



REVISIÓN

Papel de la medicina genómica en las enfermedades del oído medio e interno

José Antonio López-Escamez ^{a,b}

^a Grupo de Otología & Otoneurología, CTS495, Centro de Genómica e Investigación Oncológica –GENYO Pfizer-Universidad de Granada– Junta de Andalucía, Granada, España

^b Departamento de Otorrinolaringología, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, España

Recibido el 7 de abril de 2011; aceptado el 25 de abril de 2011

PALABRAS CLAVE

Otitis media crónica;
Otosclerosis;
Hipoacusia asociada a la edad;
Enfermedad de Meniere;
Variabilidad ADN;
Estudios de asociación genética

KEYWORDS

Chronic otitis media;
Otosclerosis;
Age-related hearing loss;

Resumen

Introducción y objetivos: La medicina genómica estudia la susceptibilidad que determinan grupos de marcadores genéticos para el desarrollo de las enfermedades genéticas complejas. El objetivo de esta revisión es introducir al otorrinolaringólogo clínico a la genómica. Se resumen los avances tecnológicos en genotipado y secuenciación que se han producido en los últimos años, y que han permitido el desarrollo de estudios de asociación genómica a gran escala en las causas más comunes de hipoacusia.

Métodos: Se ha diseñado una estrategia de búsqueda en PubMed mediante los siguientes términos: (*gene OR genomics OR GWAS OR high throughput*) AND (*hearing loss OR chronic otitis media OR age-related hearing loss OR otosclerosis OR Meniere's disease*) durante los últimos 5 años. Se obtuvieron un total de 1.846 referencias, que se filtraron a los estudios en humanos y publicados en inglés. Se evaluaron 1.295 resúmenes, seleccionándose finalmente 58 trabajos.

Resultados: Se describe el impacto de la secuenciación del genoma humano que ha permitido conocer la arquitectura del genoma, la variabilidad del ADN, y la relevancia de las variaciones estructurales en el desarrollo de las enfermedades. Se comenta la evolución de la tecnología de secuenciación, describiéndose los diversos tipos de estudios de asociación genética. Finalmente, se presentan los estudios de asociación genética que se han realizado en las enfermedades más comunes del oído.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Role of genomic medicine in middle and inner ear diseases

Abstract

Introduction and objectives: Genomic medicine investigates groups of genetic markers that determine susceptibility for complex diseases. The aim of this review was to introduce genomics

Correo electrónico: antonio.lopezescamez@genyo.es

0001-6519/\$ - see front matter © 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.
doi:10.1016/j.otorri.2011.04.003

Cómo citar este artículo: López-Escamez JA. Papel de la medicina genómica en las enfermedades del oído medio e interno. Acta Otorrinolaringol Esp. 2011. doi:10.1016/j.otorri.2011.04.003

Meniere's disease;
DNA variability;
Genome-association
studies

to the clinical otorhinolaryngologist. Technological advances in genotyping and sequencing that have facilitated genome-wide association studies in common causes of hearing loss during the last years are summarised.

Methods: A search strategy in *PubMed* was designed using the following keywords: (gene OR genomics OR GWAS OR high throughput) AND (hearing loss OR chronic otitis media OR age-related hearing loss OR otosclerosis OR Meniere's disease) during the last 5 years. A total of 1,846 references were obtained. After filtering by human studies and English as the language of publication, 1,295 summaries were evaluated, selecting 58 papers.

Results: The impact of sequencing the human genome in the knowledge of genome architecture, DNA variability and the significance of structural variations in the sequence to cause diseases is presented. The evolution of sequencing technology has determined the design and performance of genetic association studies. Finally, we present genetic association studies performed in common causes of ear diseases.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La afirmación de Gregorio Marañón (1887-1960) de que no existen enfermedades sino enfermos, tiene su traducción a nivel genómico en la extraordinaria variabilidad del ADN humano, que tiene un papel determinante para el desarrollo de muchas enfermedades. La hipótesis variante común/enfermedad común se basa en la premisa de que variaciones comunes en la estructura del ADN confieren un pequeño riesgo para el desarrollo de una enfermedad; pero la interacción de múltiples variantes con un efecto aditivo distribuidas a lo largo del genoma permiten explicar una parte significativa de la herencia en las enfermedades complejas.

La genética molecular ha permitido la identificación de genes de hipoacusia durante los últimos 20 años mediante el análisis de ligamiento en familias con varios casos de hipoacusia. Esta metodología ha demostrado ser muy útil para el diagnóstico de las enfermedades monogénicas de baja prevalencia, también denominadas enfermedades raras. Así, actualmente se han descrito 69 genes causantes de hipoacusia no sindrómica (37 genes de herencia recesiva, 25 genes dominantes, 5 genes mitocondriales con al menos 15 mutaciones y 2 genes ligados al cromosoma X) y existen al menos otros 150 *loci* asociados en los que no se ha identificado el gen (61 *loci* con patrón de herencia dominante, 84 *loci* recesivos y 5 *loci* ligados al cromosoma X; <http://hereditaryhearingloss.org>). Las tablas 1-3 resumen los genes asociados a hipoacusia no sindrómica recesivos, dominantes y genes del ADN mitocondrial¹. Además, existen enfermedades raras que presentan hipoacusia asociada a síndromes malformativos como el síndrome de Alport, el síndrome braquio-oto-renal, el síndrome de Jervell-Lange-Nielsen, el síndrome de Norrie, el síndrome de Pendred, el síndrome de Sticker, el síndrome de Tracher-Collins, el síndrome de Usher o el síndrome de Waardenburg en las que se han identificado variantes alélicas que determinan el desarrollo del cuadro clínico. La descripción de estos síndromes o los genes que se asocian a ellos excede los objetivos de este trabajo.

