durán, Andrés Soto e Ismael Arán por encontrar siempre un momento para colaborar en la recogida de muestras y aporte de información, tan necesaria para continuar con la investigación en este campo y por supuesto, para la realización del trabajo de investigación que posibilita esta tesis.

Por último, muchas gracias a todos los pacientes con la enfermedad de Ménière, por su altruismo y su buena disposición para participar en este trabajo. Igualmente, muchas gracias a la Asociación Síndrome de Ménière España (ASMES) y a todos sus socios.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	5
Ayudas y financiación .....	7
Resumen .....	8
Abreviaturas .....	11
Introducción .....	13
1.1 El oído interno.....	13
1.1.1 Anatomía y función de la cóclea .....	14
1.1.2 Anatomía y función del sistema vestibular .....	16
1.2 Enfermedad de Ménière.....	16
1.2.1 Epidemiología .....	17
1.2.2 Fisiopatología .....	18
1.2.3 Clínica.....	20
1.2.4 Diagnóstico y clasificación .....	21
1.2.5 Tratamiento .....	22
1.3 Bases moleculares de genética humana. ....	23
1.3.1 De genes a proteínas .....	24
1.3.2 Variación genética .....	24
1.4 Genética de la hipoacusia y la enfermedad de Ménière. ....	28
Hipótesis.....	37
Objetivos .....	38
4. Métodos .....	39
4.1. Caracterización clínica de pacientes con EM .....	39
4.2 Aislamiento e incubación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y determinación de citoquinas. ....	39
4.3 Estadística y análisis de datos clínicos. ....	40
4.4 Análisis genómico de pacientes con EMIP .....	40
4.4.1 Diagnóstico y selección de los casos.....	40
4.4.2 Extracción y secuenciación de ADN .....	41
4.4.3 Análisis bioinformático .....	41
4.4.4. Validación de variantes mediante secuenciación Sanger. ....	44
4.4.5 Análisis funcional.....	44
5. Resultados .....	46

5.1. Caracterización clínica de los pacientes con EM de inicio precoz .....	46
5.1.1 Pacientes con EM de inicio precoz y prevalencia de migraña. ....	48
5.1.2 Niveles de citoquinas en EM de inicio precoz e inicio tardío.....	49
5.1.3 Niveles de citoquinas no permiten diferenciar entre pacientes con migraña y sin migraña en la EM	51
5.1.4 Niveles de citoquinas entre EM familiar (EMF) y EM esporádica (EME). ....	53
5.1.5 Niveles de CCL18, CCL22 y CCL4 entre pacientes con EM, migraña y controles .....	54
5.2 Análisis genómico de pacientes con EMIP .....	56
5.2.1 Trío 1.....	56
5.3.2 Trío 2.....	61
5.3.3 Trío 3.....	65
5.3.4 Trío 4.....	69
5.3.5 Trío 5.....	74
5.3.6 Trío 6.....	77
Discusión.....	81
Perfil clínico de la enfermedad de Ménière .....	81
Perfil genómico de la enfermedad de Ménière.....	83
Conclusiones.....	91
Material suplementario .....	93
Referencias .....	116

# Ayudas y financiación

Esta tesis ha sido parcialmente financiada con los siguientes proyectos:

- Fondos del ISCIII (Instituto de Salud Carlos III) y fondos regionales europeos (Subvenciones PI17/01644 y PI20/01126).
- Fondos de la Junta de Andalucía (Beca PE-0356-2018 y Beca PI-0027-2020).
- Proyecto de investigación UNITI (Unification of Treatments and Interventions for Tinnitus Patients) financiado con fondos europeos del H2020.

# Resumen

**Introducción:** La enfermedad de Ménière (EM) es una enfermedad rara del oído interno caracterizada por ataques de vértigo asociados a pérdida de audición neurosensorial de bajas y medias frecuencias y acúfenos o sensación de plenitud ótica. Aunque su etiología permanece desconocida, su prevalencia varía de 0.5 a 1 por 1000 individuos, afectando en mayor medida a casos familiares (6-9%) que, a esporádicos, lo que sugiere una contribución genética. La EM es una enfermedad compleja, con una heterogeneidad genética que se ve acompañada de una gran diversidad en el fenotipo, lo que complica su diagnóstico.

**Objetivo:** Identificar pacientes con EM de herencia recesiva, de inicio precoz, así como identificar nuevos genes que expliquen la heterogeneidad de la enfermedad. Así mismo, se identificará y caracterizará clínicamente la EM de inicio precoz no familiar, se realizará la secuenciación del genoma completo en tríos con caso índice de EM esporádica y se realizará un análisis integrado de datos genómicos para demostrar la acumulación de variantes raras en genes (homocigotas o heterocigotas compuestas).

**Métodos:** En este estudio se incluirán un total de 6 tríos de pacientes españoles con EM esporádico con inicio precoz ( $\leq 35$  años) que cumplan los criterios diagnósticos establecidos por el Comité de Audición y Equilibrio de la Sociedad Barany para EM definida. El ADN de los casos se extraerá a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediante la extracción de 12 ml de sangre venosa periférica. Tras la extracción, las muestras de ADN se conservarán a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Este estudio se llevará a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki de 1975 (revisada en 2013) para la experimentación humana. Los pacientes e individuos sanos serán informados sobre el estudio y se obtendrá su consentimiento informado verbal y escrito. Tras la extracción, el DNA de los pacientes se procesa para la preparación de librerías de genoma completo y posterior secuenciación. A continuación, se realizará el *variant calling*, usando GATK, para realizar un realineamiento de los datos de secuenciación con el genoma de referencia humano GRCh37/hg19 y se generarán archivos *Variant Call Format* (VCF) con las variantes en cada sujeto incluyendo variantes de un solo nucleótido (SNV), inserciones /deleciones (INDELS), y variaciones de número de copia (CNV) más su correspondiente anotación en las bases de datos de referencia de frecuencia poblacional (ExAC y gnomAD) y de caracterización clínica (ClinVar) incluyendo una predicción de patogenicidad a través de CADD (Combined Annotation Dependent Depletion). Con los resultados de cada trío se realizarán diversos tipos de análisis para cubrir las diversas hipótesis acerca de la aparición de EM precoz en los casos esporádicos (aparición de variantes de novo, herencia heterocigota compuestas y herencia homocigota). El análisis de agregación de variantes raras (MAF  $< 0.05$ ) en genes y redes de regulación génica se llevará a cabo de con las herramientas *rvtest* y *GSEA*. Las variantes novedades de interés serán validadas a través de secuenciación Sanger.

**Resultados:** Para los cuatro primeros tríos se encontró una herencia autosómica recesiva, encontrándose variantes homocigotas con y sin cambio de sentido. Para los tríos cinco y seis se encontró una herencia dominante, con una variante heterocigota de novo en el trío cinco y una variante en el número de copia heterocigota de novo en el trío seis.

**Conclusiones:** Los pacientes con EM esporádica de inicio precoz tienen una mayor prevalencia de migraña que los pacientes de inicio tardío. Además, durante el análisis de citoquinas se encontró



que la migraña no está asociada a ningún perfil de citoquinas en pacientes con EM. Los niveles de citoquinas en sangre varían entre pacientes con EM, migraña y controles, lo cual podría utilizarse como herramienta diagnóstica. La EM esporádica de inicio precoz podría explicarse mediante un modelo de herencia recesivo homocigoto. Este modelo de herencia para SNV con cambio desentido se ha identificado para los genes *SH3GL1* y *LPCAT2*, mientras que para SNV sin cambio de sentido se ha identificado para los genes *RANBP9* y *ASH2L*.

# Abstract

**Introduction:** Meniere disease (MD) is a rare inner disease characterized by attacks of vertigo associated with low and medium frequency sensorineural hearing loss, and tinnitus or ear fullness. Although its etiology is unknown, its prevalence varies from 0.5 to 1 per 1000 individuals, affecting more familial cases (6-9%) than sporadic cases, which suggests a genetic contribution to MD. MD is a complex disease, with a genetic heterogeneity that is accompanied by a great diversity in the phenotype which complicates its diagnosis.

**Objective:** To identify patients with early-onset recessive inheritance MD, as well as to identify new genes that could explain the heterogeneity of the disease. In addition, early-onset sporadic MD will be identified and clinically characterized. Whole genome sequencing will be performed in threesome in which the index will be a sporadic case of MD. Analysis of genomic data will be carried out to demonstrate accumulation of rare variants in genes (homozygous or compound heterozygous).

**Methods:** This study will include a total of 6 threesome of Spanish patients with sporadic MD with early onset ( $\leq 35$  years) according to the Barany Society's Hearing and Balance Committee criteria. The DNA of the cases will be extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by extracting 12ml of venous blood. After the extraction, the DNA samples will be stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . This study will be carried out in accordance with the principles of the Helsinki Declarations of 1975 (revised in 2013) for human experimentation. Patients and controls will be informed about the study and their verbal and written consent will be required. Subsequently, the variant calling will be performed, using GATK for the realignment of the data with the GRCh27/hg19 human reference genome. Variant Call Format (VCF) files will be generated with the variants in each subject, including single nucleotide variants (SNV), insertions/deletions (INDELs), and copy number variations (CNV) and its corresponding annotation, in the population frequency reference databases (ExAC and gnomAD), and clinical characterization (ClinVar) including a pathogenicity prediction through CADD (Combined Annotation Dependent Depletion). With the results of each threesome, various type of analysis will be performed to cover the hypotheses about the appearance of early MD in sporadic cases (appearance of de novo variants, compound heterozygous inheritance, and homozygous inheritance). The gene rare variants aggregation analysis (MAF  $< 0.05$ ) and gene regulation networks will be carried out with the *rvtest* and GSEA tools. The novel variants of interest will be validated by Sanger sequencing.

**Results:** For the first four threesome, an autosomal recessive inheritance was found, finding homozygous variants with and without change of sense. For the fifth and sixth threesome, dominant inheritance was identified, with one de novo heterozygous variant in the fifth threesome, and one de novo heterozygous copy number variant in the sixth one.

**Conclusions:** Patients with early-onset sporadic MD have a higher prevalence of migraine than late-onset patients. Furthermore, cytokine analysis it was found revealed that migraine is not associated with any cytokine profile in MD patients. Cytokine levels in blood vary between patients with MD, migraine and controls. This could be used as a diagnostic tool. Early-onset sporadic MD could be explained by a homozygous recessive inheritance pattern. This inheritance model for missense SNV has been identified for *SH3GL1* and *LPCAT2* genes. Non-missense SNV has been identified for *RANBP9* and *ASH2L* genes.

# Abreviaturas

AAO-HNS	American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery
ACMG	American College of Medical Genetics
AD	Autosómico dominante
ANOVA	Analysis of Variance
AR	Autosómico recesivo
ATL	Audiometría tonal liminal
CADD	Combined Annotation Dependant Depletion
CCE	Células ciliadas externas
CCI	Células ciliadas internas
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CNV	Copy Number Variants
CSH	Canal Semicircular Horizontal
CSVS	Collaborative Spanish Variant Server
DE	Desviación estándar
DT	Desviación típica
EA	Enfermedad autoinmune
EAOI	Enfermedad autoinmune del oído interno
EAONO	European Academy of Otology and Neurotology
EM	Enfermedad de Ménière
EMA	Enfermedad de Ménière con altos niveles de citoquinas
EMB	Enfermedad de Ménière Bilateral
EMB	Enfermedad de Ménière con bajos niveles de citoquinas
EME	Enfermedad de Ménière esporádica
EMF	Enfermedad de Ménière familiar
EMIP	Enfermedad de Ménière de inicio precoz
EMIT	Enfermedad de Ménière de inicio tardío

EMU	Enfermedad de Ménière Unilateral
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FE	Fracción etiológica
GATK	Genome Analysis Toolkit
gEAR	Gene Expression Analysis Resource
gnomAD	Genome Aggregation Database
GTEx	Genotype-Tissue Expression
HE	Hidrops endolinfático
HNS	Hipoacusia neurosensorial
INDEL	Insertion–deletion mutations
MAF	Minor allele frequency
MV	Migraña vestibular
NFE	Non-Finnish European
OD	Oído derecho
OI	Oído izquierdo
OTOG	Otogelina
Pb	pares de bases
pLI	Loss-of-function Intolerant
RMN	Resonancia magnética nuclear
SE	Saco endolinfático
SNV	Single Nucleotide Variants
TFS	Tampón fosfato salino
THI	Tinnitus Handicap Inventory
VCF	Variant Call Format
vHIT	Video Head Impulse Test

# Introducción

## 1.1 El oído interno

El oído es un órgano sensorial situado en el hueso temporal. Está compuesto de tres partes (Figura 1):

- Oído externo, que incluye el pabellón auricular y el conducto auditivo externo (CAE); está separado del oído medio por la membrana timpánica.
- Oído medio, que contiene la cadena osicular (martillo, yunque y estribo).
- Oído interno, que se divide en laberinto anterior o cóclea y que contiene el órgano de Corti y laberinto posterior que incluye los canales semicirculares y el vestíbulo (Marieb and Hoehn, 2009)

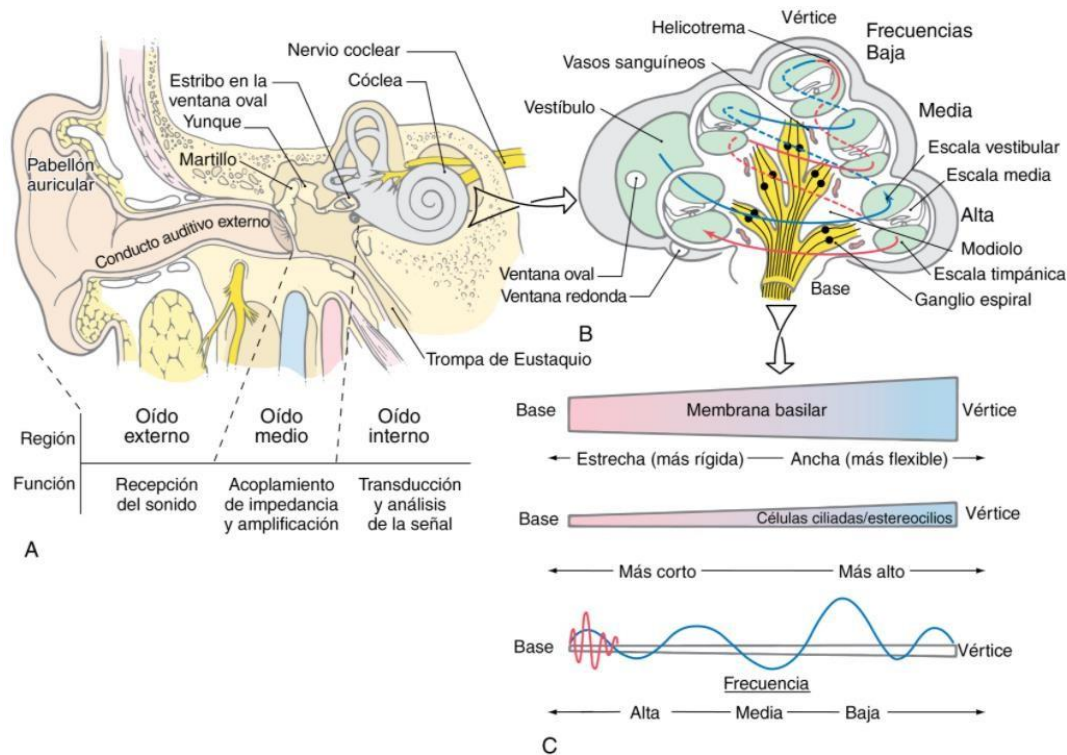


Figura 1. Anatomía del oído (Extraído de Principios de Neurociencia, Duane E. Haines, 2019).

Consta de tres estructuras principales: la cóclea, el vestíbulo y el saco endolinfático (SE). La cóclea y el vestíbulo son los órganos sensoriales periféricos que detectan el sonido y la aceleración angular / lineal, respectivamente, según el receptor sensorial involucrado, produciendo una inclinación de los estereocilios en la superficie apical de las células ciliadas vestibulares, con la consiguiente apertura de canales mecanotransductores y la entrada de iones K al interior de las células (Ohmori, 1985; Ottersen *et al.*, 1998). Por el contrario, el SE es una estructura quística, no sensorial, que no contribuye a la detección de estos estímulos. Está ubicado en el extremo distal del conducto endolinfático y se cree que cumple dos funciones: la secreción y reabsorción de endolinfa y la respuesta inmune dentro del oído interno (Rask-Andersen *et al.*, 1981; S Tomiyama, 1986).

El oído interno se puede dividir morfológicamente en dos partes: laberinto óseo y membranoso. El laberinto membranoso contiene endolinfa mientras que el laberinto óseo rodea el laberinto membranoso. La perilinfa rellena los espacios entre estas dos estructuras. La endolinfa y la perilinfa son esenciales para el correcto funcionamiento de la audición y el equilibrio (Becker, 2004)) (Figura 2). La composición de la endolinfa varía a lo largo de estas estructuras, que contienen una alta concentración de  $K^+$  y una baja concentración de  $Na^+$  en la cóclea y el sistema vestibular, mientras que las concentraciones de estos dos iones se invierten en el saco endolinfático (Marcus and Shipley, 1994; Wangemann *et al.*, 1996)

La diferencia en la concentración de iones genera un gradiente electroquímico entre ambos fluidos llamado potencial endococlear (alrededor de + 80Mv), que es esencial para el funcionamiento de las células sensoriales en el órgano de Corti (Hudspeth, 2008)

### 1.1.1 Anatomía y función de la cóclea

La cóclea humana es un conducto membranoso de 3-3,5 cm de largo que se enrolla alrededor de dos vueltas y media siguiendo un eje central llamado modiollo, donde se ubica el nervio coclear. La cóclea está envuelta por una capa ósea llamada cápsula ótica dentro del hueso temporal. El interior de la cóclea está lleno de dos fluidos, la perilinfa y la endolinfa, que quedan separados en diferentes compartimentos. La cóclea, por tanto, se divide en tres partes (Rask-Andersen *et al.*, 2012) (Figura 2):

- La escala vestibular (*scala vestibuli*), que se encuentra por encima del conducto coclear y la ventana oval y contiene perilinfa.
- La escala timpánica (*scala tympani*), que se encuentra por debajo del conducto coclear y también contiene perilinfa.
- El conducto coclear o escala media (*scala media*), que se encuentra entre los conductos anteriores y contiene el órgano de Corti. Es el único compartimiento que contiene endolinfa.

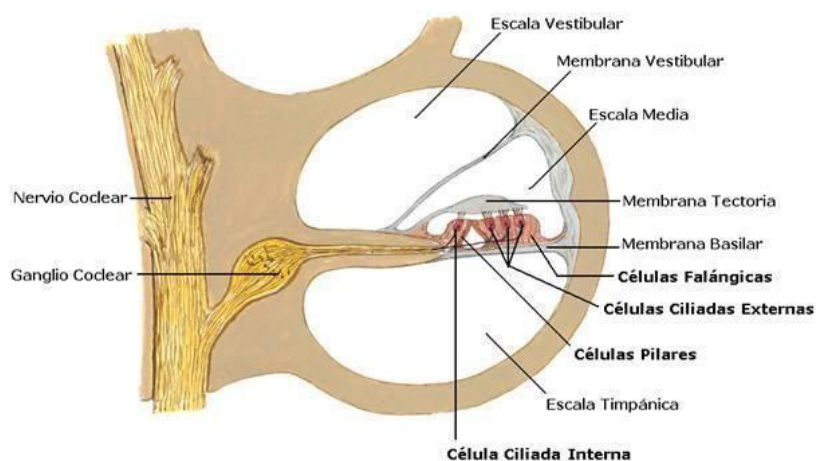


Figura 2. Anatomía de la cóclea (Extraído de Atlas de Anatomía Huhombrea, FH Netter, 2011).

La escala vestibular y timpánica se unen en el vértice de la cóclea, que se denomina helicotrema. Ambas escalas se comunican con el oído medio a través de dos discontinuidades en la capa ósea: la ventana oval,

que conecta con el oído medio y la escala vestibular y es dónde se localiza el estribo; y la ventana redonda, que se comunica con el oído medio a través de la escala timpánica. El órgano de Corti está limitado por la membrana de Reissner y la membrana basilar. La membrana basilar, a su vez, separa la escala media y la escala timpánica, y su grosor varía a lo largo de su longitud. Estos cambios de grosor hacen que la membrana basilar pueda sintonizar diferentes frecuencias, lo que se conoce como organización tonotópica de la cóclea (Ruben, 2020).

El órgano de Corti es una estructura espiral, que contiene dos tipos de células: ciliadas, células especializadas responsables de transducir las ondas sonoras en señales neuronales; y células de soporte. Las células ciliadas están organizadas en cuatro filas: una fila de células ciliadas internas (CCI) y tres filas de células ciliadas externas (CCE). Las CCE son las células ciliadas más numerosas de la cóclea y sus estereocilios están unidos a la membrana tectoria. La función principal de estas células es mejorar la sensibilidad de la audición amplificando el movimiento de la membrana basilar. Por otro lado, las CCI son los receptores, que se activan cuando sus estereocilios son desplazados por la onda viajera. Los estereocilios de las CCI no están adheridos a la membrana tectoria, lo que implica la despolarización de la fibra nerviosa aferente unida y la estimulación de la corteza auditiva como último paso (Schwander *et al.*, 2010) (Figura 3).

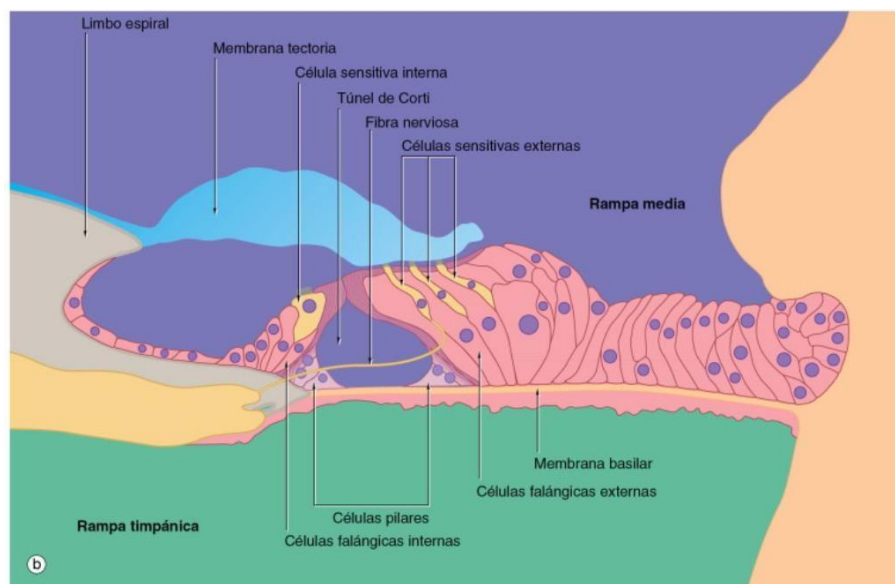


Figura 3. Órgano de Corti (Extraído de Wheater. *Histología funcional*, B. Young, 2014)

Existen varios tipos de células de soporte en el órgano de Corti: células de sostén externas (Células de Henssen), continuas a estas (de lateral hacia medial) se encuentran unas células de morfología alargada (células falángicas externas). De media hacia lateral se encuentran las células falángicas internas, las cuales se articulan con las células de los pilares (externas e internas). Estas células, son de forma piramidal y poseen una gran cantidad de filamentos de soporte. Se encuentran dispuestas en dos filas y unidas entre sí en su parte superior formando el Túnel de Corti. Estas células de sostén, sobre todo la células de los pilares y las células de Deiters contribuyen a formar la membrana reticular, que se extiende en la parte craneal del órgano de Corti por los espacios existentes entre las porciones apicales de las CCE.

### 1.1.2 Anatomía y función del sistema vestibular.

El papel principal del sistema vestibular es participar en el mantenimiento de un adecuado equilibrio. Éste es el resultado de la integración de la información sensorial que proporcionan no solo el sistema vestibular, si no también, el sistema visual y propioceptivo proveniente del tronco del encéfalo y el cerebelo.

El laberinto posterior o sistema vestibular se divide estructuralmente en cinco órganos diferentes: tres canales semicirculares y dos órganos otolíticos. Los canales semicirculares (semicircular posterior, anterior y lateral) están dispuestos en ángulo recto entre sí. Cada canal semicircular tiene una pequeña dilatación llamada ampolla que contiene células sensoriales que son sensibles a la aceleración y desaceleración angular de la cabeza y están cubiertos con una membrana gelatinosa llamada cúpula.

Los órganos otolíticos, el sáculo y el utrículo, detectan la posición cefálica y responden a la aceleración lineal. Estas estructuras contienen la mácula, un epitelio sensorial de células ciliadas cubierto por la membrana otolítica. Esta membrana contiene cientos de cristales de carbonato de calcio (otoconias) y su función es detectar aceleraciones lineales e inclinaciones de la cabeza en el plano vertical (Cha *et al.*, 2008). El sáculo está relacionado con el equilibrio y la percepción de la gravedad, y su mácula está situada horizontalmente.

Las fibras nerviosas aferentes envían estas señales a los núcleos vestibulares, quienes integran esta información con la visual para generar un reflejo vestibulo-ocular cuya finalidad es estabilizar los ojos en el campo visual (Figura 4).

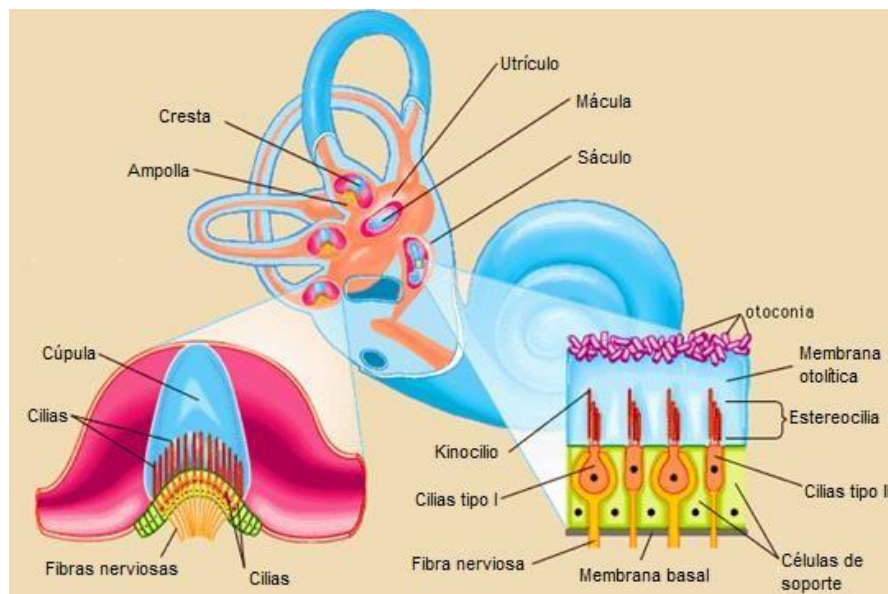


Figura 4. Sistema vestibular. (Extraído de la Enciclopedia Británica).

## 1.2 Enfermedad de Ménière.

La EM es un trastorno crónico del oído interno caracterizado por ataques espontáneos de vértigo, asociados a hipoacusia neurosensorial de baja o media frecuencia (HNS), acúfenos y sensación de plenitud



ótica (Lopez-Escamez *et al.*, 2015). En algunos pacientes también puede existir una afectación pantonal desde el inicio de la enfermedad, incluidas las altas frecuencias (Belinchon *et al.*, 2011; Espinosa-Sanchez JM, 2016). En la mayoría de los pacientes, la pérdida auditiva fluctúa al inicio de la enfermedad, particularmente en las frecuencias bajas, pero no en las altas frecuencias.

En una etapa posterior de la enfermedad, el umbral auditivo a menudo se estabiliza (Friberg *et al.*, 1984)) y la pérdida auditiva se vuelve pantonal (Herminio Perez-Garrigues 1, Jose A Lopez-Escamez, Paz Perez, Ricardo Sanz, Miguel Orts, Jaime Marco, Rafael Barona, Mari C Tapia, Ismael Aran, Carlos Cenjor, Nicolas Perez, Constantino Morera, 2015) (Tabla 1). El 74% de los pacientes considera que el síntoma que peor tolera es el vértigo, el 20% considera que es la hipoacusia y el 6% los acúfenos.

Los pacientes con EM suelen tener comorbilidades asociadas como migraña o enfermedades autoinmunes (EA) sistémicas (Caulley *et al.*, 2017; Gazquez *et al.*, 2011), lo que dificulta el diagnóstico de EM, ya que los síntomas pueden superponerse con otros trastornos vestibulares como la migraña vestibular, especialmente en los primeros años.

La sintomatología y las pruebas audiométricas son la base para el diagnóstico de esta enfermedad, ya que no se dispone de un biomarcador para la confirmación diagnóstica, excepto para la variante alélica rs4947296 (chr6: 31090401C> T), conocida por aumentar dos veces el riesgo de HNS bilateral y asociarse con EM autoinmune en la población del sur de Europa (Martín-Sierra *et al.*, 2017; Frejo *et al.*, 2017), enfermedad de Graves-Basedow de inicio temprano y la enfermedad de Behçet en la población china).

Síntomas	Fase inicial	Fase intermedia	Fase final
<b>Vértigo</b>	Ocurre de forma abrupta como un episodio persistente de vértigo	Fase intercrisis	Desaparición de los ataques de vértigo
<b>Hipoacusia</b>	Leve	Moderada y fluctuante; percibida después de los ataques de vértigo	Severa
<b>Acúfeno</b>	Simultáneo al ataque de vértigo	de Previo al ataque de vértigo	Persistente e incapacitante

Tabla 1. Historia natural de la enfermedad: síntomas y fases.

### 1.2.1 Epidemiología

Existe una gran variación en los datos sobre la incidencia (nuevos casos por año) y la prevalencia (casos en la población) de EM en la población general. Esto se debe al hecho de que el diagnóstico de EM se basa en los síntomas subjetivos informados por los pacientes. Además, estudios epidemiológicos en poblaciones de Estados Unidos, Inglaterra, África, Japón o Finlandia han revelado resultados diferentes, variando considerablemente la prevalencia de EM entre ellos. La EM parece ser más frecuente en los países europeos industrializados que en poblaciones asiáticas y africanas, con rangos alrededor de 225 casos por 100.000 individuos. Un estudio realizado en EE. UU estimó una prevalencia de EM de 195 casos por 100.000 individuos (Alexander and Harris, 2010), bastante similar a un estudio otro realizado en Reino Unido donde se estableció una prevalencia de 157 casos por 100.000 individuos.

Una investigación más amplia considerando solo las personas de ascendencia caucásica mostraron una prevalencia bastante más alta que el resto de los estudios (1-2 casos/1.000 individuos), mientras que los estudios finlandeses y japoneses detallan una prevalencia bastante menor (43 y 36 casos/100.000 individuos, respectivamente) (Shojaku, 1997; Kotimäki *et al.*, 1999). Un último estudio realizado en Cantabria sitúa la prevalencia en 75 casos por 100.000 individuos, a medio camino entre europeos y asiáticos. Las diferencias en estos resultados podrían explicarse de dos maneras: ausencia de estandarización en el diagnóstico y / o diferencias étnicas (o geográficas) entre las poblaciones estudiadas, ya que también se encuentra en otras enfermedades complejas similares. Sin embargo, tampoco se puede descartar un sesgo metodológico en la estimación de la prevalencia. Antes de 1995, la falta de estandarización en los criterios diagnósticos podría haber dado lugar a este sesgo entre las diferentes regiones. Además, la mayoría de los pacientes con EM no desarrollan todos los síntomas en las primeras etapas de la enfermedad, por lo que esto podría enmascarar y dificultar el diagnóstico.

La EM se suele diagnosticar a los 40 años, con un ligero predominio femenino, caracterizado por un curso variable de la aparición de síntomas vestibulares y cocleares que pueden no coincidir en el tiempo, pudiendo tardar años en cumplir los criterios diagnósticos de EM. La gran mayoría de los casos son esporádicos, aunque el 8% de estos pacientes presentan agregación familiar. La mayoría de las familias siguen un patrón de herencia autosómico dominante (AD), y algunos de ellos presentan anticipación genética, fenómeno en el que los síntomas tienden a aparecer a una edad más temprana en generaciones consecutivas ( Requena *et al.*, 2014).

## **1.2.2 Fisiopatología**

Según los hallazgos histopatológicos en huesos temporales de pacientes con EM, el trastorno se ha relacionado con la acumulación de endolinfa en el conducto coclear (hidropesía endolinfática). Sobre esta base, la EM se considera una enfermedad compleja en la que múltiples factores, como la genética, la autoinflamación, la autoinmunidad y la alergia podrían estar interactuando, dando lugar a dicha hidropesía endolinfática (Semaan *et al.*, 2005).

### **1.2.2.1 Hidrops endolinfático**

En condiciones normales, la endolinfa se produce en la estría vascular y se reabsorbe lentamente en el conducto y el saco endolinfáticos. En la EM, esta absorción es deficiente, causando hidrops endolinfático (HE) y dilatación de la membrana de Reissner. La ruptura de esta membrana podría explicar, en parte, los síntomas de la EM. Sin embargo, según una revisión de huesos temporales humanos con EM, en dos tercios de los pacientes no hay evidencia de ruptura de dicha membrana (Paparella and Djalilian, 2002)

El HE implica cambios moleculares y estrés celular en el oído interno. Además, se conoce que los pacientes con EM tienen la apófisis mastoides de menor tamaño, así como el acueducto vestibular. Algunas poblaciones celulares también se ven afectadas tanto en número (pérdida de células ciliadas) como en función (células de soporte defectuosas y atrofia de la membrana tectorial) (Yoda *et al.*, 2011). Así mismo, existe una pérdida de neuronas que inervan las células ciliadas del órgano de Corti y de neuronas del ganglio espiral (R Momin *et al.*, 2009), lo cual podría estar provocando la posterior pérdida de células ciliadas internas. Sin embargo, no hay evidencia de que una pérdida mayor de células ciliadas pueda ocasionar un HE más severo (R Momin *et al.*, 2009). Esto abre el camino a nuevas hipótesis donde otros

factores, como la predisposición genética, infecciones virales, factores dietéticos, enfermedades autoinmunes, respuestas alérgicas o irregularidades vasculares podrían jugar un papel importante en el desarrollo de la EM.

## **1.2.3 Clínica**

### **1.2.3.1 Vértigo**

El vértigo se experimenta como un episodio de giro de objetos externo o interno con presencia de un nistagmo de características periféricas. Estos ataques no están asociados con una disminución del nivel de conciencia. Los ataques de vértigo varían en duración, desde los 20 minutos hasta varias horas. Entre el 35 y el 65% de los pacientes presentan episodios agudos de vértigo de aparición súbita (Paparella MM, da Costa SS, Fox R, 1991; Strupp and Brandt, 2008).

El episodio puede estar precedido por un acúfeno ipsilateral de baja frecuencia. Se desconoce la etiología de los episodios de vértigo, pero la hipótesis más extendida es que las crisis se producen por cambios en la presión de la endolinfa, rotura del laberinto membranoso o cambios bruscos en la composición de la endolinfa que irritan los epitelios sensoriales del sáculo, utrículo y canales semicirculares. Una destrucción progresiva de los receptores vestibulares y la pérdida de neuronas vestibulares podrían explicar la disminución y desaparición de los episodios de vértigo durante la progresión de la enfermedad. Sin embargo, es difícil predecir una crisis ya que muestran un patrón irregular y variable (Sajjadi and Paparella, 2008).

### **1.2.3.2 Hipoacusia neurosensorial**

La HNS es uno de los síntomas más estables en la EM. La hipoacusia puede ser uni o bilateral (House *et al.*, 2006; Lopez-Escamez *et al.*, 2009) y puede ser rápidamente progresiva (semanas o meses) o lentamente progresiva (años), que es la forma de presentación más común. Inicialmente, la hipoacusia y el vértigo pueden concurrir, con una fluctuación de los rangos tonales en los primeros años. Sin embargo, algunos pacientes pueden mostrar sólo vértigo episódico o hipoacusia (EM tardía) (Kamei, 2004) con acúfenos, y posteriormente el resto de los síntomas pueden aparecer simultáneamente. A medida que la enfermedad progresa empeora la hipoacusia, llegando en algunos casos a una sordera profunda. La pérdida auditiva se diagnostica mediante audiometría tonal liminal, requiriéndose audiometrías posteriores para diferenciar la EM de otras enfermedades del oído interno (Müller and Barr-Gillespie, 2015) y para estudiar la progresión de la enfermedad (House *et al.*, 2006).

### **1.2.3.3 Acúfenos**

El acúfeno se define como la percepción de un sonido dentro del oído en ausencia de un sonido real (Baguley *et al.*, 2016; McCormack *et al.*, 2016). En la mayor parte de los casos, la intensidad del acúfeno aumenta durante los ataques de vértigo o ante un empeoramiento de la hipoacusia. En el transcurso de la enfermedad, el acúfeno se convierte en un síntoma incesante y muy incapacitante, que asociado a la pérdida auditiva dificulta la comprensión del habla y puede convertirse en el síntoma más molesto de la enfermedad a largo plazo.

### **1.2.3.4 Plenitud ótica**

La plenitud ótica se percibe como una sensación de taponamiento ótico y presión en el oído, esta sensación puede ser constante y su intensidad puede aumentar durante los ataques de vértigo.

### 1.2.3.5 Crisis de Tumarkin

Con el tiempo hay pacientes que padecen crisis otolíticas de Tumarkin, consistentes en sensación súbita de vértigo fuerte con posible caída al suelo. Ceden en segundos y el paciente se recupera en un breve periodo de tiempo. El origen de estas crisis parece ser la afectación de los órganos otolíticos.

### 1.2.4 Diagnóstico y clasificación

El diagnóstico de la EM no es sencillo debido a que los síntomas vértigo, acúfenos e hipoacusia neurosensorial no aparecen simultáneamente en todas las crisis, y esto dificulta el diagnóstico hasta que el paciente no ha presentado varias crisis. Esto llevó a la publicación de los primeros criterios de diagnóstico para la EM por la Academia Estadounidense de Otorrinolaringología y Cirugía de cabeza y cuello (AAO-HNS) en 1995 (“Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Menière’s disease. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc,” 1995) que fue revisada conjuntamente en 2015 por el Comité de Clasificación de la Sociedad Bárány, la Sociedad Japonesa para la Investigación del Equilibrio, la Academia Europea de Otolología y Neurotología, la AAO-HNS y la Sociedad del equilibrio coreana (Lopez-Escamez *et al.*, 2015).

A diferencia de otras enfermedades, el criterio diagnóstico de la EM está basado únicamente en los síntomas durante los ataques, sin considerar ningún marcador biológico o hallazgos en la resonancia magnética nuclear (Tabla 2).

Síntomas	EM definida	EM probable
Vértigo	1 o más episodios de vértigo de 12 min a 12h	2 o más episodios de vértigo de 12 min a 24h
Hipoacusia	HNS, audiométricamente comprobada, de bajas-medias frecuencias en el oído afectado durante o después de un episodio de vértigo	
Acúfenos/ Plenitud ótica	Síntomas auditivos fluctuantes	Síntomas auditivos fluctuantes
Otros	No explicado por otra enfermedad vestibular	No explicado por otra enfermedad vestibular

Tabla 2. Criterios diagnósticos definidos por la Sociedad Barany.

La EM puede presentar una superposición de síntomas con otros trastornos, lo que complica aún más el diagnóstico de la enfermedad. Los más comunes son la migraña vestibular (MV) y la enfermedad autoinmune del oído interno (EAOI) (Gazquez *et al.*, 2011; Liu and Xu, 2016).

La MV es una causa común de episodios de vértigo donde los síntomas vestibulares se superponen con la migraña. La EAOI se caracteriza por episodios de HNS bilateral brusca o progresiva. La hipoacusia de estos

pacientes inicialmente fluctúa por lo que podría confundirse con la EM. Flook *et al.* describieron un método basado en el nivel de citoquinas proinflamatorias a nivel periférico para diferenciar a los pacientes con MV de aquellos con EM en la capacidad de las citoquinas para diferenciar la MV de dos subgrupos de la EM en base a los niveles de sustancias proinflamatorias (Flook *et al.*, 2019).

Han sido establecidos cinco subgrupos de pacientes con EM unilateral y bilateral según varias variables clínicas (Tabla 3) (Frejo *et al.*, 2017, 2016)

Subgrupo	Frecuencia	Definición
1	46%	HNS metacrónica sin migraña y sin EA
2	17%	HNS sincrónica sin migraña y sin EA
3	13%	EM familiar
4	12%	Asociado a migraña
5	11%	Asociado a EA

Tabla 3. Subgrupos en la EM.

## 1.2.5 Tratamiento

El exceso de terapias médicas y quirúrgicas existentes para la EM nos indica que no se dispone de un tratamiento eficaz para estos pacientes. Sin embargo, la mayoría se benefician de una combinación de cambios en el estilo de vida y de dieta, asesoramiento psicológico y apoyo por parte de las organizaciones de pacientes (Perez-Carpena and Lopez-Escamez, 2020; Sajjadi and Paparella, 2008).

### 1.2.5.1 Cambios en el estilo de vida

Se debe recomendar a todos los pacientes con EM una reducción en la ingesta de sal a un máximo de 1,5-2 g/día. También se deben evitar productos con cafeína, la ingesta de chocolate, consumo de alcohol y tabaco. En 1934, Furstenberg mostró la relación entre la retención de sodio y la EM, y recomendó una reducción sustancial en la ingesta de sodio. Además, existe una asociación con la alergia estacional, por lo que podría esperarse una mejora en la calidad de vida de los pacientes con EM que se encuentren bajo tratamiento de esta. De hecho, la evitación de la misma podría mejorar la calidad de vida los pacientes con EM. Algunos estudios han informado una reducción significativa (hasta de un 62%) tanto de la frecuencia como de la gravedad de los ataques de vértigo en pacientes con EM después del inicio de la inmunoterapia para las alergias (Derebery, 2011).

### 1.2.5.2 Cirugía

La cirugía en pacientes con EM es infrecuente debido a su dudosa efectividad (Kim *et al.*, 2005). Sin embargo, han sido descritas diferentes técnicas quirúrgicas cuando fracasan los tratamientos previos como la cirugía del saco endolinfático, la laberintectomía o la neurectomía vestibular.

### **1.2.5.3 Tratamiento farmacológico**

#### **1.2.5.3.1 Diuréticos**

Regulan la homeostasis del oído interno, evitando la sobrecarga de líquidos, por ello, los niveles de electrolitos deben controlarse para evitar sus consecuencias. No obstante, estudios recientes han sugerido que no hay relación entre el uso de diuréticos y la EM (Thirlwall AS, 2006).

#### **1.2.5.3.2 Corticoides**

Consiste en la administración intratimpánica de prednisona o dexametasona. Lo más habitual es la administración de tres dosis a lo largo de varios días. Con esto se intenta no solo tratar el episodio agudo sino también disminuir en frecuencia y gravedad las futuras crisis.

#### **1.2.5.3.3 Gentamicina**

Consiste en la administración intratimpánica de gentamicina. La gentamicina es ototóxica, causando un daño directo tanto al epitelio neurosensorial como a las células del laberinto y afectando tanto la función vestibular como la coclear. Por lo tanto, es un tratamiento destructivo, que se basa en el efecto ototóxico dosis-dependiente, que sólo debería utilizarse cuando el vértigo es intratable. El efecto sobre la audición es bajo y se produce una discapacidad auditiva a largo plazo en el 16% de los pacientes (Martin and Perez, 2003).

## **1.3 Bases moleculares de genética humana.**

La información genética elemental se guarda en especies vivas como ácido desoxirribonucleico (ADN). Esta molécula fue descubierta en 1869 por Friedrich Miescher (Dahm, 2008), fue identificada como material hereditario por Avery, MacLeod y McCarty (Avery *et al.*, 1944), y su estructura fue deducida por Watson y Crick como una doble hélice (Watson and Crick, 1953).

El ADN consta de dos hebras complementarias formadas por la combinación de cuatro nucleótidos: adenina (A) que se une a timina (T) y citosina (C) que se une a guanina (G). Esta molécula está extremadamente condensada dentro del núcleo de las células, formando un total de 46 cromosomas (23 pares de cromosomas; genoma diploide) como se concluyó en 1956 (Tijo JH and Levan Albert, 1956). De ellos, 22 pares de cromosomas son autosomas y un par cromosomas sexuales.

Un hito en genética fue el desarrollo de métodos de secuenciación de ADN en 1977. Fue debido a este avance que fue posible identificar las primeras variantes genéticas (cambio permanente en la secuencia de bases del ADN que forma un gen) a nivel de ADN (Sanger *et al.*, 1977). Sin embargo, el análisis del ADN también necesitaba una secuencia de referencia, una secuencia de ADN de consenso para comparar con otra secuencia de ADN dada. Con este objetivo, secuenciar los 3 mil millones de nucleótidos en el genoma humano, nació el Proyecto Genoma Humano (HGP) en 1990, financiado principalmente por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (Watson, 1990). En abril de 2003 se publicó el resultado de este

proyecto, con unos 3.200 millones de pares de bases (pb) secuenciados que codifican los 18.500-20.000 genes en la especie humana (Collins *et al.*, 2003).

Las regiones del ADN que contienen información para codificar proteínas son los exones, por el contrario, los genes también contienen regiones no codificantes llamadas intrones. Las regiones intergénicas, sin embargo, se han descrito como zonas potencialmente reguladoras. Las regiones no codificantes representan casi el 99% del genoma humano y son responsables de modificar la expresión génica.

### **1.3.1 De genes a proteínas**

La información de las cadenas de ADN está codificada por un conjunto de reglas llamadas código genético. El código genético es común a la mayoría de las especies, pero difiere en algunas especies de bacterias y hongos. El proceso para obtener una proteína a partir de una secuencia de ADN se lleva a cabo en dos pasos conocidos: la transcripción, donde el ADN se transcribe a una molécula de ARNm (ARN mensajero), y la traducción, donde este ARNm se lee y se traduce a proteína. En ambos intervienen diferentes proteínas reguladoras, que actúan como pruebas de control para evitar la generación de errores (Griffiths *et al.*, 2000).

El ARNm se puede leer de 6 formas diferentes, según el sentido y el marco de lectura. El marco de lectura representa cómo la traducción dividirá la información del ADN según el conjunto de tres nucleótidos consecutivos y no superpuestos llamados codones. La combinación de tres bases en el ARNm crea un codón, y cada codón codifica para un aminoácido. Dado que hay 4 bases en el ARNm, hay 64 codones posibles para un total de 20 aminoácidos diferentes.

Además del gran conjunto de posibilidades, existe redundancia en este código, lo que significa que algunos codones traducen el mismo aminoácido. Los codones más importantes incluyen el codón AUG, o codón de inicio único, y los tres codones de parada o codones STOP. Estos codones marcan el comienzo y el final de la traducción. Mientras que el codón de inicio codifica para una metionina, los tres codones de parada no codifican para ningún aminoácido.

### **1.3.2 Variación genética**

Una variante es una alteración en la secuencia de ADN. Estos cambios en el ADN ocurren de forma natural durante la división celular y posterior replicación del ADN, siendo la principal fuente de variación genética. Se estima que la maquinaria de replicación inserta uno o varios nucleótidos incorrectos en la secuencia de ADN durante la replicación (Kunkel, 2008) (Figura 5).

La mayoría de estos cambios se restauran mediante los mecanismos de reparación del ADN, gracias al reconocimiento de nucleótidos desapareados. Sin embargo, algunos de estos errores escapan a estos procesos, pasando a las células de la próxima generación, y convirtiéndose así en mutaciones permanentes. Si las células afectadas son gametos, las variantes se transmitirán de los progenitores a los sucesores.

#### **1.3.2.1 Single nucleotide variants (SNVs)**

Las variantes de un solo nucleótido (SNV) son cambios en la secuencia de ADN que ocurre cuando se altera un solo nucleótido (adenina, timina, citosina o guanina) en la secuencia del genoma. Cuando se compara una variante con una población de referencia, podemos discernir su frecuencia.



Básicamente, las variantes se dividen en dos grupos según su frecuencia: a) variantes comunes, cuando su frecuencia es superior al 5% de la población; y b) variantes raras, cuando su frecuencia es menos del 5% de la población.

