

Lavori originali

LE IPOACUSIE GENETICHE: STUDIO CLINICO E MOLECOLARE IN UNA CASISTICA DI 164 PAZIENTI

L. GARAVELLI¹, S. ERRICO¹, E. GUARESCHI¹, F. MONTI¹, G. ALBERTINI¹, G. CASELLI¹,
P. FORMIGONI², G. BIANCHINI², N. VINSANI¹, M. C. MENOZZI¹, S. LOSI¹, P. PRIMIGNANI³,
M. BARBARESI⁴, L. PERRONI⁴, S. MELCHIONDA⁵, D. CUDA⁶, F. NICOLI⁷, G. F. CROCI⁸, G. BANCHINI¹,
F. BALLI⁹, D. COVIELLO³, S. AMARRI¹

¹Struttura Semplice di Genetica Clinica e Day-Hospital - Struttura Complessa di Pediatria, Arcispedale S. Maria Nuova, Reggio E.

²Struttura Complessa di Otorinolaringoiatria, Arcispedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia

³Laboratorio di Genetica, Ospedale Maggiore Mangiagalli e Regina Elena, Milano

⁴Laboratorio di Genetica Umana, Ospedali Galliera, Genova

⁵Servizio di Genetica Medica, IRCCS, Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza, S. Giovanni Rotondo (FG)

⁶Struttura Complessa di Otorinolaringoiatria, Ospedale di Piacenza

⁷Dipartimento di Diagnostica per Immagini, Arcispedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia

⁸Laboratorio di Genetica, Arcispedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia

⁹Clinica Pediatrica, Dipartimento Materno-Infantile, Università di Modena e Reggio Emilia

RIASSUNTO

La prevalenza approssimativa dell'ipoacusia genetica è stata calcolata pari a 1 su 1000. La diagnosi, la valutazione ed il trattamento precoci della sordità infantile sono essenziali per la normale crescita del bambino: da una diagnosi eziologica corretta derivano grandi vantaggi in senso riabilitativo e di prevenzione delle complicanze; inoltre si hanno vantaggi anche per la famiglia, alla quale si potrà offrire un'adeguata consulenza genetica. La valutazione eziologica delle ipoacusie neurosensoriali rimane ancora difficile, ma può divenire più efficiente con l'applicazione di un protocollo diagnostico sistematico e con il progresso della genetica. In questo studio si è studiata l'eziologia della sordità neurosensoriale in 164 pazienti ipoacusici. Il protocollo diagnostico include anamnesi ed esame obiettivo dettagliati e successivamente esami di laboratorio, strumentali e molecolari. Le ipoacusie genetiche rappresentano il 61% del totale, le forme acquisite il 18%, mentre le criptogenetiche il 21% del totale, in linea con la Letteratura. All'interno delle forme genetiche le NSSNHL rappresentano il 48% (29% del totale delle ipoacusie), mentre le sindromi genetiche, tra cui le più rappresentate sono le sindromi di Waardenburg, costituiscono il 52% (32% del totale). Questi dati dimostrano che l'applicazione di un protocollo clinico è molto utile per la diagnosi delle forme sindromiche e per

selezionare accertamenti molecolari mirati.

Parole chiave: Ipoacusie Genetiche, Ipoacusie Infantili, Connessione, 35delG, Consulenza Genetica

GENETIC DEAFNESS: CLINICAL AND MOLECULAR STUDY ON A POPULATION OF 164 PATIENTS

ABSTRACT

The approximate prevalence of genetic deafness has been calculated as 1 per 1000. Early diagnosis, evaluation and treatment of childhood deafness are essential for a child's normal growth: from a correct etiological diagnosis derive great benefits both from the point of view of rehabilitation and as regards the prevention of complications; moreover there are advantages for the family too, to whom it is possible to offer appropriate genetic counselling. Etiological assessment of sensorineural deafness still remains difficult, but can become more efficient with the application of a systematic diagnostic protocol and the progress of genetics. In this study, the etiology of sensorineural hearing loss has been studied in 164 hearing impaired patients. The diagnostic protocol includes detailed anamnesis and physical examination, and afterwards laboratory, instrumental and molecular tests. The total group included 82

males and 82 females. Most ages at the first suspected diagnosis are variously included in the first 3 years of life. The ages at the first access ranged from a few months to 45 years. Genetic deafness represent 61% of all cases, acquired forms number 18% and cryptogenetic forms make up 21%, in line with the literature. NSSNHL represent 48% of genetic forms (29% of all forms of deafness), while syndromic deafness, the most frequent of which are the Waardenburg syndromes, account for 52% (32% of the whole). These data show that the application of a clinical protocol is very helpful for diagnosis of syndromic forms and to select targeted molecular tests.

Key words: Genetic Deafness, Children's Deafness, Connexin, 35delG, Genetic Counselling

INTRODUZIONE

L'ipoacusia è il più frequente deficit degli organi di senso nell'uomo. Un bambino su 1000 nasce con un'ipoacusia grave o profonda ed un altro soggetto su 1000 diventa ipoacusico prima di diventare adulto. Recenti pubblicazioni nell'ambito della genetica umana e molecolare indicano che il 60-70% dei casi di ipoacusia congenita è di origine genetica e che l'ipoacusia neurosensoriale non sindromica (NSSNHL) è principalmente autosomica recessiva. Dal 1994, 85 loci per la NSSNHL sono stati identificati e 39 differenti geni sono stati clonati fino ad oggi (1-3). Nonostante la grande eterogeneità genetica, un singolo locus in 13q12 è stato riconosciuto essere coinvolto in una larga proporzione di casi di ipoacusia non sindromica autosomica recessiva (DFNB1, MIM #220290) e il gene che codifica per la connessina 26, GJB2, è stato identificato come causativo della DFNB1 (4-6). Come per le forme non sindromiche, esiste una grande eterogeneità genetica anche per le forme sindromiche e il genetista clinico svolge un ruolo di primo piano nella definizione diagnostica e nella strategia che porta alla scelta delle indagini necessarie, ma per un corretto iter diagnostico è necessaria la collaborazione di molte figure professionali, con integrazione tra specialisti di varie discipline e percorsi di tipo laboratoristico e strumentale in continua evoluzione tecnologica (7-8).