Sin embargo, existen otras enfermedades que son más frecuentes en la práctica clínica, que tienen un origen multifactorial, y cursan con hipoacusia o hipofunción vestibular en las que existe un componente hereditario que no es bien

conocido. Así, la otitis media serosa crónica es un cuadro que se desarrolla en niños que parecen tener una susceptibilidad a las infecciones en el oído medio. De igual forma, la presbiacusia presenta un componente familiar que no puede explicarse por el efecto acumulado de factores medioambientales a lo largo de la vida de un individuo. La variabilidad del genoma determina la forma que un individuo responde a factores como el ruido, los fármacos ototóxicos o las infecciones y lo hace más susceptible al desarrollo de hipoacusia en la edad adulta.

El presente trabajo describe el papel de la genómica en el diagnóstico molecular de las enfermedades comunes que causan hipoacusia como: la otitis media crónica, la otosclerosis, la presbiacusia o la enfermedad de Meniere. En una primera sección, se describen el impacto de la secuenciación del genoma humano que ha permitido conocer la arquitectura del genoma, la variabilidad del ADN y la relevancia de las variaciones estructurales en el desarrollo de las enfermedades. En una segunda sección se describen los estudios de asociación genética que se han realizado en las enfermedades más comunes del oído.

Variabilidad del genoma humano

El genoma humano está formado por ADN que se organiza en genes y regiones intergénicas. Los genes constan de exones (regiones que transcriben a ARN mensajero) e intrones (regiones no transcritas), existiendo una secuencia que regula la transcripción, denominada promotor para cada gen. Las regiones intergénicas están formadas por secuencias de ADN repetitivo y su función no es bien conocida.

La genómica es la parte de la genética que estudia la estructura del genoma y la interacción entre múltiples *loci* o genes. La variabilidad en la secuencia del genoma es debida a varios mecanismos:

Polimorfismo de nucleótido único (*single nucleotide polymorphisms* [SNPs])

El Consorcio para el Proyecto Genoma Humano², el Consorcio SNP³ y muy recientemente, el Consorcio HapMap^{3,4} han demostrado que una parte significativa de la variabilidad del genoma humano consiste en cambios en bases individuales

Tabla 1 Genes de hipoacusia neurosensorial no sindrómica autosómica recesiva^a

Locus (OMIM)	Gen (OMIM)	Referencia (OMIM)
DFNB1A	GJB2	Kelsell et al, 1997
DFNB1B	GJB6	del Castillo et al, 2002
DFNB2	MYO7A	Liu et al, 1997; Weil et al, 1997
DFNB3	MYO15A	Wang et al, 1998
DFNB4	SLC26A4	Li et al, 1998
DFNB6	TMIE	Naz et al, 2002
DFNB7/11	TMC1	Kurima et al, 2002
DFNB8/DFNB10	TMPRSS3	Scott et al, 2001
DFNB9	OTOF	Yasunaga et al, 1999
DFNB12	CDH23	Bork et al, 2001
DFNB16	STRC	Verpy et al, 2001
DFNB18	USH1C	Ouyang et al, 2002; Ahmed et al, 2002
DFNB21	TECTA	Mustapha et al, 1999
DFNB22	OTOA	Zwaenepoel et al, 2002
DFNB23	PCDH15	Ahmed et al, 2003
DFNB24	RDX	Khan et al, 2007
DFNB25	GRXCR1	Schraders et al, 2010
DFNB28	TRIOBP	Shahin et al, 2006; Riazuddin et al, 2006
DFNB29	CLDN14	Wilcox et al, 2001
DFNB30	MYO3A	Walsh et al, 2002
DFNB31	WHRN	Mburu et al, 2003
DFNB35	ESRRB	Collin et al, 2008
DFNB36	ESPN	Naz et al, 2004
DFNB37	MYO6	Ahmed et al, 2003
DFNB39	HGF	Schultz et al, 2009
DFNB49	MARVELD2	Riazuddin et al, 2006
DFNB53	COL11A2	Chen et al, 2005
DFNB59	PJVK	Delmaghani et al, 2006
DFNB61	SLC26A5	Liu et al, 2003
DFNB63	LRTOMT/COMT2	Ahmed et al, 2008; Du et al, 2008
DFNB66 /67	LHFPL5	Tlili et al, 2005; Shabbir et al, 2006; Kalay et al, 2006
DFNB77	LOXHD1	Grillet et al, 2009
DFNB79	TPRN	Rehman et al, 2010; Li et al, 2010
DFNB82	GPSM2	Walsh et al, 2010
DFNB84	PTPRQ	Schraders et al, 2010
	GJB3	Liu et al, 2000

^a Todas las referencias pueden ser localizadas en: <http://hereditaryhearingloss.org>.

que existen como dos alelos en la población (SNPs). Así, unos 10^7 SNPs tienen una frecuencia alélica superior al 1% para el alelo de menor frecuencia, y se estima que representan el 90% de la variación genética del genoma humano^{5,6}. Estos SNPs situados en regiones regulatorias de los genes confieren susceptibilidad en las enfermedades complejas. Hasta hace unos tres años se pensaba que los SNPs eran la forma predominante que determinaba las variaciones del genoma y que podía explicar las variaciones fenotípicas no patológicas. Los estudios de asociación genómica amplios (*gene-wide association studies* [GWAS]) utilizan los SNPs como marcadores del genoma para identificar las regiones de susceptibilidad, pues se ha demostrado que los SNPs se asocian con alteraciones estructurales en regiones adyacentes al SNP.