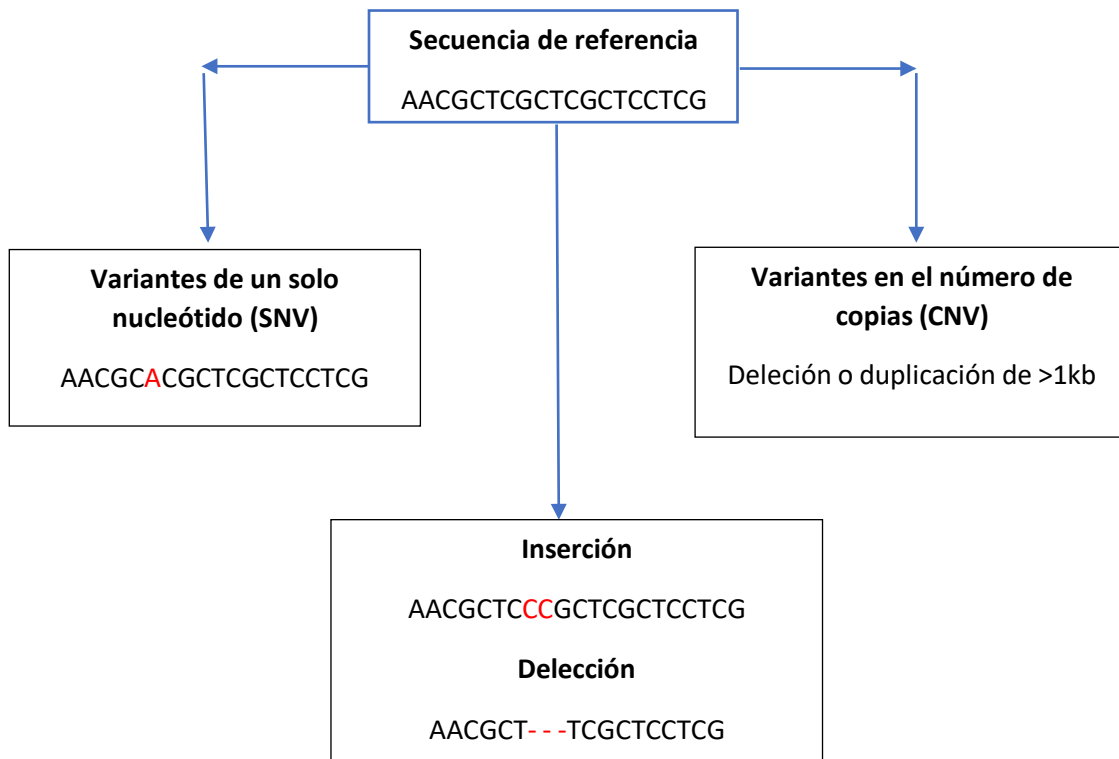


Figura 5. Tipo de variantes encontradas en el genoma humano.

Funcionalmente, las SNV se puede dividir en diferentes categorías:

**Variantes codificantes.** Son aquellas variantes localizadas en regiones codificantes. Dentro de las variantes codificantes podemos encontrar las variantes no sinónimas y las variantes sinónimos, dependiendo de si la variante involucrada da como resultado un cambio de codón en el aminoácido traducido o no, respectivamente. El código genético es redundante, lo que significa que un mismo aminoácido puede ser codificado por múltiples codones. Por lo tanto, un SNV puede provocar un cambio en la secuencia de ADN, pero el nuevo codón resultante sigue codificando el mismo aminoácido. Si eso no sucede, el aminoácido codificado cambiará, existiendo la posibilidad de que este cambio conduzca a la pérdida del codón STOP original (*stop loss*) o la aparición de uno prematuro (*stop gain*), ambos tipos denominados variantes sin sentido.

**Variantes no codificantes.** Son aquellas variantes que afectan a las regiones no codificantes. Se desconoce su importancia, pero son fuente de estudio hoy en día en la investigación genómica.

**Inserciones y deleciones (INDELs).** Son pequeñas regiones del genoma que faltan o aparecen en algún lugar diferente a la región normal en el genoma de referencia. Los INDELs oscilan entre 1 y 1.000 pb Nacional (Human Genome Research Institute). Según su efecto sobre el marco de lectura durante la traducción, se diferencian INDELs con desplazamiento de la pauta de lectura e INDELs sin desplazamiento de la pauta de lectura. Ambos tipos de INDELs pueden suponer diferentes problemas a la traducción de la proteína entera, alterando su integridad y estructura.

**Variantes estructurales (SVs).** Las variantes estructurales suelen ser alteraciones genómicas más grandes de 1000pb. Están poco estudiados; sin embargo, se consideran tan importantes como los INDELS para el desarrollo de una enfermedad.

**Variantes en el número de copias (CNVs).** Las variaciones en el número de copias son las variantes estructurales más estudiadas. Pueden suponer tanto ganancia como pérdida de copias y son las responsables de la variación fenotípica interindividual.

**Inversiones y otras variantes estructurales.** Las inversiones son regiones del ADN que aparecen invertidas con respecto al resto del genoma. Suelen aparecer como subproductos de recombinación. Las traslocaciones son el resultado de la transferencia de una secuencia del ADN de una región a otra que no implican pérdida o ganancia de nucleótidos.

### 1.3.2.2 Variantes patogénicas.

La capacidad de distinguir entre variantes benignas y patógenas es clave para obtener resultados relevantes en los estudios genéticos. En consecuencia, se han desarrollado múltiples algoritmos predictivos para evaluar la patogenicidad de las variantes genéticas. Los algoritmos utilizados son el algoritmo de agotamiento dependiente de anotaciones combinadas (CADD: *Combined Annotation Dependent Depletion*) (Rentzsch *et al.*, 2019), el algoritmo SIFT (SIFT: *Sorting Intolerant From Tolerant*) (Sim *et al.*, 2012) y el algoritmo Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2) (Adzhubei *et al.*, 2013). En 2015 se publicaron unas directrices para la interpretación de variantes de secuencia por el Colegio Americano de Medicina Genética (ACMG) y la Asociación de Patología Molecular (AMP), que se utiliza hoy en día como *gold standard* para la interpretación de variantes (Richards *et al.*, 2015). Estos criterios permiten clasificar las variantes en cinco categorías: patógenas, probablemente patógenas, de significado incierto, probablemente benignas y benignas (Tabla 4).

Además, otros estudios han propuesto el uso de la fracción etiológica (FE) para evaluar la patogenicidad de variantes raras en las pruebas de carga genética (referencia). La FE proporciona una estimación cuantitativa de las variantes raras que son causantes de la enfermedad según la ubicación, el gen y la clasificación de variantes (Tabla 5).

	BENIGNO			PATOGENICO		
	Fuerte	Secundario	Secundario	Moderado	Fuerte	Muy fuerte
<b>Base de datos poblacional</b>	La frecuencia del alelo menos común (MAF) es demasiado alta para enfermedad u observación en controles asintomáticos con penetrancia genética.			Ausente en base de datos poblacional	Prevalencia en afectados estadísticamente aumentado sobre controles	
<b>Base de datos computacionales y predictivos</b>	Las evidencias computacionales sugieren que no existe impacto en genes/productos genéticos.		Las evidencias computacionales sugieren efectos deletéreos en genes/productos genéticos.	Cambio sin sentido nuevo en un aminoácido residual donde un cambio sin sentido patológico ha sido reconocido previamente. Cambio de longitud en una proteína.	El cambio del mismo aminoácido se ha establecido como variante patológica. Variante nula en un gen donde LOF (loss of function) es un mecanismo conocido de enfermedad.	
<b>Base de datos funcionales</b>	Estudios funcionales bien establecido no han mostrado efecto deletéreo.		Mutación con cambio de sentido con baja tasa de variantes sin sentido benignas y variantes sin sentido patológicas comunes.	Puntos calientes de mutación (Hot spot) o dominios funcionales bien estudiados sin variación benigna.	Estudios funcionales bien establecidos muestran un efecto deletéreo.	
<b>Base de datos de segregación</b>	No segregación con enfermedad.		Co-segregación con enfermedad en múltiples familiares afectados.	Co-segregación con enfermedad en múltiples familiares afectados (aumento de datos).	Co-segregación con enfermedad en múltiples familiares afectados (aumento de datos).	
<b>Base de datos 'de novo'</b>				De novo sin paternidad o maternidad confirmada.	De novo con paternidad o maternidad confirmada.	
<b>Base de datos 'alélicos'</b>	Observado en trans con variante dominante u observada en cis con una variante patológica.			Detectada en trans con una variante patológica en enfermedades recesivas.		
<b>Otras bases de datos</b>	Fuente de confianza con o sin datos compartidos =benigno		Fuente de confianza donde la variante es patológica.			
<b>Otros datos</b>	Encontrado en un caso con una causa alternativa de la enfermedad.		El fenotipo del paciente es altamente específico para el gen.			

Tabla 4. Guía para interpretación de variantes por la ACMG y AMP (extraído y adaptado de Richards et al. 2015).

Guía actual ACMG/AMP			
Patogenicidad			
Secundario	Moderado	Fuerte	Muy fuerte
Error en el gen con baja tasa de benignidad, variantes sin sentido y errores patógenos comunes.	Punto caliente mutacional o dominio funcional bien definido sin variación benigna		

Guía ACMG/AMP adaptada propuesta			
Patogenicidad			
Secundario	Moderado	Fuerte	Muy fuerte
Variante no truncada en gen o región proteica con $0.8 \leq EF < 0.9$	Variante no truncada en gen o región proteica con $0.9 \leq EF < 0.95$	Variante no truncada en gen o región proteica con $EF \geq 0.95$	

Tabla 5. Adaptación de las guías ACMG / AMP para patogenicidad y fracción etiológica.

## 1.4 Genética de la hipoacusia y la enfermedad de Ménière.

Hasta la fecha, se han relacionado 119 genes con hipoacusia no sindrómica (es decir, discapacidad auditiva sin anomalías reconocidas), lo que indica una gran heterogeneidad genética (Van Camp G., 2018). Aunque la etiología de la hipoacusia es muy heterogénea, se estima que en la mitad de los casos su origen es genético (Tal Koffler, 2015). Se han descrito patrones que generalmente son más graves cuando se hereda de una manera recesiva. Las variantes patogénicas en el gen que codifica la conexina 26 (GJB2) son la causa más común de hipoacusia con herencia autosómica recesiva grave (Sloan-Heggen *et al.*, 2016)

El patrón de herencia autosómica dominante también se puede observar en la hipoacusia neurosensorial no sindrómica, existiendo 47 genes relacionados con esta condición (Tabla 6), que se caracteriza principalmente por ser una hipoacusia post-lingual (inicio igual o mayor a 20 años) y progresiva (Petersen, 2002).

Gen	Posición	Fenotipo	Referencia
<b>ESPN</b>	chr1:6,484,848-6,521,430	<b>DFNB36</b>	(Naz et al., 2004)
<b>IFNLR1</b>	chr1:24,480,647-24,514,449	<b>DFNA2C</b>	(Gao et al., 2018)
<b>GJB3</b>	chr1:35,246,790-35,251,970	<b>DFNA2B</b>	(Xia. et al., 1998)
<b>KCNQ4</b>	chr1:41,249,684-41,306,124	<b>DFNA2A</b>	(Coucke et al., 1999)
<b>BSND</b>	chr1:55,464,606-55,476,556	<b>DFNB73</b>	(Riazuddin et al., 2009)

<b>ROR1</b>	chr1:64,239,690-64,647,181	<b>DFNB108</b>	(Diaz-Horta et al., 2016)
<b>CDC14A</b>	chr1:100,810,584-100,985,833	<b>DFNB32</b>	(Delmaghani et al., 2016; Imtiaz et al., 2014)
<b>COL11A1</b>	chr1:103,342,023-103,574,052	<b>DFNA37</b>	(Booth et al., n.d.)
<b>GPSM2</b>	chr1:109,417,972-109,477,167	<b>DFNB82</b>	(Walsh et al., 2010b)
<b>LMX1A</b>	chr1:165,171,104-165,325,952	<b>DFNA7</b>	(Wesdorp et al., 2018a)
<b>NLRP3</b>	chr1:247,579,458-247,612,410	<b>DFNA34</b>	(Nakanishi et al., 2017)
<b>OTOF</b>	chr2:26,680,071-26,781,566	<b>DFNB9</b>	(Yasunaga et al., 2000)
<b>PNPT1</b>	chr2:55,861,198-55,921,045	<b>DFNB70</b>	(von Ameln et al., 2012)
<b>ELMOD3</b>	chr2:85,581,517-85,618,875	<b>DFNB88</b>	(Jaworek et al., 2013)
<b>PJVK</b>	chr2:179,316,163-179,326,117	<b>DFNB59</b>	(Delmaghani et al., 2006)
<b>TMIE</b>	chr3:46,742,823-46,752,413	<b>DFNB6</b>	(Naz et al., 2002)
<b>ILDR1</b>	chr3:121,706,170-121,741,127	<b>DFNB42</b>	(Borck et al., 2011)
<b>MCM2</b>	chr3:127,317,066-127,341,279	<b>DFNA70</b>	(Gao et al., 2015)
<b>CCDC50</b>	chr3:191,046,866-191,116,459	<b>DFNA344</b>	(Modamio-Høybjør et al., 2007)
<b>WFS1</b>	chr4:6,271,576-6,304,992	<b>DFNA6</b>	(Cryns et al., 2002; Fukuoka et al., 2007)
<b>GRXCR1</b>	chr4:42,895,283-43,032,675	<b>DFNB25</b>	(Schraders et al., 2010)
<b>REST</b>	chr4:57,774,042-57,802,010	<b>DFNA27</b>	(Nakano et al., 2018)
<b>GAB1</b>	chr4:144,257,915-144,395,721	<b>DFNB26</b>	(Yousaf et al., 2018)
<b>MARVELD 2</b>	chr5:68,710,939-68,740,157	<b>DFNB49</b>	(Kamitani et al., 2015)
<b>BDP1</b>	chr5:70,751,442-70,863,649	<b>DFNB112</b>	(Giroto et al., 2013)
<b>PPIP5K2</b>	chr5:102,455,853-102,548,500	<b>DFNB100</b>	(Yousaf et al., 2018)
<b>SLC22A4</b>	chr5:131,630,136-131,679,899	<b>DFNB60</b>	(Ben Said et al., 2016)
<b>DIAPH1</b>	chr5:140,894,583-140,998,622	<b>DFNA1</b>	(Thoenes et al., 2015)
<b>GRXCR2</b>	chr5:145,239,296-145,252,531	<b>DFNB101</b>	(Imtiaz et al., 2014)
<b>POU4F3</b>	chr5:145,718,587-145,720,083	<b>DFNA15</b>	(Collin et al., 2008a)
<b>SERPINB6</b>	chr6:2,948,393-2,972,399	<b>DFNB91</b>	(Sirmaci et al., 2010)
<b>DCDC2</b>	chr6:24,171,983-24,383,520	<b>DFNB66</b>	(Grati et al., 2015)
<b>RIPOR2</b>	chr6:24,797,601-25,042,238	<b>DFNB104</b>	(Diaz-Horta et al., 2014)
<b>COL11A2</b>	chr6:33,130,458-33,160,276	<b>DFNA13</b>	(McGuirt et al., 1999)
<b>LHFPL5</b>	chr6:35,773,070-35,801,651	<b>DFNB67</b>	(Kalay et al., 2006)

<b>CLIC5</b>	chr6:45,866,188-46,048,132	<b>DFNB103</b>	(Gagnon et al., 2006)
<b>MYO6</b>	chr6:76,458,909-76,629,254	<b>DFNA22</b>	(Melchionda et al., 2001)
<b>CD164</b>	chr6:109,687,717-109,703,762	<b>DFNA66</b>	(Nyegaard et al., 2015)
<b>EYA4</b>	chr6:133,561,736-133,853,258	<b>DFNA10</b>	(Makishima et al., 2007)
<b>GSDME</b>	chr7:24,737,972-24,809,244	<b>DFNA5</b>	(Van Laer et al., 1998)
<b>PDE1C</b>	chr7:31,790,793-32,338,941	<b>DFNA74</b>	(Wang et al., 2018)
<b>ADCY1</b>	chr7:45,613,739-45,762,715	<b>DFNB44</b>	(Rehman et al., 2014)
<b>HGF</b>	chr7:81,328,322-81,399,754	<b>DFNB39</b>	(Schultz et al., 2009)
<b>TRRAP</b>	chr7:98,475,556-98,610,866	<b>DFNA</b>	(Xia et al., 2019)
<b>SLC26A5</b>	chr7:102,993,177-103,086,624	<b>DFNB61</b>	(Liu et al., 2003)
<b>SLC26A4</b>	chr7:107,301,080-107,358,254	<b>DFNB4</b>	(Yang et al., 2009)
<b>MET</b>	chr7:116,312,444-116,438,440	<b>DFNB97</b>	(Mujtaba et al., 2015)
<b>MIRN96</b>	chr7:129,414,532-129,414,609	<b>DFNA50</b>	(Mencia et al., 2009)
<b>ESRP1</b>	chr8:95,653,302-95,719,694	<b>DFNB109</b>	(Rohacek et al., 2017)
<b>GRHL2</b>	chr8:102,504,660-102,681,954	<b>DFNA28</b>	(Vona et al., 2013)
<b>TJP2</b>	chr9:71,736,209-71,870,124	<b>DFNA51</b>	(Walsh et al., 2010a)
<b>TMC1</b>	chr9:75,136,717-75,451,267	<b>DFNB7</b>	(Hilgert et al., 2008)
<b>WHRN</b>	chr9:117,164,360-117,267,736	<b>DFNB31</b>	(Mburu et al., 2003)
<b>TNC</b>	chr9:117,782,805-117,880,536	<b>DFNA56</b>	(Zhao et al., 2013)
<b>TPRN</b>	chr9:140,086,069-140,098,645	<b>DFNB79</b>	(Li et al., 2010; Rehman et al., 2011)
<b>MYO3A</b>	chr10:26,223,002-26,501,465	<b>DFNB30</b>	(Walsh et al., 2002)
<b>PCDH15</b>	chr10:55,562,531-57,387,702	<b>DFNB23</b>	(Ahmed et al., 2003)
<b>CDH23</b>	chr10:73,156,691-73,575,704	<b>DFNB12</b>	(Bork et al., 2001)
<b>C10orf105</b>	chr10:73,471,458-73,497,581	<b>DFNB12</b>	(Bork et al., 2001)
<b>PDZD7</b>	chr10:102,767,440-102,790,914	<b>DFNB57</b>	(Vona et al., 2016)
<b>EPS8L2</b>	chr11:694,438-727,727	<b>DFNB106</b>	(Dahmani et al., 2015)
<b>USH1C</b>	chr11:17,515,442-17,565,963	<b>DFNB18A</b>	(Avan et al., 2019)
<b>OTOG</b>	chr11:17,568,920-17,668,697	<b>DFNB18B</b>	(Schraders et al., 2012)
<b>CABP2</b>	chr11:67,286,383-67,290,899	<b>DFNB93</b>	(Schrauwen et al., 2012)
<b>LRTOMT</b>	chr11:71,791,377-71,821,828	<b>DFNB63</b>	(Ahmed et al., 2008)
<b>ANAPC15</b>	chr11:71,817,424-71,823,826	<b>DFNB63</b>	(Ahmed et al., 2008)

<b>MYO7A</b>	chr11:76,839,310-76,926,286	<b>DFNA11A</b>	(Tamagawa et al., 1996)
<b>NARS2</b>	chr11:78,147,007-78,285,919	<b>DFNB94</b>	(Simon et al., 2015)
<b>RDX</b>	chr11:110,045,605-110,167,447	<b>DFNB24</b>	(Khan et al., 2007)
<b>MPZL2</b>	chr11:118,124,118-118,135,251	<b>DFNB111</b>	(Wesdorp et al., 2018b)
<b>TECTA</b>	chr11:120,971,882-121,062,202	<b>DFNA8</b>	(Plantinga et al., 2006)
<b>EPS8</b>	chr12:15,773,075-16,035,263	<b>DFNB102</b>	(Behlouli et al., 2014)
<b>MSRB3</b>	chr12:65,672,423-65,882,024	<b>DFNB74</b>	(Ahmed et al., 2011; Schultz et al., 2009)
<b>OTOGL</b>	chr12:80,603,233-80,772,870	<b>DFNB84B</b>	(Yariz et al., 2012)
<b>PTPRQ</b>	chr12:80,799,774-81,073,968	<b>DFNB84</b>	(Schraders et al., 2010b)
<b>KITLG</b>	chr12:88,886,570-88,974,628	<b>DFNA69</b>	(Zazo Seco et al., 2015)
<b>SLC17A8</b>	chr12:100,750,857-100,815,837	<b>DFNA25</b>	(Greene et al., 2001)
<b>DIABLO</b>	chr12:122,692,209-122,712,081	<b>DFNA64</b>	(Cheng et al., 2011)
<b>P2RX2</b>	chr12:133,195,366-133,198,972	<b>DFNA41</b>	(Faletra et al., 2014)
<b>d</b>	chr13:20,761,602-20,767,114	<b>DFNA3A</b>	(Tamagawa et al., 1996)
<b>GJB6</b>	chr13:20,796,101-20,806,534	<b>DFNA3B</b>	(Grifa et al., 1999)
<b>COCH</b>	chr14:31,343,720-31,364,271	<b>DFNA9</b>	(JanssensdeVarebeke et al., 2018)
<b>SIX1</b>	chr14:61,110,133-61,124,977	<b>DFNA23</b>	(Ruf et al., 2004)
<b>ESRRB</b>	chr14:76,776,957-76,968,180	<b>DFNB35</b>	(Collin et al., 2008b)
<b>STRC</b>	chr15:43,891,596-44,010,458	<b>DFNB16</b>	(Verpy et al., 2001)
<b>DMXL2</b>	chr15:51,739,908-51,915,030	<b>DFNA71</b>	(Chen et al., 2017)
<b>CIB2</b>	chr15:78,396,948-78,423,886	<b>DFNB48</b>	(Riazuddin et al., 2012)
<b>HOMER2</b>	chr15:83,509,838-83,654,661	<b>DFNA68</b>	(Azaiez et al., 2015)
<b>TBC1D24</b>	chr16:2,525,147-2,555,735	<b>DFNB86</b>	(Rehman et al., 2014)
<b>CLDN9</b>	chr16:3,062,457-3,064,506	<b>DFNB</b>	(Sineni et al., 2019)
<b>CRYM</b>	chr16:21,250,195-21,314,404	<b>DFNA40</b>	(Abe et al., 2003)
<b>OTOA</b>	chr16:21,689,835-21,772,050	<b>DFNB22</b>	(Zwaenepoel et al., 2002)
<b>KARS</b>	chr16:75,661,622-75,682,541	<b>DFNB89</b>	(Santos-Cortez et al., 2013)
<b>SPNS2</b>	chr17:4,402,129-4,443,228	<b>DFNB115</b>	(Ingham et al., 2019)
<b>MYO15A</b>	chr17:18,012,020-18,083,116	<b>DFNB3</b>	(Wang et al., 1998)
<b>GRAP</b>	chr17:18,923,986-18,950,950	<b>DFNB114</b>	(Li et al., 2019)
<b>TMEM132 E</b>	chr17:32,907,768-32,966,337	<b>DFNB99</b>	(Li et al., 2015)

<b>WBP2</b>	chr17:73,841,780-73,852,588	<b>DFNB107</b>	(Buniello et al., 2016)
<b>ACTG1</b>	chr17:79,476,997-79,490,873	<b>DFNA20</b>	(van Wijk et al., 2003)
<b>LOXHD1</b>	chr18:44,056,935-44,236,996	<b>DFNB77</b>	(Edvardson et al., 2011)
<b>GIPC3</b>	chr19:3,585,551-3,593,539	<b>DFNB15</b>	(Rehman et al., 2011)
<b>S1PR2</b>	chr19:10,332,109-10,341,948	<b>DFNB68</b>	(Santos-Cortez et al., 2016)
<b>SYNE4</b>	chr19:36,494,002-36,499,695	<b>DFNB76</b>	(Horn et al., 2013)
<b>CEACAM1 6</b>	chr19:45,202,421-45,213,986	<b>DFNA4B</b>	(Wang et al., 2015)
<b>MYH14</b>	chr19:50,691,443-50,813,802	<b>DFNA4A</b>	(Donaudy et al., 2004)
<b>OSBPL2</b>	chr20:60,813,580-60,871,269	<b>DNFA67</b>	(Thoenes et al., 2015)
<b>CLDN14</b>	chr21:37,832,919-37,948,867	<b>DFNB29</b>	(Wilcox et al., 2001)
<b>TMPRSS3</b>	chr21:43,791,996-43,816,955	<b>DFNB8</b>	(Wattenhofer et al., 2002)
<b>TSPEAR</b>	chr21:45,917,775-46,131,495	<b>DFNB98</b>	(Delmaghani et al., 2012)
<b>MYH9</b>	chr22:36,677,323-36,784,063	<b>DFNA17</b>	(Lalwani et al., 2000)
<b>TRIOBP</b>	chr22:38,092,995-38,172,563	<b>DFNB28</b>	(Shahin et al., 2006)
<b>SMPX</b>	chrX:21,724,090-21,776,281	<b>DFNX4</b>	(Schraders et al., 2011)
<b>POU3F4</b>	chrX:82,763,269-82,764,775	<b>DFNX2</b>	(de Kok et al., 1995)
<b>PRPS1</b>	chrX:106,871,654-106,894,256	<b>DFNX1</b>	(Liu et al., 2010)
<b>COL4A6</b>	chrX:107,386,780-107,682,727	<b>DFNX6</b>	(Rost et al., 2014)
<b>AIFM1</b>	chrX:129,263,337-129,299,861	<b>DFNX5</b>	(Zong et al., 2015)

Tabla 6. Genes relacionados con la hipoacusia no sindrómica.

Una de las principales evidencias que apoyan la contribución genética en la EM es la existencia de familias con más de 1 caso. Esto es conocido como agregación familiar. Paparella, en un estudio transversal con 500 pacientes con EM, encontraron que en el 20% de los casos tenían antecedentes familiares (Paparella, 1984). Además, en una cohorte de pacientes españoles e italianos con EM, Requena *et al.* encontraron antecedentes familiares en el 34% de los casos (Requena *et al.*, 2014). La mayoría de las familias siguen un patrón de herencia AD con penetrancia incompleta, existiendo fenómenos de anticipación y fenotipos más severos a medida que la edad de inicio es menor (Morrison *et al.*, 2009). Escalera-Balsera *et al.* (2020) realizaron una revisión sistemática sobre los estudios de secuenciación en la EM familiar, describiendo 20 SNV en 11 genes diferentes con herencia autosómica dominante o recesiva (Escalera-Balsera *et al.*, 2020).

Las primeras aproximaciones para el estudio de las familias con EM consideraron la enfermedad como un síndrome monogénico. Gracias al uso de la secuenciación del exoma completo (WES), Requena *et al.* encontraron los primeros genes relacionados con la EM en una sola familia del sur de España. Estos genes, *DTNA* y *FAM136A*, codifican para alfa-distrobrevina y una proteína mitocondrial con función desconocida respectivamente; y ambos expresaban en el epitelio neurosensorial de la *cresta ampullaris* de la rata (Requena *et al.*, 2015). Sin embargo, no se han descrito variantes en estos genes en otras familias con EM.



Posteriormente, Martín-Sierra *et al.* describió una variante en el gen *PRKCB* en una segunda familia con EM. Este gen muestra una alta expresión en células de la membrana tectoria y en células ciliadas internas, revelando una expresión tonotópica desde la base hasta el ápice de la cóclea (Martín-Sierra *et al.*, 2016). Además, también se encontraron variantes sin sentido en *SEMA3D* y *DPT* en dos familias españolas (C. Martín-Sierra *et al.*, 2017).

Más recientemente, se han encontrado variantes raras para EM en los genes *HMX2* y *TMEM55B* en una familia finlandesa (Skarp *et al.*, 2019), así como en el gen *MYO7A* en 9 familias españolas no relacionadas. Este último estudio, además, describe co-segregación de variantes en *MYO7A* y en otros genes que codifican para proteínas de las uniones entre los estereocilios, lo que sugieren un modelo de herencia digénica (Roman-Naranjo *et al.*, 2021).

En resumen, estos estudios ponen de manifiesto la heterogeneidad genética en la EM familiar, incluso dentro de una misma población. Los genes relacionados con la EM familiar se muestran en la Tabla 7.

Gen	Variantes	Función	Población
<b><i>DTNA</i></b>	chr18:32462094G>T	Formación y estabilidad de sinapsis	Española
<b><i>FAM136A</i></b>	chr2:70527974C>T	Desconocida	Española
<b><i>PRKCB</i></b>	chr16:23999898G>T	Quimiotaxis de neutrófilos, crecimiento y proliferación de células melanocíticas	Española
<b><i>DPT</i></b>	chr7:84642128C>T	Matriz proteica extracelular	Española
<b><i>SEMA3D</i></b>	chr1:168665849C>T	Implicada en guía axonal	Española
<b><i>OTOG</i></b>	chr11:17574758G>A chr11:17578774G>A chr11:17594747C>A chr11:17621218C>T chr11:17627548G>A chr11:17631453C>T chr11:17632921C>T chr11:17656672G>A chr11:17663747G>A chr11:17667139G>C	Proteína extracelular otogelina	Española
<b><i>COCH</i></b>	chr14:31349796G>A	Proteína extracelular coclina	Koreana
<b><i>STRC</i></b>	chr15:43896948G>A	Estereocilios en el órgano de Corti	Suiza-Noruega
<b><i>HMX2</i></b>	chr10:124909634T>A	Especialización de células neuronales en el oído interno	Finlandesa
<b><i>TMEM55B</i></b>	chr14:20927370G>A	Células de soporte en epitelio neurosensorial.	Finlandesa
<b><i>LSAMP</i></b>	chr3:115561402T>C	Implicada en guía axonal	Iraní
<b><i>MYO7A</i></b>	chr11:76841683G>A chr11:76890920G>A chr11:76891450C>T	Miosina VIIa. Organización de estereocilios en células ciliadas auditivas y vestibulares	Europea

chr11:76910646G>A  
chr11:76922875G>A  
chr11:76925719G>A  
chr11:76925733G>A

Tabla 7. Genes descritos en la EM familiar

Para el estudio de la genética subyacente en los casos esporádicos de EM, se ha utilizado un enfoque más complejo. La EM esporádica representa la mayoría de los casos de EM (92%). Utilizando la herencia poligénica como modelo, *Gallego et al.* (2019) describieron un exceso de variantes raras en genes relacionados con hipoacusia en una gran cohorte española de EM esporádica cuando se compararon con poblaciones de referencia tanto españolas como europeas no finlandesas. Entre estos genes, destacan los relacionados con la regulación de la concentración iónica en la endolinfa, como *SLC26A4* o *CLDN14*, genes asociados a conexiones dentro de las uniones GAP que causan sordera recesiva como *GJB2*, e incluso genes relacionados con hipoacusia sintomática en el síndrome de Usher tipo IG, como *USH1G* (*Gallego-Martínez et al.*, 2019) (Tabla 8).

Locus	Gen	Referencia
<b>DFNB1A</b>	<b>GJB2</b>	(Kelsell <i>et al.</i> , 1997)
<b>DFNB1B</b>	<b>GJB6</b>	(del Castillo <i>et al.</i> , 2002)
<b>DFNB2</b>	<b>MYO7A</b>	(Weil <i>et al.</i> , 1997)
<b>DFNB3</b>	<b>MYO15A</b>	(Wang <i>et al.</i> , 1998)
<b>DFNB4</b>	<b>SLC26A4</b>	(Li <i>et al.</i> , 1998)
<b>DFNB6</b>	<b>TMIE</b>	(Naz <i>et al.</i> , 2002)
<b>DFNB7/11</b>	<b>TMC1</b>	(Hilgert <i>et al.</i> , 2008)
<b>DFNB8/10</b>	<b>TMPRSS3</b>	(Wattenhofer <i>et al.</i> , 2002)
<b>DFNB9</b>	<b>OTOF</b>	(Yasunaga <i>et al.</i> , 2000)
<b>DFNB12</b>	<b>CDH23</b>	(Bork <i>et al.</i> , 2001)
<b>DFNB15/72/95</b>	<b>GIPC3</b>	(Rehman <i>et al.</i> , 2011)
<b>DFNB16</b>	<b>STRC</b>	(Verpy <i>et al.</i> , 2001)
<b>DFNB18</b>	<b>USH1C</b>	(Avan <i>et al.</i> , 2019)
<b>DFNB18B</b>	<b>OTOG</b>	(Schraders <i>et al.</i> , 2012)
<b>hen</b>	<b>TECTA</b>	(Mustapha <i>et al.</i> , 1999)
<b>DFNB22</b>	<b>OTOA</b>	(Zwaenepoel <i>et al.</i> , 2002)
<b>DFNB23</b>	<b>PCDH15</b>	(Ahmed <i>et al.</i> , 2003b)
<b>DFNB24</b>	<b>RDX</b>	(Khan <i>et al.</i> , 2007)
<b>DFNB25</b>	<b>GRXCR1</b>	(Schraders <i>et al.</i> , 2010a)
<b>DFNB26</b>	<b>GAB1</b>	(Yousaf <i>et al.</i> , 2018)
<b>DFNB28</b>	<b>TRIOBP</b>	(Shahin <i>et al.</i> , 2006)
<b>DFNB29</b>	<b>CLDN14</b>	(Wilcox <i>et al.</i> , 2001)
<b>DFNB30</b>	<b>MYO3A</b>	(Walsh <i>et al.</i> , 2002)
<b>DFNB31</b>	<b>WHRN</b>	(Mburu <i>et al.</i> , 2003)
<b>DFNB32/105</b>	<b>CDC14A</b>	(Delmaghani <i>et al.</i> , 2016; Imtiaz <i>et al.</i> , 2014)
<b>DFNB35</b>	<b>ESRRB</b>	(Collin <i>et al.</i> , 2008b)

<b>Locus</b>	<b>Gen</b>	<b>Referencia</b>
<i>DFNB36</i>	<i>ESPN</i>	(Naz <i>et al.</i> , 2004)
<i>DFNB37</i>	<i>MYO6</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 2003a)
<i>DFNB39</i>	<i>HGF</i>	(Schultz <i>et al.</i> , 2009)
<i>DFNB42</i>	<i>ILDR1</i>	(Borck <i>et al.</i> , 2011)
<i>DFNB44</i>	<i>ADCY1</i>	(Rehman <i>et al.</i> , 2014)
<i>DFNB48</i>	<i>CIB2</i>	(Riazuddin <i>et al.</i> , 2012)
<i>DFNB49</i>	<i>MARVELD2</i>	(Kamitani <i>et al.</i> , 2015)
<i>DFNB49</i>	<i>BDP1</i>	(Giroto <i>et al.</i> , 2013)
<i>DFNB53</i>	<i>COL11A2</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2005)
<i>DFNB57</i>	<i>PDZD7</i>	(Vona <i>et al.</i> , 2016)
<i>DFNB59</i>	<i>PJVK</i>	(Delmaghani <i>et al.</i> , 2006)
<i>DFNB60</i>	<i>SLC22A4</i>	(Ben Said <i>et al.</i> , 2016)
<i>DFNB61</i>	<i>SLC26A5</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2003)
<i>DFNB63</i>	<i>LRTOMT/COMT2</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 2008; Du <i>et al.</i> , 2008)
<i>DFNB66</i>	<i>DCDC2</i>	(Grati <i>et al.</i> , 2015)
<i>DFNB66/67</i>	<i>LHFPL5</i>	(Kalay <i>et al.</i> , 2006)
<i>DFNB68</i>	<i>S1PR2</i>	(Santos-Cortez <i>et al.</i> , 2016)
<i>DFNB70</i>	<i>PNPT1</i>	(von Ameln <i>et al.</i> , 2012)
<i>DFNB73</i>	<i>BSND</i>	(Riazuddin <i>et al.</i> , 2009)
<i>DFNB74</i>	<i>MSRB3</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 2011; Schultz <i>et al.</i> , 2009)
<i>DFNB76</i>	<i>SYNE4</i>	(Horn <i>et al.</i> , 2013)
<i>DFNB77</i>	<i>LOXHD1</i>	(Edvardson <i>et al.</i> , 2011)
<i>DFNB79</i>	<i>TPRN</i>	(Li <i>et al.</i> , 2010; Rehman <i>et al.</i> , 2011)
<i>DFNB82</i>	<i>GPSM2</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2010b)
<i>DFNB84</i>	<i>PTPRQ</i>	(Schraders <i>et al.</i> , 2010b)
<i>DFNB84</i>	<i>OTOGL</i>	(Yariz <i>et al.</i> , 2012)
<i>DFNB86</i>	<i>TBC1D24</i>	(Rehman <i>et al.</i> , 2014)
<i>DFNB88</i>	<i>ELMOD3</i>	(Jaworek <i>et al.</i> , 2013)
<i>DFNB89</i>	<i>KARS</i>	(Santos-Cortez <i>et al.</i> , 2013)
<i>DFNB91</i>	<i>SERPINB6</i>	(Sirmaci <i>et al.</i> , 2010)
<i>DFNB93</i>	<i>CABP2</i>	(Schrauwen <i>et al.</i> , 2012)
<i>DFNB94</i>	<i>NARS2</i>	(Simon <i>et al.</i> , 2015)
<i>DFNB97</i>	<i>MET</i>	(Mujtaba <i>et al.</i> , 2015)
<i>DFNB98</i>	<i>TSPEAR</i>	(Delmaghani <i>et al.</i> , 2012)
<i>DFNB99</i>	<i>TMEM132E</i>	(Li <i>et al.</i> , 2015)
<i>DFNB100</i>	<i>PPIP5K2</i>	(Yousaf <i>et al.</i> , 2018)
<i>DFNB101</i>	<i>GRXCR2</i>	(Imtiaz <i>et al.</i> , 2014)
<i>DFNB102</i>	<i>EPS8</i>	(Behlouli <i>et al.</i> , 2014)
<i>DFNB103</i>	<i>CLIC5</i>	(Gagnon <i>et al.</i> , 2006)
<i>DFNB104</i>	<i>FAM65B/RIPOR2</i>	(Diaz-Horta <i>et al.</i> , 2014)
<i>DFNB105</i>	<i>DFNB32</i>	(Delmaghani <i>et al.</i> , 2016; Imtiaz <i>et al.</i> , 2014)
<i>DFNB106</i>	<i>EPS8L2</i>	(Dahmani <i>et al.</i> , 2015)

Locus	Gen	Referencia
<b>DFNB108</b>	<b>ROR1</b>	(Diaz-Horta <i>et al.</i> , 2016)
	<b>WBP2</b>	(Buniello <i>et al.</i> , 2016)
	<b>ESRP1</b>	(Rohacek <i>et al.</i> , 2017)
	<b>MPZL2</b>	(Wesdorp <i>et al.</i> , 2018)
	<b>CEACAM16</b>	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
	<b>GRAP</b>	(Li <i>et al.</i> , 2019)
	<b>SPNS2</b>	(Ingham <i>et al.</i> , 2019)
	<b>CLDN9</b>	(Sineni <i>et al.</i> , 2019)
	<b>CLRN2</b>	(Vona <i>et al.</i> , 2021)
	<b>GAS2</b>	(Chen <i>et al.</i> , 2021)CHE

Tabla 8. Genes humanos relacionados con hipoacusia no sindrómica con herencia autosómica recesiva.

Estos resultados destacan la importancia de los genes relacionados con la hipoacusia en la EM. En un estudio posterior, centrado en la vía de señalización de guía axonal, también se encontró una carga de variantes raras en genes como *NTN4* y *NOX3* en una cohorte de casos esporádicos de EM en España (Gallego-Martinez *et al.*, 2019). Los genes relacionados con la EM esporádica se muestran en la Tabla 9.

Gen	Odds ratio		P corregido	
	Población española	Población europea no finlandesa	Población española	Población europea no finlandesa
<b>GJB2</b>	2.06 (1.33-3.19)	3.2 (2.12-4.83)	6.85x10-03	1.65 x10-06
<b>SEMA3D*</b>	2.67 (1.94-3.68)	0.8 (0.53-1.21)	4.06x10-09	0.5
<b>CLDN14</b>	4.64 (2.65-8.11)	23.18 (13.81-38.9)	1.49x10-07	<1.00x10-15
<b>SLC26A4</b>	2.33 (1.51-3.59)	2.88 (1.89-4.38)	7.37x10-04	4.88x10-06
<b>NFKB1*</b>	2.73 (2.03-3.66)	1.43 (1.03-1.98)	6.62x10-11	0.1
<b>ESRRB</b>	1.84 (1.33-2.54)	3.39 (2.52-4.55)	6.12x10-04	<1.00x10-15
<b>USH1G</b>	4.67 (2.68-8.17)	20.27 (12.06-34.06)	3.05x10-07	<1.00x10-15
<b>NTN4*</b>	7.22 (3.07-18.30)	3.05 (2.40-4.49)	4.58x10-02	0.4
<b>NOX3*</b>	6.96 (3.87-12.91)	1.59 (0.98-2.43)	2.33x10-03	0.5

Tabla 9. Genes humanos relacionados con la EM esporádica. \*indica que este gen solo mostró un enriquecimiento de variantes raras en la población española.

# Hipótesis

La EM posee un componente hereditario que provoca que la enfermedad aparezca de forma temprana o tardía en diferentes individuos y en sus familias.

Nuestra hipótesis de trabajo es que los casos esporádicos de EM con inicio precoz ( $\leq 35$  años) presentarían variantes raras con un gran efecto, que podría ser explicado mediante modelos de herencia recesiva (variante autosómica recesiva) o mutaciones de novo.

# Objetivos

El **objetivo general** de la tesis es la identificación de pacientes con EM de herencia recesiva en individuos con edad de inicio precoz, así como la identificación de nuevos genes que expliquen la heterogeneidad genética de la EM.

Para ello, en primer lugar, se propone un estudio clínico de pacientes con EM de inicio precoz, incluyendo el análisis de las citoquinas proinflamatorias. Posteriormente, se realizará la secuenciación de genoma completo de casos de EM esporádica con inicio precoz y de sus progenitores asintomáticos (tríos), para así poder llevar a cabo el análisis integrado de los datos generados, y demostrar con ellos la acumulación de variantes raras en genes (homocigotas o heterocigotas compuestas) y redes de regulación génica que expliquen el fenotipo de la enfermedad.

## Objetivos específicos

1. Identificación y caracterización clínica de individuos con EM de inicio precoz no familiar.
2. Secuenciación de genoma completo en tríos/cuartetos con casos índice de EM esporádica.
3. Análisis integrado de datos genómicos para identificar variantes raras homocigotas o heterocigotas compuestas.

## 4. Métodos

### 4.1. Caracterización clínica de pacientes con EM.

Un total de 83 pacientes con EM fueron reclutados para realizar un estudio transversal. Cuarenta y cuatro pacientes fueron clasificados como EM de inicio precoz (EMIP) (edad de inicio <35 años), 39 pacientes fueron clasificados como EM de inicio tardío (EMIT) (edad de inicio >50 años). Además, se reclutaron 64 pacientes con migraña y 55 controles para comparar los perfiles clínicos y de citoquinas entre los diferentes grupos. Todos los pacientes con EM fueron diagnosticados de acuerdo a los criterios diagnósticos establecidos por el Comité Internacional de la *Bárány Society* para el Comité de Clasificación de los Trastornos Vestibulares (Lopez-Escamez *et al.*, 2015). Los pacientes con migraña igualmente fueron diagnosticados y seleccionados de acuerdo a los criterios diagnósticos para la migraña de la *International Headache Society* (IHS, 2018). Los pacientes diagnosticados de migraña vestibular (Lempert *et al.*, 2012) fueron excluidos del estudio. Todos los pacientes fueron informados previamente a la evaluación clínica.

Los protocolos experimentales de este estudio fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional en todos los hospitales participantes y cada individuo firmó un consentimiento informado por escrito antes de donar muestras de sangre (PE-0356-2018). El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki revisada en 2013 para la investigación con humanos. En todos los casos de EM se realizó una valoración audiológica y vestibular completa, incluyendo las siguientes variables: sexo, edad, edad de inicio, duración de la enfermedad, tipo de EM (uni / bilateral), principales comorbilidades asociadas (migraña y trastornos autoinmunes), puntuación en el THI (*Tinnitus Handicap Inventory*) y niveles de citoquinas en sangre venosa periférica. Se recogieron audiometrías tonales liminares de las historias clínicas para evaluar la hipoacusia desde el diagnóstico inicial. Las características clínicas de los pacientes con migraña incluidos en el estudio se muestran en la Tabla A1.

### 4.2 Aislamiento e incubación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y determinación de citoquinas.

Las muestras de sangre se procesaron con la mayor brevedad posible desde su extracción. En primer lugar, la sangre completa se sometió a una centrifugación de 10 minutos a 2500rpm y se extrajo de la fase superior 1ml de plasma, que se almacena a -20°C para la cuantificación de citoquinas. Tras esto, el resto de la sangre periférica se diluyó 1:1 con 1x TFS (Tampón fosfato salino) y la mezcla se dispuso cuidadosamente sobre el volumen correspondiente de Ficoll, siendo la proporción sangre total + TFS:Ficoll de 20:12 (Lymphosep, Lymphocyte Separation Media; Biowest, Nuaille, Francia)). Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 2.000 rpm para separar por fases el contenido de sangre. Se recogieron CMSP y se lavaron dos veces con 1x TFS. Finalmente, se cultivaron en RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% (v / v) (Biowest, Nuaille, Francia) y se sembraron a  $8 \times 10^6$  células/mL en placas de 6 pocillos. Las CMSP se incubaron durante 16 h a 37°C en CO<sub>2</sub> al 7%. Después de la incubación, las células se recogieron, se centrifugaron y los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron a -80 °C hasta que se adquirieran suficientes muestras.

Las muestras de plasma y del sobrenadante, se descongelaron inmediatamente antes de la cuantificación, y ninguna de ellas se sometió a más de dos ciclos de congelación-descongelación antes del análisis. Se midieron una citocina (IL-1 $\beta$ ) y 5 quimiocinas (CCL3, CCL4, CXCL1, CCL22 y CCL18) usando kits basados en perlas magnéticas para multiplex disponibles comercialmente (EMD Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Las mediciones se realizaron de acuerdo con los protocolos específicos del kit proporcionados por Millipore, utilizando la plataforma Luminex 200 (Luminex Corp., Austin, TX, EE. UU.) Posteriormente, se leyeron con el software Luminex x PONENT 3.1 (Luminex Corp.). Se realizaron dos controles de calidad para cada citocina por duplicado.

### **4.3 Estadística y análisis de datos clínicos.**

Se realizó un análisis descriptivo utilizando GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) para los datos clínicos y de citocinas. Las variables cuantitativas se muestran como media y desviación estándar (DE).

Las variables cualitativas se compararon mediante la prueba de Chi cuadrado y la prueba exacta de Fisher mientras que las variables cuantitativas se compararon mediante la prueba de U Mann-Whitney para datos no apareados y el coeficiente de correlación de Pearson. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para comparar los 3 grupos del estudio (EM, pacientes con migraña y controles). El nivel de significación considerado fue  $p < 0.05$ .

Para eliminar valores extremos en la cuantificación de citocinas, consideramos como valores atípicos utilizamos la fórmula:  $Q1 - 1.5 \times IQR$  ( $IQR = Q3 - Q1$ ), donde Q1 es la mediana de la mitad inferior del conjunto de datos, Q3 es la mediana de la mitad superior del conjunto de datos e IQR es el rangointercuartílico, la diferencia de Q3 a Q1 ( $1.5 \times IQR > Q3$  y  $1.5 \times IQR < Q1$ ). Por lo tanto, de un total de citocinas medidas de 61 pacientes con EM, 64 pacientes con migraña y 55 controles, solo se utilizaron 56, 59 y 42 medidas respectivamente.

### **4.4 Análisis genómico de pacientes con EMIP.**

#### **4.4.1 Diagnóstico y selección de los casos**

Se seleccionó un total de 18 individuos españoles, clasificándose en 6 tríos (probando con EM y sus padres), y teniendo como caso índice un paciente con EM esporádica de inicio precoz (edad de inicio  $\leq 35$  años) y dos progenitores sanos y asintomáticos para vértigo, hipoacusia, acufenos o cualquier otro síntoma relacionado con la EM.

Los pacientes con EM definida fueron previamente diagnosticados de EM según los criterios establecidos por el Comité de Clasificación de la Sociedad Barany (Lopez-Escamez *et al.*, 2015). Se realizó además una exploración audio-vestibular completa en todos los casos y se evaluaron audiometrías desde el inicio de la enfermedad y RMN (resonancia magnética nuclear) de oído en todos los casos índice para excluir otras causas de síntomas neurológicos.



#### 4.4.2 Extracción y secuenciación de ADN

El ADN fue extraído a partir de las CMSP almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  tras el procesamiento de los 12ml de sangre periférica, tras como se explicó anteriormente. Para ello se utilizó un kit comercial (QIAmp DNA blood Mini Kit , 51106, QIAGEN). Tras la extracción, estas muestras de ADN se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se prepararon librerías de secuenciación de genoma completo, o WGS (*Whole Genome Sequencing*) de cada uno de los casos y de sus dos progenitores, mediante el kit TruSeq DNA PCR-Free (Illumina). Se secuenció mediante la plataforma NovaSeq 6000 (Illumina) con una cobertura de 30x y un tamaño mínimo de lectura de 350 pb.