Repeticiones polimórficas en tandem (*tandem repeat polymorphisms* [TRPs])

Las secuencias de ADN repetidas de forma consecutiva en el genoma son una forma del ADN repetitivo que define su variabilidad. Las TRPs se denominan ADN satélite y dependiendo de su longitud se clasifican en minisatélites (10-60 pares de bases) o microsatélites (< 10 pb), secuencias repetidas sencillas (SSRs) o repeticiones tándem⁷.

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN repetidas generalmente de 2 a 6 veces y aunque pueden localizarse tanto en los genes como en las regiones intergénicas, los microsatélites más estudiados se localizan en los promotores de los genes. Si la repetición es de 2 bases se denomina

Tabla 2 Genes de hipoacusia neurosensorial no sindrómica autosómica dominante

Locus (OMIM)	Gen (OMIM)	Referencia
	CRYM	Abe et al, 2003
DFNA1	DIAPH1	Lynch et al, 1997
DFNA2A	KCNQ4	Kubisch et al, 1999
DFNA2B	GJB3 (Cx31)	Xia et al, 1998
DFNA3A	GJB2 (Cx26)	Kelsell et al, 1997
DFNA3B	GJB6 (Cx30)	Grifa et al, 1999
DFNA4	MYH14	Donaudy et al, 2004
DFNA5	DFNA5	Van Laer et al, 1998
DFNA6/DFNA14/DFNA38	WFS1	Bespalova et al, 2001; Young et al, 2001
DFNA8	ver DFNA12	
DFNA9	COCH	Robertson et al, 1998
DFNA10	EYA4	Wayne et al, 2001
DFNA11	MYO7A	Liu et al, 1997
DFNA12 /DFNA8	TECTA	Verhoeven et al, 1998
DFNA13	COL11A2	McGuirt et al, 1999
DFNA15	POU4F3	Vahava et al, 1998
DFNA17	MYH9	Lalwani et al, 2000
DFNA20/26	ACTG1	Zhu et al, 2003; van Wijk et al, 2003
DFNA22	MYO6	Melchionda et al, 2001
DFNA28	TFCP2L3	Peters et al, 2002
DFNA36	TMC1	Kurima et al, 2002
DFNA44	CCDC50	Modamio-Hoybjor et al, 2007
DFNA48	MYO1A	Donaudy et al, 2003
DFNA50	MIRN96	Mencia et al, 2009
DFNA51	TJP2	Walsh et al, 2010

repetición tándem (*variable number tandem repeats* [VNTRs], p. ej., CTCTCT...). Cada número de repeticiones se considera un alelo diferente y así el microsatélite puede tener tantos alelos como número de repeticiones⁸. Cuando la repetición es un triplete, el número de repeticiones puede ser mucho mayor (p. ej., CAGCAGCAG...). Esta expansión de un triplete en ocasiones origina enfermedades monogénicas raras neurológicas como la ataxia de Friedreich, las ataxias espinocerebelosas o la enfermedad de Huntington⁹. Existen microsatélites que regulan la expresión de genes, al situarse en el promotor, como el tetranucleótido CATT situado en el gen MIF o el pentanucleótido CCTTT situado en el gen NOS2A¹⁰.

Elementos genéticos transponibles o transposones

Son secuencias de ADN repetidas que se encuentran dispersas en el genoma. Se han definido como secuencias móviles que pueden desplazarse de forma autosuficiente a diferentes partes del genoma¹¹. Los transposones se pueden clasificar en dos tipos:

- Transposones de ADN.
- Retrotransposones, que son aquellos que se transponen a través de un intermediario de ARN. En los mamíferos, los retrotransposones más abundantes son los que carecen de repeticiones terminales largas (*long terminal repetitions* [LTR]) y se dividen en dos clases: elementos dispersos largos de unos 6 kb (*long interspersed elements* [LINE]) y elementos dispersos cortos (SINE), con una

longitud de 300 bp. Los SINE constituyen el 13% del genoma humano y de éstos, los elementos *Alu*, denominados así por contener un sitio de restricción para el enzima *Alu I*, son las secuencias móviles más abundantes de genoma humano¹². Las inserciones *Alu* se han asociado a varias enfermedades, incluyendo varias formas de cáncer.

Alteraciones estructurales (como deleciones, duplicaciones e inversiones)

Cuando la duplicación o deleción afecta un segmento > 1 kb de ADN se denomina variante o variación del número de copias (*copy number variant* [CNV])¹³. La variabilidad en la estructura del genoma no solo está en los SNPs o los TRPs. Existen secuencias que pueden repetirse un número variable de veces lo que puede modificar la secuencia de ADN, su configuración y la interacción con factores de transcripción. Esta variación en el CNV se ha estudiado en todo el genoma y sabemos que muchas de ellas están asociadas (esto se denomina desequilibrio de ligamiento) a los SNPs. Todas estas modificaciones de la secuencia de la cadena pueden cambiar la secuencia de lectura del ADN y pueden originar una alteración en la secuencia del ARN.

Genoma y enfermedad

Las enfermedades comunes son multifactoriales y resultan del efecto aditivo de múltiples genes, factores epigenéticos y medioambientales¹⁴. La genómica intenta explicar los

Tabla 3 Genes de hipoacusia neurosensorial no sindrómica asociados a ADN mitocondrial

Gen	Mutación	Fenotipo	Referencias	Omim
MTTL1	3243A->G	MELAS y MIDD	Goto et al, 1990 van den Ouweland et al, 1992	540000 (MELAS) 590050 (MTTL1)
MTTK	8344A->G 8356T->C 8296A->G	MERRF MERRF MIDD	Shoffner et al, 1990 Zeviani et al, 1993 Kameoka et al, 1998	545000 (MERRF) 590060 (MTTK) 590060 (MTTK)
MTTS1	7512T->C	Epilepsia mioclónica progresiva, ataxia e hipoacusia	Jaksch et al, 1998b	590080 (MTTS1)
Varios	Delecciones grandes	KSS	Moraes et al, 1989	530000 (KSS)
Varios	Gran delec- ción/duplicación	MIDD	Ballinger et al, 1992	520000 (MIDD)
MTTE	14709T->C	MIDD	Hao et al, 1995	590025 (MTTE)
MTRNR1	1555A->G	Inducida/empeora por aminoglucósidos	Prezant et al, 1993 Usami et al, 1997; Estivill et al, 1998 Zhao et al, 2004	
MTRNR1	1494C->T	Inducida/empeora por aminoglucósidos		
MTRNR1	961 (diversas mutaciones)	Inducida/empeora por aminoglucósidos	Bacino et al, 1995; Casano et al, 1999	
MTTS1	7445A->G	Palmoplantar keratoderma	Reid et al, 1994 Fischel-Ghodsian et al, 1995 Seviore et al, 1998 Tiranti et al, 1995	
MTTS1	7472insC	Trastorno neurológico, incluyendo ataxia, disartria y mioclonias	Jaksch et al, 1998a Jaksch et al, 1998b Schuelke et al, 1998 Verhoeven et al, 1999	
MTTS1	7510T->C	Sin otros síntomas	Hutchin et al, 2000	
MTTS1	7511T->C	Sin otros síntomas	Friedman et al, 1999 Sue et al, 1999	

mecanismos que determinan la susceptibilidad en las enfermedades poligénicas complejas, aquellas que son causadas por muchas variantes genéticas, mientras que los factores epigenéticos son la interfase entre los estímulos medioambientales y el fenotipo celular, molecular y conductual, que determinan modificaciones como la metilación de citosinas de la cadena de ADN¹⁵.

En los trastornos poligénicos complejos, las variantes alélicas confieren un riesgo pequeño para el desarrollo de la enfermedad y sería la interacción de varias decenas o centenas de alelos lo que determinaría un riesgo fenotípico significativo. Así, cada genotipo puede determinar una o varias características clínicas de la enfermedad; cuando varios alelos de riesgo están presentes, se desarrollan algunos de los síntomas de la misma, y el fenotipo completo estaría presente en los individuos portadores de todos los alelos de riesgo expuestos a determinados factores epigenéticos y mediambientales. Muchas veces el SNP es solo un

marcador de riesgo que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con la variante genética que confiere el riesgo, y es necesario secuenciar una región de un gen (denominado mapeo fino) para identificar la variante, que puede ser una delección o una duplicación. Así, la complejidad de los estudios genéticos ha aumentado, y hemos pasado de estudiar un gen o un grupo de genes a investigar el genoma completo mediante *microarrays* de SNP y técnicas de secuenciación de alto rendimiento, lo que se denomina medicina genómica.

Material y métodos

Se ha diseñado una estrategia de búsqueda en PubMed mediante los siguientes términos: (*gene OR genomics OR GWAS OR high throughput*) AND (*hearing loss OR chronic otitis media OR age-related hearing loss OR otosclerosis OR Meniere's disease*) durante los últimos 5 años. Se obtuvieron

un total de 1.846 referencias, que se filtraron para limitarse a los estudios realizados en humanos y publicados en inglés quedando los documentos primarios en 1.295. Todos los títulos y resúmenes de estos trabajos se revisaron, seleccionándose finalmente 58 trabajos que se analizaron para la presente revisión. Además, el autor ha seleccionado algunas publicaciones clave en genética, el Proyecto Genoma Humano y revisiones sobre variabilidad del ADN humano y su papel en las enfermedades complejas.

Secuenciación del genoma humano

En 1977, Sanger inició la secuenciación del ADN mediante la separación con electroforesis de fragmentos de cadena sencilla por el método enzimático de terminación de cadena o método didesoxi¹⁶. El desarrollo de secuenciadores automáticos con sondas marcadas con fluorocromos y detectores láser permitió mejorar el rendimiento del método de Sanger. Así, en 2001 se publicó el primer borrador de la secuencia del genoma humano, que aunque representó un hito histórico, solo contenía el 90% de la secuencia y muchos errores en la misma². El Consorcio para el Proyecto Genoma Humano continuó trabajando y en 2004 se obtuvo una secuencia casi completa que cubría el 99,7% del genoma y que ya solo contenía un error por cada 100.000 bases⁶. Esta secuencia permitió conocer la estructura de los genes, así como la identificación de SNPs y mutaciones del genoma. La secuenciación del genoma de otros mamíferos y el análisis comparado ayudó a conocer e interpretar la arquitectura del genoma humano.