#### 4.4.3 Análisis bioinformático

##### 4.4.3.1 Variant calling

El protocolo de obtención de variantes aparece resumido en la figura 6. Se realizó en primer lugar el *variant calling*, o llamada de variantes. Para llevar a cabo este proceso, se utilizó la *suite* de herramientas de GATK (*Genome Analysis Toolkit*), comprendiendo un flujo de trabajo que sigue las recomendaciones estándar para la obtención de variantes y su posterior filtrado por calidad. Estas herramientas realizan también un realineamiento de los datos con el genoma de referencia humano (GRCh37/hg19 y GRCh38/Hg38) y generan un archivo VCF (*Variant Call Format*) con las variantes identificadas de cada sujeto.



Figura 6. Protocolo de obtención de variantes en la secuencia del ADN humano.

Así, se genera una lista de variantes de un solo nucleótido (SNV), inserciones y deleciones (INDELs). Las variantes en el número de copia (CNV) fueron obtenidas mediante el uso de una herramienta específica

para ese tipo de datos, ControlFreeC. Esta herramienta nos permite obtener estimar CNV de ganancia o pérdida en el número de copias en regiones concretas del genoma. En nuestro caso, cada 10.000 pares de bases. Además, nos permite anotar genes relacionados con el locus donde se han detectado estas variantes.

Para obtener más información, anotamos los archivos combinados usando la herramienta WANNVAR: <https://wannovar.wglab.org/index.php> y dbNSFP: <https://sites.google.com/site/jpopgen/Home>. Este paso nos aportara, entre otros datos de interés, información acerca de la frecuencia de cada variante en diferentes poblaciones control, además de una predicción de su patogenicidad. Así, se obtuvieron las frecuencias del alelo menor (*MAF*, *minor allele frequency*) para cada variante candidata, usando bases de referencia de frecuencia poblacional como gnomAD: <https://gnomad.broadinstitute.org/>, ExAC: <http://exac.broadinstitute.org/> (total de individuos y europeos no finlandeses) y CVS: <http://csvs.babelomics.org/>, estando esta última basada en la población española de referencia.

Dado que la prevalencia estimada de EM esporádica es de 0,75 / 1000 individuos, se seleccionaron las variantes con  $MAF < 0.001$  para el análisis de una única variante rara y se priorizaron según la puntuación  $phred \geq 15$  de *Combined Annotation Dependent Depletion* (CADD). También se confirmó la expresión de los genes en los que se encontraban las variantes de interés según su expresión en el oído mediante el uso del portal gEAR (*gene Expression Analysis Resource*: <https://umgear.org/>). Finalmente, los archivos de variantes son anotados en bases de datos de caracterización clínica como ClinVar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.

#### 4.4.3.2. Generación de callsets

Los archivos VCF generados de cada trío unen en un único archivo, mediante la función “merge” de *BCFtools*, generando una base de datos para los individuos secuenciados, que reúnen las variantes de los casos de EM esporádicos con inicio precoz y sus padres (tríos completos, una base de variantes por trío). Estos análisis cubren diversas hipótesis acerca de la aparición de EM precoz en los casos esporádicos. Para su selección, se ha realizado un filtro de la ploidía de las diferentes variantes a través de su genotipo observado para cada individuo en su respectivo trío, valorando diferentes opciones de herencia (Figura 7):

- 1) Aparición de variantes de novo: mediante filtrado según la presencia/ausencia de variantes, seleccionando aquellas variantes que aparecen exclusivamente en el probando de cada trío, pero ausentes en sus padres.
- 2) Herencia heterocigota compuesta. Se han seleccionado aquellas variantes heterocigotas en un mismo gen que segreguen de forma diferencial entre los parentales y que se acumulen en el probando.
- 3) Herencia homocigota. Se han seleccionado aquellas variantes homocigotas en el probando, así como la carga de variantes homocigotas en un mismo gen respecto a sus parentales.

Genotipos usados en el filtrado:	
- De novo	0/1 – 0/0 – 0/0
- Homocigoto recesivo	1/1 – 0/1 – 0/1
- Heterocigota compuesta	0/1 – 0/1 – 0/0 ó 0/1 – 0/0 – 0/1

Figura 7. Esquema explicativo de los genotipos utilizados en el filtrado de variantes raras.

#### 4.4.3.3 Filtrado de variantes

Se aplicó un proceso de filtrado y priorización de variantes de varios pasos para seleccionar las variantes candidatas. Este filtrado de variantes para la sección de variantes candidatas se resume en la figura 8.

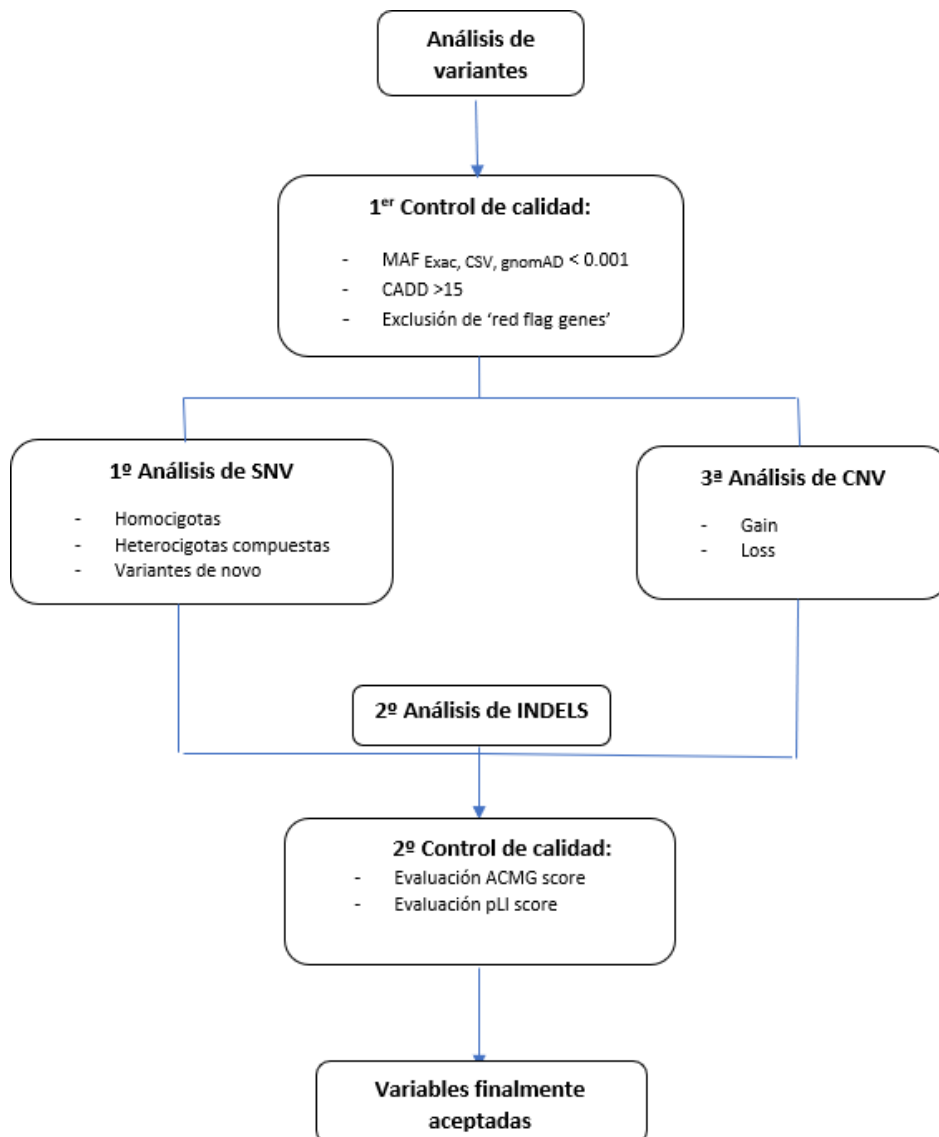


Figura 8. Algoritmo para el análisis y filtrado de variantes raras en el análisis de tríos.

##### 1. Frecuencia alélica

Se realizó un primer paso de filtrado basado en la frecuencia alélica menor de las variantes (MAF: *minor allelic frequencies*). Se consideraron los valores MAF de tres bases de datos públicas: ExAC, gnomAD y CSVS. Se aplicó como punto de corte de MAF, una frecuencia de  $10^{-3}$ , según la prevalencia de EM y los diferentes análisis, incluyendo el MAF de la población europea no finlandesa (*Non Finnish European*) y la global (*gnomAD\_All*).

##### 2. Collaborative Spanish Variant Server (CSVS)

Dado que todos los pacientes incluidos en este estudio eran principalmente de ascendencia española, las frecuencias alélicas de las variantes se anotaron con el Servidor Colaborativo de Variantes en español

(CSVS) (Peña-Chilet *et al.*, 2021). Esta base de datos contiene información alélica de un total de 2046 muestras de origen español y está disponible con acceso abierto en su portal web (<http://csvs.babelomics.org/>; consultado: 19/01/2020).

### 3. Patogenicidad

La patogenicidad se priorizó en función de la puntuación CADD para cada variante obtenida de la anotación con WANNNOVAR (Kircher *et al.*, 2014). CADD es una base de datos de puntuación precalculada que se basa en algoritmos de clasificación. El objetivo principal de la misma es predecir los efectos nocivos, funcionalmente significativos y patógenos de las variantes. Para cada variante, CADD genera la puntuación de anotación combinada (puntuación c) habiéndola referenciado con el resto de las puntuaciones c precalculadas de 8.600 millones de posibles SNP humanos. Se considera que las variantes potencialmente patógenas tienen una puntuación mayor o igual a 15.

Asimismo, se calculó la patogenicidad de las variantes a través de los criterios del ACMG/AMP (*American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*) para SNV e INDELS. Para CNV, se utilizó una adaptación de las normas ACMG en ClinGen (<https://clinicalgenome.org/>) para calcular la patogenicidad atendiendo al número de copias. Estas anotaciones se utilizaron para priorizar y clasificar cada variante en patogénica, probablemente patogénica, de significado incierto, probablemente benigna y benigna.

Además, se utilizó la puntuación pLI (*probability of being loss-of-function intolerant*) como elemento de priorización de genes candidatos. Esta puntuación refleja la tolerancia de un gen a la pérdida de función sobre la base del número de variantes de truncamiento, ponderado por el tamaño del gen y la cobertura de secuenciación. Su intervalo de valores es de 0 a 1, siendo 0 una baja probabilidad de ser intolerante a la pérdida de función es baja y 1 una alta probabilidad de ser intolerante a la pérdida de función.

#### **4.4.4. Validación de variantes mediante secuenciación Sanger.**

Dada la posibilidad de que resultados falsos positivos escapasen a los diferentes filtros de calidad propuestos en la fase de análisis bioinformático, las variantes candidatas se validaron por medio de secuenciación Sanger (3100 *Genetic Analyzer*, Applied Biosystems) y se visualizaron con Sequence Scanner Software 2.0 (Applied Biosystems). Sólo se realizó la validación Sanger en SNV. Las variantes largas como CNV no han sido validadas. Los ciclos para la amplificación de amplicones se realizaron de acuerdo con los estándares del laboratorio.

Los cebadores fueron diseñados en las regiones que flanquean las variantes mediante Primer3 v4.1 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>), se verificó si eran específicos para la región de interés con la herramienta Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), y se comprobó la ausencia en la formación heterodímeros mediante Oligoanalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer/>).

#### **4.4.5 Análisis funcional**

El análisis de agregación de variantes raras (MAF < 0,05) en genes y redes de regulación génica se ha llevado a cabo con las herramientas de enriquecimiento funcional en vías metabólicas o de interés biológico para el total de variantes observadas en los pacientes de EM.

Se ha contrastado la expresión en oído de genes candidatos (gEAR: <https://umgear.org/>), además, se ha observado también si estos se expresan de forma significativa en diferentes tejidos de interés, mediante bases de datos que resumen estudios en otros tejidos como GTEx (<https://gtexportal.org/home/>) o *Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>). También se han priorizado genes con alta expresión diferencial en células de interés de la cóclea se han priorizado por encima de genes con expresión similar en tejidos del oído y otros tejidos generales.

## 5. Resultados

### 5.1. Caracterización clínica de los pacientes con EM de inicio precoz.

Veintitrés pacientes fueron diagnosticados con como Enfermedad de Ménière Unilateral (EMU: afectación de un único oído) (54.5%) y 21 fueron considerados como Enfermedad de Ménière Bilateral (EMB: afectación de ambos oídos) (45.5%). Veintiséis (59%) eran mujeres y 18 (41%) eran hombres.

En la Tabla 10 se muestran los pacientes con EM de inicio precoz y en la Tabla 11 se muestran todos los individuos con EM de inicio tardío. Veintiséis (67%) habían sido diagnosticados como EMU y 13 como EMB (33.3%). Veintiún pacientes (54%) eran mujeres y 18 (46%) hombres.

No hubo diferencia en la frecuencia de EM familiar entre pacientes con EM de inicio precoz (11 pacientes, 25%) y EM de inicio tardío (11 pacientes, 28%). Dieciocho años fue la duración media de la enfermedad en los pacientes con EM de inicio precoz, mientras que en los pacientes con inicio tardío la media fue de 9.8 años. En nuestra serie, se observaron niveles elevados de IL-1 $\beta$  (> 4.78 pg/ml) en 5 de 44 (11.3%) pacientes con EM de inicio precoz y en 4 de 39 (10.3%) pacientes con inicio tardío.

Paciente	Género	Uni/ Bilateral	Edad de inicio	Duración de enfermedad (años)	EM familiar	Migraña	Subgrupo EM	Nivel de IL-1 $\beta$
1	mujer	Bilateral	34	8	Si	Si	3	3.68
2	mujer	Bilateral	33	8	Si	Si	3	1.24
3	mujer	Unilateral	28	12	No	Si	4	0.82
4	hombre	Unilateral	29	9	No	No	1	1.57
5	mujer	Bilateral	33	24	No	Si	4	3.20
6	mujer	Bilateral	18	34	Si	No	3	4.74
7	mujer	Unilateral	28	27	No	X	4	1.41
8	mujer	Unilateral	20	1	Si	Si	3	18.64
9	mujer	Unilateral	28	8	No	No	2	3.69
10	mujer	Unilateral	29	20	Si	Si	3	2.79
11	hombre	Bilateral	27	16	No	No	2	2.64
12	mujer	Bilateral	33	8	No	Si	4	2.10
13	mujer	Bilateral	24	15	No	Si	4	28.45
14	mujer	Bilateral	33	17	No	No	5	1.66
15	mujer	Bilateral	23	18	No	Si	4	1.59
16	hombre	Bilateral	31	15	No	Si	1	1.25
17	hombre	Unilateral	34	8	No	No	1	0.49
18	mujer	Unilateral	27	17	No	No	1	2.11
19	hombre	Bilateral	35	16	No	No	1	0.92
20	mujer	Bilateral	34	20	No	No	1	3.68
21	mujer	Unilateral	35	20	Si	No	3	0.01
22	hombre	Bilateral	29	15	No	No	2	0.18
23	hombre	Unilateral	29	11	No	No	1	0
24	hombre	Unilateral	24	1	No	No	1	1.84
25	hombre	Unilateral	30	27	No	Si	1	46.41
26	hombre	Bilateral	27	22	No	No	1	0

27	hombre	Unilateral	32	3	No	No	1	2.77
28	hombre	Bilateral	22	23	Si	Si	1	0.44
29	mujer	Bilateral	31	5	No	Si	1	1.14
30	hombre	Bilateral	22	22	No	No	1	1.57
31	hombre	Bilateral	25	25	No	No	1	0.31
32	hombre	Bilateral	34	34	No	No	1	1.14
33	hombre	Bilateral	28	18	No	No	1	18.18
34	mujer	Unilateral	28	25	No	No	5	2.19
35	mujer	Unilateral	23	50	No	No	1	3.14
36	mujer	Unilateral	29	30	No	No	5	6.66
37	mujer	Unilateral	23	50	No	No	1	3.07
38	hombre	Unilateral	27	5	No	No	1	1.79
39	mujer	Unilateral	18	18	Si	Si	3	4.68
40	mujer	Unilateral	35	20	No	No	1	0
41	mujer	Unilateral	21	2	Si	No	3	0
42	hombre	Unilateral	24	28	Si	No	3	0.80
43	mujer	Unilateral	18	9	Si	Si	2	0.69
44	mujer	Unilateral	24	28	No	Si	4	1.37

Tabla 10. Características clínicas y niveles basales de IL-1 $\beta$  en pacientes con EM de inicio precoz (n=44).

Paciente	Género	Uni/ Bilateral	Edad de inicio	Duración de enfermedad (años)	EM familiar	Migraña	Subgrupo EM	Nivel de IL-1 $\beta$
1	hombre	Bilateral	55	20	No	No	2	0.83
2	mujer	Unilateral	65	8	Si	No	3	1.23
3	hombre	Unilateral	50	13	No	No	1	1.56
4	hombre	Bilateral	55	30	No	No	2	2.24
5	hombre	Unilateral	61	16	No	No	1	2.64
6	mujer	Unilateral	50	23	Si	No	3	2.10
7	hombre	Bilateral	53	16	No	No	2	3.14
8	mujer	Unilateral	50	8	No	No	1	2.67
9	hombre	Bilateral	53	30	No	No	2	4.34
10	hombre	Unilateral	50	14	Si	No	3	6.93
11	hombre	Unilateral	62	1	No	Si	4	0.01
12	mujer	Unilateral	52	17	No	Si	4	0.57
13	mujer	Bilateral	56	24	No	No	2	2.27
14	mujer	Unilateral	55	10	No	No	1	2.06
15	mujer	Unilateral	63	13	Si	Si	3	1.07
16	hombre	Bilateral	56	5	No	No	2	0.58
17	hombre	Unilateral	53	2	Si	Si	3	0.01
18	hombre	Bilateral	54	3	No	No	2	1.03
19	mujer	Bilateral	53	4	No	Si	4	2.67
20	hombre	Bilateral	55	17	Si	No	3	1.27
21	mujer	Unilateral	50	20	Si	No	3	1.73
22	mujer	Bilateral	55	9	Si	Si	3	5.95
23	mujer	Unilateral	50	8	No	No	1	3.07
24	mujer	Bilateral	52	6	No	No	2	1.03
25	hombre	Bilateral	53	2	Si	Si	3	3.68
26	mujer	Unilateral	56	2	No	No	1	0.83
27	hombre	Unilateral	57	2	No	No	1	1.66
28	hombre	Bilateral	53	7	No	No	2	0.39

29	mujer	Unilateral	65	1	No	Si	4	4.96
30	hombre	Unilateral	69	2	No	No	1	0.76
31	hombre	Unilateral	66	5	No	No	1	2.33
32	mujer	Unilateral	51	5	No	No	1	4.67
33	mujer	Unilateral	63	6	No	No	1	3.94
34	mujer	Unilateral	61	6	No	No	1	1.25
35	hombre	Unilateral	51	7	No	No	1	1.52
36	mujer	Unilateral	50	8	No	No	1	5.79
37	mujer	Unilateral	54	1	Si	No	3	1.32
38	mujer	Unilateral	57	6	Si	No	3	1.47
39	mujer	Unilateral	54	7	No	Si	1	3.47

Tabla 11. Características clínicas y niveles basales de IL-1 $\beta$  en pacientes con EM de inicio tardío (n=39).

### 5.1.1 Pacientes con EM de inicio precoz y prevalencia de migraña.

En la tabla 12 se comparan las características clínicas de los pacientes con EM de inicio precoz e inicio tardío. Los pacientes con inicio precoz tuvieron una mayor duración de la enfermedad, (definida como el tiempo desde el inicio de los síntomas) que los pacientes con inicio tardío ( $p = 0,004$ ). Ambos grupos tenían umbrales de hipoacusia, antecedentes familiares de pérdida auditiva y presencia de factores de riesgo vascular similares. Sin embargo, los pacientes con EM de inicio precoz presentaron mayor frecuencia de migraña que los pacientes con EM de inicio tardío ( $p = 0,045$ ), pero no se encontraron diferencias para ningún tipo de cefalea entre ambos grupos.

VARIABLES	EM de inicio precoz (N = 44)	EM de inicio tardío (N = 39)	p-valor
Duración de la enfermedad (media $\pm$ D DT)	18.0 $\pm$ 11.4	9.8 $\pm$ 7.9	0.0004
Edad de inicio (media $\pm$ DT)	27.7 $\pm$ 4.9	55.6 $\pm$ 5.2	<0.0001
Género (% mujeres)	59.0	53.8	0.195
Hipoacusia bilateral (%)	45.5	33.3	0.545
Hipoacusia (% sincrónicos)	29.5	12.8	0.338
Subtipo EM			0.589
1	21	15	
2	4	9	
3	9	4	
4	7	3	
5	3	0	
Hipoacusia (%)			0.357
Alta frecuencia	61.4	69.2	
Baja frecuencia	38.6	30.8	
Historia familiar de hipoacusia (%)	25.0	28.2	0.999
Cefalea (%)	59.0	56.4	0.440
Migraña (%)	38.6	23.0	0.045
Hipertensión arterial (%)	22.7	25.6	0.948
Tabaquismo (%)	13.6	10.3	0.532
Dislipemia (%)	18.2	28.2	0.400
Diabetes Mellitus (%)	25.0	25.6	0.854

Tabla 12. Características clínicas de los pacientes con EM de inicio precoz y de inicio tardío incluidos en el estudio.



### 5.1.2 Niveles de citoquinas en EM de inicio precoz e inicio tardío.

Se midieron los niveles de citoquinas en 56 pacientes con EM (40 EMIP y 16 EMIT). No se observaron diferencias significativas entre en los niveles de IL-1 $\beta$  o cualquiera de las quimiocinas (CCL3, CCL4, CXCL1, CCL22 y CCL8) entre ambos grupos (todos p valor > 0.1), (Figura 9)).

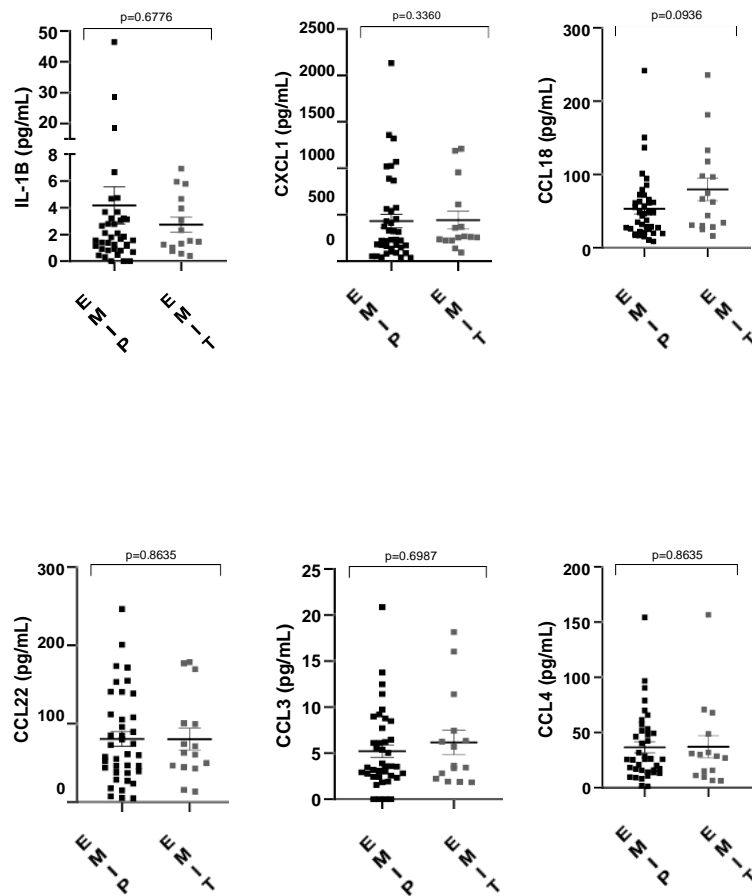


Figura 9. Gráfico de dispersión que muestra las diferencias entre los niveles de IL-1 $\beta$  o quimiocinas entre los pacientes con EM de inicio precoz e inicio tardío.

Sin embargo, cuando realizamos un análisis específico por sexo, sí que se muestran diferencias significativas en EMIP, con valores más altos en hombres ( $p = 0.039$ ) para IL-1 $\beta$  y más altos en mujeres ( $p = 0.007$ ) para CXCL1 ( $p = 0.007$ , (Figura 10)). Además, los niveles de CCL3 fueron significativamente más altos en mujeres EMIT que en hombres ( $p = 0.04$ ).

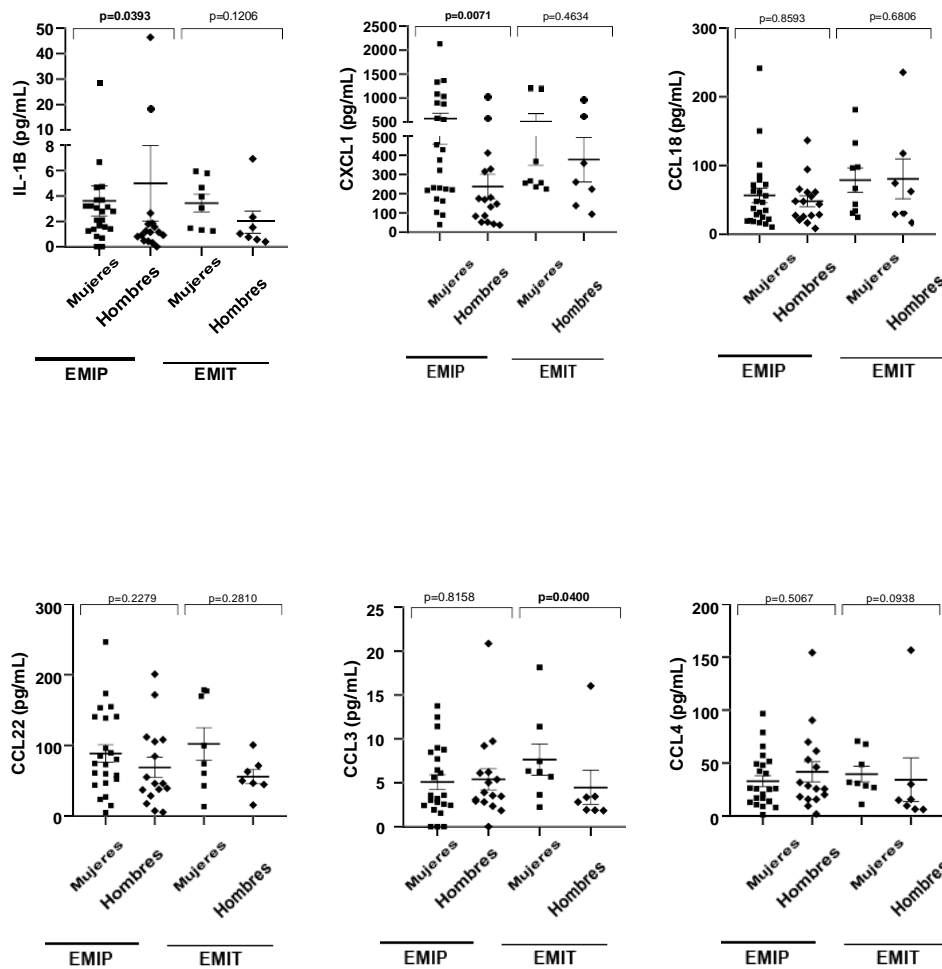


Figura 10. Gráfico de dispersión que muestra la mediana y los rangos intercuartílicos para los niveles de IL-1 $\beta$ , CCL3, CCL4, CXCL1, CCL22, CCL8 medidos en el sobrenadante de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en pacientes con EMIP y EMIT. Los niveles de citoquinas y quimiocinas se compararon entre hombres y mujeres mediante la prueba U de Mann-Whitney y los p-valores se muestran para cada comparación.

### 5.1.3 Niveles de citoquinas no permiten diferenciar entre pacientes con migraña y sin migraña en la EM.

Dado que los pacientes con EMIP presentaron una mayor prevalencia de migraña que los pacientes con EMIT ( $p = 0.045$ ), se compararon los niveles de citocinas considerando la migraña como una covariable clínica. Sin embargo, ninguna de las citoquinas o quimiocinas medidas mostró diferencias significativas entre pacientes con y sin migraña en la EM (Figura 11). Por otro lado, la prevalencia de una enfermedad autoinmune asociada fue significativamente mayor en pacientes con EM y migraña en comparación con pacientes sin migraña ( $p < 0.001$ ).

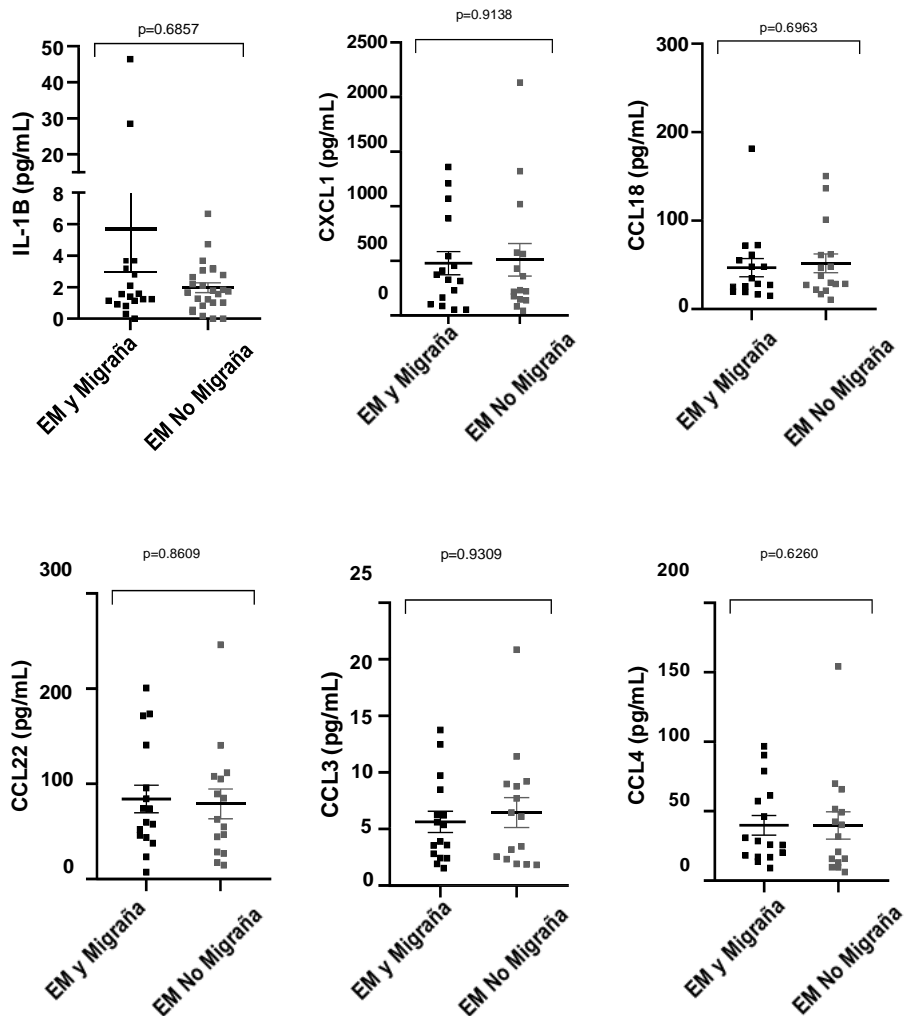


Figura 11. Gráfico de dispersión que muestra los niveles de citoquinas y quimiocinas en pacientes con EM, estratificados según la presencia de migraña.

También, se separaron a los pacientes con EM en función de los niveles de IL-1 $\beta$  en 2 grupos: EM con niveles altos de IL-1 $\beta$  (EMA) y niveles bajos de IL-1 $\beta$  (EMB) (Figura 12).

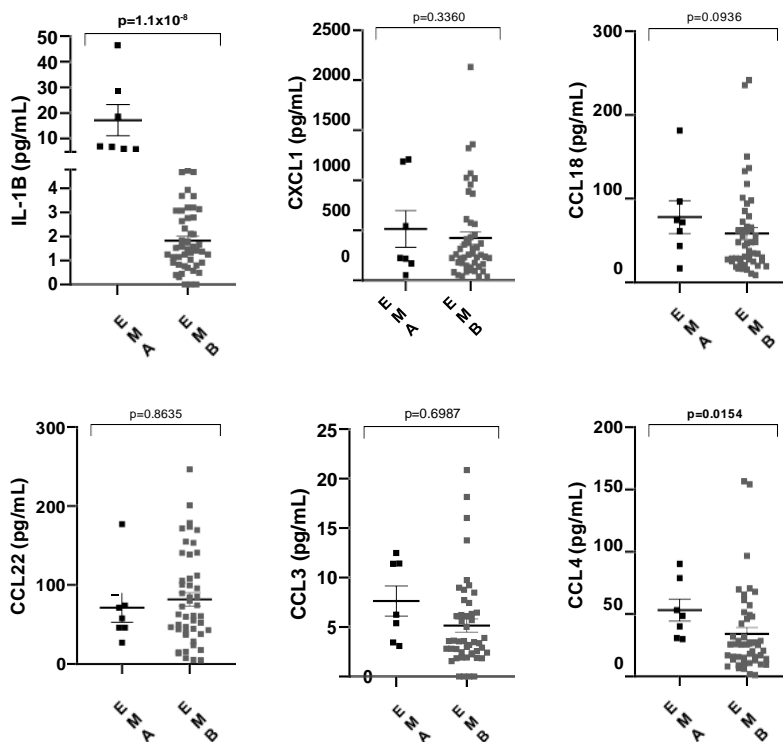


Figura 12. Pacientes con EM separados de acuerdo con sus niveles de IL-1 $\beta$ .  
EMA >4.78pg/ml y EMB <4.78pg/ml.

Sin embargo, no se encontraron diferencias en la frecuencia relativa de pacientes según los subgrupos clínicos y los niveles de IL-1 $\beta$  (Tabla 13).

Variable	EMH (N = 9)	EML (N = 74)	p-valor
Subtipo EM (%)			0.9924
1	33.3% (n=3)	44% (n=33)	
2	0% (n=0)	14.7 (n=13)	
3	33.3% (n=3)	22.9% (n=17)	
4	22.2% (n=2)	12.1% (n=9)	
5	11.1% (n=1)	2.7% (n=2)	

Tabla 13. Distribución de frecuencias de pacientes con EM según subgrupo clínico y niveles de IL-1 $\beta$ .

#### 5.1.4 Niveles de citoquinas entre EM familiar (EMF) y EM esporádica (EME).

Se observó que los niveles de IL-1 $\beta$  no fueron diferentes entre los pacientes con EM familiar (EMF) y EM esporádica (EMS), sin embargo, se encontraron diferencias significativas en CXCL1 ( $p=0.024$ ) and CCL22 ( $p=0.012$ ), (Figura 13).

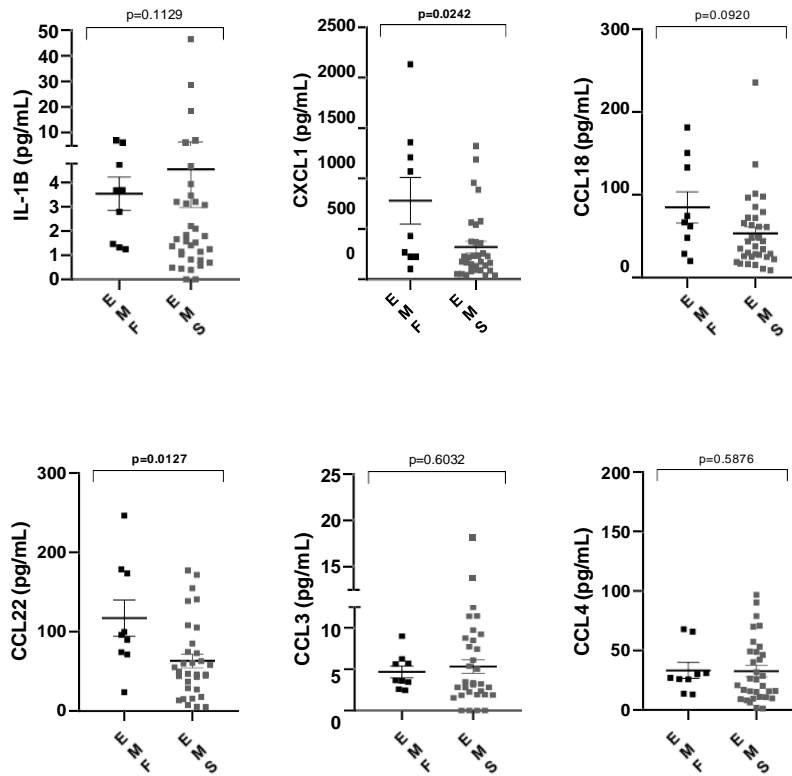


Figura 13. Niveles de citoquinas y quimiocinas en pacientes con EM familiar y EM esporádica.

### 5.1.5 Niveles de CCL18, CCL22 y CCL4 entre pacientes con EM, migraña y controles.

Se midieron los niveles de IL-1 $\beta$ , CCL3, CCL4, CXCL1, CCL22 y CCL18 en 55 controles sanos y 64 pacientes con migraña. Se encontraron diferencias significativas en los niveles de CCL18 ( $p = 0.001$ ), CCL22 ( $p = 0.03$ ) y CCL4 ( $p = 0.02$ ) cuando comparamos EM, migraña y controles. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los niveles de IL-1 $\beta$  o CXCL1 en pacientes con EM frente a pacientes con migraña (Figura 14).

Pudimos observar que los niveles de CCL18 eran mayores en pacientes con EM o migraña cuando se compararon con controles. Sin embargo, los niveles de CCL18 no permitieron distinguir entre EM y migraña ( $p = 0.74$ ). Además, no se encontró correlación en los niveles de CCL18 y la edad de los pacientes, ya sea en controles ( $p = 0.59$ ), pacientes con EM ( $p = 0.43$ ) o migraña ( $p = 0.23$ ), (Figura 15).

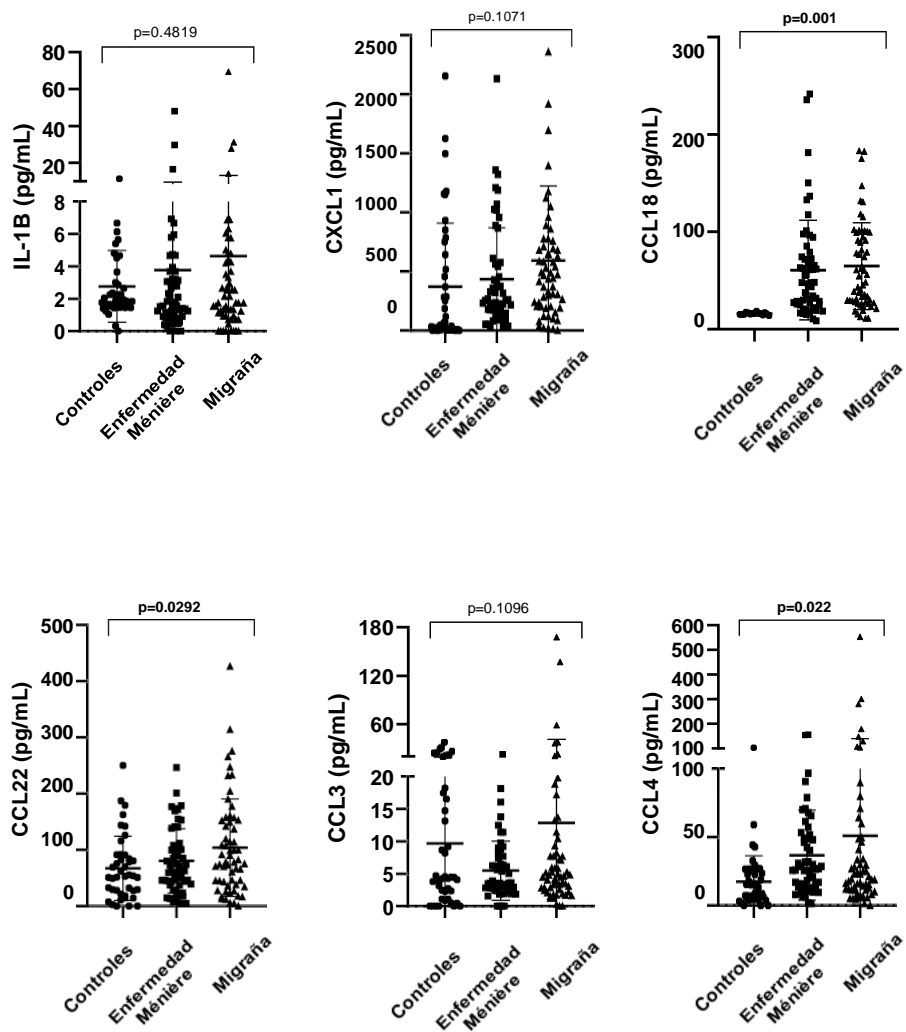


Figura 14. Gráfico de dispersión que muestra las concentraciones de IL-1 $\beta$ , CXCL1, CCL18, CCL22, CCL3 y CCL4 en controles, pacientes con EM y migraña.

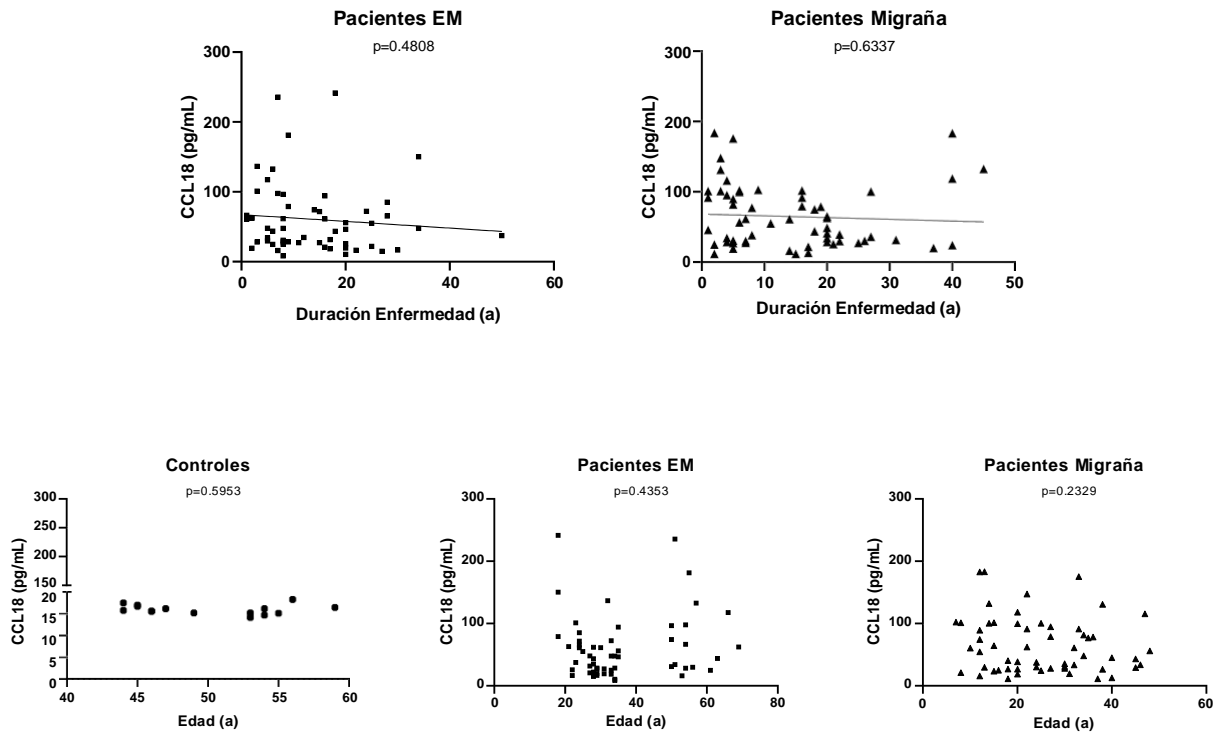


Figura 15. Correlación entre niveles de CCL18 y edad de los pacientes en controles, pacientes con EM y pacientes con migraña.

## 5.2 Análisis genómico de pacientes con EMIP.

Nuestra hipótesis sería que los pacientes esporádicos podrían seguir un modelo de:

- **Herencia recesiva**, que podría estar causada por una variante homocigota o por dos variantes heterocigotas situadas en el mismo gen (heterocigota compuesta). Ambos progenitores serían portadores de una de las dos variantes y por tanto no tendrían el fenotipo completo.
- **Herencia ligada al cromosoma X**, donde la alteración ocurre en los cromosomas sexuales; una sola copia de la mutación sería suficiente para provocar la enfermedad en varones, pero no en mujeres.
- **Variantes de novo**, que no se observan en el genoma de los padres

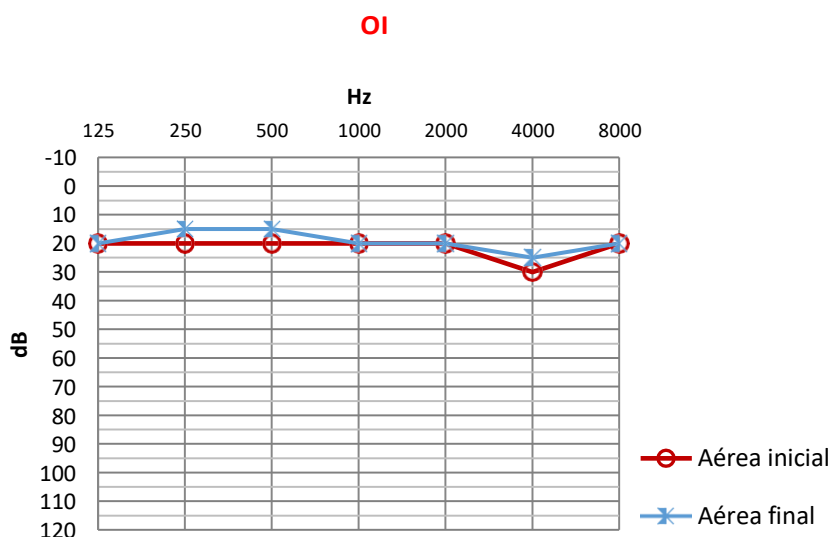
En el estudio de los CNV, se estableció como objetivo encontrar aquellas variantes con un número de copia mayor o inferior en el probando con respecto a los progenitores, por ello, se realizó un filtrado previo, tanto para las ganancias como las pérdidas en el número de copia, teniendo en cuenta que ambos progenitores tenían dos copias para cada variante.

Por lo tanto, en las tablas incluidas en el análisis individual de cada trío, que se detalla a continuación y en las tablas suplementarias solo aparecerán el número de copias del probando a estudio.

### 5.2.1 Trío 1

#### Características clínicas del probando 1

Este individuo es un varón que fue diagnosticado de EM a los 25 años, por lo que lleva 13 años de evolución. El paciente debutó con clínica de vértigo periférico rotatorio, sensación de plenitud ótica e hipoacusia neurosensorial unilateral de oído derecho (OD). Además, el paciente tenía previamente diagnosticada migraña sin aura. No existen datos de enfermedades autoinmunes asociadas. Por tanto, sería considerado una EM tipo 4. Las pruebas vestibulares realizadas (vHIT) mostraron una función vestibular bilateral dentro de los límites de la normalidad, con un valor en las ganancias del reflejo vestibulo-ocular del CSH izquierdo de 0.82 y de 0.90 para el CSH derecho. Los umbrales auditivos iniciales (2009) y finales (2020) para cada oído se presentan a continuación (2020) (Figura 16). Actualmente, los progenitores permanecen asintomáticos a la edad de 76 años (madre) y 83 años (padre).





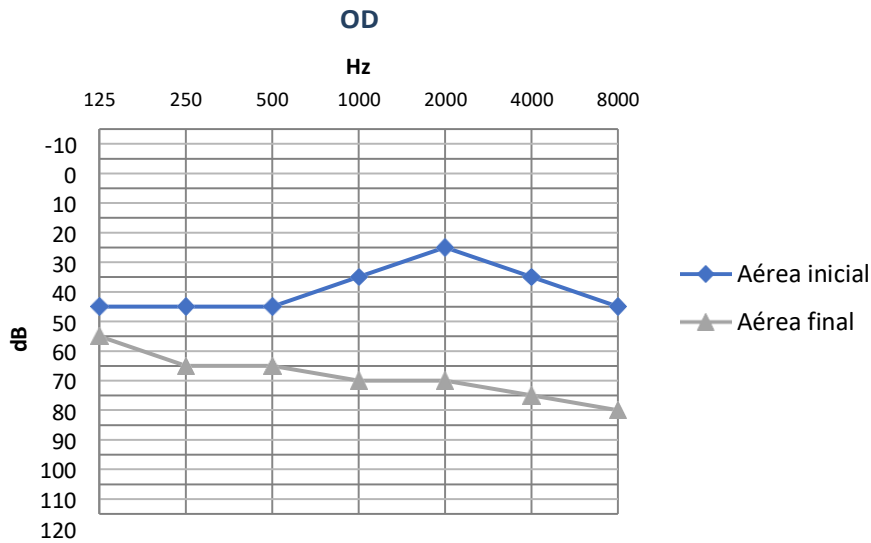


Figura 16. Audiometría tonal liminal para el probando del Trío 1.