Sin embargo, en los últimos cinco años la tecnología de secuenciación ha evolucionado mediante el desarrollo de la secuenciación en paralelo masiva, también denominada *next generation sequencing*¹⁷. Esta técnica permite la secuenciación simultánea de miles de fragmentos de ADN *in situ* en una imagen óptica bidimensional. Mientras que los métodos basados en la electroforesis podrían secuenciar 10² fragmentos, la secuenciación paralela puede llegar a leer hasta 10⁹ fragmentos. Esta evolución tecnológica ha permitido disminuir el coste por base de ADN secuenciada unas 100.000 veces. La desventaja que tiene la nueva tecnología es que los fragmentos de cadena son mucho más cortos que las que se obtienen con un secuenciador automático. Esto obliga a ordenar y ensamblar millones de fragmentos de 30-50 nucleótidos, lo que se debe de realizar con un ADN de referencia y herramientas bioinformáticas capaces de incorporar varios terabytes de información.

Las aplicaciones de la secuenciación paralela son entre otras:

1. Localización de modificaciones del ADN, de la cromatina y puntos de unión de proteínas para definir el «mapa epigenómico». Las modificaciones de la cromatina se identifican mediante *chromatin immunoprecipitation sequencing* (ChIP-Seq) y los sitios de metilación del ADN, que son las citosinas modificadas a las que se añade un grupo metilo, que se localizan mediante Methyl-Seq.
2. Resecuenciación de ADN humano, que dependiendo de la cobertura realizada permite secuenciar el genoma completo¹⁸ o bien una parte del mismo, mediante técnicas de hibridación y captura¹⁹, como puede ser

las secuencias que codifican proteínas, denominada «exoma».

3. Secuenciación de exones diana. Se pueden seleccionar un grupo de genes de interés que este asociados a una patología y secuenciar sus exones. En nuestro área, se ha desarrollado una plataforma para el estudio de la hipoacusia neurosensorial no sindrómica denominada OtoSCOPE (*otologic sequence capture of pathogenic exons*)²⁰, que contiene los exones de los 54 genes conocidos de hipoacusia, que permite la identificación de mutaciones nuevas en los genes conocidos de hipoacusia.

Estudios de asociación genética

Estudios de asociación de genes candidatos

Los estudios de asociación de genes candidatos se utilizan frecuentemente como un primer paso en la identificación de rutas bioquímicas potenciales para una enfermedad. Este abordaje se basa en un conocimiento previo de la patogenia de la enfermedad para seleccionar un buen gen candidato y requiere que las poblaciones de casos y controles estén bien ajustadas para otras covariables (edad, sexo...) para generar datos robustos²¹. Los estudios de replicación son a veces incapaces de replicar los resultados de un estudio de asociación inicial, o la asociación no es tan fuerte como describía el estudio original por diversos motivos²²: en primer lugar, la etiología de la enfermedad puede diferir entre los diversos grupos étnicos, así las infecciones del oído medio tienen un origen diferente dependiendo de la población estudiada; en segundo lugar, el diseño del estudio puede llevar a la falta de reproductibilidad si el fenotipo no está cuidadosamente definido en el grupo de casos, algo que ocurrió con la hipoacusia no sindrómica causada por mutaciones del gen COCH (DFNA9), una forma de hipoacusia neurosensorial bilateral con trastorno del equilibrio autosómico dominante que fue considerada una variante clínica de la enfermedad de Ménière²³; en tercer lugar, los problemas derivados de la selección de las muestras que pueden resultar en una estratificación de la población de casos o controles; en cuarto lugar, pueden existir variantes específicas en un mismo gen, que necesiten la secuenciación de un gen completo para evitar la pérdida potencial de asociaciones en otras poblaciones²²; finalmente, las asociaciones previas podrían ser espúreas^{21,24}. Por todos estos problemas, los estudios de asociación de genes candidatos son difíciles de replicar y su utilidad es cuestionable.

Estudios de asociación de genoma (*gene-wide association study* [GWAS])

Los estudios de asociación de todo el genoma no parten de una hipótesis *a priori*, sino que se basan en una metodología probabilística. Se seleccionan cohortes muy amplias de casos y controles y se comparan empleando 10⁶ SNPs que se utilizan como marcadores a lo largo de todo el genoma para identificar áreas del genoma donde la frecuencia de los SNPs difiere entre ambos grupos²⁵.

La calidad de los datos fenotípicos y los criterios de inclusión de pacientes en los estudios de asociación del genoma determina que el resultado de un GWAS²⁶. En la tabla 4,

Tabla 4 Diseño y fases de un estudio de asociación genómica amplio para enfermedades complejas (GWAS)

Fase 1. Fase de descubrimiento	Estudio de N casos y controles en una población genéticamente definida El tamaño muestral depende de la prevalencia de la enfermedad en la población
Genotipado de SNPs mediante <i>microarrays</i> :	
– Selección de SNPs diana	
– SNPs aleatorios para cubrir todo el genoma	
– Marcadores de ancestría	
Control de calidad:	
– % <i>muestras genotipadas (call rate)</i> > 93%	
– Concordancia de género	
Validación técnica: genotipado de un subgrupo de muestras de fase 1 mediante tecnología diferente (p. ej., sondas Taqman)	
Nivel de significación $p < 10^{-7}$, incluyendo la corrección por comparación múltiple	
Fase 2. Fase de replicación	Estudio de N + 1 casos y controles en población independiente con el mismo origen genético
Casos con el mismo fenotipo y la asociación debe demostrarse los mismos SNPs y con el mismo efecto genético	
Genotipado de SNPs seleccionados de fase 1	
Nivel de significación $p < 0,05$ corregida por comparación múltiple	

se presenta el diseño general de un GWAS. Estos estudios se realizan en dos fases (descubrimiento y replicación), y la replicación es necesaria para confirmar los SNPs, pues la fase 1 genera muchas asociaciones falsas positivas, debido a la comparación múltiple. La estratificación de casos o controles y los errores técnicos durante la recogida de muestras.

Estudios del genoma en causas frecuentes de hipoacusia

Otitis media serosa/otitis media crónica

La otitis media es la infección bacteriana más frecuente en la infancia, precisa tratamiento antibiótico y es la causa más frecuente de hipoacusia en niños. Existen ciertos niños que son susceptibles a desarrollar otitis media. Los estudios epidemiológicos indican que la otitis media supurada y la otitis media serosa son formas clínicas de un proceso relacionado con la entrada de bacterias al oído medio y que el resultado clínico depende de las variaciones en la cantidad y patogenicidad bacteriana, así como del tipo de respuesta inflamatoria. Así, la otitis media se considera un espectro de trastornos infecciosos del oído medio donde varía el tipo de exudado y la respuesta inflamatoria, mientras que la retracción de la membrana timpánica y el colesteatoma se asocian con la presencia de inflamación crónica de la mucosa.

La otitis media es, por tanto, una enfermedad compleja y multifactorial que tiene un componente de susceptibilidad genética que determina la recurrencia de la infección o el desarrollo de «*glue-ear*». El componente hereditario se estima en un 60-70%, y serían un número elevado de genes los que determinan la susceptibilidad²⁷.

La susceptibilidad genética a las infecciones agudas del oído medio están determinadas por la capacidad de respuesta del sistema linfático nasofaríngeo, a la presencia de virus respiratorios, o bacterias. En este sentido, muchos genes de la respuesta inmune innata y adquirida podrían estar implicados en la aparición de la otitis media serosa. Además, diferentes *loci* podrían determinar la persistencia

del proceso inflamatorio como variantes en genes de citocinas.

Algunos estudios han investigado la asociación entre otitis media y diversos genes candidatos de la respuesta inmune o inflamatoria. Así, el gen *Fbxo 11* (MIM *607871), que regula la ruta de TGF β , presenta una variante que se ha asociado a otitis media crónica severa en un estudio realizado en familias con cohorte de replicación²⁸. Existen dos modelos experimentales de otitis media crónica, los ratones mutantes *Jeff 2* y *Junbo3*, y el ratón *Jeff* es portador de una mutación en el exon 13 del gen *Fbxo11*, donde la variante heterocigota determina una otitis media crónica con otorrea²⁹. El gen *Fbxo11* es miembro de una familia de proteínas que actúan como factores específicos del complejo ligasa ubiquitin SCF E3 y son responsables del transporte de proteínas para su degradación. La existencia del modelo murino con el mismo gen implicado puede permitir investigar y desarrollar fármacos nuevos para el tratamiento de la inflamación del oído medio.

Actualmente se ha formado un consorcio internacional denominado OTIGEN, para iniciar un GWAS en 4.000 niños con otitis media serosa, analizando el genoma completo.

Otosclerosis

La otosclerosis (MIM 166800) tiene una prevalencia de 0,3-1% entre la población europea¹. La hipoacusia de transmisión comienza en la tercera década y se caracteriza por un proceso de formación ósea sobre el estribo y la platina que limita su movilidad. La etiología es desconocida y se considera una enfermedad genética compleja con intervención a factores epigenéticos y medioambientales no conocidos. Los estudios de ligamiento realizados en familias han identificado 8 *loci* asociados a la otosclerosis, aunque no se ha clonado ningún gen (tabla 5). En 2009 se publicó un GWAS realizado en 302 pacientes europeos caucásicos con otosclerosis mediante un *chip* con 555.000 SNPs, que permitió identificar 2 SNPs en los cromosomas 7q22.1 y 11q13.1 que fueron replicados en dos poblaciones independientes de 392 pacientes de Bélgica-Holanda y 455 de Francia. El mapeo

Tabla 5 Loci asociados a otosclerosis

Locus (OMIM)	Localización	Gen (OMIM)	Referencia
OTSC1	15q26.1-qter	Desconocido	Tomek et al, 1998
OTSC2	7q34-q36	Desconocido	Van den Bogaert et al, 2001
OTSC3	6p21.3-22.3	Desconocido	Chen et al, 2002
OTSC4	16q21-23.2	Desconocido	Brownstein et al, 2006
OTSC5	3q22-q24	Desconocido	Van den Bogaert et al, 2004
OTSC6	Reservado		
OTSC7	6q13-16.1	Desconocido	Thys et al, 2007
OTSC8	9p13.1-9q21.11	Desconocido	Bel Hadj Ali et al, 2008

fino de estas regiones ha permitido identificar varios SNPs en el gen RELN³⁰. Este gen codifica reelina, una proteína que regula la migración neuronal en el desarrollo cerebral, pero su papel en el desarrollo de la otosclerosis no es conocido. Estos hallazgos se han observado también en la población de Túnez no europea³¹, lo que confirma al gen RELN como un gen clave asociado a la otosclerosis esporádica.