### **Hipótesis: Modelo de herencia recesiva**

#### A) Variantes de un solo nucleótido homocigotas recesivas del Trío 1

Para el primer trío, las variantes homocigotas obtenidas inicialmente fueron 2703. Tras el filtrado de variantes finalmente se dejó como posible la variante chr9:4361656-4361656, C>T, rs150388848, del gen **SH3GL1** (Tabla 14). Esta variante con cambio de sentido es homocigota en el probando y heterocigota en sus progenitores. Tiene una frecuencia alélica de 0.001 en NFE (*Non Finnish European*) y de 0.008 en la población española. La frecuencia en homocigosis sería de  $6.4 \times 10^{-5}$ , por lo que podría explicar el fenotipo. Esta variante, se considera probablemente benigna según la guía ACMG y es expresada en las células de Deiters y en las células ciliadas externas (CCE) humanas.

#### B) Variantes de un solo nucleótido heterocigotas compuestas del Trío 1

No se encontraron variantes heterocigotas compuestas candidatas para el Trío 1, ya que las variantes no superaron el MAF previamente establecido o no se expresaban en el oído interno.

#### C) Estudio de INDELS del Trío 1

En el primer trío, los INDELS obtenidos en el análisis fueron inicialmente 7 (Tabla suplementaria 1). De todos ellos, la variante que mejor podría explicar el fenotipo es una delección heterocigota de origen materno de 18 nucleótidos que cambia el marco de lectura, chr5:149751746-149751763, AGTGAGGAGGGATCTGAA>-, rs528897827 y se encuentra en el gen **TCOF1**. Esta variante, tiene una frecuencia alélica de 0.0016 en NFE (*Non Finnish European*) y de 0.002 en la población española. Este genya es conocido por ser el causante del síndrome de Treacher Collins. Por lo tanto, además de ser un gen causante de hipoacusia, tiene un CADD de 23.2. Según la guía ACMG se considera de significado incierto. SupLI score o grado de tolerancia es de 0.95. Existen en el padre tres variantes para el gen **TCOF1**, la primera es una variante intrónica, chr5: 149747116, C>T, rs144667249; la segunda es una variante missense, chr5:149759201, C>T, rs114689020 y la tercera es una variante sinónima, chr5:149776113, G>A.

### **Hipótesis: Modelo de herencia ligada al X**

#### D) Herencia ligada al cromosoma X del Trío 1

Para el primer trío, se encontró la variante chrX:2833605-2833605, C>T, rs111939179, del gen **ARSD**, la cual superaba los filtros establecidos de MAF y CADD, además de poseer un valor ACMG de 11 y ser considerada patogénica. Esta variante es de origen paterno, por lo que, al no presentar el progenitor el fenotipo, se decidió excluir dicha variante.

### **Hipótesis: Modelo de herencia dominante**

#### E) Variantes de novo del Trío 1

La variante candidata de novo fue chr19:54744373-54744373, A>C, del gen **LILRA6** (Tabla 16). Esta variante, que no estaba en ninguno de los progenitores se considera una buena candidata ya que presenta un ACMG score de 7 y un CADD de 35, por lo que es considerada como probablemente patogénica. Presenta además un MAF en gnomAD y en CSVS de 0 y sin homocigotos conocidos en dichas bases de datos. Esta variante, además, se expresa en las células de Deiters.

#### F) Estudio de variantes en el número de copia (CNV) del Trío 1.

Para el primer trío no se encontraron variantes significativas en el análisis de aumento del número de copias (Tabla suplementaria 2 y 3). En el análisis de pérdida de número de copias, sin embargo, se encontró la variante homocigota en la posición chr3:191060000-191070000, que afecta al gen **CCDC50** en una zona intrónica entre el exón 1 y exón 2 (Tabla 18). Concretamente, solapa con una variante estructural anotada en gnomAD en el locus 3:191064685-191071667, con una frecuencia de 0.01 en población europea. Esta misma variante se ha encontrado en el probando del trío 4 con una pérdida completa de la región. Este gen es conocido por ser un gen causante de hipoacusia neurosensorial postlingual progresiva (DFNA44), la cual también podría ser tenida en cuenta como variante explicativa del Trío.

En resumen, la variante que más probablemente estaría asociada a este individuo sería la variante **homocigota SH3GL1, seguida de la variante heterocigota** de novo situada en el gen **LILRA6**, aunque las variantes estructurales que implican a los genes **TCOF1** y **CCDC50** no pueden ser excluidas, siendo su probabilidad algo menor de acuerdo a los criterios de priorización empleados.

Gen	Tipo variante	Herencia	Posición (Hg19)	rs	CSVS Frecuencia	CSVS Nº homocigotos	gnomAD	gnomAD_NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
SH3GL1	Exónica Con cambio de sentido	SNV homocigota	19:4361656-4361656 C>T	rs150388848	0.008	0	0.00106	0.00159	0	24.7	Benign (PP3 + BS1)	-3	0.64

Tabla 14. Variantes candidatas SNV homocigotas del Trío 1.

Gen	Tipo variante	Herencia	Posición (Hg19)	rs	CSVS Frecuencia	CSVS Nº homocigotos	gnomAD	gnomAD_NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
ARSD	Exónica Stopgain	Herencia ligada al X	X:2833605-2833605 C>T	rs111939179	0	0	0	0	0	35	Pathogenic (PVS1 + PM3 + PP3)	11	0.86

Tabla 15. Variantes candidatas ligadas al X del Trío 1

Gen	Tipo variante	Herencia	Posición (Hg19)	rs	CSVS Frecuencia	CSVS Nº homocigotos	gnomAD	gnomAD_NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
LILRA6	Exónica	De novo	19:54744373-54744373 A>C		0	0	0.00000423 6	0.00000910 2	0	35	Likely Pathogenic (PS2 + PM2 + PP3)	7	0

Tabla 16. Variante de novo candidata del Trío 1.

Gen	Tipo variante	Genotipo	Origen	Posición (Hg19)	rs	CSVS	CSVS Nº homocigotos	gnomAD	gnomAD NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
TCOF1	Delección sin cambio del marco de lectura	INDEL heterocigoto	Materno	5:149751746-149751763 AGTGAGGAGGGATCTGAA >	rs528897827	0.002	0	0.0003	0.0016	0	23.2	Uncertain Significance (PS4 + PM4 + PP3 + BS1 + BS2)	-1	0.95
TCOF1	Intrónica	Variante paterna		5:149747116-149747116 C>T	rs144667249	0.041	1	0.006179	0.00006481	0	6.75	Benign (BS1 + BS2 + BP4 + BP6)	-10	0.95
TCOF1	Exónica con cambio de sentido	Variante paterna		5:149759201-149759201 C>T	rs114689020	0.002	0	0.008410	0.002289	79	33	Benign (BA1 + BP6 + BP4)	-9	0.95
TCOF1	Exónica Sinónima	Variante paterna		5:149776113-149776113 G>A	rs114169102	0	0	0.003873	0.0002188	19	0.11	Benign (BP6 + BS1 + BS2 + BP4 + BP7)	-14	0.95

Tabla 17. Variantes INDELS y SNV candidatas del Trío 1.

Posición (Hg19)			Número de copias Probando	Gen
chr3	191060000	191070000	1	CCDC50

Tabla 18. CNV candidata (pérdida en número de copias) del Trío 1.

### 5.3.2 Trío 2.

#### Características clínicas del probando 2

Este individuo es una mujer que fue diagnosticado de EM a los 24 años, por lo que lleva 22 años de evolución. El paciente debutó con clínica de vértigo periférico rotatorio, acúfeno de alta frecuencia e hipoacusia unilateral de oído derecho (OD). Además, el paciente tenía previamente diagnosticada migraña sin aura e hipotiroidismo autoinmune (Anticuerpos anti-Ku, anti-tiroglobulina y anti peroxidasa tiroidea positivos), por lo que es considerado una EM Tipo 5. Las pruebas vestibulares realizadas (vHIT) mostraron unos resultados compatibles con la normalidad, con unas ganancias para los impulsos cefálicos horizontales de 0.75 en oído derecho y 0.80 en el oído izquierdo. Los umbrales auditivos iniciales (ATL en año 2008) y finales para cada oído (ATL en año 2021) se presentan a continuación (Figura 17). Actualmente, ambos progenitores a la edad de 78 años (madre) y 79 años (padre) permanecen asintomáticos.

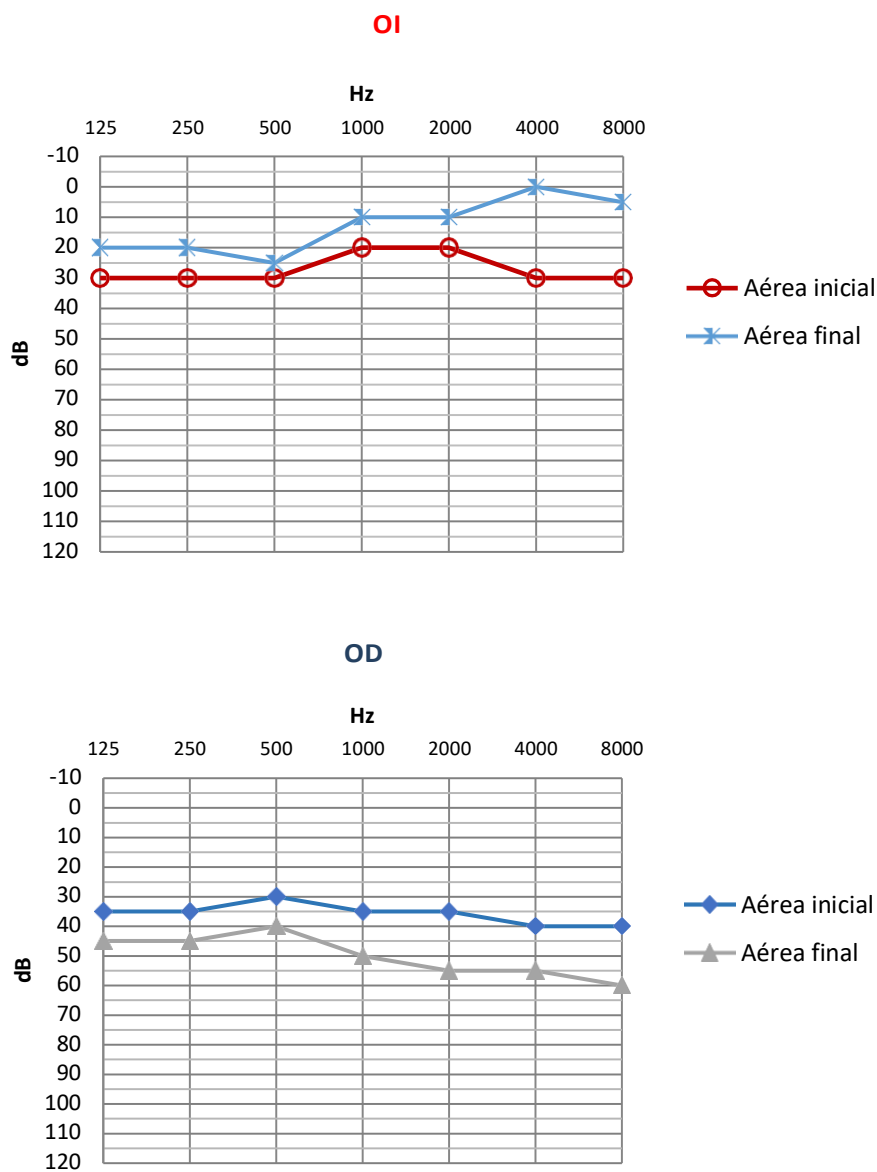


Figura 17. Audiometría tonal liminal para el Probando del Trío 2.

### **Hipótesis: Modelo de herencia recesiva**

#### A) Variantes de un solo nucleótido homocigotas recesivas del Trío 2

Para el segundo trío, las variantes homocigotas obtenidas inicialmente fueron 38742. De todas ellas, únicamente una variante con pérdida de función cumplió todos los criterios previamente mencionados. Esta variante homocigota, chr16:55562359-55562359, G>A, rs61739979 del gen **LPCAT2** tiene una frecuencia de 0.0078 en NFE y de 0.013 en población española, por lo que la frecuencia en homocigosis sería  $1 \times 10^{-4}$  (Tabla 19). Esta variante fue clasificada como probablemente benigna con un ACMG score de -5. Además, presenta un CADD de 17.73 y un pLI de 0. Este gen se expresa en las CCI, CCE, células de Deiters y células de los pilares del túnel de Corti.

#### B) Variantes de un solo nucleótido heterocigotas compuestas del Trío 2

Para el segundo trío, no se encontraron variantes heterocigotas compuestas candidatas. Las variantes estudiadas no superaron el umbral de frecuencia alélica en gnomAD ni en CSVS. Por otro lado, algunas de ellas fueron excluidas por presentar un AMCG score <-7, siendo consideradas como benignas.

#### C) Estudio de INDELS del Trío 2.

Para este trío, se encontraron dos posibles variantes en el análisis inicial de los INDELS (Tabla suplementaria 4). De estas, la variante heterocigota chr3:108118023-108118025, TCT>-, rs753407125, es de origen paterno de 3 nucleótidos y que modifica el marco de lectura en el gen **MYH15**. Dicha variante, tiene una frecuencia alélica de 0 en NFE y de 0 en la población española, no estando descrita en las poblaciones de referencia usadas. Según la guía ACMG se considera de significado incierto, con un ACMG score de 3 y un CADD de 22. Su pLI score o grado de tolerancia es de 0 y es expresada tanto por las CCI como por las células de los pilares. Este gen es codificante de la cadena pesada de la miosina, y es además causante de sordera. Aparece en heterocigosis, así que no podría explicar el fenotipo por sí sola, pero sí la existencia de una segunda variante de un solo nucleótido presente en la madre. Durante un análisis más detallado, se encontró una variante no sinónima en el probando de origen materno, localizada en chr3:108188993-108188993, G>A, rs9868484, del gen **MYH15**, con una frecuencia alélica de 0.729 en NFE y de 0.611 para la población española. Este hallazgo podría teóricamente explicar el fenotipo del probando, pero es muy poco probable, por lo que se filtraron ambas variantes.

### **Hipótesis: Modelo de herencia ligada al X**

#### D) Herencia ligada al cromosoma X del Trío 2

No se encontraron variantes ligadas al X para este Trío, ya que las encontradas eran variantes comunes superando el umbral de frecuencia alélica determinado.

### **Hipótesis: Modelo de herencia dominante**

#### E) Variantes de novo del Trío 2

No se validaron variantes de novo en el probando de este Trío. Durante el análisis se encontró una variante de novo heterocigota, chr17:45214527-45214527, T>C, rs62075618, en el gen **CDC27**, la cual fue

secuenciada por Sanger y posteriormente excluida por ser un falso positivo. Su ACMG score fue de 5, por lo que es considerada como una variante probablemente patogénica. Su CADD fue de 32 y su pLI de 1.

F) Estudio de variantes en el número de copia (CNV) del Trío 2.

Para el segundo trío no se encontraron variantes significativas en el análisis de aumento del número de copias (Tabla suplementaria 5) ni de pérdida de número de copias (Tabla suplementaria 6).

En resumen, después de evaluar los distintos modelos de herencia para este trío, el modelo de herencia autosómica recesiva podría dar explicación al fenotipo de este trío, así la variante **LPCAT2** en homocigosis, de acuerdo a los criterios de priorización empleados, es la que más probablemente estaría asociada a este individuo.

Gen	Tipo variante	Genotipo	Posición (Hg19)	rs	CSVS	CSVS Nº homocigotos	gnomAD	gnomAD NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
LPCAT2	Exonica con pérdida de función	SNV homocigota	16:55562359-55562359 G>A	rs61739979	0.013	1	0.0073	0.0078	20	17.73	Likely Benign (BS1 + BP6)	-5	0

Tabla 19. Variantes candidatas SNV homocigotas del Trío 2.



### 5.3.3 Trío 3.

#### Características clínicas del probando 3.

Este individuo es un varón que fue diagnosticado de EM a los 30 años, por lo que lleva 22 años de evolución. El paciente debutó con clínica de vértigo periférico rotatorio e hipoacusia unilateral de oído derecho (OD). Posteriormente, desarrollo un acufeno ipsilateral de alta frecuencia. El paciente no tenía previamente historia de cefalea previas, enfermedades autoinmunes asociadas o alteraciones de la función vestibular, por lo que se clasificó como Ménière tipo 1.

El estudio vestibular mediante vHIT, mostró unas ganancias de los impulsos cefálicos horizontales de 0.88 en el OI y de 0.81 en el OD. Los umbrales auditivos iniciales (ATL en año 2005) y finales (ATL en año 2021) para cada oído se presentan a continuación (Figura 18). Actualmente, los dos progenitores permanecen asintomáticos, a la edad de 81 años (madre) y 83 años (padre).

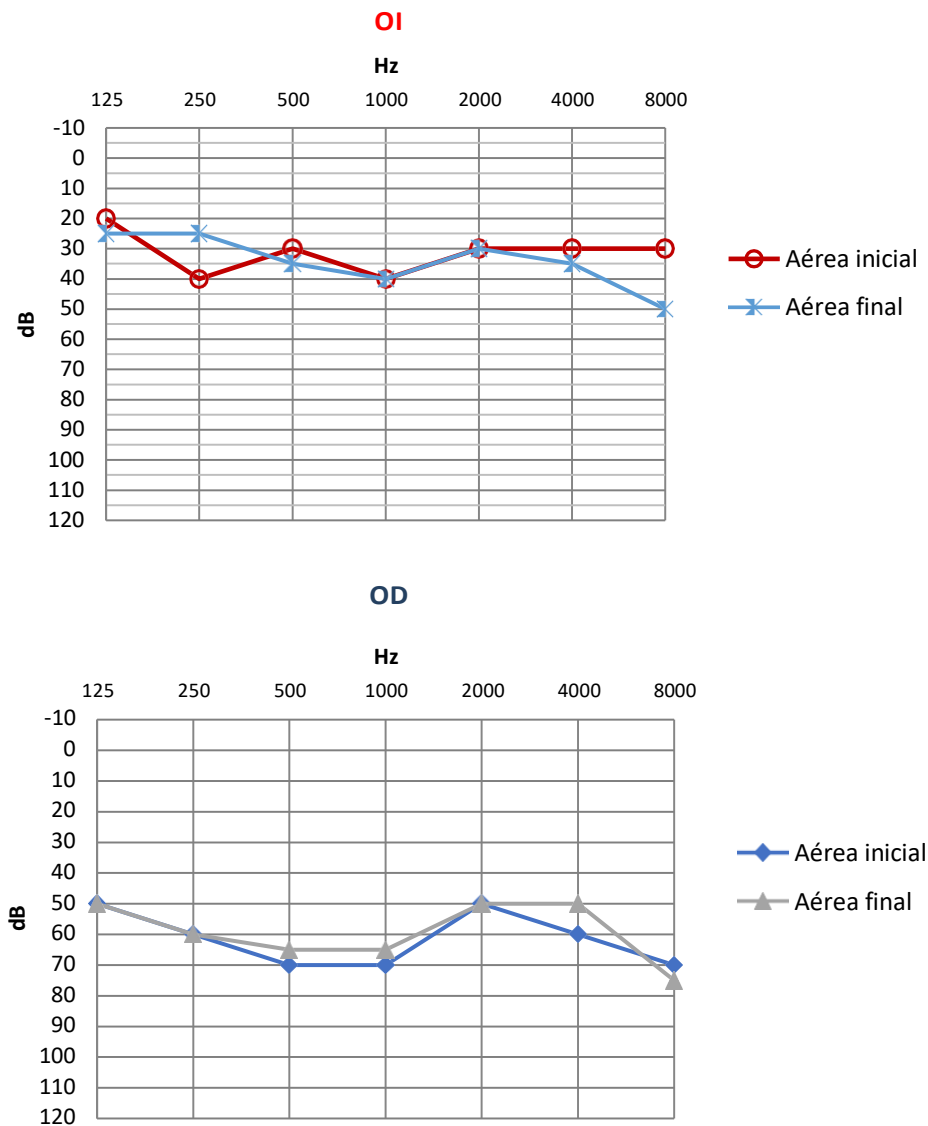


Figura 18. Audiometría tonal liminal para el Probando del Trío 3.

### **Hipótesis: Modelo de herencia recesiva**

#### A) Variantes de un solo nucleótido homocigotas recesivas del Trío 3

Para el tercer trío, las variantes homocigotas obtenidas inicialmente fueron 34676. Se encontró una variante homocigota sinónima, chr6:13711339-13711339, G>A, rs557587859, en el gen **RANBP9** que estaba presente en los progenitores como variante heterocigota (Tabla 20). Esta variante presenta una frecuencia alélica de 0 en NFE y de 0.001 en la población española. La variante se clasifica como probablemente benigna, con un ACMG score de -2, un pLI score de 1 y un CADD de 18.4. Este gen es expresado en CCE, CCI, Células de Deiters y células de los pilares.

#### B) Variantes de un solo nucleótido heterocigotas compuestas del Trío 3.

En el análisis de las variantes heterocigotas compuestas, se encontraron varias variantes heterocigotas segregando en 2 genes (Tabla suplementaria 7). De dichas variantes, el posible gen candidato que podría explicar este trío sería **KRT18**, en el cual se han encontrado 6 variantes diferentes. Solo la primera variante heterocigota y de origen paterno, localizada en chr12:53343148-53343148, C>G, podría explicar el fenotipo, sin embargo, fue excluida por no superar el filtro de MAF y CADD establecido previamente. Además, la región detectada parece acumular numerosos falsos positivos.

El resto de variantes descritas a continuación están presentes tanto en el probando como en los dos progenitores, por lo que se excluyeron. Además, la zona en la que se encuentran, aparece anotada en gnomAD como región de difícil lectura, por lo que se consideran falsos positivos. Estas variantes excluidas fueron chr12:53343209-53343209, G>A, chr12:53343225-53343225, C>T, chr12:53343231-53343231, G>C, chr12:53343265-53343265, C>A y chr12:53343007-53343007, G>A. Las variantes Chr12:53343148-53343148, C>G y Chr12:53343007-53343007, G>A.

### **Hipótesis: Modelo de herencia ligada al X**

#### C) Herencia ligada al cromosoma X del Trío 3.

Para el tercer trío, no se encontraron variantes ligadas al cromosoma X. En el análisis se consideró inicialmente una variante en el gen **SLC25A5**, la cual se excluyó por ser el probando un varón y tener la variante tanto un origen materno como paterno. Al ser los padres sanos, se consideró que la variante no podía explicar el fenotipo.

### **Hipótesis: Modelo de herencia dominante**

#### D) Variantes de novo del Trío 3.

En el análisis de este trío no se encontraron variantes candidatas. Inicialmente, se encontró una variante, chr17:42148520-42148520, A>C, rs34878178, en el gen **G6PC3**, el cual fue secuenciado por Sanger y excluido posteriormente por ser un falso positivo. Su CADD score fue de 25 y su ACMG score de 2 por lo que fue considerada una variante probablemente benigna. Su pLI score fue de 0.

#### E) Estudio de INDELS del Trío 3.

En el Trío 3, el análisis detallado de los INDELS obtenidos se muestran en la Tabla suplementaria 8. En resumen, de todas las variantes obtenidas, las que más probablemente podrían explicar este Trío se localizarían en los genes **COL9A3** y **GPR179** (Tabla 21).

La variante chr20:61448935-61448935 G->GC del gen **COL9A3**, es uno de los genes causantes del Síndrome de Stickler, caracterizado por hipoacusia neurosensorial, miopía con vitreorretinopatía y displasia epifisaria. Esta variante modifica el marco de lectura, es de tres nucleótidos, es heterocigota y de origen materno. Presenta una frecuencia alélica de 0 tanto para la población NFE como para la población española. Además, se considera patogénica con un ACMG score de 11, sin embargo, presenta un pLI de 0. Este gen se expresa sobre todo en las células de Deiters, y en menor medida en las células de los pilares, CCI y CCE. En el análisis no se encontró otra variante para este gen en ninguno de los progenitores. En gnomAD, esta delección aparece filtrada por un filtro de calidad, lo que podría suponer un falso positivo.

Por último, la variante heterocigota chr17:36486035-36486038, ACTC>-, rs775455243, es de origen paterno, modifica el marco de lectura, es de cuatro nucleótidos y se localiza en el gen **GPR179**, la cual sería otra posible opción. Pero al no identificarse otra variante rara en el mismo gen quedaría excluida en un modelo de herencia heterocigota compuesta. Es un gen expresado por las células de Deiters, CCE y CCI. Al igual que las dos variantes, anteriores, es considerada como variante patogénica con un ACMG score de 11 y un pLI score es de 0.

#### F) Estudio de variantes en el número de copia (CNV) del Trío 3.

En el estudio de aumento o pérdida de número de copias (Tabla Suplementaria 9 y 10), no se encontró ninguna variante significativa para la explicación de este Trío.

En resumen, después de evaluar los distintos modelos, el modelo de herencia recesivo, sería el que podría explicar el fenotipo de este trío, donde existiría una variante sinónima homocigota recesiva en el gen RANBP9. Aun así, aunque las variantes estructurales encontradas que implican al gen COL9A3 y GPR179 no puede ser excluidas, siendo la probabilidad de que sean responsables algo menor de acuerdo a los criterios de priorización empleados.

Gen	Tipo variante	Genotipo	Posición (Hg19)	rs	CSVS	CSVS Nº Homocigotos	gnomAD	gnomAD _NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
RANBP9	Exónica sinónima	SNV Homocigota	6:13711339- 13711339 G>A	rs557587859	0.001	0	0.00004766	0.00003959	0	18.4	Likely Benign (PS4 + BS1 + BP4 BP7)	-2	1

Tabla 20. Variantes candidatas SNV homocigotas del Trío 3.

Gen	Tipo variante	Genotipo	Origen	Posición (Hg19)	rs	CSVS	CSVS Nº Homocigotos	gnomAD	gnomAD _NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
GPR179	frameshift deletion	INDEL heterocigoto	Materno	17:36486035- 36486038 ACTC>-	rs775455243	0	0	0.000004371	0	0	16.41	Pathogenic (PVS1 + PM2 + PP3)	11	0
COL9A3	frameshift insertion	INDEL heterocigoto	Paterno	20:61448935- 61448935 G>GC	rs766668875	0	0	0	0	0	22.3	Pathogenic (PVS1 + PM2 + PP3)	11	0

Tabla 21. Variantes INDELS candidatas del Trío 3

### 5.3.4 Trío 4.

#### Características clínicas del probando 4.

Este individuo es un varón que fue diagnosticado de EM a los 19 años, por lo que lleva 4 años de evolución. El paciente debutó con clínica de vértigo periférico rotatorio e hipoacusia neurosensorial unilateral de oído derecho (OD), habiendo desarrollado, con el paso de los años, una hipoacusia neurosensorial bilateral. Este paciente no mostró datos de alteración vestibular en las pruebas realizadas, presentando unas ganancias de impulsos cefálicos horizontales de 0.8 para ambos oídos en el vHIT. Además, presenta migraña sin aura y neuralgia trigeminal izquierda. No se conocen enfermedades autoinmunes asociadas, por lo que es considerado como Ménière tipo 4.

Los umbrales auditivos iniciales (ATL en 2017) y finales para cada oído (ATL en 2020) se presentan a continuación (Figura 19). Los dos progenitores en la actualidad se encuentran asintomáticos a la edad de 53 años (madre) y 55 años (padre).

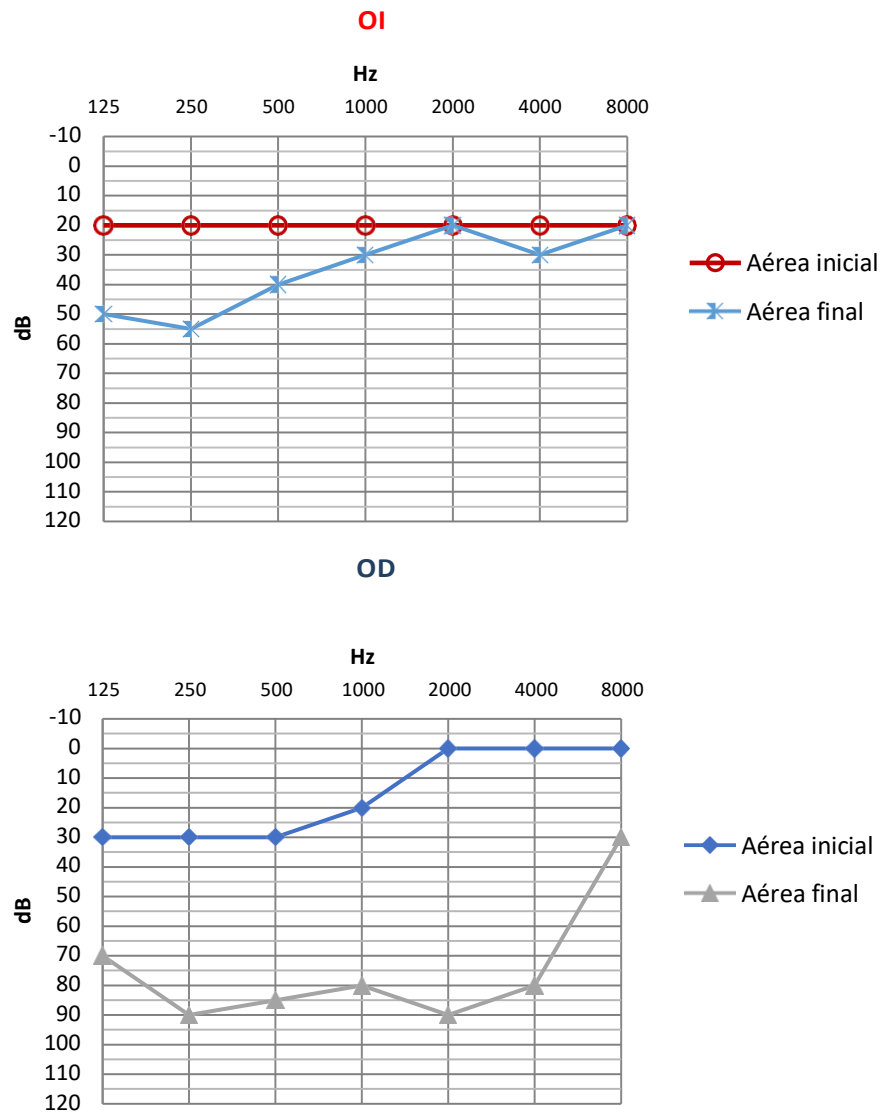


Figura 19. Audiometría tonal liminal para el Probando del Trío 4.

### **Hipótesis: Modelo de herencia recesiva**

A) Variantes de un solo nucleótido homocigotas recesivas del Trío 4.

Para el cuarto trío, las variantes homocigotas obtenidas inicialmente fueron 37476. Se encontró una única variante sinónima chr8:37963081-37963081, G>C, rs193080501 del gen **ASH2L** (Tabla 22). Esta variante tiene una frecuencia alélica de 0.01 tanto para la población NFE como para la población española, por lo que la frecuencia en homocigosis sería 0.0001. Este gen, se expresa en las células de Deiters, las células de los pilares, CCE y CCI. Tiene un ACMG score de 3, por lo que se considera de significado incierto y un pLI de 1.

B) Variantes de un solo nucleótido heterocigota compuesta del Trío 4.

Para el cuarto trío, no se encontraron variantes heterocigotas en el mismo gen que pudiesen explicar una herencia heterocigota compuesta en el trío. En el análisis de las mismas, las variantes que se encontraron no superaron los filtros de MAF establecidos o fueron falsos positivos.

### **Hipótesis: Modelo de herencia ligada al X.**

C) Herencia ligada al cromosoma X del Trío 4.

En el análisis de la herencia ligada al cromosoma X, se encontró una variante con cambio de sentido, de origen paterno, en el gen **ARSD**. Este gen es expresado por las células de Deiters, las células de los pilares, CCE y CCI. Su ACMG score es de 9, por lo que se considera una variante de significado incierto. EL pLI score es de 0, por lo que está poco conservado.

Este gen, como en el trío previo, posee numerosos pseudogenes y se encuentra en una región de difícil secuenciación y gran número de falsos positivos, requiriendo de validación secundaria. Dado que esta variante estaba también presente en el padre, y el probando era un varón, quedaría excluida (Tabla 23).

### **Hipótesis: Modelo de herencia dominante**

D) Variantes de novo del Trío 4.

Para este trío, se encontró la variante heterocigota de novo chr12:52845683-52845683, A>G, rs747994676, localizada en el gen **KRT6B** (Tabla 24). Esta variante presenta una frecuencia alélica de 0 para la población española. Presenta un CADD de 17, aunque está considerada como benigna por presentar un ACMG, con score de -6 y un pLI score de 0. Este gen está relacionado con la paquioniquia congénita, donde la hiperqueratosis palmo-plantar es la manifestación más frecuente, pero también puede afectar a otros órganos como el oído, produciendo por ello hipoacusia.

E) Estudio de INDELS del Trío 4.

En el Trío 4, las inserciones y deleciones obtenidas en el estudio se muestran en la Tabla suplementaria 11 y en la Tabla suplementaria 12. De todas ellas, la variante que podría explicar

este trío se muestra en la Tabla 25, siendo una variante en el gen **UFSP1**. Esta variante heterocigota modifica el marco de lectura, es de origen paterno y se localiza en Chr7:100486696-100486696 con la inserción de una citosina, rs763916652. Esta variante tiene una frecuencia alélica de 0.0002 para la población NFE y de 0 para la población española. Este gen se expresa fundamentalmente por las CCI y en menor proporción por las células de Deiters, células de los pilares y CCE. Es considerada como probablemente patogénica, portener un ACMG score de 7, un CADD de 22.6 y con un pLI score de 0.03. Sin embargo, dado que esta variante estaba en el padre y dado que, durante el análisis no se encontró otra variante del mismo gen en la madre del probando, fue excluida.

#### F) Estudio de variantes en el número de copia (CNV) para el Trío 4.

En el estudio de las variantes en el número de copias, se encontró una pérdida en el número de copias en una región que incluye el gen **CCDC50** (Tabla 26), conocido por ser un gen causante de hipoacusia neurosensorial postlingual progresiva (DFNA44), la cual también podría ser tomada en cuenta como variante explicativa del trío. Esta variante homocigota se sitúa entre la posición chr3:191060000-191070000, afectando al primer intrón del gen **CCDC50**. Concretamente, solapa con una variante estructural anotada en gnomAD en el locus 3:191064685-191071667, con una frecuencia de 0.01 en población europea. Esta misma variante se ha encontrado en el probando del trío 1, también en homocigosis, con pérdida completa de copias en la región. El estudio del resto de variantes CNV se encuentran en las Tablas suplementarias 13 (aumento del número de copias) y 14 (pérdida del número de copias).

En resumen, el modelo de herencia recesiva podría explicar el fenotipo de este trío. Así, el probando del trío 4 tendría la variante sinónima homocigota recesiva chr8:37963081-37963081, G>C, rs193080501 del gen **ASH2L** como primera opción para la explicación del fenotipo. Aun así, el modelo de herencia dominante debido a la variante de novo del gen **KRT6B**, y la pérdida del número de copias que incluye el gen **CCDC50** no pueden ser excluidas; siendo su probabilidad algo menor de acuerdo a los criterios de priorización empleados.

Gen	Tipo variante	Genotipo	Posición (Hg19)	rs	CSVS Frecuencia	CSVS Nº homocigotos	gnomAD	gnomAD NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
ASH2L	Exónica sinónima	SNV homocigota	8:37963081-37963081 G>C	rs193080501	0.012	1	0.007217	0.01100	9	23.4	Uncertain Significance (PM2 + PP3)	3	1

Tabla 22. Variantes candidatas SNV homocigotas del Trío 4

Gen	Tipo variante	Genotipo	Origen	Posición (Hg19)	rs	CSVS	CSVS Nº Homocigotos	gnomAD	gnomAD_ NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
ARSD	Exónica Stopgain	Herencia ligada al X	Paterno	X:2833605-2833605 C>T	rs111939179	0	0	0.00004756	0.00001488	0	35	Uncertain Significance (PVS1 + PP3)	9	0

Tabla 23. Variantes candidatas ligadas al X del Trío 4

Gen	Tipo variante	Herencia	Posición (Hg19)	rs	CSVS Frecuencia	CSVS Nº homocigotos	gnomAD	gnomAD NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
KRT6B	Exónica	De novo	12:52845683-52845683 A>G	rs747994676	0	0	0.0002598	0.0004336	0	17	Benign (PS2 + BS1 + BS2 + BP4 + BP7)	-6	0

Tabla 24. Variante de novo candidata del Trío 4.



Gen	Tipo variante	Genotipo	Origen	Posición (Hg19)	rs	CSVS Frecuencia	CSVS Nº homocigotos	gnomAD	gnomAD NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
UFSP1	frameshift insertion	INDEL heterocigoto	Paterno	7:100486696-100486696	rs763916652	0	0	0	0.0002	0	22.6	Likely Pathogenic (PS4 + PM2 + PP3)	7	0.03

Tabla 25. Variante INDELS candidata del Trío 4.

Posición (Hg19)			Número de copias	Gen
chr3	191060000	191070000	1	CCDC50

Tabla 26. CNV candidata (pérdida en el número de copias) del Trío 4.

### 5.3.5 Trío 5

#### Características clínicas del probando 5.

Este individuo es una mujer que fue diagnosticado de EM a los 33 años, por lo que lleva 2 años de evolución. El paciente debutó con clínica de vértigo periférico rotatorio e hipoacusia neurosensorial unilateral de oído izquierdo (OI). La videonistagmografía realizada mostró un déficit de 25% izquierdo, reflectividad derecha 47.8°/s y preponderancia 17% izquierda. El paciente no tenía previamente historia de migraña o cefaleas ni enfermedades autoinmunes asociadas por lo que sería considerada como EM tipo 1. Los umbrales auditivos iniciales (ATL en 2018) y finales (ATL en 2020) para cada oído se presentan a continuación (Figura 20).

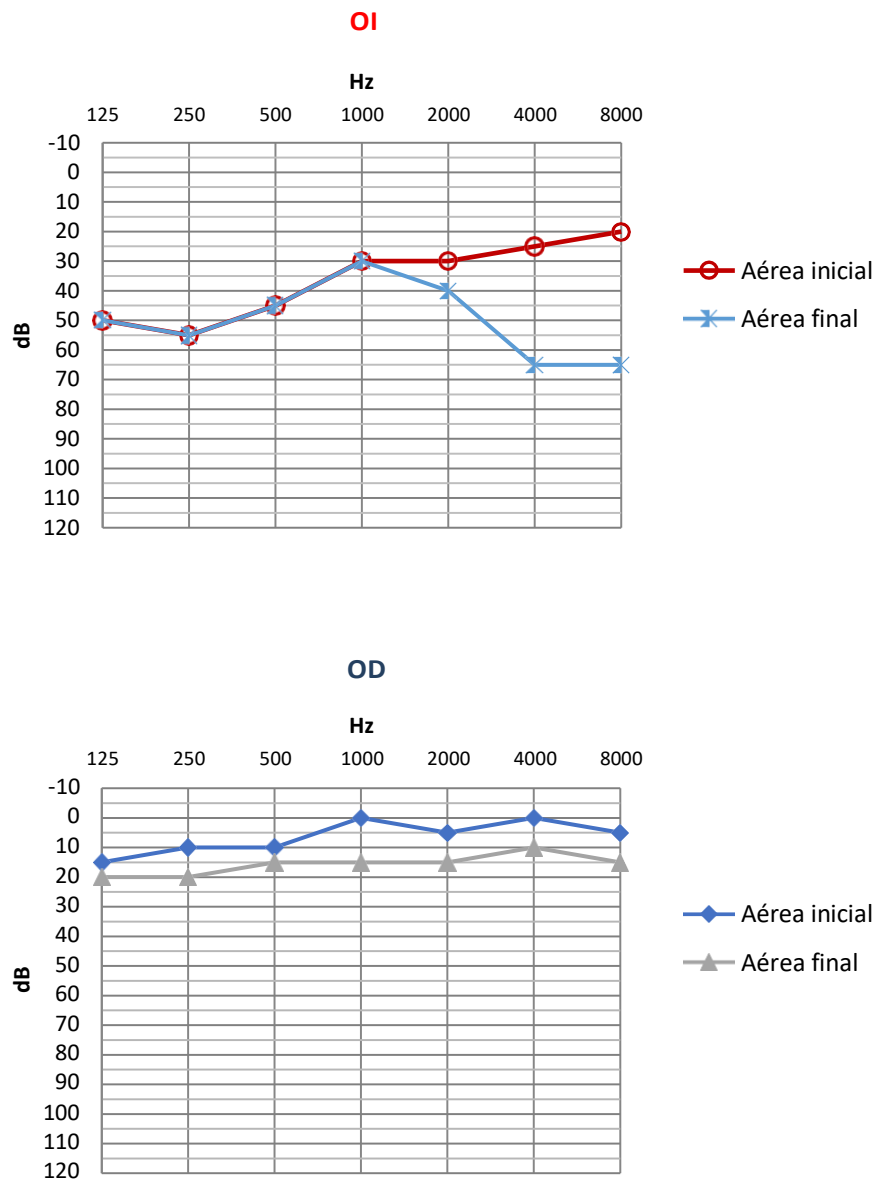


Figura 20. Audiometría tonal liminal para el Probando del Trío 5.

### **Hipótesis: Modelo de herencia recesiva**

A) Variantes de un solo nucleótido homocigotas recesivas del Trío 5.

Para el quinto trío, no se encontraron variantes homocigotas candidatas por no superar durante el análisis los filtros de MAF y CADD establecidos previamente.

B) Variantes de un solo nucleótido heterocigota compuesta del Trío 5.

Para el quinto trío, no se encontró durante el análisis ninguna combinación de 2 variantes heterocigotas que segregasen el fenotipo.

### **Hipótesis: Modelo de herencia ligada al X**

D) Herencia ligada al cromosoma X del Trío 5.

Durante el análisis detallado de este trío, no se encontró ninguna variante ligada al cromosoma X en el probando.

### **Hipótesis: Modelo de herencia dominante**

C) Variantes de novo del Trío 5.

En el análisis de este trío, se encontró una variante heterocigota de novo en el gen **TRAIP** (Tabla 27). Esta variante está localizada en Chr3:49832729-49832729, A>G, rs1329958463. Dicha variante tiene una frecuencia alélica de 0.02861 para la población NFE y de 0.001 para la población española y son homocigotos conocidos en gnomAD y CSVS. Esta variante, se considera de significado incierto ya que presenta un ACMG score de 3 y un CADD de 24.

E) Estudio de INDELS del Trío 5.

Durante el análisis de este trío, no se encontró ningún INDEL candidato, por no superar bien los filtros de frecuencia alélica o el CADD establecido previamente.

F) Estudio de variantes en el número de copia (CNV) para el Trío 5.

En el estudio de aumento o pérdida de número de copias (Tabla Suplementaria 15 y 16), no se encontró ninguna variante significativa para la explicación de este trío.

En conclusión, el modelo de herencia dominante sería la que más probablemente podría explicar el fenotipo de este trío. Así, el probando del trío 5 presenta como variante más probable la variante heterocigota de novo en el gen **TRAIP**, podría ser la responsable de la enfermedad del probando.

Posición (Hg19)			Número de copias	Gen
chr3	191060000	191070000	1	CCDC50

*Tabla 26. CNV candidata (pérdida en el número de copias) del Trío 4.*

### 5.3.6 Trío 6

#### Características clínicas del probando 6.

Este individuo es un varón que fue diagnosticado de EM a los 18 años, por lo que lleva 2 años de evolución. El paciente debutó con clínica de vértigo periférico rotatorio e hipoacusia neurosensorial unilateral de oído derecho (OD). El paciente no tenía previamente historia de cefaleas ni de enfermedades autoinmunes. Este paciente fue clasificado como enfermedad de Ménière Tipo 5. El estudio vestibular realizado fue la VNG, obteniéndose unos resultados de un 16% de déficit derecho, reflectividad 36.5º/s izquierdo y preponderancia 8% izquierda.

Los umbrales auditivos iniciales (ATL en 2009) y finales (ATL en 2020) para cada oído se presentan a continuación (Figura 21).

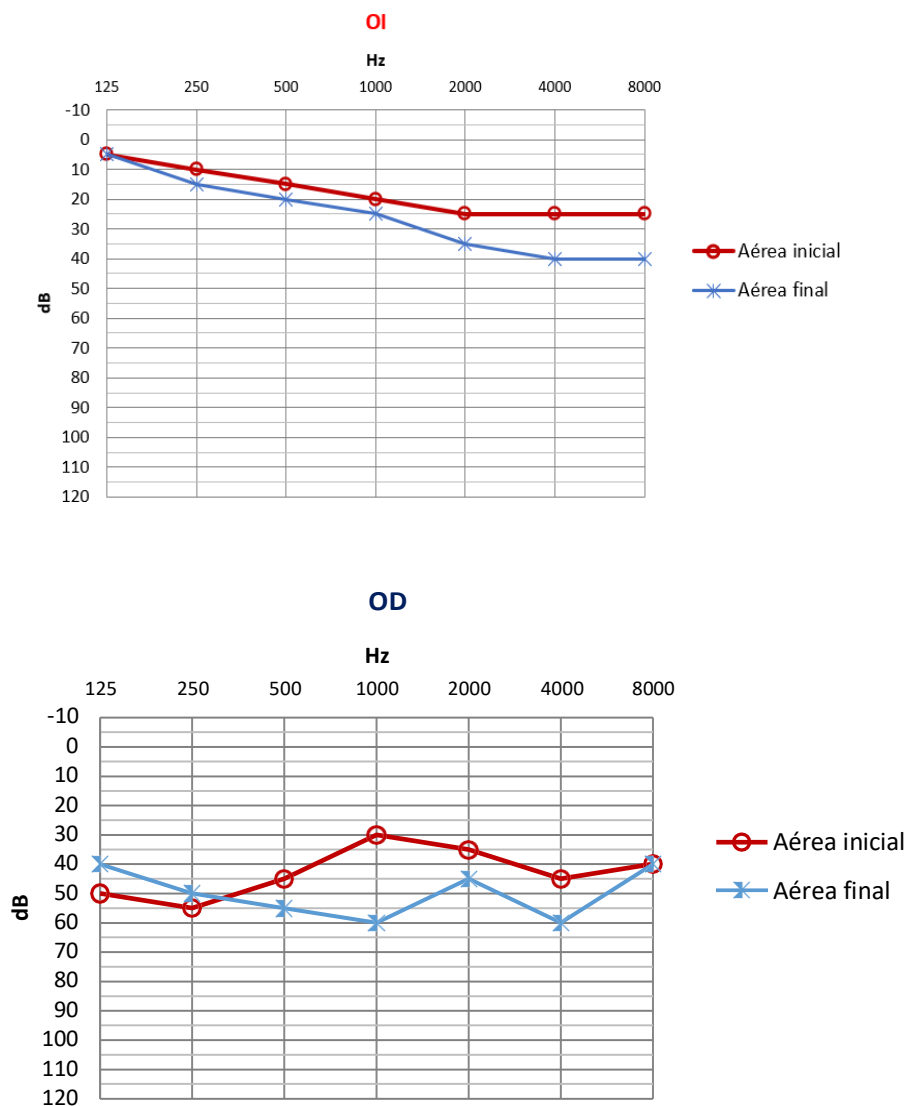


Figura 21. Audiometría tonal liminal para el Probando del Trío 6.

### **Hipótesis: Modelo de herencia recesiva**

A) Variantes de un solo nucleótido homocigotas recesivas del Trío 6.

Para el sexto trío, no se encontraron variantes homocigotas candidatas. El análisis de las variantes para este trío no superaron los filtros establecidos de frecuencia alélica en las distintas bases de datos ni tampoco el filtro de CADD prefijado.

B) Variantes de un solo nucleótido heterocigota compuesta del Trío 6.

Para el sexto trío, tampoco se encontraron variantes heterocigotas compuestas, ya que ninguna de ellas superaba el MAF y CADD fijado previamente.

### **Hipótesis: Modelo de herencia ligada al X**

C) Herencia ligada al cromosoma X del Trío 6.

Durante el análisis de este trío, no se encontró ninguna variante candidata en ningún gen con herencia ligada al cromosoma X.

### **Hipótesis: Modelo de herencia dominante**

D) Variantes de novo del Trío 6.

En el análisis de este trío, no se encontró ninguna variante de novo que superase los filtros establecidos de CADD y frecuencia alélica.

E) Estudio de INDELS del Trío 6.

Durante el análisis de este trío, no se encontró ningún INDEL candidato, por no superar bien los filtros de frecuencia alélica o el CADD establecido previamente.

F) Estudio de variantes en el número de copia (CNV) para el Trío 6.