Presbiacusia

La pérdida de audición asociada a la edad tiene un componente hereditario que se ha estimado entre el 40-50% y se trata de una enfermedad genética compleja donde muchas variantes alélicas protectoras y de riesgo determinan el perfil individual de riesgo frente a la exposición a agentes medioambientales como la exposición al ruido. Este modelo se basa en la hipótesis de que una parte significativa de la herencia se debe al efecto aditivo de muchas variantes alélicas que son comunes en la población. El estudio de la hipoacusia asociada a la edad se ha beneficiado de la evolución en las tecnologías de genotipado y secuenciación que ha permitido analizar grandes cohortes de pacientes. En 2009, se publicó un GWAS que se realizó en 846 pacientes y 846 controles seleccionados de 3.434 individuos europeos con hipoacusia asociada a la edad, procedentes de 6 países, mediante un *chip* con 506.627 SNPs. Se identificó un *locus* de susceptibilidad, rs11928865 en el gen GRM7, que fue replicado en población centroeuropea y en finlandeses^{32,33}. El mapeo fino de una región de 400 kb del gen GRM7 alrededor de rs11928865 éste permitió de terminar que el posible alelo responsable de la presbiacusia se sitúa dentro de una región de 150 kb en el exon 2 del gen GRM7. Este gen codifica un receptor metabotrópico de glutamato (mGluR), que se expresa en el oído interno. Mediante inmunohistoquímica se localizó que el receptor se expresa en el epitelio sensorial del órgano de Corti, en las células ciliadas vestibulares y en las neuronas del ganglio espiral en ratones. En humanos, la expresión se demostró en células ciliadas externas e internas, el limbo espiral, fibrocitos tipo II del ligamento espiral y neuronas del ganglio espiral³².

Los mGluR se activan por L-glutamato y junto con proteínas G, activa segundos mensajeros que modulan la excitabilidad neuronal y la respuesta sináptica. El receptor mGluR7 está unido al enzima adenilato-ciclasa y su activación reduce los niveles de AMPc, lo que inhibe la liberación de Glu de la sinapsis³⁴. La neurotoxicidad por Glu se ha implicado en varias formas de hipoacusia progresiva como el traumatismo sonoro, la presbiacusia y la enfermedad de

Meniere. El receptor mGluR7 reduce la liberación de Glu y es posible que variantes alélicas de este receptor modifiquen la autoregulación en la sinapsis entre la célula ciliada interna y la neurona auditiva.

Enfermedad de Meniere

Diversos estudios han intentado identificar los factores genéticos asociados a la enfermedad de Meniere mediante estudios de casos y controles o la secuenciación de genes candidatos seleccionados. Entre estos genes se encuentran *antiquitin*³⁵, *aquaporina 2*³⁶, el gen *COCH (coagulation factor C homology)*²³, genes de canales de potasio (*KCNE1* y *KCNE3*)³⁷, genes de HLA *declassa II*^{38,39}, gen *aducina-alfa*⁴⁰, *heat-shock protein 70*⁴¹ and *PTPN22*⁴². Sin embargo, ninguno de estos genes ha sido replicado en otra cohorte de casos con enfermedad de Meniere en una población independiente⁴³⁻⁴⁵.

Actualmente se ha formado un consorcio internacional denominado GENOMEN, para iniciar un GWAS en 2.000 adultos con enfermedad de Meniere de origen europeo, e identificar marcadores genéticos de la enfermedad.