En el estudio de variantes en el número de copia (Tabla Suplementaria 17 y 18) se encontró una variante heterocigota con aumento en el número de copias en una región que incluye la región distal del gen **KMT2C**, conocido por ser un gen expresado en la *stria vascularis* (Tabla 28). Esta región se sitúa en chr7:152.400.000-152.410.000, y afecta a una la región central del intrón 1 del gen. La variante en el número de copias predicha solapa con otras duplicaciones parciales observadas en gnomAD, pero todas ellas con una frecuencia alélica inferior a 0.01. La duplicación que mejor solapa en gnomAD es DUP\_7\_22923 con una frecuencia de 0.0001312 en la población europea. Dado que esta duplicación no está presente en los progenitores, ni en las bases de referencia del genoma podría ser considerada para explicar el fenotipo.

En resumen, bajo el modelo de herencia dominante, la CNV heterocigota situada en la región intrónica de **KMT2C**, suponiendo que supone un aumento en el número de copias, junto con su expresión en la *stria vascularis* sería la opción más probable, de acuerdo con los criterios de priorización empleados.

Posición (Hg38)			Número de copias	Gen
chr7	152.400.000	152.410.000	7	KMT2C

*Tabla 28. CNV candidatas (aumento en el número de copias) del Trío 6.*



# Discusión

## Perfil clínico de la enfermedad de Ménière

La EM es un trastorno clínico heterogéneo y complejo, que posiblemente resulta de la interacción de múltiples factores genéticos, epigenéticos y medioambientales. Existen varias evidencias epidemiológicas que indican que la EM podría tener una base genética:

- a) La prevalencia de esta enfermedad es superior en población europea que asiática (Ohmen *et al.*, 2013).
- b) La frecuencia de la enfermedad familiar es de un 8% (Hietikko *et al.*, 2013) y el riesgo de recurrencia entre hermanos es 48 veces mayor al esperado en la población española (Requena *et al.*, 2013).
- c) La concordancia entre los casos de gemelos homocigotos es superior a la de gemelos dicigotos (Requena *et al.*, 2013)

En el estudio previamente mencionado, se analizan el perfil clínico y los niveles de citoquinas y quimiocinas sanguíneas (IL-1 $\beta$ , CCL3, CCL4, CCL22, CCL18 y CXCL1) en pacientes con EM según la edad de inicio de la enfermedad, la cual sigue una distribución normal (Frejo *et al.*, 2017b, 2016), con una media de aproximadamente 43 años. Nuestro principal hallazgo es que la migraña se observa con mayor frecuencia en los pacientes con EMIP que en los pacientes con EMIT, aunque los niveles de citoquinas no están relacionados con la edad de aparición en la EM.

Estudios previos ha informado que sobre un 20% de los pacientes con EM muestras niveles elevados de citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Frejo *et al.*, 2018). Además, Flook *et al.* revelaron diferencias significativas en varias citoquinas y quimiocinas entre pacientes con EM y migraña vestibular, lo que sugiere que estos biomarcadores podrían distinguir entre EM y migraña vestibular (Flook *et al.*, 2019). En nuestros resultados se ha confirmado la hipótesis de la activación de la señalización de IL-1 $\beta$ , que contribuye a mantener una respuesta autoinflamatoria en la EM, sin embargo, esta respuesta no depende de la edad.

Esto podría explicar las respuestas de algunos pacientes a los fármacos antiinflamatorios (Gazquez *et al.*, 2012). En nuestro estudio, las concentraciones de IL-1 no dependen de la edad, ni en pacientes con EM ni en controles sanos. Es de destacar, que también se encontraron niveles de IL-1 más altos en un subgrupo de pacientes con migraña, lo que sugeriría un estado proinflamatorio en estos pacientes. Además, se observó que los pacientes con EMIP tienen una mayor prevalencia de migraña como comorbilidad en comparación con los pacientes con EMIT. Este hallazgo confirma lo observado por Frejo *et al.*, que los pacientes con EM y migraña (tipo 4) presentaron un inicio de la enfermedad más precoz que el resto de los pacientes con EM (Lidia Frejo *et al.*, 2017a, 2016).

Además, la asociación clínica entre la autoinmunidad y la EM sugiere la posibilidad de un endofenotipo autoinmune de acuerdo con el papel inmune del saco endolinfático o la síntesis de citoquinas (Greco *et al.*, 2012). Hay dos tipos de pacientes con EM según la patología del saco endolinfático; un endotipo que se caracteriza por la degeneración epitelial del saco, y otro segundo endotipo que muestra hipoplasia del saco (Bächinger *et al.*, 2019). Sin embargo, no

se ha demostrado asociación entre el saco endolinfático hipoplásico y la migraña, tampoco entre el perfil de citoquinas y la hipoplasia del saco.

Se han encontrado niveles más altos de CXCL1 y CCL22 en la EM familiar, pero la relevancia de dicho hallazgo no está claro. El papel de la quimiocina CXCL1 consiste en reclutar y activar neutrófilos en el sitio de infección (Jin Liliang, Sanjay Batra, David Nobuhiro Douda and Jeyaseelan., 2014) y es esencial para la expresión de mediadores proinflamatorios junto con la activación de NF-KB y MAPKs (Sawant *et al.*, 2016).

CCL22 es una quimiocina derivada de los macrófagos y un potente quimioatrayente para los linfocitos T activados crónicamente (Atri *et al.*, 2018; Scheu *et al.*, 2017). Además se cree que esta quimiocina está involucrada en varios procesos como alergia, autoinmunidad y procesos tumorales (Scheu *et al.*, 2017)

Existen varios mecanismos que pueden impulsar la aparición de una EM, una opción barajada es una respuesta inflamatoria persistente que puede afectar a uno o a ambos oídos, junto con la participación de factores locales. El acúmulo de endolinfa es el resultado del daño a nivel del oído interno, generalmente asociado con hipoacusia neurosensorial (Tonndorf, 1976). La enfermedad autoinflamatoria del oído interno (EAOI) puede deberse a una respuesta inmunológica innata mediada por monocitos, IL-1 $\beta$  y autoanticuerpos no específicos (Vambutas and Pathak, 2016). En individuos sanos, IL-1RA es detectable en sangre mientras que los niveles de IL-1 no lo son. En nuestro estudio, los niveles de IL-1RA estaban más elevados en la mayoría de los pacientes con EM independientemente de los niveles de IL-1 (Frejo *et al.*, 2018).

También se observó que solo 58 genes se expresaban diferencialmente en los pacientes con EM con niveles basales de IL-1 altos, lo que respalda la hipótesis de que esta respuesta anómala puede facilitar la identificación de subgrupos de EM mediante la expresión genética. Por lo tanto, el cambio en la actividad inflamatoria en pacientes con migraña puede ser una de las principales causas de disfunción endotelial y aumento de la permeabilidad de las células endoteliales, lo que conduce a un aumento del fluido paracelular y proteínas (Gürol *et al.*, 2015). En diferentes estudios de pacientes con migraña y mediciones en los niveles de citoquinas se ha observado que cambios inmunológicos podrían desempeñar un papel en la fisiopatología de la migraña. Por lo tanto, podemos especular que el aumento de liberación de CCL18 observado en estos pacientes, en combinación con otros mediadores proinflamatorios, contribuyen a un estado inflamatorio persistente que puede desencadenar la aparición de EM en personas susceptibles.

Este subgrupo de pacientes con EM y migraña pueden tener un inicio más temprano y un mayor riesgo de autoinflamación. Además, la falta de correlación entre la edad y los niveles plasmáticos de IL-1 independientemente del envejecimiento de la respuesta inmune, sugiere que tanto los factores genéticos como epigenéticos son necesarios para desarrollar la EM en pacientes con migraña (Gallego-Martinez *et al.*, 2020). Nuestro estudio permite una mejor comprensión de como los mediadores inmunes pueden influir en la edad de inicio de la EM, lo cual es de gran importancia para proporcionar estrategias enfocadas en retrasar la aparición de la enfermedad en individuos susceptibles en una población cada vez mayor.

## Perfil genómico de la enfermedad de Ménière

El conocimiento de la estructura genética de la EM es aún bastante limitado y gran parte de lo que sabemos ha sido a través de los estudios familiares realizados mayoritariamente en España (Escalera-Balsera *et al.* 2020).

La EM familiar tiene un inicio más temprano que los casos esporádicos de la enfermedad, lo que sugiere que debutar de manera temprana puede tener una carga genética más alta, incluidos los pacientes con una herencia recesiva. Estudios previos han demostrado que existe un enriquecimiento de varias raras con cambio de sentido “*missense*” en algunos genes relacionados con la hipoacusia. Este exceso de variantes con cambio de sentido en algunos genes puede aumentar el riesgo de desarrollar pérdida auditiva en esta enfermedad (Gallego- Martínez *et al.*, 2019).

Una gran parte de los pacientes con EM familiar (EMF) tienen una herencia autosómica dominante (AD) con penetrancia incompleta (Morrison *et al.*, 2009; Requena *et al.*, 2014), con unos pocos genes involucrados en familias (Martín-Sierra *et al.*, 2017; Requena *et al.*, 2015).

Sin embargo, se ha encontrado un enriquecimiento de variantes raras con cambio de sentido, en varios pacientes no relacionados, en el gen *OTOG* (Roman-Naranjo *et al.*, 2020). Estas variantes se observaron en 15 de 46 familias no relacionadas (33% de casos familiares). Siete de las 15 familias con variantes raras en *OTOG*, además, mostraron una penetrancia incompleta (47%) y mostraron una sintomatología parcial de la enfermedad (vértigo episódico o hipoacusia) (Martín-Sierra *et al.*, 2017; Morrison *et al.*, 2009; Requena *et al.*, 2015).

La mayoría de estas variantes raras, se encontraron en algunos individuos no emparentados. Sin embargo, la mayoría de las variantes en *OTOG* se encontraron en pacientes familiares con inicio precoz de la enfermedad, pero no se observaron en otros casos esporádicos (singleton variants) (Roman-Naranjo *et al.*, 2020). El gen *OTOG* codifica otogelina, una proteína extracelular que participa en el anclaje de los otolitos a la membrana otolítica, las coronas de unión a la membrana tectoria y las uniones entre los estereocilios (Avan *et al.*, 2019). Los estereocilios están conectados entre sí a través de diferentes enlaces que involucran una gran cantidad de proteínas, una de ellas es la miosina VIIa (Goodyear *et al.*, 2005).

Se conoce que existen algunas variantes codificantes raras en el gen *MYO7A*, que ocasionan diferentes síndromes cocleovestibulares, como es *DFNB2*, *DFNA11* y *USH1B* (Friedman, TB., Belyantseva, IA., Frolenkov, 2020). La hipoacusia es un rasgo característico de estos síndromes, sin embargo, los umbrales auditivos afectados varían entre ellos. Se ha visto que la disfunción vestibular es otra manifestación que puede aparecer en los portadores de variantes raras en *MYO7A*.

Román-Naranjo *et al.*, identificaron 9 variantes raras en el gen *MYO7A* en 9 familias europeas con EM no relacionadas entre sí, de las cuales, tres variantes habían sido previamente identificadas en pacientes con síndrome de Usher (Roman-Naranjo *et al.*, 2021). La variante con pérdida inicial *MYO7A:c.3G>A;p.Met1*, había sido encontrada junto con la variante *p.Leu1839Pro MYO7A* en un paciente con síndrome de Usher tipo 2 (Fuster-García *et al.*, 2021). La variante *p.Arg873Trp* en el gen *MYO7A* también había sido observada previamente en pacientes con Síndrome de Usher tipo 2 (Västinsalo *et al.*, 2013). La variante *p.Arg336His*, fue observada en pacientes con síndrome de Usher tipo 1, siendo clasificada como una variante causante de enfermedad (Jaijo *et al.*, 2006).

Debido a su ubicación y función en el complejo de transducción de las células ciliadas, la miosina VIIa, parece que actúa como un motor que tensiona la mecanotransducción de las células ciliadas en las uniones 'tip' (Li *et al.*, 2020). Las variaciones raras en el gen *MYO7A*, solo o combinado con variantes raras en genes que codifican la unión de miosina VIIa, conducirían a enlaces 'tip' y 'ankle' frágiles, con pérdida de cohesión entre los estereocilios, y una apertura anormal del complejo MET. Esto conduciría a una despolarización sostenida de las células ciliadas y finalmente a una pérdida de audición y/o disfunción vestibular.

Román-Naranjo *et al.* (2021) han encontrado una asociación entre variantes raras en *MYO7A* con variantes sin sentido en genes codificantes de miosina VIIa, incluyendo los genes *ADGRV1*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1C* y *SHROOM2* (Roman-Naranjo *et al.*, 2021). Esto sugiere que algunos casos de EM pueden presentar un patrón de herencia compuesto, donde exista una variante en un gen principal (*MYO7A*) junto con una variante adicional en un segundo gen candidato (por ejemplo, *CDH23*, *PCDH15*, *ADRV1*...) que modifique el fenotipo (por ejemplo, la edad de aparición de la enfermedad). El digenismo compuesto podría, por tanto, ser otro mecanismo por el que explicar la expresividad variable que se encuentra en la EM.

Los estudios de secuenciación en pacientes con EM esporádica son escasos. Gallego-Martínez *et al.*, publicó dos estudios seleccionando casos esporádicos (no familiares) de EM. El primer estudio incluyó 45 genes autosómicos relacionados con la hipoacusia neurosensorial.; En el segundo estudio se incluyeron genes de 2 vías principales (señalización de la guía axonal y la vía de extravasación de los leucocitos) que mostraban genes expresados diferencialmente en las células de soporte de la cóclea y los órganos vestibulares (Gallego-Martínez *et al.*, 2019). Estos estudios encontraron un enriquecimiento de múltiples variantes raras con cambio de sentido en varios genes de hipoacusia como *GJB2*, *USH1G*, *SLC26A4* y *CLDN14* y genes de señalización de la guía axonal como *NTN4* y *NOX3* en pacientes con EM no familiares.

En la presente Tesis, hemos realizado los primeros estudios de secuenciación de genoma completo en pacientes con EM esporádica mediante el análisis de tríos. Nuestros resultados demuestran, que la EM esporádica de inicio precoz tiene un patrón complejo de herencia (Figura 22), pudiendo ser herencia recesiva homocigota dominante, como hemos identificado en 4 probandos. Además, hemos identificado variantes de novo que podrían explicar el fenotipo incluyendo CNV.

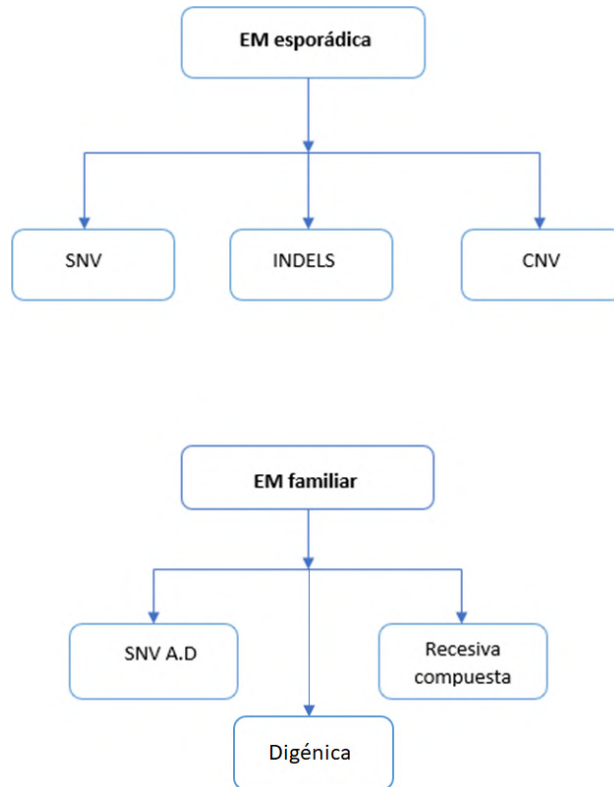


Figura 22. Representación del modelo de herencia para EM familiar y EM esporádica.

Así, en el trío 1, la variante homocigota candidata obtenida fue encontrada en el gen **SH3GL1** (*SH3 Domain Containing GRB2 Like 1*). Se conoce que este gen codifica un miembro de la familia de endofilinas. La proteína codificada participa en la endocitosis y también puede desempeñar un papel en el ciclo celular (Boucrot *et al.*, 2015).

Se halló una variante de novo candidata en el gen **LILRA6** (*Leukocyte Immunoglobulin Like Receptor A6*), codificando un receptor relacionado con la enfermedad de Schwartzman; además, interviene en vías relacionadas del con el sistema inmunológico innato y las e interacciones inmunorreguladoras entre células linfoides y células no linfoides (Bashirova *et al.*, 2014; López-Álvarez *et al.*, 2016). En cuanto a la delección obtenida en este trío en el gen **TCOF1** (*Treacle Ribosome Biogenesis Factor 1*), este gen se encarga de codificar una proteína nucleolar con un dominio homólogo LIS1. La proteína participa en la transcripción del ADN ribosómico a través de su interacción con el factor UBTF (*upstream binding factor*). Las mutaciones en este gen se han asociado con el síndrome de Treacher Collin tipo 1 y con el síndrome de Crouzon (Bowman *et al.*, 2012; Werner *et al.*, 2015). En cuanto a los CNV, se encontró una variante en el número de copias en el gen **CCDC50** (*Coiled-Coil Domain Containign 50*). Este gen se encarga de codificar una proteína citoplásmica soluble, fosforilada en tirosina con múltiples dominios que interactúan con la ubiquitina. Las mutaciones en este gen causan hipoacusia DFNA44 (hipoacusia neurosensorial progresiva postlingual y no sindrómica) (Modamio-Høybjør *et al.*, 2003). En el ratón, esta proteína se expresa en el oído interno durante el desarrollo y la maduración postnatal. Esta proteína también puede funcionar como un regulador negativo de la señalización de NF-κB y como un efector de la señalización celular mediada por el factor de crecimiento epidérmico (FCE) (Modamio-Høybjør *et al.*, 2007; Tashiro *et al.*, 2006). La variante encontrada en esa región solapa con delecciones

conocidas y comunes en la población. Concretamente, solapa con la delección 3:191064685-191071667(DEL\_3\_4086), con una frecuencia alélica en la población global de gnomAD de 0.009311. Se observa de forma muy común en poblaciones europeas (0.01167) y africanas (0.008706), pero es extremadamente rara en poblaciones asiáticas (0.0004139). En nuestros datos, esta variante en el número de copias ha sido hallada como una pérdida homocigota de la región intrónica proximal al exón 2, mientras que ningún individuo homocigoto para la esta delección ha sido observado en gnomAD. Esta misma variante ha sido hallada en el probando de otro trío más, lo que incrementa su interés como candidata.

En la Tabla 29 se muestran las variantes candidatas de este trío ordenadas por orden de probabilidad.

En este trío se ha priorizado la variante *SH3GL1* en homocigosis por tener baja frecuencia alélica.

Gen	Tipo variante	Herencia	Posición (Hg19)	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score	MAF NFE
<b>SH3GL1</b>	SNV homocigota	Recesiva	19:4361656-4361656 C>T	24.7	Benign (PP3 + BS1)	-3	0.64	10 <sup>-6</sup> en homocigosis
<b>TCOF1</b>	Delección heterocigota	Recesiva compuesta	5:149751746-149751763 AGTGAGGAGGG ATCTGAA>	23.2	Uncertain Significance (PS4 + PM4 + PP3 + BS1 + BS2)	-1	0.95	0.0016 en heterocigosis
<b>TCOF1</b>	Variante Intrónica de origen paterno		5:149747116-149747116 C>T	6.75	Benign (BS1 + BS2 + BP4 + BP6)	-10	0.95	10 <sup>-7</sup>
<b>TCOF1</b>	Variante con cambio de sentido de origen paterno		5:149759201-149759201 C>T	33	Benign (BA1 + BP6 + BP4)	-9	0.95	3x10 <sup>-6</sup>
<b>TCOF1</b>	Variante sinónima de origen paterno		5:149776113-149776113 G>A	0.11	Benign (BP6 + BS1 + BS2 + BP4 + BP7)	-14	0.95	3x10 <sup>-7</sup>
<b>CCDC50</b>	Homocigota CNV	Dominante	3:191060000-191070000	15.47	Uncertain Significance (PM2 + BP4)	1	0	0 en homocigosis
<b>LILRA6</b>	Heterocigota De novo	Dominante	19:54744373-54744373 A>C	35	Likely Pathogenic (PS2 + PM2 + PP3)	7	0	0 en heterocigosis

Tabla 29. Priorización de variantes candidatas en el trío 1.

Con respecto al Trío 2, la variante homocigota recesiva encontrada fue **LPCAT2** (*lysophosphatidylcholine Acyltransferase 2*). Este gen codifica una proteína miembro de la familia de las lisofosfolípidos aciltransferasas. La enzima codificada puede funcionar de dos maneras, bien catalizando la biosíntesis del factor activador de plaquetas o catalizando la síntesis de precursores de glicerofosfolípidos (Shindou *et al.*, 2007). Esta proteína puede funcionar en la biogénesis de la membrana y la producción del factor activador de plaquetas

en células inflamatorias (Soupene *et al.*, 2008). Además, la enzima puede localizarse en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. En la Tabla 30, se muestra la variante candidata.

Gen	Tipo variante	Herencia	Posición (Hg19)	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score	MAF NFE
<b>LPCAT2</b>	SNV homocigota	Recesiva	16:55562359- 55562359 G>A	17.73	Likely Benign (BS1 + BP6)	-5	17.73	6x10 <sup>-5</sup> en homocigosis

Tabla 30. Variantes candidatas ordenadas de más a menos probables en el trío 2.

En el trío 3, la variante homocigota recesiva encontrada se halló en **RANBP9** (RAN Binding Protein 9). Se conoce que este gen codifica una proteína que se une a RAN, una pequeña proteína de unión a GTP perteneciente a la superfamilia RAS, que es esencial para la translocación de ARN y proteínas a través del complejo del poro nuclear (Nakamura *et al.*, 1998). También se ha demostrado que la proteína codificada por este gen interactúa con varias otras proteínas, incluido el protooncogén **MET**, la proteína quinasa 2, el receptor de andrógenos y la quinasa-11 dependiente de ciclina (Harada *et al.*, 2008).

En cuanto a las variantes heterocigotas compuestas, se encontraron variantes heterocigotas en el gen **IGSF3** (Immunoglobulin Superfamily Member 3). Se trata de un gen que codifica una proteína de membrana de tipo inmunoglobulina que contiene varios dominios de tipo Ig-V. Una mutación en este gen se ha asociado con patología ocular (Foster II *et al.*, 2014). Su expresión en el oído interno se encuentra en CCE fundamentalmente, y en menor medida en células de los pilares, células de Deiters y CCI. Además, se encontraron también variantes heterocigotas en **KRT18** (Keratin 18). Este gen codifica la queratina 18, que junto con la queratina 8 son los miembros más comúnmente encontrados de la familia de genes codificantes de filamentos intermedios. Se expresan en tejidos epiteliales de una sola capa. Las mutaciones en este gen se han relacionado con la cirrosis citogenética (Ku *et al.*, 2003). Además, se han encontrado dos variantes de transcripción que codifican la misma proteína. En el oído interno, su expresión se limita a las células de Deiters, CCE y células de los pilares. No obstante, ambos genes han sido excluidos finalmente como posibles candidatos en los filtros realizados.

En cuanto a los INDELS de este trío, se ha detectado una inserción en **COL9A3** (Collagen Type IX Alpha 3 Chain). Este gen codifica una de las tres cadenas alfa del colágeno tipo IX, el principal componente del colágeno del cartílago hialino. El colágeno tipo IX, es una molécula heterotrimérica, que se encuentra generalmente en tejidos que contienen colágeno tipo II, un colágeno de tipo fibrilar. Las mutaciones en este gen se asocian con la displasia epifisaria múltiple tipo 3 (Bönnemann *et al.*, 2000; Faletra *et al.*, 2014). A su vez, también se han encontrado una delección candidata en **GPR179** (G Protein-Coupled Receptor 179), gen que codifica un miembro de la subfamilia de receptores de glutamato acoplados a la proteína G. La proteína codificada tiene un dominio de unión a calcio similar a FCE y un dominio transmembrana en la región N-terminal de la proteína. Las mutaciones en este gen también están asociadas con la ceguera nocturna congénita tipo 1E (Audo *et al.*, 2012). En la Tabla 31 se muestran ordenadas las variantes candidatas de mayor a menor probabilidad.

En este trío se ha priorizado igualmente la variante homocigota **RANBP9** por tener menor frecuencia alélica en comparación con el resto de variantes.

Gen	Tipo variante	Herencia	Posición (Hg19)	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score	MAF NFE
<b>RANBP9</b>	SNV homocigota	Recesiva	6:13711339-13711339 G>A	18.4	Likely Benign (PS4 + BS1 + BP4 BP7)	-2	1	1.56e <sup>-9</sup>
<b>GPR179</b>	Delección heterocigota	Dominante	17:36486035-36486038 ACTC>-	16.41	Pathogenic (PVS1 + PM2 + PP3)	11	0	0 en heterocigosis
<b>COL9A3</b>	Inserción heterocigota	Dominante	20:61448935-61448935 ->C	22.3	Pathogenic (PVS1 + PM2 + PP3)	11	0	0 en heterocigosis

Tabla 31. Variantes candidatas ordenadas de más a menos probables en el trío 3.

En el Trío 4, **ASH2L** fue el gen candidato (*ASH2 Like, Histone Lysine Methyltransferase Complex Subunit*) con una variante homocigota recesiva. Este gen está asociado con enfermedades como la alacrimia, acalasia y síndromes asociados con retraso mental. Entre sus vías relacionadas, se encuentra la estimulación de PKN1 (*Protein Kinase N1*), que se encarga de la transcripción de genes regulados por receptores de andrógenos, KLK2 (*Kallikrein Related Peptidase 2*), KLK3 (*Kallikrein Related Peptidase 3*) y las PKMT (*protein lysine methyltransferase*) (Li *et al.*, 2016a).

Entre las variantes de novo, se encontró para este trío una variante en **KRT6B** (*Keratin 6B*), la proteína codificada por este gen es miembro de la familia de genes de la queratina. Las citoqueratinas de tipo II son proteínas dispuestas en pares de cadenas heterotípicas expresadas durante la diferenciación de tejidos epiteliales simples y estratificados (Guo *et al.*, 2014). Para los INDELS, **UFSP1** (*UFM1 Specific Peptidase 1*) fue el gen candidato determinado. Este gen codifica una proteína similar a otras proteasas específicas de UFM1. Los estudios en ratones determinaron que UFSP1 libera UFM1 (Ubiquitin-fold modifier 1 precursor) de sus complejos conjugados, lo que también lo convierte en una forma activa (Sung *et al.*, 2007).

Nuevamente, en este probando se identificó una CNV en el gene **CCDC50** (*Coiled-Coil Domain Containing 50*), gen conocido por asociarse a hipoacusia neurosensorial progresiva (DFNA44) (Modamio-Høybjør *et al.*, 2007, 2003). En la Tabla 32, se encuentran ordenadas las variables candidatas según su grado de probabilidad.

En este trío, se ha priorizado la variante homocigota **ASH2L**, por tener menor frecuencia alélica y por tener mayor CADD en comparación con el resto de variantes candidatas.

Gen	Tipo variante	Herencia	Posición (Hg19)	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score	MAF NFE
<b>ASH2L</b>	SNV homocigota	Recesiva	8:37963081-37963081 G>C	23.4	Uncertain Significance (PM2 + PP3)	3	1	10 <sup>-4</sup> en homocigosis
<b>KRT6B</b>	Heterocigota de novo	Dominante	12:52845683-52845683	17	Benign (PS2 + BS1 + BS2 +	-6	0	4x10 <sup>-4</sup> en heterocigosis



			A>G		BP4 + BP7)			
<b>UFSP1</b>	Inserción heterocigota	Dominante	7:100486696-100486696 T>TC	22.6	Likely Pathogenic (PS4 + PM2 + PP3)	7	0.03	$2 \times 10^{-3}$ en heterocigosis
<b>CCDC50</b>	Homocigota CNV	Dominante	3:191060000-191070000	15.4	Uncertain Significance (PM2 + BP4)	1	0	0 en homocigosis

*Tabla 32. Variantes candidatas ordenadas de más a menos probables en el trío 4.*

En el Trío 5, la variante encontrada fue una variante de novo con cambio de sentido en el gen **TRAIP** (*Traf Interacting Protein*), el cual se expresa en las CCI, CCE y células de los pilares (Tabla 33). Aunque esta variante tiene una frecuencia alélica en población europea que es superior a la prevalencia de EM esporádica, tiene una MAF muy baja en la población española, que podría explicar el fenotipo. Este gen codifica una proteína que contiene una región 'ring' N-terminal con un dominio en espiral. Una proteína murina similar interactúa con el factor 1 asociado a TNFR (TRAF1), el factor 2 asociado a TNFR (TRAF2) y la cilindromatosis. La interacción con TRAF2 inhibe el factor nuclear kappa-B mediado por TRAF2, por lo que se activa la subunidad 1 necesaria para la activación celular y la protección frente a la apoptosis (Harley *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019).

Gen	Tipo variante	Herencia	Posición (Hg38)	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score	MAF NFE
<b>TRAIP</b>	Heterocigota De novo	Dominante	3:49832729 -49832729 A>G	24	Uncertain Significance (PS2 + BP4)	3	0	2.8x10 <sup>-2</sup> en heterocigosis

Tabla 33. Variante candidata en el trío 5.

En el trío 6, se encontró únicamente una variante en el número de copia involucrando al gen **KMT2C** (*Lysine Methyltransferase 2C*). Este gen se expresa tanto en las CCI, CCE, células de Deiters, y células de los pilares. Este gen codifica una proteína nuclear con un dominio de unión al ADN de tipo AT, un dominio SET y un dominio postSET. Esta proteína es miembro del complejo ASC-2/NCOA6, que posee actividad de metilación de histonas y participa en la coactivación de la transcripción (Li *et al.*, 2016b; Faundes *et al.*, 2018). Además, este gen es conocido por ser expresado en la *stria vascularis*. En la Tabla 34, se muestran las características de dicha variante.

Gen	Tipo variante	Herencia	Posición (Hg38)	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score	MAF NFE
<b>KMT2C</b>	Heterocigota CNV	Dominante	7:152400000 -152410000	11	Uncertain Significance (BP4)	1	1	0.01 en heterocigosis

Tabla 34. Variante candidata en el trío 6.

# Conclusiones

1. Los pacientes con Enfermedad de Ménière (EM) esporádica de inicio precoz tienen una mayor prevalencia de migraña que los pacientes con EM de inicio tardío.
2. La migraña no está asociada a ningún perfil de citoquinas en pacientes con EM.
3. Los niveles de CCL18, CCL3 y CXCL4 varían entre pacientes con EM, migraña y controles y podrían utilizarse para su diagnóstico.
4. La enfermedad de Ménière esporádica de inicio precoz podría explicarse mediante un modelo de herencia recesivo homocigoto.
5. El modelo de herencia recesivo homocigoto para variantes de un solo nucleótido con cambio de sentido se ha identificado para los genes *SH3GL1* y *LPCAT2*.
6. El modelo de herencia recesivo homocigoto para variantes de un solo nucleótido sin cambio de sentido se ha encontrado para los genes *RANBP9* y *ASH2L*.
7. Los pacientes con EM de inicio precoz presentan variantes heterocigotas de novo de un solo nucleótido, así como variaciones en el número de copias heterocigotas de novo que segregan el fenotipo en el análisis de tríos.

# Conclusions

1. Patients with early onset sporadic MD have a higher prevalence of migraine than patients with late onset MD.
2. Migraine is not associated with any cytokine profile in MD patients.
3. Level of CCL18, CCL3 and CXCL4 vary between patients with MD, migraine and controls. This could be used as a tool for the diagnosis.
4. Early onset sporadic MD could be explained by a homozygous recessive inheritance model.
5. Homozygous recessive model of inheritance for missense single nucleotide variants has been identified for *SH3GL1* and *LPCAT2* genes.
6. Homozygous recessive model of inheritance for non-missense single nucleotide variants has been identified for *RANBP9* and *ASH2L* genes.
7. Patients with early onset MD have single nucleotide de novo heterozygous variants as well as de novo heterozygous copy number variations that segregate the phenotype in threesome analysis.

# Material suplementario

Gen	Tipo variante	Genotipo	Origen	Posición (Hg19)	rs	CSVS	CSVS Nº homocigotos	gnomAD	gnomAD NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
<i>SMYD2</i>	Non frameshift deletion	INDEL heterocigoto	Materno	1: 214498014-214498016 GAA>-	rs778692186	0.003	0	0	0	0	50	Uncertain Significance (PM4 + PP3 + BS1)	-1	0
<i>CSRNP1</i>	Non frameshift deletion	INDEL heterocigoto	Materno	3:39188103-39188105 GAG>-	rs748236739	0.002	0	0.0001	0	0	15	Likely pathogenic (PS4 + PM2 + PP3)	7	0.34
<i>MLL3</i>	Non frameshift deletion	INDEL heterocigoto	Paterno	9:20414341-20414343 CTA>-	rs767180736	0	0	.	.	0	22.5	Uncertain Significance (PM2 + PP3)	3	1
<i>NIPA1</i>	Non frameshift deletion	INDEL heterocigoto	Paterno	15:23086365-23086367 GCC>-	rs531550505	0.002	0	.	.	0	18.89	Benign (PP3 + BA1 + BP6 + BP3)	-8	0.01
<i>ZFH3</i>	Non frameshift deletion	INDEL heterocigoto	Materno	16:72992582-72992596 TCTTCCTCCTCTCT>-	rs376713069	0	0	0.0008	0.0009	1	22.8	Uncertain Significance (PM4 + PP3 + BS1)	-1	1

Tabla suplementaria 1. Estudio de INDELS del Trío 1.

Posición (Hg19)			Número de copias	Gen
chr1	121110000	121130000	4	ANKRD20A8P
chr1	121140000	121150000	4	ARHGEF34P,ARHGEF5,CTAGE4,CTAGE8,LOC101928605,OR2A1,OR2A1-AS1,OR2A20P,OR2A42,OR2A9P
chr2	95470000	95530000	3	C22orf42
chr2	131310000	131320000	3	CBWD3,CBWD5,FOXD4L3,FOXD4L4,FOXD4L5,LOC101928381
chr3	197830000	197850000	3	CCDC144B
chr4	9370000	9380000	3	CFC1,CFC1B,POTEJ,PRSS40A,PRSS40B
chr5	69600000	69620000	3	CTAGE9,ENPP3,OR2A4
chr6	29760000	29790000	3	CXADRP2,MIR3118-2,MIR3118-3,MIR3118-4,MIR5701-1,MIR5701-2,MIR5701-3,NF1P2,POTEB,POTEB2,POTEB3
chr6	132020000	132030000	3	FAM157A,FAM157B
chr7	34830000	34840000	3	FAM230F,LOC102725072
chr7	100540000	100640000	3	FAM230G,FAM230J
chr7	143540000	143550000	4	FAM230H,GGT2,LOC102724728,POM121L8P
chr7	144070000	144080000	3	FAM66A,LOC649352
chr7	158380000	158390000	3	GOLGA8F,GOLGA8G,HERC2P11,LOC100132202,MIR4509-1,MIR4509-2,MIR4509-3
chr8	12230000	12250000	3	GUSBP3
chr9	70180000	70940000	3	HCG4,HLA-V
chr11	89620000	89630000	3	IGHV1OR15-1,IGHV1OR15-3,LINC02203,LOC101927079,LOC102724760,LOC105369274,LOC642131,MIR1268A,OR4M2,OR4N3P,OR4N4,REREP3
chr14	52990000	53000000	3	LINC01022,MIR5707,PTPRN2
chr15	22030000	22040000	3	MIR8078,ROCK1P1
chr15	22590000	22650000	4	MUC12,MUC3A
chr15	28840000	28850000	3	NPSR1,NPSR1-AS1
chr16	6680000	6690000	3	PDXDC1
chr16	15120000	15130000	3	RBFOX1
chr17	18510000	18520000	4	RBMY1A1,RBMY1B,RBMY1D,RBMY1E
chr18	100000	120000	64	SRGAP2-AS1,SRGAP2B,SRGAP2C,SRGAP2D
chr22	18800000	18870000	3	SRGAP2-AS1,SRGAP2B,SRGAP2C,SRGAP2D
chr22	20630000	20650000	3	TCAF1
chr22	21570000	21670000	3	TRIM49D1,TRIM49D2,TRIM51EP,TRIM64B
chr22	32540000	32550000	4	TXNDC16
chrX	1200000	1210000	2	USP17L24,USP17L25,USP17L26,USP17L27,USP17L28,USP17L29,USP17L30,USP17L5,USP17L6P,USP17L9P

Tabla suplementaria 2. Variantes con incremento en el número de copia observadas en el Trío 1 y genes cercanos al locus determinado.

Posición (Hg19)		Número de copias	Gen	
chr1	147420000	147430000	1	GPR89B,LOC100505824,LOC101927468,NBPF11,NBPF19,PDE4DIPP1,PDZK1P1
chr1	196720000	196730000	1	CFHR1,CFHR3
chr3	191060000	191070000	1	CCDC50
chr5	69670000	69680000	1	GTF2H2,GTF2H2B,GUSBP3,SMA5
chr5	69770000	69780000	1	GTF2H2,GTF2H2B,GUSBP3,SMA5
chr6	32610000	32650000	1	HLA-DQA1,HLA-DQB1,HLA-DQB1-AS1
chr7	72530000	72580000	1	GTF2IP1,GTF2IP4,SPDYE10P
chr7	74580000	74640000	1	CASTOR2,GTF2IP1,GTF2IP4,NCF1C,PMS2P5,PMS2P7,SPDYE10P,SPDYE11,SPDYE13P,SPDYE14P,SPDYE15P,SPDYE17,SPDYE8P
chr7	143410000	143420000	1	TCAF2,TCAF2P1
chr9	41970000	41990000	1	FGF7P3
chr10	17770000	17780000	1	MIR511,MRC1,TMEM236
chr12	99790000	99810000	1	ANKS1B
chr14	35600000	35620000	1	KIAA0391
chr15	21190000	21210000	1	FAM30C,LINC01193
chr15	21240000	21250000	1	FAM30C,LINC01193
chr15	22650000	22730000	1	GOLGA8DP,MIR4509-1,MIR4509-2,MIR4509-3
chr16	14780000	14850000	1	NPIPA2,NPIPA3,PLA2G10
chr16	28700000	28720000	1	EIF3C
chr17	34500000	34510000	1	CCL3L1,CCL3L3,CCL4L1,CCL4L2,TBC1D3G,TBC1D3H
chr17	34570000	34590000	1	CCL3L1,CCL3L3,CCL4L1,CCL4L2,TBC1D3G,TBC1D3H
chr17	34670000	34790000	1	CCL3L1,CCL3L3,CCL4L1,CCL4L2,TBC1D3G,TBC1D3H
chr20	1550000	1560000	1	SIRPB1
chr20	52650000	52660000	1	BCAS1

Tabla suplementaria 3. Variantes con pérdida en el número de copia observadas en el Trío 1 y genes cercanos al locus determinado.



Gen	Tipo variante	Genotipo	Origen	Posición (Hg19)	rs	CSVS	CSVS Nº Homocigotos	gnomAD	gnomAD NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	PLI score
MYH15	frameshift insertion	INDEL heterocigoto	Paterno	3:108118023- 108118025 TCT>-	rs753407125	0	0	0	0	0	22	Uncertain Significance (PM2 + PP3)	3	0
MYH15	Exónica	Cambio de sentido	Materno	3:108188993- 108188993 G>A	rs9868484	0.611	0	0.6116	0.7287	57093	22.9	Benigno (BA1 + BS3 + BP1)	9	0
ZMYM5	frameshift insertion	INDEL heterocigoto	Paterno	13:20426142- 20426142 ->CAT	rs112044779	0.002	0	0.0013	0.0011	1	25.3	Likely Benign (PS4 + PP3 + BS1 + BP3)	0	0

Tabla suplementaria 4. Estudio de INDELS del Trío 2

Posición (Hg19)			Número de copias	Gen
chr9	69410000	69540000	3	ANKRD20A4,ANKRD20A4-ANKRD20A20P,LOC105379252
chr2	98120000	98140000	3	ANKRD36B
chr22	22620000	22670000	3	BMS1P20
chr22	32540000	32550000	4	C22orf42
chr13	108340000	108350000	3	FAM155A
chr15	28750000	28850000	3	GOLGA8F,GOLGA8G,HERC2P11,LOC100132202
chr5	69510000	69520000	3	GUSBP3,SMA4
chr11	130000	140000	3	LINC01001
chr16	21410000	21510000	3	LOC100190986,NPIP3,SMG1P3
chr6	19770000	19780000	3	LOC100506885
chr8	12340000	12360000	3	LOC100506990,LOC729732
chr19	28300000	28310000	3	LOC101927151
chr1	148560000	148670000	3	NBPF15,NBPF25P
chr1	144510000	144520000	4	NBPF19,NBPF20
chr14	20420000	20430000	3	OR4K1,OR4K2,OR4K3,OR4K5,OR4M1,OR4N2,OR4Q3
chr11	70210000	70220000	3	PPFIA1
chr7	157940000	157950000	5	PTPRN2
chr11	89650000	89660000	3	TRIM49D1,TRIM49D2

Tabla suplementaria 5. Variantes con incremento en el número de copia observadas en el Trío 2 y genes cercanos al locus determinado.

Posición (Hg19)			Número de copias	Gen
chr1	0	100000	1	AFG1L
chr1	13110000	13320000	1	ANKS1B
chr1	147700000	147710000	1	ARL17A,ARL17B,LRRC37A,NSFP1
chr3	195500000	195520000	1	ARL17A,ARL17B,NSF,NSFP1
chr5	68870000	68920000	1	BMS1P14,FAM27E3,LOC102723709,LOC102724580,LOC105379807
chr6	53930000	53940000	1	DDX111L1,FAM138A,FAM138F,LOC102725121,MIR1302-10,MIR1302-11,MIR1302-2,MIR1302-9,MIR6859-1, MIR6859-2,MIR6859-3,MIR6859-4,OR4F5,WASH7P
chr6	108610000	108620000	1	DEFB109A,DEFB130A,DEFB130B,FAM66A,FAM66D,FAM85A,FAM86B1,FAM86B2,FAM90A25P,FAM90A2P, LOC100506990,LOC392196,LOC649352,USP17L2,USP17L7,ZNF705D
chr8	8050000	8060000	1	DEFB109A,DEFB130A,DEFB130B,FAM66A,FAM66D,FAM85A,FAM86B1,FAM86B2,FAM90A25P,FAM90A2P, LOC100506990,LOC392196,LOC649352,USP17L2,USP17L7,ZNF705D
chr8	11970000	12150000	1	DEFB109A,DEFB130A,DEFB130B,FAM66A,FAM66D,FAM85A,FAM86B1,FAM86B2,FAM90A25P,FAM90A2P, LOC100506990,LOC392196,LOC649352,USP17L2,USP17L7,ZNF705D
chr8	12290000	12320000	1	DNM1P41,GOLGA6L5P,LOC102724034,LOC103171574
chr8	12330000	12340000	1	FAM85B,FAM86B3P
chr9	45480000	45600000	1	GPR89B,LOC100505824,LOC101927468,NBPF11,NBPF19,PDE4DIPP1,PDZK1P1
chr9	67320000	67350000	1	GTF2H2C,GTF2H2C_2
chr11	4970000	4980000	1	KLRC1,KLRC2,KLRC3
chr11	89660000	89680000	1	LINC01138,LOC100132057,MIR6077
chr11	89760000	89830000	1	LOC107984035
chr11	125070000	125090000	1	MIR1270,ZNF826P
chr12	10570000	10580000	1	MLIP
chr12	99790000	99810000	1	MUC4
chr15	84960000	85050000	1	OR51A2
chr17	44560000	44570000	1	PKNOX2
chr17	44640000	44650000	1	TRIM49C,UBTFL1
chr19	20500000	20600000	1	TRIM49D1,TRIM49D2,TRIM51EP,TRIM64

Tabla suplementaria 6. Variantes con pérdida en el número de copia observadas en el Trío 2 y genes cercanos al locus determinado.

Gen	Tipo variante	Genotipo	Origen	Posición (Hg19)	rs	CSVS	CSVS Nº Homocigotos	gnomAD	gnomAD NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pU score
IGSF3	Exónica	Heterocigota compuesta	Materno y paterno	1:117150617-117150617 A>G	rs199735707	0	0	0.00006769	0.00003526	0	26.4	Uncertain Significance (PM2 + PM3 + BP1)	3	0.26
IGSF3	Exónica	Heterocigota compuesta	Materno	1:117156584-117156584 T>C	rs143106517	0	0	0.000003982	0.000008816	0	24.7	Likely Benign (PM2 + PM3 + BP1 + BP4)	2	0.26
IGSF3	Exónica	Heterocigota compuesta	Materno y paterno	1:117150736-117150736 C>G	rs61786589	0.006	0	0.000007963	0	0	2.04	Likely Benign (PM2 + PM3 + BP1 + BP4)	2	0.26
KRT18	Exónica	Heterocigota compuesta	Paterno	12:53343148-53343148 C>G	rs1216443356	0.012	0	0.000004083	0	0	8.43	Uncertain Significance (PM2 + PM3 + BP4)	3	0.73
KRT18	Exónica	Heterocigota compuesta	Materno y paterno	12:53343209-53343209 G>A	rs79346135	0.008	0	0.000004049	0	0	24.4	Likely Pathogenic (PM1 + PM2 + PM3 + PP3)	7	0.73
KRT18	Exónica	Heterocigota compuesta	Materno y paterno	12:53343225-53343225 C>T	rs1397020078	0.006	0	0.000003591	0	0	23.5	Likely Pathogenic (PM1 + PM2 + PM3 + PP3)	7	0.73
KRT18	Exónica	Heterocigota compuesta	Materno y paterno	12:53343231-53343231 G>C	rs1434610693	0.004	0	0.000004044	0	0	29.3	Likely Pathogenic (PM1 + PM2 + PM3 + PP3 + BP6)	6	0.73
KRT18	Exónica	Heterocigota compuesta	Materno y paterno	12:53343265-53343265 C>A	rs1273250739	0.003	0	0.000008088	0	0	22.9	Likely Pathogenic (PM1 + PM2 + PM3 + PM5 + BP4)	6	0.73
KRT18	Exónica	Heterocigota compuesta	Materno y paterno	12:53343007-53343007 G>A	rs79476176	0.016	0	0	0	0	26.36	Uncertain Significance (PM3 + PP3)	3	0.73

Tabla suplementaria 7. Estudio de SNV heterocigotos del Trío 3

Gen	Tipo variante	Genotipo	Origen	Posición (Hg19)	rs	CSVS	CSVS Nº Homocigotos	gnomAD	gnomAD NFE	gnomAD Nº homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	gLI score
GPR179	frameshift deletion	INDEL heterocigoto	Materno	17:36486035- 36486038 ACTC>	rs775455243	0	0	0.000004371	0	0	16.41	Pathogenic (PVS1 + PM2 + PP3)	11	0
COL9A3	frameshift insertion	INDEL heterocigoto	Paterno	20:61448935- 61448935 ->C	.	0	0	0	0	0	22.3	Pathogenic (PVS1 + PM2 + PP3)	11	0

Tabla suplementaria 8. Estudio de INDELS candidatos del Trío 3

Posición (Hg19)			Número de copias	Gen
chr2	92220000	92290000	3	ACTR3BP2
chr10	38890000	39070000	3	ACTR3BP5
chr9	67800000	67970000	3	ANKRD20A1,ANKRD20A3
chr7	144070000	144080000	3	ARHGEF34P,ARHGEE5,CTAGE4,CTAGE8,LOC101928605,OR2A1,OR2A1-AS1,OR2A20P,OR2A42,OR2A7,OR2A9P
chr14	19700000	19710000	4	BMS1P17,BMS1P18,BMS1P22,DUXAP10,DUXAP9
chr17	16740000	16750000	3	CCDC144A,FAM106CP,KRT16P2,KRT17P1,USP32P1
chr9	43390000	43930000	3	CNTNAP3B,CNTNAP3P2,FAM74A7,SPATA31A6
chr14	19660000	19670000	4	DUXAP10,DUXAP9
chr6	170680000	170690000	3	FAM120B
chr22	21540000	21570000	3	FAM230B,FAM230H,GGT2,LOC102724728,POM121L8P
chr22	18820000	18830000	3	FAM230E,FAM230F,GGT3P,LOC102725072
chr22	20680000	20700000	20	FAM230G
chr22	20650000	20660000	31	FAM230G,FAM230J
chr9	45990000	46120000	3	FAM27E2
chr4	190830000	190840000	3	FRG1-DT
chr15	22590000	22750000	5	IGHV1OR15-1,IGHV1OR15-3,LOC101927079,LOC102724760,LOC105369274,LOC642131,MIR1268A,MIR4509-1,MIR4509-2,MIR4509-3,OR4N3P,OR4N4,REREP3
chr7	64680000	64690000	3	INTS4P1
chr1	215380000	215390000	11	KCNK2
chr15	22180000	22290000	3	LINC02203,LOC101927079
chr6	860000	870000	3	LOC101927691
chr5	70080000	70090000	3	LOC101929599,LOC653080
chr17	18960000	19010000	3	LOC388436,LOC79999
chr7	76670000	76690000	3	PMS2P9,SPDYE18
chrY	23710000	23720000	2	RBMY1A1,RBMY1B,RBMY1D,RBMY1E
chr17	81170000	81180000	3	RPL23AP87
chr4	0	70000	10	ZNF595,ZNF718

Tabla suplementaria 9. Variantes con aumento en el número de copia observadas en el Trío 3 y genes cercanos al locus determinado

Posición (Hg19)			Número de copias	Gen
chr1	13120000	13320000	1	ACTG1P4, <u>AMY1A</u> ,AMY1B,AMY1C,AMY2A,AMY2B,LOC101928436,RNPC3
chr1	103780000	103790000	1	ACTG1P4, <u>AMY1A</u> ,AMY1B,AMY1C,AMY2A,AMY2B,LOC101928436,RNPC3
chr1	104000000	104310000	1	ARL17A,ARL17B,NSF,NSFP1
chr1	152550000	152590000	0	BMS1P14,FAM27E3,LOC102723709,LOC102724580,LOC105379807
chr3	98410000	98420000	1	CCDC144B, <u>FAM106A</u> ,KRT16P1,KRT17P2,LGALS9C,USP32P2
chr3	195370000	195390000	1	DEFB104A, <u>DEFB104B</u> ,DEFB105A,DEFB105B,DEFB106A,DEFB106B,DEFB107A,DEFB107B,FAM90A10P,FAM90A7P,PRR23D1,PRR23D2,SPAG11B
chr6	53930000	53940000	1	ERC1
chr6	79520000	79530000	1	FAM74A1, <u>FAM74A3</u> ,FAM74A6,LOC105379450,SPATA31A3,SPATA31A5,SPATA31A7,ZNF658,ZNF658B
chr7	141770000	141800000	1	FRMPD2
chr8	7620000	7640000	1	HNRNPCL1,HNRNPCL2,HNRNPCL3,HNRNPCL4,LINC01784,PRAMEF1,PRAMEF10,PRAMEF11,PRAMEF13,PRAMEF14,PRAMEF15,PRAMEF17,PRAMEF18,PRAMEF19,PRAMEF2,PRAMEF20,PRAMEF22,PRAMEF25,PRAMEF26,PRAMEF27,PRAMEF33,PRAMEF34P,PRAMEF36P, <u>PRAMEF4</u> ,PRAMEF5,PRAMEF6,PRAMEF7,PRAMEF8,PRAMEF9
chr9	40640000	40830000	1	LCE3B,LCE3C,LCE3D
chr9	45480000	45680000	1	LINC01198,LOC112268117
chr9	45920000	45990000	1	LINC02402
chr9	46910000	46960000	1	LOC105374297,SDHAP2
chr9	67310000	67320000	1	LOC107984035
chr10	49270000	49290000	1	LOC729305
chr11	134600000	134610000	1	MGAM
chr12	1190000	1200000	1	MIR1270,ZNF826P
chr12	43020000	43030000	1	MLIP
<del>chrX</del>	52500000	52570000	0	XAGE1A,XAGE1B,XAGE2

Tabla suplementaria 10. Variantes con pérdida en el número de copia observadas en el Trío 3 y genes cercanos al locus determinado

Gen	Tipo variante	Genotipo	Origen	Posición (Hg19)	rs	CSVS Frecuencia	CSVS N° homocigotos	gnomAD	gnomAD_NFE	gnomAD N° homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
ERAP1	frameshift deletion	INDEL heterocigoto	Materno	5:96121571-96121574 CAGT>C	rs566514039	0.004	0	0,0014	0,0018	0	22.8	Uncertain Significance (PS4 + PP3 + BS1)	1	0
UFSP1	frameshift insertion	INDEL heterocigoto	Paterno	7:100486696-100486696 T>TC	rs763916652	0	0	0	0,0002	0	22.6	Likely Pathogenic (PS4 + PM2 + PP3)	7	0.03
OSBP	nonframeshift insertion	INDEL heterocigoto	Paterno	11:59382887-59382887 ->CGCCCGAGC	rs1368702079	0	0	0.0003	0	0	21.3	Uncertain Significance (PM2 + PM4 + PP3)	5	1

Tabla suplementaria 11. Estudio de INDELs del Trío 4.

Gen	Tipo variante	Genotipo	Origen	Posición (Hg19)	rs	CSVS Frecuencia	CSVS N° homocigotos	gnomAD	gnomAD_NFE	gnomAD N° homocigotos	CADD	ACMG	ACMG score	pLI score
ARSD	nonframeshift deletion	INDEL heterocigoto ligado al X	Paterno	X:2835999-2835999 CCACGCCGG>-	rs113556864	0	0.001	0	0	0	8.99	Uncertain Significance (PM4 + BP4)	1	0

Tabla suplementaria 12. Estudio de INDELs ligados al X candidatos del Trío 4.



Posición (Hg19)		Número de copias	Gen	
chr1	96510000	96520000	4	ANKRD36C
chr2	47520000	47550000	3	ASNSP1
chr2	131410000	131420000	3	CFC1,CFC1B,POTEJ,PRSS40A,PRSS40B
chr2	126670000	126680000	3	CTBP2,ZRANB1
chr2	35310000	35320000	3	CUL2
chr3	114320000	114330000	3	DDX11L2,FAM138B,MIR1302-3,PGM5P4,WASH2P
chr3	213050000	213060000	4	ERBB4
chr3	20880000	20940000	3	FAM30C,LINC01193,LINC02203,MIR3118-2,MIR3118-3,MIR3118-4,MIR5701-1,MIR5701-2,MIR5701-3,NBEAP1,NF1P2,POTEB,POTEB2,POTEB3
chr4	11980000	12080000	4	FAM66D,LOC392196,USP17L2,USP17L7
chr4	46910000	46960000	3	FGF7P6,LINC01189,LOC103908604,LOC103908605
chr4	23490000	23510000	3	GOLGA6L22,GOLGA8EP,HERC2P7
chr5	28750000	28850000	3	GOLGA8F,GOLGA8G,HERC2P11,LOC100132202,MIR4509-1,MIR4509-2,MIR4509-3
chr5	68920000	68940000	3	GUSBP3
chr6	215380000	215390000	5	KCNK2
chr6	55280000	55300000	3	KIR2DL1,LOC101928804
chr7	18300000	18310000	3	KRT17P5,LINC02076
chr8	54730000	54750000	4	LILRA6,LILRB3
chr8	7140000	7150000	3	LINC00965
chr8	28300000	28310000	3	LOC101927151
chr9	19520000	19530000	4	MALRD1
chr19	48330000	48340000	4	OR4C3,OR4C45,OR4C5
chr19	195670000	195690000	3	SDHAP1
chr19	195720000	195730000	3	SDHAP1
chr22	132680000	132690000	3	SNHG27
chrY	34570000	34590000	3	TBC1D3G,TBC1D3H

Tabla suplementaria 13. Variantes con aumento en el número de copia observadas en el Trío 4 y genes cercanos al locus determinado.

Posición (Hg19)			Número de copias	Gen
chr4	75320000	75330000	1	AREG
chr3	191060000	191070000	1	CCDC50
chr19	170000	180000	1	FAM138A,FAM138F,MIR1302-10,MIR1302-11,MIR1302-2,MIR1302-9,OR4F17,WASH5P
chr5	69210000	69360000	1	GUSBP3,LOC653080,SERF1A,SERF1B,SMA4,SMN1,SMN2
chr5	69550000	69560000	1	GUSBP3,LOC653080,SERF1A,SERF1B,SMA4,SMN1,SMN2
chr22	21750000	21810000	1	HIC2,PI4KAP2,RIMBP3B,RIMBP3C,TMEM191C,UBE2L3
chr17	20350000	20440000	1	KRT16P3,LGALS9B,NOS2P3
chr8	12320000	12330000	1	LOC100506990
chr9	45670000	45680000	1	LOC107984035
chr17	77500000	77620000	1	RBFOX3
chr3	53030000	53040000	1	SFMBT1
chr19	52130000	52150000	1	SIGLEC14,SIGLEC5
chr19	19830000	19840000	1	ZNF14

Tabla suplementaria 14. Variantes con pérdida en el número de copia observadas en el Trío 4 y genes cercanos al locus determinado.

Posición (Hg38)			Número de copias	Gen
chr2	32.910.000	32.920.000	47	LINC00486
chr3	75.660.000	75.670.000	31	FRG2C
chr4	5.310.000	5.320.000	23	STK32B
chr4	150.480.000	150.490.000	15	LRBA
chr4	168.150.000	168.160.000	13	ANXA10
chr4	175.630.000	175.640.000	10	GPM6A
chr7	100.950.000	100.960.000	10	MUC3A
chr8	85.720.000	85.830.000	13	REXO1L2P
chr9	63.810.000	63.830.000	10	LINC00537,MIR4477A,MIR4477B
chr9	67.720.000	67.730.000	10	FAM27B
chr18	100.000	110.000	225	ROCK1P1
chr18	110.000	120.000	51	MIR8078,ROCK1P1
chr18	53.420.000	53.430.000	19	DCC
chr21	8.200.000	8.260.000	112	LOC100507412,MIR3648-1,MIR3648-2,MIR663A,MIR6724-1,MIR6724-2,MIR6724-3,MIR6724-4,RNA18SN1,RNA18SN2,RNA18SN3,RNA18SN4,RNA18SN5,RNA28SN2,RNA28SN5,RNA45SN2,RNA5-8SN1,RNA5-8SN2,RNA5-8SN3,RNA5-8SN4,RNA5-8SN5
chr21	8.380.000	8.470.000	122	LOC100507412,MIR10396A,MIR10396B,MIR6724-1,MIR6724-2,MIR6724-3,MIR6724-4,RNA18SN1,RNA18SN2,RNA18SN3,RNA18SN4,RNA18SN5,RNA28SN1,RNA28SN2,RNA28SN3,RNA28SN5,RNA45SN1,RNA45SN3,RNA45SN5,RNA5-8SN1,RNA5-8SN2,RNA5-8SN3,RNA5-8SN4,RNA5-8SN5
chr22	11.850.000	11.940.000	10	LOC102723769
chr22	18.730.000	18.740.000	60	FAM230E
chr22	18.890.000	18.900.000	63	FAM230F

Tabla suplementaria 15. Variantes con aumento en el número de copia observadas en el Trío 5 y genes cercanos al locus determinado.

Posición (Hg38)		Número de copias	Gen	
chr9	39.150.000	39.340.000	1	CNTNAP3
chr21	13.040.000	13.160.000	1	ANKRD30BP2
<del>chrY</del>	56.890.000	57.227.415	0	DDX11L16,IL9R,SPRY3,VAMP7,WASIR1
<del>chrY</del>	56.890.000	57.227.415	0	DDX11L16,IL9R,SPRY3,VAMP7,WASIR1

Tabla suplementaria 16. Variantes con pérdida en el número de copia observadas en el Trío 5 y genes cercanos al locus determinado.

Posición (Hg38)			Número de copias	Gen
chr1	2.650.000	2.660.000	11	TTC34
chr1	2.680.000	2.760.000	5	TTC34
chr1	13.220.000	13.250.000	3	PRAMEF18,PRAMEF22
chr1	16.500.000	16.560.000	3	LINC01783,MIR3675,RNU1-1,RNU1-2,RNU1-3,RNU1-4,RNVU1-18
chr1	16.560.000	16.660.000	8	CROCCP2,MST1P2,NBPF1
chr1	16.660.000	16.690.000	4	MIR3675,RNU1-1,RNU1-2,RNU1-3,RNU1-4,RNVU1-18
chr1	16.690.000	16.770.000	6	ESPNP,MST1L,RNU1-1,RNU1-2,RNU1-3,RNU1-4,RNVU1-18
chr1	16.770.000	16.870.000	4	MIR3675
chr1	16.870.000	16.880.000	6	LOC112267871
chr1	16.880.000	16.950.000	3	CROCC,LOC105376805,RNU1-1,RNU1-2,RNU1-3,RNU1-4,RNVU1-18
chr1	145.290.000	145.390.000	3	NBPF20
chr1	146.980.000	146.990.000	5	NBPF12
chr1	148.540.000	148.560.000	4	NBPF14
chr1	224.010.000	224.020.000	7	LOC100287497
chr2	32.910.000	32.920.000	40	LINC00486
chr2	89.530.000	89.610.000	3	LOC107985911
chr2	89.610.000	89.810.000	4	LOC101927050
chr2	94.190.000	94.280.000	4	BMS1P14
chr2	95.930.000	95.960.000		ANKRD36C
chr2	97.140.000	97.270.000	3	ANKRD36
chr2	109.190.000	109.200.000	5	SH3RF3
chr2	113.570.000	113.600.000	3	DDX11L2,FAM138B,MIR1302-3,WASH2P
chr2	130.560.000	130.660.000	3	CFC1,POTEJ,PRSS40A,PRSS40B
chr2	242.000.000	242.010.000	5	LINC01237,LOC285097
chr3	75.630.000	75.720.000	5	FRG2C,LINC00960,MIR1324

chr3	75.720.000	75.750.000	3	MIR4273,ZNF717
chr3	75.750.000	75.760.000	5	ZNF717
chr4	168.150.000	168.160.000	4	ANXA10
chr5	760.000	850.000	3	ZDHC11,ZDHC11B
chr5	21.470.000	21.500.000	10	GUSBP1
chr5	34.180.000	34.200.000	11	C1QTNF3,LOC646652
chr5	69.890.000	69.920.000	3	GUSBP14,GUSBP16,LOC101929599
chr5	70.770.000	70.790.000	5	GUSBP16,LOC101929599
chr5	71.200.000	71.240.000	4	GUSBP1,GUSBP16,GUSBP9
chr6	260.000	380.000	3	DUSP22
chr6	860.000	870.000	4	LOC101927691
chr6	35.790.000	35.800.000	4	CLPS,CLPSL1
chr6	160.590.000	160.630.000	4	LPA
chr6	160.630.000	160.640.000	7	LPA
chr7	5.900.000	5.920.000	4	CCZ1
chr7	56.810.000	56.820.000	3	LOC401357
chr7	73.080.000	73.220.000	3	GTF2IP1,GTF2IP4,SPDYE10P,SPDYE11,SPDYE13,SPDYE14,SPDYE15,SPDYE17,SPDYE8
chr7	100.950.000	100.960.000	8	MUC3A
chr7	100.960.000	100.970.000	4	MUC12,MUC3A
chr7	102.480.000	102.680.000	4	POLR2J2,POLR2J3,RASA4,RASA4B,RASA4DP,SPDYE2,SPDYE2B,UPK3BL1,UPK3BL2
chr7	152.400.000	152.410.000	7	KMT2C
chr7	158.140.000	158.150.000	4	PTPRN2
chr7	158.590.000	158.600.000	4	LINC01022,MIR5707
chr8	7.250.000	7.290.000	3	FAM90A7P,LINC00965
chr8	7.400.000	7.550.000	3	DEFB103A,DEFB103B,DEFB104A,DEFB104B,DEFB105A,DEFB105B,DEFB106A,DEFB106B,DEFB107A,DEFB107B,DEFB4B,PRR23D1,PRR23D2,SPAG11A,SPAG11B
chr8	7.570.000	7.590.000	3	FAM90A7P
chr8	7.760.000	7.770.000	4	FAM90A10P

chr8	8.130.000	8.200.000	3	FAM85B
chr8	12.170.000	12.230.000	3	FAM85A,FAM86B1,FAM86B2,FAM90A2P
chr8	12.500.000	12.540.000	3	LOC100506990,LOC729732
chr8	12.540.000	12.600.000	7	LOC100506990,LOC729732
chr8	57.200.000	57.220.000	5	LINC01606
chr8	85.640.000	85.830.000	17	REXO1L2P
chr9	38.960.000	39.080.000	5	CNTNAP3
chr9	39.800.000	39.820.000	4	FGF7P3,GLIDR
chr9	40.870.000	41.010.000	6	FRG1HP,MIR1299,PGM5P2
chr9	41.010.000	41.110.000	4	FRG1HP,LOC440896,PGM5P2
chr9	41.110.000	41.210.000	3	CBWD5,CBWD6,FOXD4L6,LOC440896
chr9	41.210.000	41.310.000	6	MIR4477A,MIR4477B
chr9	41.310.000	41.970.000	3	CNTNAP3B,FAM242F,FAM27E2,LOC107984035
chr9	61.140.000	61.230.000	3	FAM74A1,FAM74A4,FAM74A6,SPATA31A5,SPATA31A7
chr9	61.850.000	61.860.000	8	FAM27C
chr9	62.380.000	62.680.000	3	FGF7P6,LINC01189,LOC103908604,LOC103908605
chr9	62.750.000	62.880.000	7	LERFS,LINC01410,LOC100132249,PTGER4P2-CDK2AP2P2
chr9	62.880.000	62.930.000	3	LERFS,LOC728673
chr9	63.260.000	63.410.000	3	AQP7P1,AQP7P3,LOC100996643,LOC105379443
chr9	63.760.000	63.830.000	5	LINC00537,MIR4477A,MIR4477B
chr9	63.830.000	64.560.000	3	ANKRD20A4-ANKRD20A20P,FAM95B1,FLJ43315,FRG1JP,LOC105379252
chr9	65.650.000	65.750.000	3	CBWD5,FOXD4L4
chr9	65.910.000	66.330.000	3	AQP7P3,FAM95B1,GXYLT1P3,LOC105379252,LOC642929
chr9	67.270.000	67.440.000	3	CNTNAP3P2
chr9	67.720.000	67.730.000	11	FAM27B
chr10	46.370.000	46.510.000	3	ANXA8L1,FAM25BP,HNRNPA1P33,LINC00842,NPY4R
chr10	46.520.000	46.560.000	5	GPRIN2
chr10	46.560.000	46.610.000	3	LOC101927699,SYT15

chr10	47.480.000	47.610.000	3	AGAP9,ANXA8,BMS1P2,BMS1P2-AGAP9,CTSLP2,FAM25C,FAM25G
chr10	79.700.000	79.720.000	3	NUTM2B,NUTM2B-AS1
chr10	125.880.000	125.890.000	4	DHX32
chr10	125.890.000	125.900.000	7	FANK1
chr10	125.900.000	125.910.000	4	FANK1
chr10	125.910.000	125.930.000	3	FANK1
chr11	3.650.000	3.660.000	4	ART1
chr11	56.700.000	56.710.000	3	OR9G1,OR9G9
chr11	89.860.000	89.880.000	3	TRIM51EP,TRIM64B
chr11	124.910.000	124.920.000	4	HEPACAM,HEPN1
chr12	8.210.000	8.240.000	3	FAM86FP,FAM90A1,LINC02449
chr13	57.140.000	57.170.000	3	PRR20A,PRR20B,PRR20C,PRR20D,PRR20E
chr14	18.600.000	18.670.000	3	LINC02297,OR11H12
chr14	18.960.000	19.160.000	3	BMS1P17,BMS1P18,BMS1P22,DUXAP10,DUXAP9,LNCRNA-ATB,LOC100508046,POTEM
chr14	19.250.000	19.960.000	4	BMS1P17,BMS1P18,BMS1P22,DUXAP10,DUXAP9,LINC01297,LINC01297-DUXAP10-NBEAP6,LOC101929572,OR11H2,OR4K1,OR4K2,OR4K3,OR4K5,OR4M1,OR4N2,OR4Q3,POTEG,POTEH-AS1
chr14	105.610.000	105.710.000	3	ELK2AP,MIR8071-1,MIR8071-2
chr14	106.460.000	106.490.000	4	LINC00221
chr15	20.190.000	20.310.000	5	CHEK2P2
chr15	20.350.000	20.420.000	6	HERC2P3
chr15	20.420.000	20.430.000	3	HERC2P3
chr15	20.550.000	20.640.000	3	GOLGA8CP
chr15	21.300.000	21.390.000	3	CXADRP2
chr15	22.220.000	22.550.000	3	GOLGA8EP,HERC2,HERC2P2,HERC2P7,MIR1268A,REREP3
chr15	24.330.000	24.540.000	3	PWRN3
chr15	28.450.000	28.500.000	3	MIR1268A,MIR4509-1,MIR4509-2,MIR4509-3
chr15	74.070.000	74.090.000	4	GOLGA6A
chr15	75.260.000	75.290.000	3	GOLGA6C,GOLGA6D

chr15	82.440.000	82.510.000	3	GOLGA2P10,LOC102724034,LOC727751
chr16	14.890.000	14.940.000	3	LOC100288162,MIR3179-1,MIR3179-2,MIR3179-3,MIR3179-4,MIR3180-1,MIR3180-2, MIR3180-3,MIR3670-1,MIR3670-2, MIR3670-3,MIR3670-4, MIR6511A1,MIR6511A2,MIR6511A3,MIR6511A4,MIR6770-1,MIR6770-2,MIR6770-3,NOMO1, NOMO3,NPIPA1,PKD1P3-NPIPA1
chr16	14.940.000	15.030.000	5	MIR1972-1,MIR1972-2,NPIPA1,PDXDC1,PKD1P3-NPIPA1
chr16	21.400.000	21.500.000	3	LOC100190986,NPIPB3,SMG1P3
chr16	21.500.000	21.580.000	4	MIR3680-1,MIR3680-2,RRN3P3,SLC7A5P2,SMG1P3
chr16	21.730.000	21.930.000	3	LOC100190986,NPIPB3,NPIPB4,NPIPB5,OTOA,OTOAP1,RRN3,RRN3P1
chr16	22.440.000	22.610.000	3	LOC100190986,NPIPB5,OTOAP1,SMG1P1
chr16	29.430.000	29.540.000	3	BOLA2,BOLA2-SMG1P6,BOLA2B,LOC388242,LOC606724,LOC613038,NPIPB12, SLX1A,SLX1A-SULT1A3, SLX1B,SLX1B-SULT1A4, SMG1P6,SULT1A3,SULT1A4
chr16	30.190.000	30.290.000	3	BOLA2, BOLA2B,LOC388242,LOC613038,NPIPB12,NPIPB13,SLX1A,SLX1A-SULT1A3,SLX1B, SLX1B-SULT1A4, SMG1P5, SULT1A3,SULT1A4
chr16	32.030.000	32.310.000	3	HERC2P4,LOC102723753,LOC390705,TP53TG3D
chr16	33.330.000	33.340.000	7	LOC105369266
chr16	33.490.000	33.730.000	3	LOC390705
chr16	33.750.000	33.830.000	3	ENPP7P13
chr16	34.160.000	34.180.000	5	MIR9901
chr16	70.120.000	70.170.000	5	LOC400541,PDPR
chr16	74.360.000	74.430.000	5	CLEC18B,LOC105376772,LOC283922,NPIPB15
chr17	16.750.000	16.840.000	4	CCDC144A,FAM106C,KRT16P2,USP32P1
chr17	21.290.000	21.310.000	4	MAP2K3
chr17	21.670.000	21.840.000	3	KCNJ18
chr17	36.110.000	36.230.000	3	CCL3,CCL3L1,CCL3L3,CCL4L1,CCL4L2,TBC1D3B,TBC1D3D,TBC1D3G,TBC1D3H, TBC1D3I,TBC1D3L
chr17	37.940.000	37.980.000	3	TBC1D3D,TBC1D3H,TBC1D3I,TBC1D3L
chr17	43.230.000	43.280.000	3	RNU2-1
chr17	43.280.000	43.290.000	7	RNU2-1
chr17	46.090.000	46.290.000	4	ARL17B,KANSL1,KANSL1-AS1
chr17	64.890.000	64.930.000	3	LRRC37A3
chr18	100.000	120.000	138	MIR8078,ROCK1P1

chr19	47.900.000	47.960.000	5	SNAR-A1,SNAR-A10,SNAR-A11,SNAR-A12,SNAR-A13,SNAR-A14,SNAR-A2,SNAR-A3,SNAR-A4, SNAR-A5,SNAR-A6,SNAR-A7, SNAR-A8,SNAR-A9,SNAR-C1,SNAR-C2,SNAR-C3,SNAR-C4,SNAR-C5
chr19	50.090.000	50.140.000	7	SNAR-A10,SNAR-A11,SNAR-A14,SNAR-A3,SNAR-A4,SNAR-A5,SNAR-A6,SNAR-A7,SNAR-A8, SNAR-A9,SNAR-B1,SNAR-B2
chr20	28.570.000	28.650.000	3	FRG1CP
chr20	29.050.000	29.100.000	7	FRG1DP
chr20	29.390.000	29.490.000	4	FRG1EP,FRG2EP,LOC105379477
chr20	29.490.000	29.520.000	7	FRG1EP
chr20	29.860.000	29.910.000	9	MIR4477A,MIR4477B
chr20	30.350.000	30.420.000	4	FRG1BP,MLLT10P1
chr21	7.860.000	8.200.000	3	LOC100507412
chr21	8.200.000	8.260.000	146	LOC100507412,MIR3648-1,MIR3648-2,MIR663A,MIR6724-1,MIR6724-2, MIR6724-3,MIR6724-4, RNA18SN1, RNA18SN2, RNA18SN3, RNA18SN4, RNA18SN5, RNA28SN2, RNA28SN5, RNA45SN2, RNA5-8SN1, RNA5-8SN2, RNA5-8SN3, RNA5-8SN4, RNA5-8SN5
chr21	8.380.000	8.470.000	158	LOC100507412,MIR10396A,MIR10396B,MIR6724-1,MIR6724-2,MIR6724-3,MIR6724-4, RNA18SN1, RNA18SN2, RNA18SN3, RNA18SN4, RNA18SN5, RNA28SN1, RNA28SN2, RNA28SN3, RNA28SN5, RNA45SN1, RNA45SN3, RNA45SN5, RNA5-8SN1, RNA5-8SN2, RNA5-8SN3, RNA5-8SN4, RNA5-8SN5
chr21	8.700.000	10.490.000	6	BAGE,BAGE2,BAGE3,BAGE4,LINC01667,LOC105379514,MIR10396A,MIR10396B,MIR3648-1, MIR3648-2,NCOR1P4,TEKT4P2
chr21	10.490.000	10.570.000	3	BAGE2,BAGE3,BAGE4,TPTE
chr21	10.570.000	10.870.000	7	TPTE
chr21	12.720.000	13.040.000	3	ANKRD30BP2
chr22	10.780.000	11.070.000	8	FRG1FP
chr22	11.260.000	12.960.000	6	LOC102723769
chr22	15.520.000	15.880.000	4	BMS1P17,BMS1P18,BMS1P22,DUXAP8,OR11H1,POTEH,POTEH-AS1,PSLNR
chr22	18.730.000	18.740.000	11	FAM230E
chr22	18.770.000	18.900.000	4	FAM230F,GGT3P,LOC102725072
chrX	270.000	9.400.000	2	AKAP17A, ANOS1, ARSD, ARSD-AS1, ARSF, ARSH, ARSL, ASMT, ASMTL,ASMTL-AS1,CD99,CD99P1,CRLF2,CSF2RA,DHR5X, FAM239A, FAM239B,FAM9A, FAM9B,GTPBP6,GYG2,IL3RA,LINC00102,LINC00106,LINC00685,LINC01546, LOC101928201, LOC105373156,LOC389906,MIR3690,MIR4767,MIR4770,MIR6089,MIR651,MXRA5,NLGN4X, P2RY8,PLCXD1,PNPLA4, PPP2R3B,PRKX,PRKX-AS1,PUDP,SHOX,SLC25A6,SNORA48B,STS,VCX, VCX2, VCX3A,VCX3B,XG,XGY2,ZBED1

chrX	9.420.000	49.320.000	2	ACE2,ACOT9,ADGRG2,AMELX,AP1S2,APOO,ARAF,ARHGAP6,ARX,ASB11,ASB9, ATP6AP2,ATXN3L,BCLAF3,BCOR,BEND2, BMX,CA5B,CA5BP1,CA5BP1-CA5B,CACNA1F,CASK, CBL2,CCDC120,CCDC22,CDK16,CDKL5,CFAP47,CFP,CHST7,CLCN4, CLDN34, CLTRN,CNKSR2,CTPS2,CXXC1P1,Cxorf21,Cxorf38,Cxorf58,CYBB, DCAF8L1,DCAF8L2,DDX3X,DDX53, DIPK2B, DMD,DUSP21,DYNLT3,EBP,EFHC2,EGFL6,EIF1AX,EIF1AX-AS1,EIF2S3,ELK1,ERAS,FAM47A,FAM47B,FAM47C,FAM9C, FANCB,FLICR,FOXP3,FRMPD4,FTHL17,FTHL18,FTSJ1,FUNDC1,GAGE10,GATA1,GEMIN8,GK,GLOD5,GLRA2, GPKOW,GPM6B,GPR143,GPR34,GPR82,GRIAP1,GRPR,GS1594A7.3,GS1600G8.3,H2AP,HCCS, HDAC6,IL1RAPL1, INE1,INE2,JADE3, KCND1,KDM6A,KLHL15,KLHL34,KRBOX4,LANCL3,LINC01186,LINC01203,LINC01204, LINC01281, LINC01282,LINC01456,LINC01545,LINC01560, LINC02154,LINC02595,LINC02601,LOC100132831,LOC101927476, LOC101927635,LOC101928389,LOC101928627,LOC392452,LOC729609,MAGEB1,MAGEB10,MAGEB16, MAGEB17, MAGEB18,MAGEB2,MAGEB3,MAGEB4,MAGEB5,MAGEB6,MAGIX, MAOA,MAOB,MAP3K15,MAP7D2,MBTPS2,MED14, MED14OS,MID1,MID1IP1,MID1IP1-AS1,MIR1587,MIR221,MIR222,MIR223,MIR23C,MIR3915,MIR3937,MIR4666B,MIR4768, MIR4769,MIR548A2,MIR548AM,MIR548AX,MIR548F5,MIR6086,MIR6134,MOSPD2,MPC1L,MSL3,NDP, NDP- AS1,NDUFB11,NHS,NHS-AS1,NR0B1,NYX,OFD1,OTC,OTUD5,PCSK1N,PCYT1B,PCYT1B-AS1,PDHA1, PDK3,PHEX,PHEX- AS1,PHKA2,PHKA2-AS1,PIGA,PIM2,PINCR,PIR,PIR-FIGF,PLP2,POLA1,PORCN, PPEF1,PPEF1-AS1,PPP1R2C,PPP1R3F,PPP4R3C, PQBP1,PRAF2,PRDX4,PRICKLE3,PRPS2, PRRG1,PTCHD1,PTCHD1-AS,RAB9A,RAI2,RBBP7,RBM10,RBM3,REPS2,RGN, RP2,RPGR,RPS6KA3,RS1,S100G,SAT1,SCARNA23,SCARNA9L,SCML1,SCML2,SH3KBP1,SHROOM2.SLC35A2,SLC38A5, SLC9A7,SMPX,SMS,SNORA11C,SPACA5,SPACA5B,SRPX,SSX1,SSX3,SSX4,SSX4B,SSX5,SSX6P,SSX9P,SUPT20HL1, SUPT20HL2,SUV39H1,SYAP1,SYN1,SYP,SYP-AS1,SYTL5,TAB3,TAB3-AS1,TBC1D25,TBL1X,TCEANC,TFE3,TIMP17B,TIMP1, TLR7, TLR8,TLR8-AS1,TMEM47,TMSB4X,TRAPPC2,TSPAN7,TXLNG,UBA1,UBE2E4P,USP11, USP9X,UXT,UXT-AS1,VEGFD, VENTXP1,WAS,WDR13,WDR45,WWC3,XK,YY2,ZFX,ZFX-AS1,ZNF157,ZNF182,ZNF41,ZNF630, ZNF630-AS1,ZNF674,ZNF674- AS1,ZNF81,ZRSR2
chrX	49.320.000	49.590.000	4	GAGE12B,GAGE12C,GAGE12D,GAGE12E,GAGE12F,GAGE12G,GAGE12H,GAGE12I,GAGE12J,GAGE12K,GAGE13,GAGE2A,GAGE2B, GAGE2C,GAGE2D,GAGE2E,GAGE4,GAGE5,GAGE6,GAGE7,GAGE8
chrX	49.590.000	49.600.000	7	GAGE1,GAGE2A,GAGE2B,GAGE2C
chrX	49.600.000	52.490.000	2	AKAP4,BMP15,CCNB3,CENPVL1,CENPVL2,CENPVL3,CLCN5,DGKK,EZH1P,GAGE1,GSPT2,LINC01284,LINC01496, MAGED1,MAGED4,MAGED4B,MIR188,MIR362,MIR500A, MIR500B,MIR501,MIR502,MIR532,MIR660, MIR8088,NUDT10, NUDT11,PAGE1,PAGE4, SHROOM4,SNORA11D,SNORA11E,USP27X,USP27X-AS1,XAGE2
chrX	52.490.000	52.520.000	4	FAAH2,NBDY,NLRP2B,SPIN2A,SPIN2B,SPIN3,ZXDA,ZXDB

chrX	62.300.000	115.720.000	2	ABCB7,ACSL4,ALG13,AMER1,AMMECR1,AMOT,APOOL,AR,ARHGFE9,ARHGFE9-IT1,ARL13A,ARMCX1,ARMCX2, ARMCX3,ARMCX4,ARMCX5,ARMCX5-GPRASP2,ARMCX6,ARR3,ASB12,ATG4A,ATP7A,ATRX,AWAT1,AWAT2,BEX1, BEX2,BEX3,BEX4,BEX5,BHLHB9,BRDTP1,BRDW3,BTK,CAPN6,CDX4,CENPI,CHIC1,CHM,CHMP1B2P,CHRD1,CITED1, CLDN2, COL4A5, COL4A6, COX7B, CPXCR1, CSTF2, CXCR3, Cxorf49, Cxorf49B, Cxorf65, CYLC1, CYSLTR1, DACH2, DCX, DGAT2L6,DIAPH2,DIAPH2-AS1,DLG3,DLG3-AS1,DMRTC1,DMRTC1B,DNAAF6,DRP2,EDA,EDA2R,EFNB1,ERCC6L,ESX1, FAM133A,FAM155B,FAM199X,FAM226A,FAM226B,FAM236A,FAM236B,FAM236C,FAM236D,FGF16,FLJ44635, FOXO4,FRMD8P1,FRMPD3,FRMPD3-AS1,FTX,GCNA,GDPD2,GJB1,GLA,GLRA4,GPR174,GPRASP1,GPRASP2,GUCY2F, H2BW1,H2BW2,H2BW3P,H2BW4P,HDAC8,HDX,HEPH,HMGNS,HNRNP2,HTR2C,IGBP1,IL13RA2,IL1RAPL2,IL2RG, INGX,IRS4,ITGB1BP2,ITM2A,JPX,KCNE5,KIF4A,KLHL4,LAS1L,LHFPL1,LINC00269,LINC00630,LINC00891,LINC01278, LINC02589,LOC100129291,LOC100132741,LOC101059915,LOC101928128,LOC101928335,LOC101928358, LOC101928437,LOC105373311,LOC286437,LPAR4,LRCH2,LUZP4,MAGEE1,MAGEE2,MAGT1,MAP2K4P1,MED12,MID2, MIR1264,MIR1298,MIR1321,MIR1468,MIR1911,MIR1912,MIR223,MIR325,MIR325HG,MIR361,MIR374A,MIR374B, MIR374C,MIR384,MIR3978,MIR421,MIR4328,MIR4329,MIR4454,MIR448,MIR545,MIR548AN,MIR548I4,MIR548M, MIR652,MIR676,MIR764,MORC4,MORF4L2,MORF4L2-AS1,MSN,MTMR8,NAP1L2,NAP1L3,NAP1L6P,NCBP2L,NEXMIF, NHSL2,NLGN3,NONO,NOX1,NRK,NUP62CL,NXF2,NXF2B,NXF3,NXF4,NXF5,NXT2,OGT,OPHN1,OTUD6A,P2RY10, P2RY4,PABPC1L2A,PABPC1L2B,PABPC1L2B-AS1,PABPCS,PABPCS-AS1,PAK3,PBDC1,PCDH11X,PCDH19,PDZD11, PGAM4,PGK1,PHKA1,PHKA1-AS1,PIN4,PJA1,PLP1,PLS3,PLS3-AS1,POF1B,POU3F4,PRPS1,PSMD10,PWWP3B,RAB40A, RAB40AL,RAB41,RAB9B,RADX,RBM41,RBMXL3,RIPPLY1,RLIM,RNF128,RPA4,RPL36A,RPL36AHNRNP2,RPS26P11, RPS4X,RPS6KA6,RTL3,RTL4,RTL5,RTL9,SATL1,SERPINA7,SERTM2,SH3BGRL,SLC16A2,SLC25A53,SLC7A3,SNORA35, SNORA35B,SNORD3E,SNORD96B,SNX12,SPIN4,SRPX2,STARDB,SYTL4,TAF1,TAF7L,TAF9B,TBC1D8B,TBX22,TCEAL1, TCEAL2,TCEAL3,TCEAL4,TCEALS,TCEAL6,TCEAL7,TCEAL8,TCEAL9,TCP11X1,TCP11X2,TDGF1P3,TENT5D,TEX11, TEX13A,TEX13B,TGIF2LX,TIMM8A,TMEM164,TMEM31,TMEM35A,TMSB15A,TMSB15B,TMSB15B-AS1,TNMD, TRMT2B,TRPCS,TRPCSOS,TSC2D23,TSIX,TSPAN6, TTC3P1,UBE2DNL,UPRT,VSIG1,VSIG4,XACT,XIST,XKRX,YIPF6, ZC3H12B,ZCAH2,ZCCHC13,ZCCHC18,ZDHC15,ZMAT1,ZMYM3,ZNF711
chrX	115.720.000	115.860.000	5	DANT1,DANT2
chrX	115.860.000	115.880.000	7	DANT1,DANT2
chrX	115.880.000	115.890.000	5	DANT1,DANT2
chrX	115.890.000	120.870.000	2	AGTR2,AKAP14,ATP1B4,C1GALT1C1,CT83,CUL4B,Cxorf56,DANT1,DANT2,DOCK11,IL13RA1,KIAA1210,KLHL13, LAMP2,LINC01285,LINC01402,LOC100126447,LOC101928336,LONRF3,MCTS1,MIR1277,MIR766,NDUFA1,NKAP, NKAPP1,NKRF,PGRMC1,RHOXF1,RHOXF1-AS1,RHOXF1P1,RHOXF2,RHOXF2B,RNF113A,RPL39,SEPTIN6,SLC25A43, SLC25A5,SLC25A5-AS1,SLC6A14,SNORA69,SOWAHD,TMEM255A,UBE2A,UPF3B,WDR44,ZBTB33,ZCCHC12



chrX	120.990.000	154.150.000	2	<p>ABCD1, ACTRT1, ADGRG4, AFF2, AIFM1, APLN, ARHGAP36, ARHGAP4, ARHGEF6, ATP11C, ATP2B3, AVPR2, BCAP31, BCORL1, BGN, BRS3, CCDC160, CCNQ, CD40LG, CD99L2, CDR1, CETN2, CNGA2, CSAG1, CSAG3, CSAG4, CT45A1, CT45A10, CT45A2, CT45A3, CT45A5, CT45A6, CT45A7, CT45A8, CT45A9, CT55, CXorf51A, CXorf51B, CXorf66, DCAF12L1, DCAF12L2, DENND10P1, DUSP9, ELF4, ENOX2, EOLA1, EOLA2, ETDA, ETDB, ETDC, F9, FAM122B, FAM122C, FATE1, FGF13, FGF13-AS1, FHL1, FIRRE, FMR1, FMR1-AS1, FMR1NB, FRMD7, GABRA3, GABRE, GABRQ, GLUD2, GPC3, GPC3-AS1, GPC4, GPR101, GPR119, GPR50, GPR50-AS1, GRIA3, HAUS7, HCF1, HCF1-AS1, HMGB3, HPRT1, HS6ST2, HS6ST2-AS1, HSF1, HSF2, HSF3, HSF4, HTATSF1, IDH3G, IDS, IGSF1, INTS6L, INTS6L-AS1, IRAK1, L1CAM, LCA10, LDOC1, LINC00629, LINC00632, LINC00850, LINC00892, LINC00893, LINC00894, LINC01201, LINC02243, LOC100506790, LOC101928402, LOC101928495, LOC105373338, LOC105373378, LOC105373383, LOC105377213, LOC389895, LOC645188, LOC728660, MAGEA1, MAGEA10, MAGEA10-MAGEA5, MAGEA11, MAGEA12, MAGEA2, MAGEA2B, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA4-AS1, MAGEA5, MAGEA6, MAGEA8, MAGEA8-AS1, MAGEA9, MAGEA9B, MAGEC1, MAGEC2, MAGEC3, MAMLD1, MAP7D3, MBNL3, MCF2, MECP2, MIR105-1, MIR105-2, MIR106A, MIR12129, MIR18B, MIR19B2, MIR20B, MIR2114, MIR224, MIR3202-1, MIR3202-2, MIR320D2, MIR363, MIR3672, MIR424, MIR4330, MIR450A1, MIR450A2, MIR450B, MIR452, MIR503, MIR503HG, MIR504, MIR505, MIR506, MIR507, MIR508, MIR509-1, MIR509-2, MIR509-3, MIR510, MIR513A1, MIR513A2, MIR513B, MIR513C, MIR514A1, MIR514A2, MIR514A3, MIR514B, MIR542, MIR718, MIR767, MIR888, MIR890, MIR891A, MIR891B, MIR892A, MIR892B, MIR892C, MIR92A2, MIR934, MGMT1, MOSPD1, MTM1, MTMR1, NAA10, NSDHL, OCRL, OPN1LW, OR13H1, PASD1, PDZD4, PHF6, PLAC1, PLXNB3, PNCK, PNMA3, PNMA5, PNMA6A, PNMA6E, PNMA6F, PRR32, PRRG3, RAB33A, RAP2C, RAP2C-AS1, RBMX, RBMX2, RENBP, RNU6-1, RNU6-2, RNU6-7, RNU6-8, RNU6-9, RTL8A, RTL8B, RTL8C, SAGE1, SAGE2P, SASH3, SH2D1A, SLC25A14, SLC6A8, SLC9A6, SLITRK2, SLITRK4, SMARCA1, SMIM10, SMIM10L2A, SMIM10L2B, SMIM10L2B-AS1, SNORD61, SOX3, SPANXA1, SPANXA2, SPANXA2-OT1, SPANXB1, SPANXC, SPANXD, SPANXN1, SPANXN2, SPANXN3, SPANXN4, SRD5A1P1, SRPK3, SSR4, STAG2, STK26, TENM1, TEX13C, TEX13D, TFDP3, THOC2, TMEM185A, TMEM187, TREX2, UBE2NL, USP26, UTP14A, VGLL1, VMA21, XIAP, XPNPEP2, ZDHHC9, ZFP92, ZIC3, ZNF185, ZNF275, ZNF280C, ZNF449, ZNF75D</p>
chrX	154.290.000	155.560.000	2	<p>ATP6AP1, BRCC3, CH17-340M24.3, CLIC2, CMC4, CTAG1A, CTAG1B, CTAG2, DKC1, DNASE1L1, EMD, F8, F8A1, F8A2, F8A3, FAM223A, FAM223B, FAM3A, FAM50A, FLNA, FUNDC2, G6PD, GAB3, GDI1, H2AB1, H2AB2, H2AB3, IKBKG, LAGE3, LOC101927830, MIR1184-1, MIR1184-2, MIR1184-3, MIR664B, MIR6858, MPP1, MTCP1, PLXNA3, RAB39B, RPL10, SLC10A3, SMIM9, SNORA36A, SNORA56, SNORA70, TAZ, TEX28, TKTL1, TMLHE, TMLHE-AS1, UBL4A, VBP1</p>
chrX	155.570.000	156.040.895	2	DDX11L16, IL9R, SPY3, TMLHE, VAMP7, WASIR1
chrX	155.570.000	156.040.895	2	DDX11L16, IL9R, SPY3, TMLHE, VAMP7, WASIR1

Tabla suplementaria 17. Variantes con aumento en el número de copia observadas en el Trío 6 y genes cercanos al locus determinado.

Posición (Hg38)			Número de copias	Gen
chr1	13.170.000	13.220.000	1	PRAMEF13,PRAMEF9
chr1	103.630.000	103.760.000	1	AMY1A,AMY1B,AMY1C
chr1	109.680.000	109.700.000	0	GSTM1,GSTM2
chr1	120.600.000	120.920.000	1	<a href="#">LINC00623</a> , <a href="#">LOC100996720</a> , <a href="#">LOC100996724</a> , <a href="#">NBPF26</a> , <a href="#">NOTCH2NLR</a> , <a href="#">PPIAL4A</a> , <a href="#">RNVU1-19</a>
chr1	169.250.000	169.280.000	1	NME7
chr1	248.510.000	248.660.000	1	<a href="#">OR2G6</a> , <a href="#">OR2T10</a> , <a href="#">OR2T11</a> , <a href="#">OR2T27</a> , <a href="#">OR2T29</a> , <a href="#">OR2T34</a> , <a href="#">OR2T35</a> , <a href="#">OR2T5</a>
chr2	97.520.000	97.550.000	0	ANKRD36B
chr2	109.930.000	109.980.000	1	LIMS3- <a href="#">LOC440895</a> , <a href="#">LOC100288570</a> , <a href="#">LOC440895</a>
chr2	130.470.000	130.560.000	1	CFC1B,POTEI,PRSS40A,PRSS40B
chr3	113.850.000	113.900.000	1	GRAMD1C
chr4	9.450.000	9.480.000	0	DEFB131A
chr4	68.510.000	68.630.000	1	UGT2B17
chr5	69.650.000	69.890.000	1	GUSBP14,GUSBP16,GUSBP3, <a href="#">LINC02197</a>
chr6	0	150.000	1	<a href="#">LINC00266-3</a>
chr6	32.490.000	32.530.000	1	HLA-DRB5
chr7	6.810.000	6.830.000	1	CCZ1B
chr7	63.490.000	63.690.000	1	MIR4283-1,MIR4283-2
chr7	75.190.000	75.340.000	1	GTF2IP1,PMS2P7,SPDYE10P,SPDYE11,SPDYE13,SPDYE14,SPDYE15,SPDYE17,SPDYE8
chr7	76.510.000	76.540.000	1	SPDYE16,UPK3B
chr7	143.600.000	143.730.000	1	TCAF2,TCAF2P1
chr1	13.170.000	13.220.000	1	PRAMEF13,PRAMEF9
chr8	7.550.000	7.570.000	1	FAM90A7P
chr8	7.950.000	8.010.000	1	DEFB109B,FAM66E,USP17L3,USP17L8,ZNF705B
chr8	8.070.000	8.130.000	1	FAM85B,MIR548I3
chr8	12.040.000	12.100.000	1	DEFB130A,DEFB130B,ZNF705D
chr8	39.370.000	39.530.000	1	ADAM3A,ADAM5
chr9	39.160.000	39.340.000	1	CNTNAP3
chr9	40.500.000	40.570.000	1	<a href="#">LOC101929583</a> , <a href="#">LOC102724580</a> , <a href="#">LOC105379443</a>
chr9	62.930.000	63.260.000	1	<a href="#">LOC101928195</a> , <a href="#">LOC101928381</a> , <a href="#">LOC101929583</a> , <a href="#">LOC286297</a>
chr9	64.560.000	64.760.000	1	<a href="#">LOC100996643</a> , <a href="#">LOC101928195</a> , <a href="#">LOC101928381</a> , <a href="#">LOC101929583</a> , <a href="#">LOC105379443</a>
chr11	89.930.000	89.980.000	1	TRIM49D1,TRIM49D2,TRIM64
chr12	9.480.000	9.580.000	0	OVOS
chr12	11.350.000	11.390.000	1	PRB1
chr13	57.170.000	57.220.000	1	PRR20A,PRR20B,PRR20C,PRR20D,PRR20E
chr14	41.140.000	41.200.000	0	<a href="#">LINC02315</a>
chr14	73.530.000	73.560.000	0	ACOT1,HEATR4
chr15	21.390.000	21.420.000	1	MIR3118-2,MIR3118-3,MIR3118-4,POTEB3
chr15	21.970.000	22.220.000	1	IGHV1OR15-1, <a href="#">IGHV1OR15-3</a> , <a href="#">LOC101927079</a> , <a href="#">LOC102724760</a> , <a href="#">LOC642131</a> ,OR4M2,OR4N3P,OR4N4
chr15	24.140.000	24.190.000	1	PWRN2
chr15	76.590.000	76.610.000	1	SCAPER

chr15	84.240.000	84.390.000	1	GOLGA6L4
chr16	33.160.000	33.330.000	1	LOC102723655,LOC105369266,TP53TG3,TP53TG3B,TP53TG3C,TP53TG3E,TP53TG3F
chr16	33.340.000	33.490.000	1	LOC102723655,LOC105369266,TP53TG3,TP53TG3B,TP53TG3C,TP53TG3E,TP53TG3F
chr16	34.340.000	34.520.000	1	CCNYL3
chr16	34.960.000	35.070.000	1	CCNYL3
chr17	18.440.000	18.560.000	0	CCDC144B,FAM106A,KRT16P1,LGALS9C,USP32P2
chr17	46.290.000	46.490.000	1	ARL17A,ARL17B,LRRC37A,NSFP1
chr17	46.570.000	46.700.000	1	ARL17A,ARL17B,NSF,NSFP1
chr17	63.870.000	63.910.000	1	CSH1,CSH2,CSHL1,GH2
chr20	1.580.000	1.610.000	0	SIRPB1
chr21	0	5.250.000	1	DNMT3L-AS1,GATD3A,GATD3B, ICOSLG,LINC01678,LOC102723996,LOC102724159,PWP2
chr21	5.970.000	6.580.000	1	CBS,CBSL,CRYAA,CRYAA2,FRGCA,H2BS1,LINC00313,LINC00319,LINC01669,LOC102723360,LOC102724219,LOC102724843,LOC102724951,LOC106780825,SIK1,SIK1B,U2AF1,U2AF1L5
chr21	7.750.000	7.860.000	1	FAM243A,FAM243B,KCNE1B,SMIM11A,SMIM11B,SMIM34A
chr21	43.030.000	43.570.000	1	CBS,CBSL,CRYAA,CRYAA2,FRGCA,H2BS1,HSF2BP,LINC00313,LINC00319,LINC00322,LINC01669,LINC01679,LOC106780825,PKNOX1,SIK1,SIK1B,U2AF1,U2AF1L5
chr22	18.520.000	18.730.000	1	PI4KAP1,RIMBP3,TMEM191B
chr22	18.740.000	18.770.000	1	FAM230E
chrX	155.560.000	155.570.000	0	TMLHE

chrY	0	10.650.000	0	AKAP17A,AMELY,ASMT,ASMTL,ASMTL-AS1,CD99,CD99P1,CRLF2,CSF2RA,DHRX,FAM197Y2, FAM197Y3,FAM197Y4, FAM197Y5,FAM197Y6,FAM197Y7,FAM197Y8,FAM197Y9, GTPBP6,IL3RA,LINC00102,LINC00106, LINC00278,LINC00279,LINC00280,LINC00685,MIR3690,MIR6089,MIR9985,P2RY8,PCDH11Y,PLCXD1, PPP2R3B,PRKY,RBMY1A3P, RBMY3AP,RPS4Y1,SHOX,SLC25A6, SRY,TBL1Y,TGIF2LY, TSPY1, TSPY10,TSPY2, TSPY3,TSPY4,TSPY8,TTTY1,TTTY11, TTTY12,TTTY16,TTTY18,TTTY19,TTTY1B,TTTY2,TTTY20, TTTY21, TTTY21B,TTTY22,TTTY23,TTTY23B,TTTY2B,TTTY7,TTTY7B,TTTY8,TTTY8B,XGY2,ZBED1,ZFY,ZFY-AS1
chrY	11.750.000	56.830.000	0	BCORP1,BPY2,BPY2B,BPY2C,CDY1,CDY1B,CDY2A,CDY2B,CSPG4P1Y,DAZ1,DAZ2,DAZ3,DAZ4,DDX3Y,EIF1AY, FAM224A,FAM224B,FAM41AY1,FAM41AY2,GOLGA2P2Y,GOLGA2P3Y,GYG2P1,HSFY1,HSFY2, KDM5D, LOC100652931,LOC101929148,MIR12120,NLGN4Y,NLGN4Y-AS1, PRORY,PRY, PRY2,RBMY1A1, RBMY1B, RBMY1D,RBMY1E,RBMY1F,RBMY1J, RBMY2EP, RBMY2FP, RPS4Y2,TMSB4Y,TTTY10,TTTY13,TTTY14, TTTY15,TTTY17A,TTTY17B,TTTY17C,TTTY3,TTTY3B,TTTY4, TTTY4B,TTTY4C, TTTY5, TTTY6, TTTY6B,TTTY9A,TTTY9B,TXLNGY,USP9Y,UTY,VCY,VCY1B,XKRY,XKRY2
chrY	56.890.000	57.227.415	0	DDX11L16,IL9R,SPRY3,VAMP7,WASIR1
chrY	56.890.000	57.227.415	0	DDX11L16,IL9R,SPRY3,VAMP7,WASIR1

Tabla suplementaria 18. Variantes con pérdida en el número de copia observadas en el Trío 6 y genes cercanos al locus determinado.