Medicina preventiva personalizada

El conocimiento de la secuencia del genoma humano ha acelerado de forma significativa la investigación biomédica, mejorando nuestra comprensión de las bases biológicas de las enfermedades hereditarias⁴⁶. La secuenciación del genoma completo de un individuo va a permitir la conocer *a priori* la susceptibilidad que va a tener una persona para el desarrollo de la mayoría de las enfermedades comunes, incluyendo el riesgo de hipoacusia. El coste de la secuenciación del genoma se reducirá en los próximos 3-5 años, facilitando su aplicación diagnóstica. De esta forma, la medicina preventiva de los próximos años estará basada en un perfil de riesgo individualizado y cada paciente tendrá un programa de salud personalizado a lo largo de su vida. Así, sabremos el riesgo individual para un determinado paciente de desarrollar otosclerosis, otitis media crónica o enfermedad de Meniere, lo que tendrá un impacto significativo sobre la utilización de los recursos sanitarios. En los próximos años, los programas de detección universales de hipoacusia serán reemplazados por el análisis genómico y programas de seguimiento clínico limitado a los niños con susceptibilidad genética.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado mediante el Proyecto AES PI10/00920 del Instituto de Salud Carlos III.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Available in: <http://hereditaryhearingloss.org>.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860–921.
3. The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001;409:928–33.
4. The International HapMap 3 Consortium. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*. 2010;467:52–8.
5. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291:1304–51.
6. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431:931–45.
7. Hannan AJ. TRPing up the genome: tandem repeat polymorphisms as dynamic sources of genetic variability in health and disease. *Discov Med*. 2010;10:314–21.
8. Hancock JM, Simon M. Simple sequence repeats in proteins and their significance for network evolution. *Gene*. 2005;345:113–8.
9. Orr HT, Zoghbi HY. Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci*. 2007;30:575–621.
10. Gázquez I, López-Escámez JA, Moreno A, Campbell CA, Meyer NC, Carey JP, et al. Functional variants in NOS1 and NOS2A are not associated with progressive hearing loss in Meniere's disease in an European Caucasian population. *DNA Cell Biol* 2011. May 25. [Epub ahead of print] PMID: 21612410.
11. McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1950;36:344–55.
12. Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet*. 2002;3:370–9.
13. Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, et al. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome*. 2006;16:949–61.
14. Hemminki K, Lorenzo Bermejo J, Forsti A. The balance between heritable and environmental aetiology of human disease. *Nature Rev Genet*. 2006;7:958–65.
15. Petronis A. Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature*. 2010;465:721–8.
16. Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977;74:5463–7.
17. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*. 2008;24:133–41.
18. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008;456:53–9.
19. Okou DT, Steinberg KM, Middle C, Cutler DJ, Albert TJ, Zwick ME. Microarray-based genomic selection for high-throughput resequencing. *Nature Methods*. 2007;4:907–9.
20. Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS, Taylor KR, Gurrola 2nd J, Scherer S, et al. Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:21104–9.
21. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*. 2002;3:391–7.
22. Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, Boerwinkle E, Hunter DJ, Thomas G, et al., NCI-NHGRI Working Group on Replication in Association Studies. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature*. 2007;447:655–60.
23. Franssen E, Verstreken M, Verhagen WI, Wuyts FL, Huygen PL, D'Haese P, et al. High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. *Hum Mol Genet*. 1999;8:1425–9.
24. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science*. 1994;265:2037–48.
25. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. Genome-wide association studies for complex traits: Consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet*. 2008;9:356–69.
26. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA*. 2008;299:1335–44.
27. Casselbrant ML, Mandel EM. Genetic susceptibility to otitis media. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5:1–4.
28. Rye MS, Wiertsema SP, Scaman ES, Oommen J, Sun W, Francis RW, et al. FBXO11, a regulator of the TGFβ pathway, is associated with severe otitis media in Western Australian children. *Genes Immun*. 2011. Feb 3 [Epub ahead of print] PMID: 21293382.
29. Hardisty-Hughes RE, Tateossian H, Morse SA, Romero MR, Middleton A, Tymowska-Lalanne Z, et al. A mutation in the F-box gene, Fbxo11, causes otitis media in the Jeff mouse. *Hum Mol Genet*. 2006;15:3273–9.
30. Schrauwen I, Ealy M, Huentelman MJ, Thys M, Homer N, Vanderstraeten K, et al. A genome-wide analysis identifies genetic variants in the RELN gene associated with otosclerosis. *Am J Hum Genet*. 2009;84:328–38.
31. Khalfallah A, Schrauwen I, Mnaja M, Franssen E, Lahmar I, Ealy M, et al. Genetic variants in RELN are associated with otosclerosis in a non-European population from Tunisia. *Ann Hum Genet*. 2010;74:399–405.
32. Friedman RA, Van Laer L, Huentelman MJ, Sheth SS, Van Eyken E, Corneveaux JJ, et al. GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Hum Mol Genet*. 2009;18:785–96.
33. Van Laer L, Huyghe JR, Hannula S, Van Eyken E, Stephan DA, Mäki-Torkko E, et al. A genome-wide association study for age-related hearing impairment in the Saami. *Eur J Hum Genet*. 2010;18:685–93.
34. Makoff A, Pilling C, Harrington K, Emson P. Human metabotropic glutamate receptor type 7: molecular cloning and mRNA distribution in the CNS. *Brain Res*. 1996;40:165–70.
35. Lynch M, Cameron TL, Knight M, Kwok TY, Thomas P, Forrest SM, et al. Structural and mutational analysis of antiqutin as a candidate gene for Meniere disease. *Am J Med Genet*. 2002;110:397–9.
36. Mhatre AN, Jero J, Chiappini I, Bolasco G, Barbara M, Lalwani AK. Aquaporin-2 expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Meniere's disease. *Hear Res*. 2002;170:59–69.
37. Doi K, Sato T, Kuramasu T, Hibino H, Kitahara T, Horii A, et al. Meniere's disease is associated with single nucleotide polymorphisms in the human potassium channel genes, KCNE1 and KCNE3. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2005;67:289–93.
38. Koo JW, Oh SH, Chang SO, Park MH, Lim MJ, Yoo TJ, et al. Association of HLA-DR and type II collagen autoimmunity with Meniere's disease. *Tissue Antigens*. 2003;61:99–103.
39. López-Escámez JA, Vilchez JR, Soto-Varela A, Santos-Perez S, Perez-Garrigues H, Aran I, et al. HLA-DRB1*1101 allele may be

- associated with bilateral Meniere's disease in southern european population. *Otol Neurotol.* 2007;28:891–5.
40. Teggi R, Lanzani C, Zagato L, Delli Carpini S, Manunta P, Bianchi G, et al. Gly460Trp alpha-adducin mutation as a possible mechanism leading to endolymphatic hydrops in Meniere's syndrome. *Otol Neurotol.* 2008;29:824–8.
 41. Kawaguchi S, Hagiwara A, Suzuki M. Polymorphic analysis of the heat-shock protein 70 gene (HSPA1A) in Menière's disease. *Acta Otolaryngol.* 2008;128:1173–7.
 42. López-Escámez JA, Sáenz-López P, Acosta L, Moreno A, Gazquez I, Perez-Garrigues H, et al. Association of a functional polymorphism of PTPN22 encoding a lymphoid protein phosphatase in bilateral Meniere's disease. *Laryngoscope.* 2010;120:103–7.
 43. Usami S, Takahashi K, Yuge I, Ohtsuka A, Namba A, Abe S, et al. Mutations in the COCH gene are a frequent cause of autosomal dominant progressive cochleo-vestibular dysfunction, but not of Meniere's disease. *Eur J Hum Genet.* 2003;11:744–8.
 44. Sánchez E, López-Escámez JA, López-Nevot MA, López-Nevot A, Cortés R, Martín J. Absence of COCH mutations in patients with Meniere disease. *Eur J Hum Genet.* 2004;12:75–8.
 45. Campbell CA, Della Santina CC, Meyer NC, Smith NB, Myrie OA, Stone EM, et al. Polymorphisms in KCNE1 or KCNE3 are not associated with Ménière disease in the caucasian population. *Am J Med Genet Part A.* 2010;152A:67–74.
 46. Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature.* 2011;470:187–203.