# Referencias

- Abe, S., Katagiri, T., Saito-Hisaminato, A., Usami, S., Inoue, Y., Tsunoda, T., Nakamura, Y., 2003. Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 73–82. <https://doi.org/10.1086/345398>
- Ahmed, Z.M., Masmoudi, S., Kalay, E., Belyantseva, I.A., Mosrati, M.A., Collin, R.W.J., Riazuddin, Saima, Hmani-Aifa, M., Venselaar, H., Kawar, M.N., Tlili, A., van der Zwaag, B., Khan, S.Y., Ayadi, L., Riazuddin, S.A., Morell, R.J., Griffith, A.J., Charfedine, I., Caylan, R., Oostrik, J., Karaguzel, A., Ghorbel, A., Riazuddin, Sheikh, Friedman, T.B., Ayadi, H., Kremer, H., 2008. Mutations of LRTOMT, a fusion gene with alternative reading frames, cause nonsyndromic deafness in humans. *Nat. Genet.* 40, 1335–1340. <https://doi.org/10.1038/ng.245>
- Ahmed, Z.M., Morell, R.J., Riazuddin, Saima, Gropman, A., Shaukat, S., Ahmad, M.M., Mohiddin, S.A., Fananapazir, L., Caruso, R.C., Husnain, T., Khan, S.N., Riazuddin, Sheikh, Griffith, A.J., Friedman, T.B., Wilcox, E.R., 2003a. Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFN37. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1315–1322. <https://doi.org/10.1086/375122>
- Ahmed, Z.M., Riazuddin, Saima, Ahmad, J., Bernstein, S.L., Guo, Y., Sabar, M.F., Sieving, P., Riazuddin, Sheikh, Griffith, A.J., Friedman, T.B., Belyantseva, I.A., Wilcox, E.R., 2003b. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFN23. *Hum. Mol. Genet.* 12, 3215–3223. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg358>
- Ahmed, Z.M., Yousaf, R., Lee, B.C., Khan, S.N., Lee, S., Lee, K., Husnain, T., Rehman, A.U., Bonneux, S., Ansar, M., Ahmad, W., Leal, S.M., Gladyshev, V.N., Belyantseva, I.A., Van Camp, G., Riazuddin, Sheikh, Friedman, T.B., Riazuddin, Saima, 2011. Functional null mutations of MSRB3 encoding methionine sulfoxide reductase are associated with human deafness DFN74. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.11.010>
- Avan, P., Le Gal, S., Michel, V., Dupont, T., Hardelin, J.P., Petit, C., Verpy, E., 2019. Otogelin, otogelin-like, and stereocilin form links connecting outer hair cell stereocilia to each other and the tectorial membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 25948–25957. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902781116>
- Behloul, A., Bonnet, C., Abdi, S., Bouaita, A., Lelli, A., Hardelin, J.-P., Schietroma, C., Rous, Y., Louha, M., Cheknane, A., Lebdi, H., Boudjelida, K., Makrelouf, M., Zenati, A., Petit, C., 2014. EPS8, encoding an actin-binding protein of cochlear hair cell stereocilia, is a new causal gene for autosomal recessive profound deafness. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 55. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-9-55>
- Ben Said, M., Grati, M., Ishimoto, T., Zou, B., Chakchouk, I., Ma, Q., Yao, Q., Hammami, B., Yan, D., Mittal, R., Nakamichi, N., Ghorbel, A., Neng, L., Tekin, M., Shi, X.R., Kato, Y., Masmoudi, S., Lu, Z., Hmani, M., Liu, X., 2016. A mutation in SLC22A4 encoding an organic cation transporter expressed in the cochlea stria endothelium causes human recessive non-syndromic hearing loss DFN60. *Hum. Genet.* 135, 513–524. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1657-7>
- Borck, G., Ur Rehman, A., Lee, K., Pogoda, H.-M., Kakar, N., von Ameln, S., Grillet, N., Hildebrand, M.S., Ahmed, Z.M., Nürnberg, G., Ansar, M., Basit, S., Javed, Q., Morell, R.J., Nasreen, N., Shearer, A.E., Ahmad, A., Kahrizi, K., Shaikh, R.S., Ali, R.A., Khan, S.N., Goebel, I., Meyer, N.C., Kimberling, W.J., Webster, J.A., Stephan, D.A., Schiller, M.R., Bahlo, M., Najmabadi, H., Gillespie,

- P.G., Nürnberg, P., Wollnik, B., Riazuddin, Saima, Smith, R.J.H., Ahmad, W., Müller, U., Hammerschmidt, M., Friedman, T.B., Riazuddin, Sheikh, Leal, S.M., Ahmad, J., Kubisch, C., 2011. Loss-of-function mutations of ILDR1 cause autosomal-recessive hearing impairment DFNB42. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.12.011>
- Bork, J.M., Peters, L.M., Riazuddin, S., Bernstein, S.L., Ahmed, Z.M., Ness, S.L., Polomeno, R., Ramesh, A., Schloss, M., Srisailpathy, C.R., Wayne, S., Bellman, S., Desmukh, D., Ahmed, Z., Khan, S.N., Kaloustian, V.M., Li, X.C., Lalwani, A., Riazuddin, S., Bitner-Glindzicz, M., Nance, W.E., Liu, X.Z., Wistow, G., Smith, R.J., Griffith, A.J., Wilcox, E.R., Friedman, T.B., Morell, R.J., 2001. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 26–37. <https://doi.org/10.1086/316954>
- Buniello, A., Ingham, N.J., Lewis, M.A., Huma, A.C., Martinez-Vega, R., Varela-Nieto, I., Vizcay-Barrena, G., Fleck, R.A., Houston, O., Bardhan, T., Johnson, S.L., White, J.K., Yuan, H., Marcotti, W., Steel, K.P., 2016. Wbp2 is required for normal glutamatergic synapses in the cochlea and is crucial for hearing. *EMBO Mol. Med.* 8, 191–207. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505523>
- Chen, T., Rohacek, A.M., Caporizzo, M., Nankali, A., Smits, J.J., Oostrik, J., Lanting, C.P., Küçük, E., Gilissen, C., van de Kamp, J.M., Pennings, R.J.E., Rakowiecki, S.M., Kaestner, K.H., Ohlemiller, K.K., Oghalai, J.S., Kremer, H., Prosser, B.L., Epstein, D.J., 2021. Cochlear supporting cells require GAS2 for cytoskeletal architecture and hearing. *Dev. Cell* 56, 1526-1540.e7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.04.017>
- Chen, W., Kahrizi, K., Meyer, N.C., Riazalhosseini, Y., Van Camp, G., Najmabadi, H., Smith, R.J.H., 2005. Mutation of COL11A2 causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the DFNB53 locus. *J. Med. Genet.* <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.032615>
- Collin, R.W.J., Kalay, E., Tariq, M., Peters, T., van der Zwaag, B., Venselaar, H., Oostrik, J., Lee, K., Ahmed, Z.M., Çaylan, R., Li, Y., Spierenburg, H.A., Eyupoglu, E., Heister, A., Riazuddin, Saima, Bahat, E., Ansar, M., Arslan, S., Wollnik, B., Brunner, H.G., Cremers, C.W.R.J., Karaguzel, A., Ahmad, W., Cremers, F.P.M., Vriend, G., Friedman, T.B., Riazuddin, Sheikh, Leal, S.M., Kremer, H., 2008. Mutations of ESRRB Encoding Estrogen-Related Receptor Beta Cause Autosomal-Recessive Nonsyndromic Hearing Impairment DFNB35. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 125–138. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.008>
- Dahmani, M., Ammar-Khodja, F., Bonnet, C., Lefèvre, G.M., Hardelin, J.-P., Ibrahim, H., Mallek, Z., Petit, C., 2015. EPS8L2 is a new causal gene for childhood onset autosomal recessive progressive hearing loss. *Orphanet J. Rare Dis.* 10, 96. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0316-8>
- del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M.A., del Castillo, F.J., Alvarez, A., Tellería, D., Menéndez, I., Moreno, F., 2002. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N. Engl. J. Med.* 346, 243–249. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012052>
- Delmaghani, S., Aghaie, A., Bouyacoub, Y., El Hachmi, H., Bonnet, C., Riahi, Z., Chardenoux, S., Perfettini, I., Hardelin, J.-P., Houmeida, A., Herbomel, P., Petit, C., 2016. Mutations in CDC14A, Encoding a Protein Phosphatase Involved in Hair Cell Ciliogenesis, Cause Autosomal-Recessive Severe to Profound Deafness. *Am. J. Hum. Genet.* 98, 1266–1270. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.04.015>
- Delmaghani, S., Aghaie, A., Michalski, N., Bonnet, C., Weil, D., Petit, C., 2012. Defect in the gene encoding the EAR/EPTP domain-containing protein TSPEAR causes DFNB98 profound deafness. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3835–3844. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds212>
- Delmaghani, S., del Castillo, F.J., Michel, V., Leibovici, M., Aghaie, A., Ron, U., Van Laer, L., Ben-Tal, N., Van Camp, G., Weil, D., Langa, F., Lathrop, M., Avan, P., Petit, C., 2006. Mutations in the gene encoding pejkakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nat. Genet.* 38, 770–778. <https://doi.org/10.1038/ng1829>
- Diaz-Horta, O., Abad, C., Sennaroglu, L., Foster, J., DeSmidt, A., Bademci, G., Tokgoz-Yilmaz, S., Duman, D., Cengiz, F.B., Grati, M., Fitoz, S., Liu, X.Z., Farooq, A., Imtiaz, F., Currall, B.B.,

Morton, C.C., Nishita, M., Minami, Y., Lu, Z., Walz, K., Tekin, M., 2016. ROR1 is essential for proper innervation of auditory hair cells and hearing in humans and mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 5993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522512113>

Diaz-Horta, O., Subasioglu-Uzak, A., Grati, M., DeSmidt, A., Foster, J. 2nd, Cao, L., Bademci, G., Tokgoz-Yilmaz, S., Duman, D., Cengiz, F.B., Abad, C., Mittal, R., Blanton, S., Liu, X.Z., Farooq, A., Walz, K., Lu, Z., Tekin, M., 2014. FAM65B is a membrane-associated protein of hair cell stereocilia required for hearing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 9864–9868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401950111>

Du, X., Schwander, M., Moresco, E.M.Y., Viviani, P., Haller, C., Hildebrand, M.S., Pak, K., Tarantino, L., Roberts, A., Richardson, H., Koob, G., Najmabadi, H., Ryan, A.F., Smith, R.J.H., Müller, U., Beutler, B., 2008. A catechol-O-methyltransferase that is essential for auditory function in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14609–14614. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807219105>

Edvardson, S., Jalas, C., Shaag, A., Zenvirt, S., Landau, C., Lerer, I., Elpeleg, O., 2011. A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. *Am. J. Med. Genet. A* 155A, 1170–1172. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33972>

Gagnon, L.H., Longo-Guess, C.M., Berryman, M., Shin, J.-B., Saylor, K.W., Yu, H., Gillespie, P.G., Johnson, K.R., 2006. The chloride intracellular channel protein CLIC5 is expressed at high levels in hair cell stereocilia and is essential for normal inner ear function. *J. Neurosci.* 26, 10188–10198. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2166-06.2006>

Giroto, G., Abdulhadi, K., Buniello, A., Vozzi, D., Licastro, D., d'Eustacchio, A., Vuckovic, D., Alkowari, M.K., Steel, K.P., Badii, R., Gasparini, P., 2013. Linkage study and exome sequencing identify a BDP1 mutation associated with hereditary hearing loss. *PLoS One* 8, e80323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080323>

Grati, M., Chakchouk, I., Ma, Q., Bensaid, M., Desmidt, A., Turki, N., Yan, D., Baanannou, A., Mittal, R., Driss, N., Blanton, S., Farooq, A., Lu, Z., Liu, X.Z., Masmoudi, S., 2015. A missense mutation in DCDC2 causes human recessive deafness DFNB66, likely by interfering with sensory hair cell and supporting cell cilia length regulation. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2482–2491. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv009>

Hilgert, N., Alasti, F., Dieltjens, N., Pawlik, B., Wollnik, B., Uyguner, O., Delmaghani, S., Weil, D., Petit, C., Danis, E., Yang, T., Pandelia, E., Petersen, M.B., Goossens, D., Favero, J.D., Sanati, M.H., Smith, R.J.H., Van Camp, G., 2008. Mutation analysis of TMC1 identifies four new mutations and suggests an additional deafness gene at loci DFNA36 and DFNB7/11. *Clin. Genet.* 74, 223–232. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01053.x>

Horn, H.F., Brownstein, Z., Lenz, D.R., Shivatzki, S., Dror, A.A., Dagan-Rosenfeld, O., Friedman, L.M., Roux, K.J., Kozlov, S., Jeang, K.-T., Frydman, M., Burke, B., Stewart, C.L., Avraham, K.B., 2013. The LINC complex is essential for hearing. *J. Clin. Invest.* 123, 740–750. <https://doi.org/10.1172/JCI66911>

Imtiaz, A., Kohrman, D.C., Naz, S., 2014. A frameshift mutation in GRXCR2 causes recessively inherited hearing loss. *Hum. Mutat.* 35, 618–624. <https://doi.org/10.1002/humu.22545>

Ingham, N.J., Pearson, S.A., Vancollie, V.E., Rook, V., Lewis, M.A., Chen, J., Buniello, A., Martelletti, E., Preite, L., Lam, C.C., Weiss, F.D., Powis, Z., Suwannarat, P., Lelliott, C.J., Dawson, S.J., White, J.K., Steel, K.P., 2019. Mouse screen reveals multiple new genes underlying mouse and human hearing loss. *PLoS Biol.* 17, e3000194. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000194>

Jaworek, T.J., Richard, E.M., Ivanova, A.A., Giese, A.P.J., Choo, D.I., Khan, S.N., Riazuddin, Sheikh, Kahn, R.A., Riazuddin, Saima, 2013. An alteration in ELMOD3, an Arl2 GTPase-activating protein, is associated with hearing impairment in humans. *PLoS Genet.* 9, e1003774. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003774>

Kalay, E., Li, Y., Uzumcu, A., Uyguner, O., Collin, R.W., Caylan, R., Ulubil-Emiroglu, M., Kersten, F.F.J., Hafiz, G., van Wijk, E., Kayserili, H., Rohmann, E., Wagenstaller, J., Hoefsloot, L.H., Strom, T.M., Nürnberg, G., Baserer, N., den Hollander, A.I., Cremers, F.P.M., Cremers, C.W.R.J., Becker, C., Brunner, H.G., Nürnberg, P., Karaguzel, A., Basaran, S., Kubisch, C., Kremer, H.,

- Wollnik, B., 2006. Mutations in the lipoma HMGIC fusion partner-like 5 (LHFPL5) gene cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum. Mutat.* 27, 633–639. <https://doi.org/10.1002/humu.20368>
- Kamitani, T., Sakaguchi, H., Tamura, A., Miyashita, T., Yamazaki, Y., Tokumasu, R., Inamoto, R., Matsubara, A., Mori, N., Hisa, Y., Tsukita, S., 2015. Deletion of Tricellulin Causes Progressive Hearing Loss Associated with Degeneration of Cochlear Hair Cells. *Sci. Rep.* 5, 18402. <https://doi.org/10.1038/srep18402>
- Kelsell, D.P., Dunlop, J., Stevens, H.P., Lench, N.J., Liang, J.N., Parry, G., Mueller, R.F., Leigh, I.M., 1997. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387, 80–83. <https://doi.org/10.1038/387080a0>
- Khan, S.Y., Ahmed, Z.M., Shabbir, M.I., Kitajiri, S., Kalsoom, S., Tasneem, S., Shaiq, S., Ramesh, A., Srisailpathy, S., Khan, S.N., Smith, R.J.H., Riazuddin, Saima, Friedman, T.B., Riazuddin, Sheikh, 2007. Mutations of the RDX gene cause nonsyndromic hearing loss at the DFNB24 locus. *Hum. Mutat.* 28, 417–423. <https://doi.org/10.1002/humu.20469>
- Li, C., Bademci, G., Subasioglu, A., Diaz-Horta, O., Zhu, Y., Liu, J., Mitchell, T.G., Abad, C., Seyhan, S., Duman, D., Cengiz, F.B., Tokgoz-Yilmaz, S., Blanton, S.H., Farooq, A., Walz, K., Zhai, R.G., Tekin, M., 2019. Dysfunction of GRAP, encoding the GRB2-related adaptor protein, is linked to sensorineural hearing loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 1347–1352. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810951116>
- Li, J., Zhao, X., Xin, Q., Shan, S., Jiang, B., Jin, Y., Yuan, H., Dai, P., Xiao, R., Zhang, Q., Xiao, J., Shao, C., Gong, Y., Liu, Q., 2015. Whole-exome sequencing identifies a variant in TMEM132E causing autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss DFNB99. *Hum. Mutat.* 36, 98–105. <https://doi.org/10.1002/humu.22712>
- Li, X.C., Everett, L.A., Lalwani, A.K., Desmukh, D., Friedman, T.B., Green, E.D., Wilcox, E.R., 1998. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat. Genet.* 18, 215–217. <https://doi.org/10.1038/ng0398-215>
- Li, Y., Pohl, E., Boulouiz, R., Schradars, M., Nürnberg, G., Charif, M., Admiraal, R.J.C., von Ameln, S., Baessmann, I., Kandil, M., Veltman, J.A., Nürnberg, P., Kubisch, C., Barakat, A., Kremer, H., Wollnik, B., 2010. Mutations in TPRN cause a progressive form of autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 479–484. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.02.003>
- Liu, X.Z., Ouyang, X.M., Xia, X.J., Zheng, J., Pandya, A., Li, F., Du, L.L., Welch, K.O., Petit, C., Smith, R.J.H., Webb, B.T., Yan, D., Arnos, K.S., Corey, D., Dallos, P., Nance, W.E., Chen, Z.Y., 2003. Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1155–1162. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg127>
- Mburu, P., Mustapha, M., Varela, A., Weil, D., El-Amraoui, A., Holme, R.H., Rump, A., Hardisty, R.E., Blanchard, S., Coimbra, R.S., Perfettini, I., Parkinson, N., Mallon, A.-M., Glenister, P., Rogers, M.J., Paige, A.J., Moir, L., Clay, J., Rosenthal, A., Liu, X.Z., Blanco, G., Steel, K.P., Petit, C., Brown, S.D.M., 2003. Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat. Genet.* 34, 421–428. <https://doi.org/10.1038/ng1208>
- Mujtaba, G., Schultz, J.M., Imtiaz, A., Morell, R.J., Friedman, T.B., Naz, S., 2015. A mutation of MET, encoding hepatocyte growth factor receptor, is associated with human DFNB97 hearing loss. *J. Med. Genet.* 52, 548–552. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103023>
- Mustapha, M., Weil, D., Chardenoux, S., Elias, S., El-Zir, E., Beckmann, J.S., Loiselet, J., Petit, C., 1999. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum. Mol. Genet.* 8, 409–412. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.3.409>
- Naz, S., Giguere, C.M., Kohrman, D.C., Mitchem, K.L., Riazuddin, Saima, Morell, R.J., Ramesh, A., Srisailpathy, S., Deshmukh, D., Riazuddin, Sheikh, Griffith, A.J., Friedman, T.B., Smith, R.J.H., Wilcox, E.R., 2002. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 632–636. <https://doi.org/10.1086/342193>

- Naz, S., Griffith, A.J., Riazuddin, S., Hampton, L.L., Battey, J.F., Khan, S.N., Riazuddin, S., Wilcox, E.R., Friedman, T.B., 2004. Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. *J. Med. Genet.* 41, 591–595. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.018523>
- Rehman, A.U., Gul, K., Morell, R.J., Lee, K., Ahmed, Z.M., Riazuddin, Saima, Ali, R.A., Shahzad, M., Jaleel, A.-U., Andrade, P.B., Khan, S.N., Khan, S., Brewer, C.C., Ahmad, W., Leal, S.M., Riazuddin, Sheikh, Friedman, T.B., 2011. Mutations of GIPC3 cause nonsyndromic hearing loss DFNB72 but not DFNB81 that also maps to chromosome 19p. *Hum. Genet.* 130, 759–765. <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1018-5>
- Rehman, A.U., Santos-Cortez, R.L.P., Morell, R.J., Drummond, M.C., Ito, T., Lee, K., Khan, A.A., Basra, M.A.R., Wasif, N., Ayub, M., Ali, R.A., Raza, S.I., Nickerson, D.A., Shendure, J., Bamshad, M., Riazuddin, Saima, Billington, N., Khan, S.N., Friedman, P.L., Griffith, A.J., Ahmad, W., Riazuddin, Sheikh, Leal, S.M., Friedman, T.B., 2014. Mutations in TBC1D24, a gene associated with epilepsy, also cause nonsyndromic deafness DFNB86. *Am. J. Hum. Genet.* 94, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.12.004>
- Riazuddin, Saima, Anwar, S., Fischer, M., Ahmed, Z.M., Khan, S.Y., Janssen, A.G.H., Zafar, A.U., Scholl, U., Husnain, T., Belyantseva, I.A., Friedman, P.L., Riazuddin, Sheikh, Friedman, T.B., Fahlke, C., 2009. Molecular basis of DFNB73: mutations of BSND can cause nonsyndromic deafness or Bartter syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.07.003>
- Riazuddin, Saima, Belyantseva, I.A., Giese, A.P.J., Lee, K., Indzhykulian, A.A., Nandamuri, S.P., Yousaf, R., Sinha, G.P., Lee, S., Terrell, D., Hegde, R.S., Ali, R.A., Anwar, S., Andrade-Elizondo, P.B., Sirmaci, A., Parise, L. V., Basit, S., Wali, A., Ayub, M., Ansar, M., Ahmad, W., Khan, S.N., Akram, J., Tekin, M., Riazuddin, Sheikh, Cook, T., Buschbeck, E.K., Frolenkov, G.I., Leal, S.M., Friedman, T.B., Ahmed, Z.M., 2012. Alterations of the CIB2 calcium- and integrin-binding protein cause Usher syndrome type 1J and nonsyndromic deafness DFNB48. *Nat. Genet.* 44, 1265–1271. <https://doi.org/10.1038/ng.2426>
- Rohacek, A.M., Bebee, T.W., Tilton, R.K., Radens, C.M., McDermott-Roe, C., Peart, N., Kaur, M., Zaykaner, M., Cieply, B., Musunuru, K., Barash, Y., Germiller, J.A., Krantz, I.D., Carstens, R.P., Epstein, D.J., 2017. ESRP1 Mutations Cause Hearing Loss due to Defects in Alternative Splicing that Disrupt Cochlear Development. *Dev. Cell* 43, 318–331.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.09.026>
- Santos-Cortez, R.L.P., Faridi, R., Rehman, A.U., Lee, K., Ansar, M., Wang, X., Morell, R.J., Isaacson, R., Belyantseva, I.A., Dai, H., Acharya, A., Qaiser, T.A., Muhammad, D., Ali, R.A., Shams, S., Hassan, M.J., Shahzad, S., Raza, S.I., Bashir, Z.-E.-H., Smith, J.D., Nickerson, D.A., Bamshad, M.J., Riazuddin, S., Ahmad, W., Friedman, T.B., Leal, S.M., 2016. Autosomal-Recessive Hearing Impairment Due to Rare Missense Variants within S1PR2. *Am. J. Hum. Genet.* 98, 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.12.004>
- Santos-Cortez, R.L.P., Lee, K., Azeem, Z., Antonellis, P.J., Pollock, L.M., Khan, S., Irfanullah, Andrade-Elizondo, P.B., Chiu, I., Adams, M.D., Basit, S., Smith, J.D., Nickerson, D.A., McDermott, B.M.J., Ahmad, W., Leal, S.M., 2013. Mutations in KARS, encoding lysyl-tRNA synthetase, cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB89. *Am. J. Hum. Genet.* 93, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.05.018>
- Schraders, M., Lee, K., Oostrik, J., Huygen, P.L.M., Ali, G., Hoefsloot, L.H., Veltman, J.A., Cremers, F.P.M., Basit, S., Ansar, M., Cremers, C.W.R.J., Kunst, H.P.M., Ahmad, W., Admiraal, R.J.C., Leal, S.M., Kremer, H., 2010a. Homozygosity mapping reveals mutations of GRXCR1 as a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.12.017>
- Schraders, M., Oostrik, J., Huygen, P.L.M., Strom, T.M., van Wijk, E., Kunst, H.P.M., Hoefsloot, L.H., Cremers, C.W.R.J., Admiraal, R.J.C., Kremer, H., 2010b. Mutations in PTPRQ are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB84 and associated with vestibular dysfunction. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 604–610. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.02.015>



Schraders, M., Ruiz-Palmero, L., Kalay, E., Oostrik, J., del Castillo, F.J., Sezgin, O., Beynon, A.J., Strom, T.M., Pennings, R.J.E., Zazo Seco, C., Oonk, A.M.M., Kunst, H.P.M., Domínguez-Ruiz, M., García-Arumi, A.M., del Campo, M., Villamar, M., Hoefsloot, L.H., Moreno, F., Admiraal, R.J.C., del Castillo, I., Kremer, H., 2012. Mutations of the gene encoding otogelin are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic moderate hearing impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 883–889. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.012>

Schrauwen, I., Helfmann, S., Inagaki, A., Predoehl, F., Tabatabaieifar, M.A., Picher, M.M., Sommen, M., Zazo Seco, C., Oostrik, J., Kremer, H., Dheedene, A., Claes, C., Fransen, E., Chaleshtori, M.H., Coucke, P., Lee, A., Moser, T., Van Camp, G., 2012. A mutation in CABP2, expressed in cochlear hair cells, causes autosomal-recessive hearing impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.08.018>

Schultz, J.M., Khan, S.N., Ahmed, Z.M., Riazuddin, Saima, Waryah, A.M., Chhatre, D., Starost, M.F., Ploplis, B., Buckley, S., Velásquez, D., Kabra, M., Lee, K., Hassan, M.J., Ali, G., Ansar, M., Ghosh, M., Wilcox, E.R., Ahmad, W., Merlino, G., Leal, S.M., Riazuddin, Sheikh, Friedman, T.B., Morell, R.J., 2009. Noncoding mutations of HGF are associated with nonsyndromic hearing loss, DFNB39. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.06.003>

Shahin, H., Walsh, T., Sobe, T., Abu Sa'ed, J., Abu Rayan, A., Lynch, E.D., Lee, M.K., Avraham, K.B., King, M.-C., Kanaan, M., 2006. Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 144–152. <https://doi.org/10.1086/499495>

Simon, M., Richard, E.M., Wang, X., Shahzad, M., Huang, V.H., Qaiser, T.A., Potluri, P., Mahl, S.E., Davila, A., Nazli, S., Hancock, S., Yu, M., Gargus, J., Chang, R., Al-Sheqaih, N., Newman, W.G., Abdenur, J., Starr, A., Hegde, R., Dorn, T., Busch, A., Park, E., Wu, J., Schwenzer, H., Flierl, A., Florentz, C., Sissler, M., Khan, S.N., Li, R., Guan, M.-X., Friedman, T.B., Wu, D.K., Procaccio, V., Riazuddin, Sheikh, Wallace, D.C., Ahmed, Z.M., Huang, T., Riazuddin, Saima, 2015. Mutations of human NARS2, encoding the mitochondrial asparaginyl-tRNA synthetase, cause nonsyndromic deafness and Leigh syndrome. *PLoS Genet.* 11, e1005097. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005097>

Sineni, C.J., Yildirim-Baylan, M., Guo, S., Camarena, V., Wang, G., Tokgoz-Yilmaz, S., Duman, D., Bademci, G., Tekin, M., 2019. A truncating CLDN9 variant is associated with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum. Genet.* 138, 1071–1075. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02037-1>

Sirmaci, A., Erbek, S., Price, J., Huang, M., Duman, D., Cengiz, F.B., Bademci, G., Tokgöz-Yilmaz, S., Hişmi, B., Ozdağ, H., Oztürk, B., Kulaksizoglu, S., Yildirim, E., Kokotas, H., Grigoriadou, M., Petersen, M.B., Shahin, H., Kanaan, M., King, M.-C., Chen, Z.-Y., Blanton, S.H., Liu, X.Z., Zuchner, S., Akar, N., Tekin, M., 2010. A truncating mutation in SERPINB6 is associated with autosomal-recessive nonsyndromic sensorineural hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 797–804. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.04.004>

Verpy, E., Masmoudi, S., Zwaenepoel, I., Leibovici, M., Hutchin, T.P., Del Castillo, I., Nouaille, S., Blanchard, S., Lainé, S., Popot, J.L., Moreno, F., Mueller, R.F., Petit, C., 2001. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat. Genet.* 29, 345–349. <https://doi.org/10.1038/ng726>

von Ameln, S., Wang, G., Boulouiz, R., Rutherford, M.A., Smith, G.M., Li, Y., Pogoda, H.-M., Nürnberg, G., Stiller, B., Volk, A.E., Borck, G., Hong, J.S., Goodyear, R.J., Abidi, O., Nürnberg, P., Hofmann, K., Richardson, G.P., Hammerschmidt, M., Moser, T., Wollnik, B., Koehler, C.M., Teitell, M.A., Barakat, A., Kubisch, C., 2012. A mutation in PNPT1, encoding mitochondrial-RNA-import protein PNPase, causes hereditary hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 919–927. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.002>

Vona, B., Lechno, S., Hofrichter, M.A.H., Hopf, S., Läg, A.K., Haaf, T., Keilmann, A., Zechner, U., Bartsch, O., 2016. Confirmation of PDZD7 as a Nonsyndromic Hearing Loss Gene. *Ear Hear.* 37, e238-46. <https://doi.org/10.1097/AUD.0000000000000278>

Vona, B., Mazaheri, N., Lin, S.-J., Dunbar, L.A., Maroofian, R., Azaiez, H., Booth, K.T., Vitry, S.,

- Rad, A., Rüschemdorf, F., Varshney, P., Fowler, B., Beetz, C., Alagramam, K.N., Murphy, D., Shariati, G., Sedaghat, A., Houlden, H., Petree, C., VijayKumar, S., Smith, R.J.H., Haaf, T., El-Amraoui, A., Bowl, M.R., Varshney, G.K., Galehdari, H., 2021. A biallelic variant in CLRN2 causes non-syndromic hearing loss in humans. *Hum. Genet.* 140, 915–931. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02254-z>
- Walsh, T., Shahin, H., Elkan-Miller, T., Lee, M.K., Thornton, A.M., Roeb, W., Abu Rayyan, A., Loulus, S., Avraham, K.B., King, M.C., Kanaan, M., 2010. Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.010>
- Walsh, T., Walsh, V., Vreugde, S., Hertzano, R., Shahin, H., Haika, S., Lee, M.K., Kanaan, M., King, M.-C., Avraham, K.B., 2002. From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7518–7523. <https://doi.org/10.1073/pnas.102091699>
- Wang, A., Liang, Y., Fridell, R.A., Probst, F.J., Wilcox, E.R., Touchman, J.W., Morton, C.C., Morell, R.J., Noben-Trauth, K., Camper, S.A., Friedman, T.B., 1998. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* 280, 1447–1451. <https://doi.org/10.1126/science.280.5368.1447>
- Wang, H., Wang, Xinwei, He, C., Li, H., Qing, J., Grati, M., Hu, Z., Li, J., Hu, Y., Xia, K., Mei, L., Wang, Xingwei, Yu, J., Chen, H., Jiang, L., Liu, Y., Men, M., Zhang, H., Guan, L., Xiao, J., Zhang, J., Liu, X., Feng, Y., 2015. Exome sequencing identifies a novel CEACAM16 mutation associated with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss DFNA4B in a Chinese family. *J. Hum. Genet.* 60, 119–126. <https://doi.org/10.1038/jhg.2014.114>
- Wattenhofer, M., Di Iorio, M.V., Rabionet, R., Dougherty, L., Pampanos, A., Schwede, T., Montserrat-Sentis, B., Arbones, M.L., Iliades, T., Pasquadibisceglie, A., D'Amelio, M., Alwan, S., Rossier, C., Dahl, H.-H.M., Petersen, M.B., Estivill, X., Gasparini, P., Scott, H.S., Antonarakis, S.E., 2002. Mutations in the TMPRSS3 gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients. *J. Mol. Med. (Berl.)* 80, 124–131. <https://doi.org/10.1007/s00109-001-0310-6>
- Weil, D., Küssel, P., Blanchard, S., Lévy, G., Levi-Acobas, F., Dira, M., Ayadi, H., Petit, C., 1997. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat. Genet.* 16, 191–193. <https://doi.org/10.1038/ng0697-191>
- Wesdorp, M., Murillo-Cuesta, S., Peters, T., Celaya, A.M., Oonk, A., Schraders, M., Oostrik, J., Gomez-Rosas, E., Beynon, A.J., Hartel, B.P., Okkersen, K., Koenen, H.J.P.M., Weeda, J., Lelieveld, S., Voermans, N.C., Joosten, I., Hoyng, C.B., Lichtner, P., Kunst, H.P.M., Feenstra, I., de Bruijn, S.E., Admiraal, R.J.C., Yntema, H.G., van Wijk, E., Del Castillo, I., Serra, P., Varela-Nieto, I., Pennings, R.J.E., Kremer, H., 2018. MPZL2, Encoding the Epithelial Junctional Protein Myelin Protein Zero-like 2, Is Essential for Hearing in Man and Mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 103, 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.05.011>
- Wilcox, E.R., Burton, Q.L., Naz, S., Riazuddin, S., Smith, T.N., Ploplis, B., Belyantseva, I., Ben-Yosef, T., Liburd, N.A., Morell, R.J., Kachar, B., Wu, D.K., Griffith, A.J., Riazuddin, S., Friedman, T.B., 2001. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 104, 165–172. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00200-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00200-8)
- Yariz, K.O., Duman, D., Zazo Seco, C., Dallman, J., Huang, M., Peters, T.A., Sirmaci, A., Lu, N., Schraders, M., Skromne, I., Oostrik, J., Diaz-Horta, O., Young, J.I., Tokgoz-Yilmaz, S., Konukseven, O., Shahin, H., Hatterschijt, L., Kanaan, M., Oonk, A.M.M., Edwards, Y.J.K., Li, H., Atalay, S., Blanton, S., Desmidt, A.A., Liu, X.-Z., Pennings, R.J.E., Lu, Z., Chen, Z.-Y., Kremer, H., Tekin, M., 2012. Mutations in OTOGL, encoding the inner ear protein otogelin-like, cause moderate sensorineural hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 872–882. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.011>
- Yasunaga, S., Grati, M., Chardenoux, S., Smith, T.N., Friedman, T.B., Lalwani, A.K., Wilcox, E.R., Petit, C., 2000. OTOF encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the

long ones underlie recessive deafness DFN9. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 591–600.  
<https://doi.org/10.1086/303049>

Yousaf, R., Ahmed, Z.M., Giese, A.P., Morell, R.J., Lagziel, A., Dabdoub, A., Wilcox, E.R., Riazuddin, Sheikh, Friedman, T.B., Riazuddin, Saima, 2018. Modifier variant of METTL13 suppresses human GAB1-associated profound deafness. *J. Clin. Invest.* 128, 1509–1522.  
<https://doi.org/10.1172/JCI97350>

Zwaenepoel, I., Mustapha, M., Leibovici, M., Verpy, E., Goodyear, R., Liu, X.Z., Nouaille, S., Nance, W.E., Kanaan, M., Avraham, K.B., Tekaiia, F., Loiselet, J., Lathrop, M., Richardson, G., Petit, C., 2002. Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFN22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6240–6245.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.082515999>

Ahmed, Z.M., Riazuddin, Saima, Ahmad, J., Bernstein, S.L., Guo, Y., Sabar, M.F., Sieving, P., Riazuddin, Sheikh, Griffith, A.J., Friedman, T.B., Belyantseva, I.A., Wilcox, E.R., 2003. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFN23. *Hum. Mol. Genet.* 12, 3215–3223.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddg358>

Azaiez, H., Decker, A.R., Booth, K.T., Simpson, A.C., Shearer, A.E., Huygen, P.L.M., Bu, F., Hildebrand, M.S., Ranum, P.T., Shibata, S.B., Turner, A., Zhang, Y., Kimberling, W.J., Cornell, R.A., Smith, R.J.H., 2015. HOMER2, a stereociliary scaffolding protein, is essential for normal hearing in humans and mice. *PLoS Genet.* 11, e1005137. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005137>

Booth, K.T., Askew, J.W., Talebizadeh, Z., M Huygen, P.L., Eudy, J., Kenyon, J., Hoover, D., Hildebrand, M.S., Smith, K.R., Bahlo, M., Kimberling, W.J., H Smith, R.J., Azaiez, H., Smith, S.D., n.d. Splice-altering variant in COL11A1 as a cause of nonsyndromic hearing loss DFNA37.  
<https://doi.org/10.1038/s41436>

Chen, D.-Y., Liu, X.-F., Lin, X.-J., Zhang, D., Chai, Y.-C., Yu, D.-H., Sun, C.-L., Wang, X.-L., Zhu, W.-D., Chen, Y., Sun, L.-H., Wang, X.-W., Shi, F.-X., Huang, Z.-W., Yang, T., Wu, H., 2017. A dominant variant in DMXL2 is linked to nonsyndromic hearing loss. *Genet. Med.* 19, 553–558.  
<https://doi.org/10.1038/gim.2016.142>

Cheng, J., Zhu, Y., He, S., Lu, Y., Chen, J., Han, B., Petrillo, M., Wrzeszczynski, K.O., Yang, S., Dai, P., Zhai, S., Han, D., Zhang, M.Q., Li, W., Liu, X., Li, H., Chen, Z.-Y., Yuan, H., 2011. Functional mutation of SMAC/DIABLO, encoding a mitochondrial proapoptotic protein, causes human progressive hearing loss DFNA64. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 56–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.05.027>

Collin, R.W.J., Chellappa, R., Pauw, R.-J., Vriend, G., Oostrik, J., van Drunen, W., Huygen, P.L., Admiraal, R., Hoefsloot, L.H., Cremers, F.P.M., Xiang, M., Cremers, C.W.R.J., Kremer, H., 2008a. Missense mutations in POU4F3 cause autosomal dominant hearing impairment DFNA15 and affect subcellular localization and DNA binding. *Hum. Mutat.* 29, 545–554.  
<https://doi.org/10.1002/humu.20693>

Collin, R.W.J., Kalay, E., Tariq, M., Peters, T., van der Zwaag, B., Venselaar, H., Oostrik, J., Lee, K., Ahmed, Z.M., Çaylan, R., Li, Y., Spierenburg, H.A., Eyupoglu, E., Heister, A., Riazuddin, Saima, Bahat, E., Ansar, M., Arslan, S., Wollnik, B., Brunner, H.G., Cremers, C.W.R.J., Karaguzel, A., Ahmad, W., Cremers, F.P.M., Vriend, G., Friedman, T.B., Riazuddin, Sheikh, Leal, S.M., Kremer, H., 2008b. Mutations of ESRRB Encoding Estrogen-Related Receptor Beta Cause Autosomal-Recessive Nonsyndromic Hearing Impairment DFN35. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 125–138.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.008>

Coucke, P.J., Van Hauwe, P., Kelley, P.M., Kunst, H., Schatteman, I., Van Velzen, D., Meyers, J., Ensink, R.J., Verstreken, M., Declau, F., Marres, H., Kastury, K., Bhasin, S., McGuirt, W.T., Smith, R.J.H., Cremers, C.W.R.J., Van de Heyning, P., Willems, P.J., Smith, S.D., Van Camp, G., 1999. Mutations in the KCNQ4 Gene Are Responsible for Autosomal Dominant Deafness in Four DFNA2 Families. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1321–1328. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.7.1321>

Cryns, K., Pfister, M., Pennings, R.J.E., Bom, S.J.H., Flothmann, K., Caethoven, G., Kremer, H.,

- Schatteman, I., Köln, K.A., Tóth, T., Kupka, S., Blin, N., Nürnberg, P., Thiele, H., van de Heyning, P.H., Reardon, W., Stephens, D., Cremers, C.W.R.J., Smith, R.J.H., Van Camp, G., 2002. Mutations in the WFS1 gene that cause low-frequency sensorineural hearing loss are small non-inactivating mutations. *Hum. Genet.* 110, 389–394. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0719-1>
- de Kok, Y.J., van der Maarel, S.M., Bitner-Glindzicz, M., Huber, I., Monaco, A.P., Malcolm, S., Pembrey, M.E., Ropers, H.H., Cremers, F.P., 1995. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science* 267, 685–688. <https://doi.org/10.1126/science.7839145>
- Donaudy, F., Snoeckx, R., Pfister, M., Zenner, H.-P., Blin, N., Di Stazio, M., Ferrara, A., Lanzara, C., Ficarella, R., Declau, F., Pusch, C.M., Nürnberg, P., Melchionda, S., Zelante, L., Ballana, E., Estivill, X., Van Camp, G., Gasparini, P., Savoia, A., 2004. Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am. J. Hum. Genet.* 74, 770–776. <https://doi.org/10.1086/383285>
- Faletta, F., Girotto, G., D’Adamo, A.P., Vozzi, D., Morgan, A., Gasparini, P., 2014. A novel P2RX2 mutation in an Italian family affected by autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Gene* 534, 236–239. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.052>
- Fukuoka, H., Kanda, Y., Ohta, S., Usami, S., 2007. Mutations in the WFS1 gene are a frequent cause of autosomal dominant nonsyndromic low-frequency hearing loss in Japanese. *J. Hum. Genet.* 52, 510–515. <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0144-3>
- Gao, J., Wang, Q., Dong, C., Chen, S., Qi, Y., Liu, Y., 2015. Whole exome sequencing identified MCM2 as a novel causative gene for autosomal dominant nonsyndromic deafness in a Chinese family. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133522>
- Gao, X., Yuan, Y.Y., Lin, Q.F., Xu, J.C., Wang, W.Q., Qiao, Y.H., Kang, D.Y., Bai, D., Xin, F., Huang, S.S., Qiu, S.W., Guan, L.P., Su, Y., Wang, G.J., Han, M.Y., Jiang, Y., Liu, H.K., Dai, P., 2018. Mutation of IFNLR1, an interferon lambda receptor 1, is associated with autosomal-dominant non-syndromic hearing loss. *J. Med. Genet.* 55, 298–306. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104954>
- Greene, C.C., McMillan, P.M., Barker, S.E., Kurnool, P., Lomax, M.I., Burmeister, M., Lesperance, M.M., 2001. DFNA25, a Novel Locus for Dominant Nonsyndromic Hereditary Hearing Impairment, Maps to 12q21-24. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 254–260. <https://doi.org/10.1086/316925>
- Grifa, A., Wagner, C.A., D’Ambrosio, L., Melchionda, S., Bernardi, F., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Arbones, M., Monica, M.D., Estivill, X., Zelante, L., Lang, F., Gasparini, P., 1999. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat. Genet.* <https://doi.org/10.1038/12612>
- JanssensdeVarebeke, S.P.F., Van Camp, G., Peeters, N., Elinck, E., Widdershoven, J., Cox, T., Deben, K., Ketelslagers, K., Crins, T., Wuyts, W., 2018. Bi-allelic inactivating variants in the COCH gene cause autosomal recessive prelingual hearing impairment. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 26, 587–591. <https://doi.org/10.1038/s41431-017-0066-2>
- Lalwani, A.K., Goldstein, J.A., Kelley, M.J., Luxford, W., Castelein, C.M., Mhatre, A.N., 2000. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1121–1128. [https://doi.org/10.1016/S0002-9297\(07\)62942-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9297(07)62942-5)
- Liu, X., Han, D., Li, J., Han, B., Ouyang, X., Cheng, J., Li, X., Jin, Z., Wang, Y., Bitner-Glindzicz, M., Kong, X., Xu, H., Kantardzhieva, A., Eavey, R.D., Seidman, C.E., Seidman, J.G., Du, L.L., Chen, Z.-Y., Dai, P., Teng, M., Yan, D., Yuan, H., 2010. Loss-of-function mutations in the PRPS1 gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, DFN2. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.11.015>
- Makishima, T., Madeo, A.C., Brewer, C.C., Zalewski, C.K., Butman, J.A., Sachdev, V., Arai, A.E., Holbrook, B.M., Rosing, D.R., Griffith, A.J., 2007. Nonsyndromic hearing loss DFNA10 and a novel mutation of EYA4: evidence for correlation of normal cardiac phenotype with truncating mutations of the Eya domain. *Am. J. Med. Genet. A* 143A, 1592–1598.

<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31793>

McGuirt, W.T., Prasad, S.D., Griffith, A.J., Kunst, H.P., Green, G.E., Shpargel, K.B., Runge, C., Huybrechts, C., Mueller, R.F., Lynch, E., King, M.C., Brunner, H.G., Cremers, C.W., Takanosu, M., Li, S.W., Arita, M., Mayne, R., Prockop, D.J., Van Camp, G., Smith, R.J., 1999. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nat. Genet.* 23, 413–419.

<https://doi.org/10.1038/70516>

Melchionda, S., Ahituv, N., Bisceglia, L., Sobe, T., Glaser, F., Rabionet, R., Arbones, M.L., Notarangelo, A., Di Iorio, E., Carella, M., Zelante, L., Estivill, X., Avraham, K.B., Gasparini, P., 2001. MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 635–640.

<https://doi.org/10.1086/323156>

Mencía, A., Modamio-Høybjør, S., Redshaw, N., Morín, M., Mayo-Merino, F., Olavarrieta, L., Aguirre, L.A., del Castillo, I., Steel, K.P., Dalmay, T., Moreno, F., Moreno-Pelayo, M.A., 2009.

Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nat. Genet.* 41, 609–613. <https://doi.org/10.1038/ng.355>

Modamio-Høybjør, S., Mencía, Á., Goodyear, R., Del Castillo, I., Richardson, G., Moreno, F., Moreno-Pelayo, M.A., 2007. A mutation in CCDC50, a gene encoding an effector of epidermal growth factor-mediated cell signaling, causes progressive hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 1076–1089. <https://doi.org/10.1086/518311>

Nakanishi, H., Kawashima, Y., Kurima, K., Chae, J.J., Ross, A.M., Pinto-Patarroyo, G., Patel, S.K., Muskett, J.A., Ratay, J.S., Chattaraj, P., Park, Y.H., Grevich, S., Brewer, C.C., Hoa, M., Kim, H.J., Butman, J.A., Broderick, L., Hoffman, H.M., Aksentijevich, I., Kastner, D.L., Goldbach-Mansky, R., Griffith, A.J., 2017. NLRP3 mutation and cochlear autoinflammation cause syndromic and nonsyndromic hearing loss DFNA34 responsive to anakinra therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E7766–E7775. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702946114>

Nakano, Y., Kelly, M.C., Rehman, A.U., Boger, E.T., Morell, R.J., Kelley, M.W., Friedman, T.B., Bánfi, B., 2018. Defects in the Alternative Splicing-Dependent Regulation of REST Cause Deafness. *Cell* 174, 536–548.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.004>

Nyegaard, M., Rendtorff, N.D., Nielsen, M.S., Corydon, T.J., Demontis, D., Starnawska, A., Hedemand, A., Buniello, A., Niola, F., Overgaard, M.T., Leal, S.M., Ahmad, W., Wikman, F.P., Petersen, K.B., Crüger, D.G., Oostrik, J., Kremer, H., Tommerup, N., Frödin, M., Steel, K.P., Tranebjærg, L., Børglum, A.D., 2015. A Novel Locus Harboring a Functional CD164 Nonsense Mutation Identified in a Large Danish Family with Nonsyndromic Hearing Impairment. *PLoS Genet.* 11, e1005386. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005386>

Plantinga, R.F., de Brouwer, A.P.M., Huygen, P.L.M., Kunst, H.P.M., Kremer, H., Cremers, C.W.R.J., 2006. A novel TECTA mutation in a Dutch DFNA8/12 family confirms genotype-phenotype correlation. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 7, 173–181. <https://doi.org/10.1007/s10162-006-0033-z>

Rost, S., Bach, E., Neuner, C., Nanda, I., Dysek, S., Bittner, R.E., Keller, A., Bartsch, O., Mlynski, R., Haaf, T., Müller, C.R., Kunstmann, E., 2014. Novel form of X-linked nonsyndromic hearing loss with cochlear malformation caused by a mutation in the type IV collagen gene COL4A6. *Eur. J. Hum. Genet.* 22, 208–215. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.108>

Ruf, R.G., Xu, P.-X., Silviu, D., Otto, E.A., Beekmann, F., Muerb, U.T., Kumar, S., Neuhaus, T.J., Kemper, M.J., Raymond, R.M.J., Brophy, P.D., Berkman, J., Gattas, M., Hyland, V., Ruf, E.-M., Schwartz, C., Chang, E.H., Smith, R.J.H., Stratakis, C.A., Weil, D., Petit, C., Hildebrandt, F., 2004. SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8090–8095. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308475101>

Schraders, M., Haas, S.A., Weegerink, N.J.D., Oostrik, J., Hu, H., Hoefsloot, L.H., Kannan, S., Huygen, P.L.M., Pennings, R.J.E., Admiraal, R.J.C., Kalscheuer, V.M., Kunst, H.P.M., Kremer, H., 2011. Next-generation sequencing identifies mutations of SMPX, which encodes the small muscle protein, X-linked, as a cause of progressive hearing impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 628–634. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.04.012>

- Tamagawa, Y., Kitamura, K., Ishida, T., Ishikawa, K., Tanaka, H., Tsuji, S., Nishizawa, M., 1996. A gene for a dominant form of non-syndromic sensorineural deafness (DFNA11) maps within the region containing the DFNB2 recessive deafness gene. *Hum. Mol. Genet.* 5, 849–852. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.6.849>
- Thoenes, M., Zimmermann, U., Ebermann, I., Ptok, M., Lewis, M.A., Thiele, H., Morlot, S., Hess, M.M., Gal, A., Eisenberger, T., Bergmann, C., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Steel, K.P., Knipper, M., Bolz, H.J., 2015. OSBPL2 encodes a protein of inner and outer hair cell stereocilia and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA67). *Orphanet J. Rare Dis.* 10, 15. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0238-5>
- Van Laer, L., Huizing, E.H., Verstreken, M., van Zuijlen, D., Wauters, J.G., Bossuyt, P.J., Van de Heyning, P., McGuirt, W.T., Smith, R.J., Willems, P.J., Legan, P.K., Richardson, G.P., Van Camp, G., 1998. Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. *Nat. Genet.* 20, 194–197. <https://doi.org/10.1038/2503>
- van Wijk, E., Krieger, E., Kemperman, M.H., De Leenheer, E.M.R., Huygen, P.L.M., Cremers, C.W.R.J., Cremers, F.P.M., Kremer, H., 2003. A mutation in the gamma actin 1 (ACTG1) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26). *J. Med. Genet.* 40, 879–884. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.12.879>
- Vona, B., Nanda, I., Neuner, C., Müller, T., Haaf, T., 2013. Confirmation of GRHL2 as the gene for the DFNA28 locus. *Am. J. Med. Genet. A* 161A, 2060–2065. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36017>
- Walsh, T., Pierce, S.B., Lenz, D.R., Brownstein, Z., Dagan-Rosenfeld, O., Shahin, H., Roeb, W., McCarthy, S., Nord, A.S., Gordon, C.R., Ben-Neriah, Z., Sebat, J., Kanaan, M., Lee, M.K., Frydman, M., King, M.-C., Avraham, K.B., 2010a. Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.011>
- Walsh, T., Shahin, H., Elkan-Miller, T., Lee, M.K., Thornton, A.M., Roeb, W., Abu Rayyan, A., Loulus, S., Avraham, K.B., King, M.-C., Kanaan, M., 2010b. Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.010>
- Wang, L., Feng, Y., Yan, D., Qin, L., Grati, M., Mittal, R., Li, T., Sundhari, A.K., Liu, Y., Chapagain, P., Blanton, S.H., Liao, S., Liu, X., 2018. A dominant variant in the PDE1C gene is associated with nonsyndromic hearing loss. *Hum. Genet.* 137, 437–446. <https://doi.org/10.1007/s00439-018-1895-y>
- Wesdorp, M., de Koning Gans, P.A.M., Schraders, M., Oostrik, J., Huynen, M.A., Venselaar, H., Beynon, A.J., van Gaalen, J., Piai, V., Voermans, N., van Rossum, M.M., Hartel, B.P., Lelieveld, S.H., Wiel, L., Verbist, B., Rotteveel, L.J., van Dooren, Marieke F., Lichtner, P., Kunst, Henricus P.M., Feenstra, Ilse, Admiraal, Ronald J.C., van Dooren, M. F., de Gier, H.H.W., Hoefsloot, E.H., van der Schroeff, M.P., Kant, S.G., Rotteveel, L.J.C., Frints, S.G.M., Hof, J.R., Stokroos, R.J., Vanhoutte, E.K., Admiraal, R. J.C., Feenstra, I., Kremer, H., Kunst, H. P.M., Pennings, R. J.E., Yntema, H. G., van Essen, A.J., Free, R.H., Klein-Wassink, J.S., Yntema, Helger G., Hoefsloot, L.H., Pennings, Ronald J.E., Kremer, Hanne, 2018a. Heterozygous missense variants of LMX1A lead to nonsyndromic hearing impairment and vestibular dysfunction. *Hum. Genet.* 137, 389–400. <https://doi.org/10.1007/s00439-018-1880-5>
- Wesdorp, M., Murillo-Cuesta, S., Peters, T., Celaya, A.M., Oonk, A., Schraders, M., Oostrik, J., Gomez-Rosas, E., Beynon, A.J., Hartel, B.P., Okkersen, K., Koenen, H.J.P.M., Weeda, J., Lelieveld, S., Voermans, N.C., Joosten, I., Hoyng, C.B., Lichtner, P., Kunst, H.P.M., Feenstra, I., de Bruijn, S.E., Admiraal, R.J.C., Yntema, H.G., van Wijk, E., Del Castillo, I., Serra, P., Varela-Nieto, I., Pennings, R.J.E., Kremer, H., 2018b. MPZL2, Encoding the Epithelial Junctional Protein Myelin Protein Zero-like 2, Is Essential for Hearing in Man and Mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 103, 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.05.011>
- Xia, W., Hu, J., Ma, J., Huang, J., Wang, X., Jiang, N., Zhang, J., Ma, Z., Ma, D., 2019. Novel

TRRAP mutation causes autosomal dominant non-syndromic hearing loss. *Clin. Genet.* 96, 300–308. <https://doi.org/10.1111/cge.13590>

Xia, J., Liu, C., Tang, B., Pan, Q., Huang, L., Dai, H., Zhang, B., Xie, W., Hu, D., Zheng, D., Shi, X., Wang, D., Xia, K., Yu, K., Liao, X., Feng, Y., Yang, Y., Xiao, J., Xie, D., Huang, J., 1998. Mutations in the gene encoding gap junction protein  $\beta$ -3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat. Genet.* 20, 370–373. <https://doi.org/10.1038/3845>

Yang, T., Gurrola, J.G., Wu, H., Chiu, S.M., Wangemann, P., Snyder, P.M., Smith, R.J.H., 2009. Mutations of KCNJ10 together with mutations of SLC26A4 cause digenic nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.04.014>

Yasunaga, ichiro, Grati, hamed, Chardenoux, S., Smith, T.N., Friedman, T.B., Lalwani, A.K., Wilcox, E.R., Petit, C., 2000. OTOF Encodes Multiple Long and Short Isoforms: Genetic Evidence That the Long Ones Underlie Recessive Deafness DFNB9, *Am. J. Hum. Genet.*

Zazo Seco, C., Serrão de Castro, L., van Nierop, J.W., Morín, M., Jhangiani, S., Verver, E.J.J., Schraders, M., Maiwald, N., Wesdorp, M., Venselaar, H., Spruijt, L., Oostrik, J., Schoots, J., van Reeuwijk, J., Lelieveld, S.H., Huygen, P.L.M., Insenser, M., Admiraal, R.J.C., Pennings, R.J.E., Hoefsloot, L.H., Arias-Vásquez, A., de Ligt, J., Yntema, H.G., Jansen, J.H., Muzny, D.M., Huls, G., van Rossum, M.M., Lupski, J.R., Moreno-Pelayo, M.A., Kunst, H.P.M., Kremer, H., 2015. Allelic Mutations of KITLG, Encoding KIT Ligand, Cause Asymmetric and Unilateral Hearing Loss and Waardenburg Syndrome Type 2. *Am. J. Hum. Genet.* 97, 647–660. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.09.011>

Zhao, Y., Zhao, F., Zong, L., Zhang, P., Guan, L., Zhang, J., Wang, D., Wang, Jing, Chai, W., Lan, L., Li, Q., Han, B., Yang, L., Jin, X., Yang, W., Hu, X., Wang, X., Li, N., Li, Y., Petit, C., Wang, Jun, Wang, H.Y.J., Wang, Q., 2013. Exome sequencing and linkage analysis identified tenascin-C (TNC) as a novel causative gene in nonsyndromic hearing loss. *PLoS One* 8, e69549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069549>

Zong, L., Guan, J., Ealy, M., Zhang, Q., Wang, D., Wang, H., Zhao, Y., Shen, Z., Campbell, C.A., Wang, F., Yang, J., Sun, W., Lan, L., Ding, D., Xie, L., Qi, Y., Lou, X., Huang, X., Shi, Q., Chang, S., Xiong, W., Yin, Z., Yu, N., Zhao, H., Wang, Jun, Wang, Jing, Salvi, R.J., Petit, C., Smith, R.J.H., Wang, Q., 2015. Mutations in apoptosis-inducing factor cause X-linked recessive auditory neuropathy spectrum disorder. *J. Med. Genet.* 52, 523–531. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102961>

Alexander, T.H., Harris, J.P., 2010. Current Epidemiology of Meniere's Syndrome. *Otolaryngologic Clinics of North America* 43, 965–970. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2010.05.001>

Atri, C., Guerfali, F.Z., Laouini, D., 2018. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>

Audo, I., Bujakowska, K., Orhan, E., Poloschek, C.M., Defoort-Dhellemmes, S., Drumare, I., Kohl, S., Luu, T.D., Lecompte, O., Zrenner, E., Lancelot, M.E., Antonio, A., Germain, A., Michiels, C., Audier, C., Letexier, M., Saraiva, J.P., Leroy, B.P., Munier, F.L., Mohand-Saïd, S., Lorenz, B., Friedburg, C., Preising, M., Kellner, U., Renner, A.B., Moskova-Doumanova, V., Berger, W., Wissinger, B., Hamel, C.P., Schorderet, D.F., de Baere, E., Sharon, D., Banin, E., Jacobson, S.G., Bonneau, D., Zanlonghi, X., le Meur, G., Casteels, I., Koenekoop, R., Long, V.W., Meire, F., Prescott, K., de Ravel, T., Simmons, I., Nguyen, H., Dollfus, H., Poch, O., Léveillard, T., Nguyen-Ba-Charvet, K., Sahel, J.A., Bhattacharya, S.S., Zeitz, C., 2012. Whole-exome sequencing identifies mutations in GPR179 leading to autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. *American Journal of Human Genetics* 90, 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.007>

Avan, P., Le Gal, S., Michel, V., Dupont, T., Hardelin, J.P., Petit, C., Verpy, E., 2019. Otogelin, otogelin-like, and stereocilin form links connecting outer hair cell stereocilia to each other and the tectorial membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116, 25948–25957. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902781116>

- Avery, O.T., Macleod, C.M., McCarty, M., 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *Journal of Experimental Medicine* 79, 137–158. <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>
- Bächinger, D., Brühlmann, C., Honegger, T., Michalopoulou, E., Naldi, A.M., Wettstein, V.G., Muff, S., Schuknecht, B., Eckhard, A.H., 2019. Endotype-phenotype patterns in Meniere's disease based on gadolinium-enhanced MRI of the vestibular aqueduct. *Frontiers in Neurology* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00303>
- Baguley, D.M., Cope, T.E., McFerran, D.J., 2016. Functional auditory disorders. *Handbook of Clinical Neurology* 139, 367–378. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801772-2.00032-1>
- Bashirova, A.A., Apps, R., Vince, N., Mochalova, Y., Yu, X.G., Carrington, M., 2014. Diversity of the human LILRB3/A6 locus encoding a myeloid inhibitory and activating receptor pair. *Immunogenetics* 66, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00251-013-0730-9>
- Becker, K.G., 2004. The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. *Medical Hypotheses* 62, 309–317. [https://doi.org/10.1016/S0306-9877\(03\)00332-3](https://doi.org/10.1016/S0306-9877(03)00332-3)
- Belinchon, A., Perez- Garrigues, H., Tenias, J.M., Lopez, A., 2011. Hearing assessment in Ménière's disease. *Laryngoscope* 121, 622–626. <https://doi.org/10.1002/lary.21335>
- Bönnemann, C.G., Cox, G.F., Shapiro, F., Wu, J.-J., Feener, C.A., Thompson, T.G., Anthony, D.C., Eyre, D.R., Darras, B.T., Kunkel, L.M., 2000. A mutation in the alpha 3 chain of type IX collagen causes autosomal dominant multiple epiphyseal dysplasia with mild myopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 1212. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.1212>
- Boucrot, E., Ferreira, A.P.A., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., Bertot, L., Sauvonnnet, N., McMahon, H.T., 2015. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* 517, 460–465. <https://doi.org/10.1038/nature14067>
- Bowman, M., Oldridge, M., Archer, C., O'Rourke, A., McParland, J., Brekelmans, R., Seller, A., Lester, T., 2012. Gross deletions in TCOF1 are a cause of Treacher–Collins–Franceschetti syndrome. *European Journal of Human Genetics* 20, 769–777. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.2>
- Caulley, L., Quimby, A., Karsh, J., Ahrari, A., Tse, D., Kontorinis, G., 2017. Autoimmune arthritis in Ménière's disease: A systematic review of the literature. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2017.11.008>
- Cha, Y.H., Kane, M.J., Baloh, R.W., 2008. Familial clustering of migraine, episodic vertigo, and Ménière's disease. *Otology and Neurotology* 29, 93–96. <https://doi.org/10.1097/mao.0b013e31815c2abb>
- Collins, F.S., Morgan, M., Patrinos, A., 2003. The Human Genome Project: Lessons from large-scale biology. *Science* 300, 286–290. <https://doi.org/10.1126/science.1084564>
- Dahm, R., 2008. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics* 122, 565–581. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0433-0>
- Derebery, M.J., 2011. Allergic and immunologic features of Ménière's disease. *Otolaryngologic Clinics of North America* 44, 655–666, ix. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2011.03.004>
- Escalera-Balseira, A., Roman-Naranjo, P., Lopez-Escamez, J.A., 2020. Systematic review of sequencing studies and gene expression profiling in familial meniere disease. *Genes* 11, 1–17. <https://doi.org/10.3390/genes11121414>
- Espinosa-Sanchez JM, L.-E.J.A., 2016. Ménière's disease, 1st ed, *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63437-5.00019-4>
- Faletta, F., D'Adamo, A.P., Bruno, I., Athanasakis, E., Biskup, S., Esposito, L., Gasparini, P., 2014. Autosomal recessive stickler syndrome due to a loss of function mutation in the COL9A3 gene. *American Journal of Medical Genetics Part A* 164, 42–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36165>



Faundes, V., Newman, W.G., Bernardini, L., Canham, N., Clayton-Smith, J., Dallapiccola, B., Davies, S.J., Demos, M.K., Goldman, A., Gill, H., Horton, R., Kerr, B., Kumar, D., Lehman, A., McKee, S., Morton, J., Parker, M.J., Rankin, J., Robertson, L., Temple, I.K., Banka, S., 2018. Histone Lysine Methylases and Demethylases in the Landscape of Human Developmental Disorders. *American Journal of Human Genetics* 102, 175–187. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.11.013>

Flook, M., Frejo, L., Gallego-Martinez, A., Martin-Sanz, E., Rossi-Izquierdo, M., Amor-Dorado, J.C., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Batuecas-Caletrio, A., Espinosa-Sanchez, J.M., Pérez-Carpena, P., Martinez-Martinez, M., Aran, I., Lopez-Escamez, J.A., 2019. Differential proinflammatory signature in vestibular migraine and meniere disease. *Frontiers in Immunology* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01229>

Foster II, J., Kapoor, S., Diaz-Horta, O., Singh, A., Abad, C., Rastogi, A., Moharana, R., Tekeli, O., Walz, K., Tekin, M., 2014. Identification of an IGSF3 mutation in a family with congenital nasolacrimal duct obstruction. *Clinical Genetics* 86, 589–591. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cge.12321>

Frejo, L., Gallego-Martinez, A., Requena, T., Martin-Sanz, E., Amor-Dorado, J.C., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Espinosa-Sanchez, J.M., Batuecas-Caletrio, A., Aran, I., Fraile, J., Rossi-Izquierdo, M., Lopez-Escamez, J.A., 2018. Proinflammatory cytokines and response to molds in mononuclear cells of patients with Meniere disease. *Scientific Reports* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23911-4>

Frejo, L., Martin-Sanz, E., Teggi, R., Trinidad, G., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Manrique, R., Perez, N., Aran, I., Almeida-Branco, M.S., Batuecas-Caletrio, A., Fraile, J., Espinosa-Sanchez, J.M., Perez-Guillen, V., Perez-Garrigues, H., Oliva-Dominguez, M., Aleman, O., Benitez, J., Perez, P., Lopez-Escamez, J.A., Alemán, O., Amor-Dorado, J.C., Dominguez, E., García-Arumi, A.M., González-Aguado, R., Jimenez-Luna, A., Knäpper, J., Huarte, R.M., Perez-Fernandez, N., Marques, P., Sanz, R., Tapia, M.C., 2017. Extended phenotype and clinical subgroups in unilateral Meniere disease: A cross-sectional study with cluster analysis. *Clinical Otolaryngology* 42, 1172–1180. <https://doi.org/10.1111/coa.12844>

Frejo, L., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Aran, I., Batuecas-Caletrio, A., Perez-Guillen, V., Perez-Garrigues, H., Fraile, J., Martin-Sanz, E., Tapia, M.C., Trinidad, G., García-Arumi, A.M., González-Aguado, R., Espinosa-Sanchez, J.M., Marques, P., Perez, P., Benitez, J., Lopez-Escamez, J.A., Amor-Dorado, J.C., Huarte, R.M., Perez-Fernandez, N., Sanz, R., Dominguez, M.O., Teggi, R., 2016. Clinical subgroups in bilateral meniere disease. *Frontiers in Neurology* 7. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00182>

Frejo, Lidia, Giegling, I., Teggi, R., Lopez-Escamez, J.A., Rujescu, D., 2016. Genetics of vestibular disorders: pathophysiological insights. *Journal of Neurology* 263 Suppl 1, S45–53. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7988-9>

Frejo, Lidia, Requena, T., Okawa, S., Gallego-Martinez, A., Martinez-Bueno, M., Aran, I., Batuecas-Caletrio, A., Benitez-Rosario, J., Espinosa-Sanchez, J.M., Fraile-Rodrigo, J.J., García-Arumi, A.M., González-Aguado, R., Marques, P., Martin-Sanz, E., Perez-Fernandez, N., Pérez-Vázquez, P., Perez-Garrigues, H., Santos-Perez, S., Soto-Varela, A., Tapia, M.C., Trinidad-Ruiz, G., Del Sol, A., Alarcon Riquelme, M.E., Lopez-Escamez, J.A., 2017a. Regulation of Fn14 Receptor and NF-κB Underlies Inflammation in Meniere's Disease. *Frontiers in Immunology* 8, 1739. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01739>

Frejo, Lidia, Requena, T., Okawa, S., Gallego-Martinez, A., Martinez-Bueno, M., Aran, I., Batuecas-Caletrio, A., Benitez-Rosario, J., Espinosa-Sánchez, J.M., Fraile-Rodrigo, J.J., García-Arumi, A.M., González-Aguado, R., Marques, P., Martin-Sanz, E., Pérez-Fernández, N., Pérez-Vázquez, P., Perez-Garrigues, H., Santos-Pérez, S., Soto-Varela, A., Tapia, M.C., Trinidad-Ruiz, G., del Sol, A., Alarcón-Riquelme, M.E., Lopez-Escamez, J.A., 2017b. Regulation of Fn14 Receptor and NF-κB Underlies Inflammation in Meniere's Disease. *Frontiers in immunology* 8, 1739. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01739>

Friberg, U., Stahle, J., Svedberg, A., 1984. The natural course of Meniere's disease. *Acta Oto-*

Laryngologica. Supplementum 406, 72–77.

Friedman, TB., Belyantseva, IA., Frolenkov, G.I., 2020. Myosins and Hearing. *Advances in Experimental Medicina and Biologu*. Springer. 317–330.

Fuster-García, C., García-Bohórquez, B., Rodríguez-Muñoz, A., Aller, E., Jaijo, T., Millán, J.M., García-García, G., 2021. Usher syndrome: Genetics of a human ciliopathy. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms22136723>

Gallego-Martinez, A., Requena, T., Roman-Naranjo, P., Lopez-Escamez, J.A., 2019. Excess of Rare Missense Variants in Hearing Loss Genes in Sporadic Meniere Disease. *Frontiers in genetics* 10, 76. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00076>

Gallego-Martinez, A., Requena, T., Roman-Naranjo, P., May, P., Lopez-Escamez, J.A., 2020. Enrichment of damaging missense variants in genes related with axonal guidance signalling in sporadic Meniere's disease. *Journal of Medical Genetics* 57, 82–88. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106159>

Gazquez, I., Requena, T., Espinosa, J.M., Batuecas, A., Lopez-Escamez, J.A., 2012. Genetic and clinical heterogeneity in Meniere's disease. *Autoimmunity Reviews* 11, 925–926. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.02.020>

Gazquez, I., Soto-Varela, A., Aran, I., Santos, S., Batuecas, A., Trinidad, G., Perez-Garrigues, H., Gonzalez-Oller, C., Acosta, L., Lopez-Escamez, J.A., 2011. High prevalence of systemic autoimmune diseases in patients with Meniere's disease. *PLoS One* 6, e26759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026759>

Goodyear, R.J., Marcotti, W., Kros, C.J., Richardson, G.P., 2005. Development and properties of stereociliary link types in hair cells of the mouse cochlea. *Journal of Comparative Neurology* 485, 75–85. <https://doi.org/10.1002/cne.20513>

Greco, A., Gallo, A., Fusconi, M., Marinelli, C., Macri, G.F., de Vincentiis, M., 2012. Meniere's disease might be an autoimmune condition? *Autoimmunity Reviews* 11, 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.01.004>

Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., 2000. Transcription: an overview of gene regulation in eukaryotes.

Guo, K., Xiao, S., Geng, S., Feng, Y., Zhang, D., Zhou, P., Zhang, Y., 2014. Delayed-onset pachyonychia congenita caused by a novel mutation in the V2 domain of keratin 6b. *The Journal of Dermatology* 41, 108–109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1346-8138.12349>

Gürol, G., Ciftci, I.H., Harman, H., Karakece, E., Kamanli, A., Tekeoglu, I., 2015. Roles of claudin-5 and von Willebrand factor in patients with rheumatoid arthritis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8, 1979–1984.

H Shojaku, Y.W., 1997. The prevalence of definite cases of Meniere's disease in the Hida and Nishikubiki districts of central Japan: a survey of relatively isolated areas of medical care. *Acta Otolaryngol Suppl* 528:94–6.

Harada, N., Yokoyama, T., Yamaji, R., Nakano, Y., Inui, H., 2008. RanBP10 acts as a novel coactivator for the androgen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368, 121–125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.072>

Harley, M.E., Murina, O., Leitch, A., Higgs, M.R., Bicknell, L.S., Yigit, G., Blackford, A.N., Zlatanou, A., Mackenzie, K.J., Reddy, K., Halachev, M., McGlasson, S., Reijns, M.A.M., Fluteau, A., Martin, C.-A., Sabbioneda, S., Elcioglu, N.H., Altmüller, J., Thiele, H., Greenhalgh, L., Chessa, L., Maghnie, M., Salim, M., Bober, M.B., Nürnberg, P., Jackson, S.P., Hurles, M.E., Wollnik, B., Stewart, G.S., Jackson, A.P., 2016. TRAP promotes DNA damage response during genome replication and is mutated in primordial dwarfism. *Nature Genetics* 48, 36–43. <https://doi.org/10.1038/ng.3451>

Herminio Perez-Garrigues 1, Jose A Lopez-Escamez, Paz Perez, Ricardo Sanz, Miguel Orts, Jaime Marco, Rafael Barona, Mari C Tapia, Ismael Aran, Carlos Cenjor, Nicolas Perez, Constantino Morera, R.R., 2015. Time Course of Episodes of Definitive Vertigo in Ménière's Disease 134, 1149–1154.

- Hietikko, E., Kotimäki, J., Sorri, M., Männikkö, M., 2013. High incidence of Meniere-like symptoms in relatives of Meniere patients in the areas of Oulu University Hospital and Kainuu Central Hospital in Finland. *European Journal of Medical Genetics* 56, 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2013.03.010>
- House, J.W., Doherty, J.K., Fisher, L.M., Derebery, M.J., Berliner, K.I., 2006. Meniere's disease: prevalence of contralateral ear involvement. *Otology & Neurotology: Official Publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 27, 355–361.
- Hudspeth, A.J., 2008. Making an effort to listen: mechanical amplification in the ear. *Neuron* 59, 530–545. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.012>
- Jaijo, T., Aller, E., Oltra, S., Beneyto, M., Nájera, C., Ayuso, C., Baiget, M., Carballo, M., Antiñolo, G., Valverde, D., Moreno, F., Vilela, C., Perez-Garrigues, H., Navea, A., Millán, J.M., 2006. Mutation profile of the MYO7A gene in Spanish patients with Usher syndrome type I. *Human mutation* 27, 290–291. <https://doi.org/10.1002/humu.9404>
- Jin Liliang, Sanjay Batra, David Nobuhiro Douda, N.P. and, Jeyaseelan., S., 2014. CXCL1 Contributes to Host Defense in Polymicrobial Sepsis via Modulating T cell and Neutrophil Functions. *Bone* 193, 3549–3558. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401138.CXCL1>
- Kamei, T., 2004. Delayed endolymphatic hydrops as a clinical entity. *The International Tinnitus Journal* 10, 137–143.
- Kim, H.H., Wiet, R.J., Battista, R.A., 2005. Trends in the diagnosis and the management of meniere's disease: Results of a survey. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 132, 722–726. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2005.01.007>
- Kircher, M., Witten, D.M., Jain, P., O'Roak, B.J., Cooper, G.M., Shendure, J., 2014. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature genetics* 46, 310–315. <https://doi.org/10.1038/ng.2892>
- Kotimäki, J., Sorri, M., Aantaa, E., Nuutinen, J., 1999. Prevalence of Meniere disease in Finland. *Laryngoscope* 109, 748–753. <https://doi.org/10.1097/00005537-199905000-00013>
- Ku, N.-O., Darling, J.M., Krams, S.M., Esquivel, C.O., Keeffe, E.B., Sibley, R.K., Lee, Y.M., Wright, T.L., Omary, M.B., 2003. Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 6063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0936165100>
- Kunkel, M. and, 2008. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Bone* 23, 1–7. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.4.The>
- Lempert, T., Olesen, J., Furman, J., Waterston, J., Seemungal, B., Carey, J., Bisdorff, A., Versino, M., Evers, S., Newman-Toker, D., 2012. Vestibular migraine: diagnostic criteria. *Journal of Vestibular Research: Equilibrium & Orientation* 22, 167–172. <https://doi.org/10.3233/VES-2012-0453>
- Li, S., Mecca, A., Kim, J., Caprara, G.A., Wagner, E.L., Du, T.T., Petrov, L., Xu, W., Cui, R., Rebutini, I.T., Kachar, B., Peng, A.W., Shin, J.B., 2020. Myosin-VIIa is expressed in multiple isoforms and essential for tensioning the hair cell mechanotransduction complex. *Nature Communications* 11, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15936-z>
- Li, Y., Han, J., Zhang, Y., Cao, F., Liu, Z., Li, S., Wu, J., Hu, C., Wang, Y., Shuai, J., Chen, J., Cao, L., Li, D., Shi, P., Tian, C., Zhang, J., Dou, Y., Li, G., Chen, Y., Lei, M., 2016a. Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases. *Nature* 530, 447–452. <https://doi.org/10.1038/nature16952>
- Li, Y., Han, J., Zhang, Y., Cao, F., Liu, Z., Li, S., Wu, J., Hu, C., Wang, Y., Shuai, J., Chen, J., Cao, L., Li, D., Shi, P., Tian, C., Zhang, J., Dou, Y., Li, G., Chen, Y., Lei, M., 2016b. Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases. *Nature* 530, 447–452. <https://doi.org/10.1038/nature16952>
- Liu, Y.F., Xu, H., 2016. The Intimate Relationship between Vestibular Migraine and Meniere Disease: A Review of Pathogenesis and Presentation. *Behavioural Neurology* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3182735>

- López-Álvarez, M.R., Jiang, W., Jones, D.C., Jayaraman, J., Johnson, C., Cookson, W.O., Moffatt, M.F., Trowsdale, J., Traherne, J.A., 2016. LILRA6 copy number variation correlates with susceptibility to atopic dermatitis. *Immunogenetics* 68, 743–747. <https://doi.org/10.1007/s00251-016-0924-z>
- Lopez-Escamez, J.A., Carey, J., Chung, W.H., Goebel, J.A., Magnusson, M., Mandalà, M., Newman-Toker, D.E., Strupp, M., Suzuki, M., Trabalzini, F., Bisdorff, A., 2015. Diagnostic criteria for Menière’s disease. *Journal of Vestibular Research: Equilibrium and Orientation* 25, 1–7. <https://doi.org/10.3233/VES-150549>
- Lopez-Escamez, J.A., Viciano, D., Garrido-Fernandez, P., 2009. Impact of bilaterality and headache on health-related quality of life in Meniere’s disease. *Annals of Otolaryngology and Rhinology and Laryngology* 118, 409–416. <https://doi.org/10.1177/000348940911800603>
- Marcus, D.C., Shipley, A.M., 1994. Potassium secretion by vestibular dark cell epithelium demonstrated by vibrating probe. *Biophysical Journal* 66, 1939–1942. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80987-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80987-7)
- Marieb, E.N., Hoehn, K., 2009. *Human anatomy & physiology*. Pearson Education, Upper Saddle River, N.J.; Harlow.
- Martin, E., Perez, N., 2003. Hearing loss after intratympanic gentamicin therapy for unilateral Ménière’s Disease. *Otology and Neurotology* 24, 800–806. <https://doi.org/10.1097/00129492-200309000-00018>
- Martín-Sierra, C., Gallego-Martinez, A., Requena, T., Frejo, L., Batuecas-Caletrió, A., Lopez-Escamez, J.A., 2017. Variable expressivity and genetic heterogeneity involving DPT and SEMA3D genes in autosomal dominant familial Meniere’s disease. *European Journal of Human Genetics* 25, 200–207. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.154>
- Martín-Sierra, C., Requena, T., Frejo, L., Price, S.D., Gallego-Martinez, A., Batuecas-Caletrio, A., Santos-Pérez, S., Soto-Varela, A., Lysakowski, A., Lopez-Escamez, J.A., 2016. A novel missense variant in PRKCB segregates low-frequency hearing loss in an autosomal dominant family with Meniere’s disease. *Human Molecular Genetics* 25, 3407–3415. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw183>
- Martín-Sierra, Carmen, Gallego-Martinez, A., Requena, T., Frejo, L., Batuecas-Caletrió, A., Lopez-Escamez, J.A., 2017. Variable expressivity and genetic heterogeneity involving DPT and SEMA3D genes in autosomal dominant familial Meniere’s disease. *European journal of human genetics: EJHG* 25, 200–207. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.154>
- McCormack, A., Edmondson-Jones, M., Somerset, S., Hall, D., 2016. A systematic review of the reporting of tinnitus prevalence and severity. *Hearing Research* 337, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.05.009>
- Modamio-Høybjør, S., Mencía, Á., Goodyear, R., del Castillo, I., Richardson, G., Moreno, F., Moreno-Pelayo, M.Á., 2007. A mutation in CCDC50, a gene encoding an effector of epidermal growth factor-mediated cell signaling, causes progressive hearing loss. *American Journal of Human Genetics* 80, 1076–1089. <https://doi.org/10.1086/518311>
- Modamio-Høybjør, S., Moreno-Pelayo, M., Mencía, A., del Castillo, I., Chardenoux, S., Armenta, D., Lathrop, M., Petit, C., Moreno, F., 2003. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA44) maps to chromosome 3q28–29. *Human Genetics* 112, 24–28. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0836-x>
- Morrison, A.W., Bailey, M.E.S., Morrison, G. a. J., 2009. Familial Ménière’s disease: clinical and genetic aspects. *The Journal of Laryngology and Otology* 123, 29–37. <https://doi.org/10.1017/S0022215108002788>
- Müller, U., Barr-Gillespie, P.G., 2015. New treatment options for hearing loss. *Nature Reviews. Drug Discovery* 14, 346–365. <https://doi.org/10.1038/nrd4533>
- Nakamura, M., Masuda, H., Horii, J., Kuma, K.-I., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M., Nishimoto, T., 1998. When Overexpressed, a Novel Centrosomal Protein, RanBPM, Causes Ectopic Microtubule Nucleation Similar to-Tubulin, *The Journal of Cell Biology*.

Ohmen, Jeffry Douglas; White, Cory H.; Li, Xin\*; Wang, Juemei\*; Fisher, Laurel M.‡; Zhang, Huan§; Derebery, Mary Jennifer\*; Friedman, R.A.\*||, 2013. Genetic Evidence for an Ethnic Diversity in the Susceptibility to Meniere's Disease. *Otology & Neurotology* 34, 1336–1341.

Ohmori, H., 1985. Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. *The Journal of Physiology* 359, 189–217. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015581>

Ottersen, O.P., Takumi, Y., Matsubara, A., Landsend, A.S., Laake, J.H., Usami, S. ichi, 1998. Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: The afferent synapses of hair cells in the inner ear. *Progress in Neurobiology* 54, 127–148. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00054-3)

Paparella MM, da Costa SS, Fox R, Y.TH., 1991. Meniere's disease and other labyrinthine diseases. *Otolaryngology. 2nd edn.* WB Saunders, Philadelphia 1991:1689-1714.

Paparella, M.M., 1984. Pathogenesis of Meniere's disease and Meniere's syndrome. *Acta Oto-Laryngologica. Supplementum* 406, 10–25.

Paparella, M.M., Djalilian, H.R., 2002. Etiology, pathophysiology of symptoms, and pathogenesis of Meniere's disease. *Otolaryngologic Clinics of North America* 35, 529–545. [https://doi.org/10.1016/S0030-6665\(02\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0030-6665(02)00019-1)

Peña-Chilet, M., Roldán, G., Perez-Florido, J., Ortuño, F.M., Carmona, R., Aquino, V., Lopez-Lopez, D., Loucera, C., Fernandez-Rueda, J.L., Gallego, A., García-García, F., González-Neira, A., Pita, G., Núñez-Torres, R., Santoyo-López, J., Ayuso, C., Minguez, P., Avila-Fernandez, A., Corton, M., Moreno-Pelayo, M.Á., Morin, M., Gallego-Martinez, A., Lopez-Escamez, J.A., Borrego, S., Antiñolo, G., Amigo, J., Salgado-Garrido, J., Pasalodos-Sanchez, S., Morte, B., Carracedo, Á., Alonso, Á., Dopazo, J., 2021. CSVS, a crowdsourcing database of the Spanish population genetic variability. *Nucleic Acids Research* 49, D1130–D1137. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa794>

Perez-Carpena, P., Lopez-Escamez, J.A., 2020. Current Understanding and Clinical Management of Meniere's Disease: A Systematic Review. *Seminars in Neurology* 40, 138–150. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3402065>

Petersen, M.B., 2002. Non-syndromic autosomal-dominant deafness. *Clinical Genetics* 62, 1–13. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2002.620101.x>

R Momin, S., Melki, S., N Alagramam, K., A Megerian, C., 2009. Spiral ganglion loss outpaces inner hair cell loss in endolymphatic hydrops. *The Laryngoscope* 120, 159–165. <https://doi.org/10.1002/lary.20673>

Rask-Andersen, H., Bredberg, G., Lyttkens, L., Löf, G., 1981. The Function of the Endolymphatic Duct—an Experimental Study Using Ionic Lanthanum As a Tracer: a Preliminary Report. *Annals of the New York Academy of Sciences* 374, 11–19. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1981.tb30855.x>

Rask-Andersen, H., Liu, W., Erixon, E., Kinnefors, A., Pfaller, K., Schrott-Fischer, A., Glueckert, R., 2012. Human cochlea: Anatomical characteristics and their relevance for cochlear implantation. *Anatomical Record* 295, 1791–1811. <https://doi.org/10.1002/ar.22599>

#### REFERENCIAS ACTUALIZADAS

Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G.M., Shendure, J., Kircher, M., 2019. CADD: Predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Research* 47, D886–D894. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1016>

Requena, T, Espinosa-Sanchez, J.M., Cabrera, S., Trinidad, G., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Teggi, R., Perez, P., Batuecas-Caletrio, A., Fraile, J., Aran, I., Martin, E., Benitez, J., Pérez-Fernández, N., Lopez-Escamez, J.A., 2014. Familial clustering and genetic heterogeneity in Meniere's disease. *Clinical Genetics* 85, 245–252. <https://doi.org/10.1111/cge.12150>

Requena, T., Cabrera, S., Martín-Sierra, C., Price, S.D., Lysakowski, A., Lopez-Escamez, J.A.,

2015. Identification of two novel mutations in FAM136A and DTNA genes in autosomal-dominant familial Meniere's disease. *Human Molecular Genetics* 24, 1119–1126.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu524>

Requena, T., Espinosa-Sanchez, J.M., Cabrera, S., Trinidad, G., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Teggi, R., Perez, P., Batuecas-Caletrio, A., Fraile, J., Aran, I., Martin, E., Benitez, J., Pérez-Fernández, N., Lopez-Escamez, J.A., 2014. Familial clustering and genetic heterogeneity in Meniere's disease. *Clinical Genetics* 85, 245–252. <https://doi.org/10.1111/cge.12150>

Requena, T., Gazquez, I., Moreno, A., Batuecas, A., Aran, I., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Perez, N., Perez-Garrigues, H., Lopez-Nevot, A., Martin, E., Sanz, R., Perez, P., Trinidad, G., Alarcon-Riquelme, M.E., Teggi, R., Zagato, L., Lopez-Nevot, M.A., Lopez-Escamez, J.A., 2013. Allelic variants in TLR10 gene may influence bilateral affectation and clinical course of Meniere's disease. *Immunogenetics* 65, 345–355. <https://doi.org/10.1007/s00251-013-0683-z>

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H.L., 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 17, 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

Roman-Naranjo, P., Gallego-Martinez, A., Soto-Varela, A., Aran, I., Moleon, M. del C., Espinosa-Sanchez, J.M., Amor-Dorado, J.C., Batuecas-Caletrio, A., Perez-Vazquez, P., Lopez-Escamez, J.A., 2020. Burden of Rare Variants in the OTOG Gene in Familial Meniere's Disease.

Roman-Naranjo, P., Moleon, M.D.C., Aran, I., Escalera-Balsera, A., Soto-Varela, A., Bächinger, D., Gomez-Fiñana, M., Eckhard, A.H., Lopez-Escamez, J.A., 2021. Rare coding variants involving MYO7A and other genes encoding stereocilia link proteins in familial meniere disease. *Hearing Research* 409. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2021.108329>

Ruben, R.J., 2020. The Developing Concept of Tonotopic Organization of the Inner Ear. *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 21, 1–20.

<https://doi.org/10.1007/s10162-019-00741-3>

S Tomiyama, J.P.H., 1986. [tomi.pdf. https://doi.org/10.1288/00005537-198606000-00018](https://doi.org/10.1288/00005537-198606000-00018)

Sajjadi, H., Paparella, M.M., 2008. Meniere's disease. *Lancet (London, England)* 372, 406–414. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61161-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61161-7)

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463–5467.

Sawant, K. V., Poluri, K.M., Dutta, A.K., Sepuru, K.M., Troshkina, A., Garofalo, R.P., Rajarathnam, K., 2016. Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Scientific Reports* 6, 4–11. <https://doi.org/10.1038/srep33123>

Scheu, S., Ali, S., Ruland, C., Arolt, V., Alferink, J., 2017. The C-C chemokines CCL17 and CCL22 and their receptor CCR4 in CNS autoimmunity. *International Journal of Molecular Sciences* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18112306>

Schwander, M., Kachar, B., Müller, U., 2010. The cell biology of hearing. *Journal of Cell Biology* 190, 9–20. <https://doi.org/10.1083/jcb.201001138>

Semaan, M.T., Alagramam, K.N., Megerian, C.A., 2005. The basic science of Meniere's disease and endolymphatic hydrops. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 13, 301–307.

Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., Ishii, S., Taguchi, R., Shimizu, T., 2007. A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells: Cloning and characterization of acetyl-CoA:lyso-PAF acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 282, 6532–6539.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M609641200>

Sim, N.L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G., Ng, P.C., 2012. SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Research* 40, 452–457.

<https://doi.org/10.1093/nar/gks539>

Skarp, S., Kanervo, L., Kotimäki, J., Sorri, M., Männikkö, M., Hietikko, E., 2019. Whole-exome sequencing suggests multiallelic inheritance for childhood-onset Ménière's disease. *Annals of Human Genetics* 83, 389–396. <https://doi.org/10.1111/ahg.12327>

Sloan-Heggen, C.M., Bierer, A.O., Shearer, A.E., Kolbe, D.L., Nishimura, C.J., Frees, K.L., Ephraim, S.S., Shibata, S.B., Booth, K.T., Campbell, C.A., Ranum, P.T., Weaver, A.E., Black-Ziegelbein, E.A., Wang, D., Azaiez, H., Smith, R.J.H., 2016. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Human Genetics* 135, 441–450. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1648-8>

**Soupe**, E., Fyrst, H., Kuypers, F.A., 2008. Mammalian acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709737104>

Strupp, M., Brandt, T., 2008. Leitsymptom schwindel: Diagnose und therapie. *Deutsches Arzteblatt* 105, 173–180. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2008.0173>

Sung, H.K., Gi, R.K., Seong, M., Sung, H.B., Jae, H.S., Ok, S.B., Ovaa, H., Tatsumi, K., Komatsu, M., Tanaka, K., Chin, H.C., 2007. Two novel ubiquitin-fold modifier 1 (Ufm1)-specific proteases, UfSP1 and UfSP2. *Journal of Biological Chemistry* 282, 5256–5262. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610590200>

Tal Koffler, K.U. and K.B.A., 2015. Genetics of Hearing Loss-Syndromic. *Otolaryngol Clin North Am.* 48, 1041–1061. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2015.07.007>

Tashiro, K., Konishi, H., Sano, E., Nabeshi, H., Yamauchi, E., Taniguchi, H., 2006. Suppression of the ligand-mediated down-regulation of epidermal growth factor receptor by Ymer, a novel tyrosine-phosphorylated and ubiquitinated protein. *Journal of Biological Chemistry* 281, 24612–24622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604184200>

Thirlwall AS, K.S., 2006. Diuretics for Ménière's disease or syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003599.pub2>

Tijo JH and Levan Albert, 1956. [TjioJH\\_Hereditas\\_1956.pdf](https://doi.org/10.1002/14651858.CD003599.pub2).

Tonndorf, J., 1976. Endolymphatic hydrops: mechanical causes of hearing loss. *Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 212, 293–299. <https://doi.org/10.1007/BF00453677>

Vambutas, A., Pathak, S., 2016. AAO: Autoimmune and Autoinflammatory (Disease) in Otolaryngology: What is New in Immune-Mediated Hearing Loss. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology* 1, 110–115. <https://doi.org/10.1002/lio2.28>

Van Camp G., S.R.J.H., 2018. Hereditary Hearing Loss Homepage.

Västinsalo, H., Jalkanen, R., Bergmann, C., Neuhaus, C., Kleemola, L., Jauhola, L., Bolz, H.J., Sankila, E.M., 2013. Extended mutation spectrum of Usher syndrome in Finland. *Acta Ophthalmologica* 91, 325–334. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2012.02397.x>

Wangemann, P., Liu, J., Shiga, N., 1996. Vestibular dark cells contain the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 in the basolateral membrane. *Hearing Research* 94, 94–106. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(96\)00008-1](https://doi.org/10.1016/0378-5955(96)00008-1)

Watson, J.D., 1990. Past , Present , Future The Human Genome Project : Sciences-New York

Watson, J.D., Crick, F.H., 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738.

Werner, A., Iwasaki, S., McGourty, C.A., Medina-Ruiz, S., Teerikorpi, N., Fedrigo, I., Ingolia, Wu, R.A., Semlow, D.R., Kamimae-Lanning, A.N., Kochenova, O. v, Chistol, G., Hodskinson, Yoda, S., Cureoglu, S., Shimizu, S., Morita, N., Fukushima, H., Sato, T., Harada, T., Paparella, M.M., 2011. Round window membrane in Ménière's disease: a human temporal bone study. *Otology & Neurotology: Official Publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 32, 147–151. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e318200a0e0>