MATERIALI E METODI

La popolazione in studio è composta da 164 pazienti, prevalentemente in età pediatrica giunti presso la Struttura

Complessa di ORL per programmare un impianto cocleare e/o inviati presso la Struttura Semplice di Genetica Clinica per una valutazione eziologica dell'ipoacusia. I pazienti sono giunti alla nostra osservazione negli anni dal 1993 al 2006.

È stato applicato un protocollo diagnostico che comprende l'anamnesi prenatale, perinatale e postnatale, con valutazione di età e circostanze del primo sospetto di ipoacusia, lo studio del linguaggio, la raccolta dell'albero genealogico, un accurato esame obiettivo, la programmazione delle seguenti indagini di laboratorio e strumentali, con possibili variazioni valutate caso per caso sulla base della clinica: esame urine, TORCH, FT3, FT4, TSH, ecografia tiroidea, ecografia renale, ECG, visita oculistica, valutazione audioimpedenzometrica, ABR, TAC e MRI per orecchio medio e interno. L'iter di svolgimento dei test molecolari, valutato sempre sulla base della clinica, nelle forme non sindromiche è stato il seguente: 1) analisi molecolare di GJB2 2) ricerca delle delezioni di GJB6 3) ricerca delle principali mutazioni mitocondriali A1555G e A7445G. Nel sospetto di una forma sindromica sono state proposte le indagini molecolari finora disponibili (geni PAX3, MITF, EYA1, COL2A1, COL11A1, COL11A2, SLC26A4, MID1, CHD7, FISH per 22q11).

RISULTATI

I 164 soggetti sono composti da 82 maschi ed 82 femmine; questo dato non è stato un criterio di selezione del campione ma una casualità. L'età al primo sospetto e/o diagnosi di ipoacusia è alquanto variabile: la maggior parte delle età di insorgenza sono variamente distribuite nei primi 3 anni di vita. Vi è qualche caso di ipoacusia esordita in età adolescenziale o addirittura nella prima età adulta (Tabella 1).

L'età di primo accesso in ambulatorio oscilla da un'età minima di pochi mesi (4 mesi per le sospette forme non sindromiche; 1 mese per 2 pazienti con sospetta Sindrome di Goldenhar) ad un massimo di 45 anni (Tabella 2).

Per quanto riguarda invece l'anno di primo accesso, l'afflusso di pazienti è andato progressivamente incrementando sino al 2002, per avere poi un successivo decremento dall'anno seguente. Alcuni dei soggetti osservati dal 1993 al 1999 si sono presentati successivamente per eseguire il test molecolare per le forme non sindromiche e/o per le forme sindromiche (Tabella 3).

Gli anni di maggior afflusso sono quelli in cui sono stati offerti su larga scala i test molecolari per i geni delle connessine (GJB2 e GJB6) e successivamente delle mutazioni

TABELLA 1

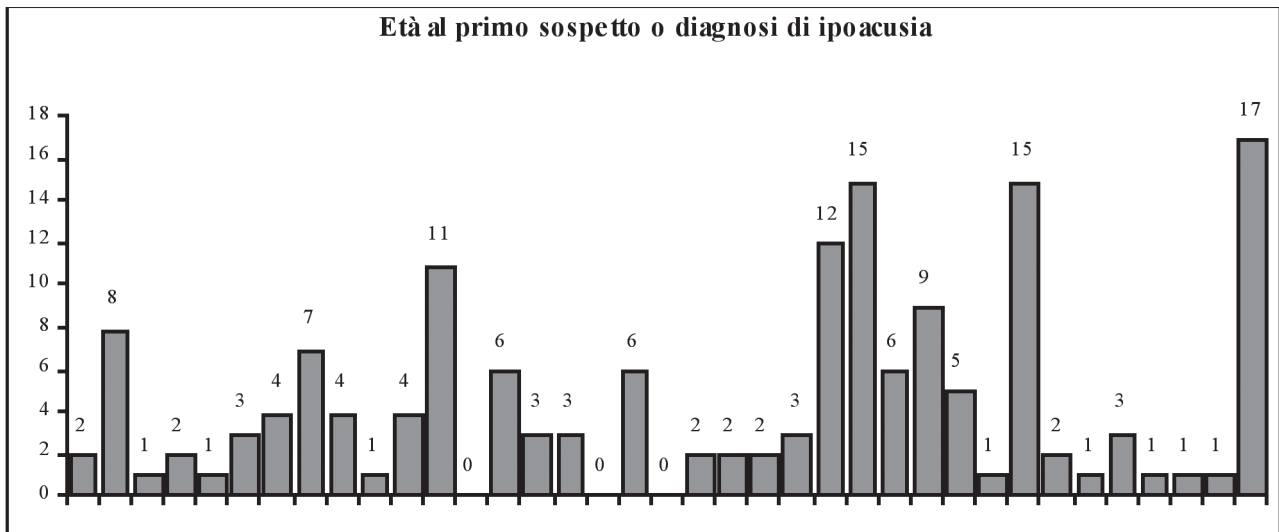


TABELLA 2

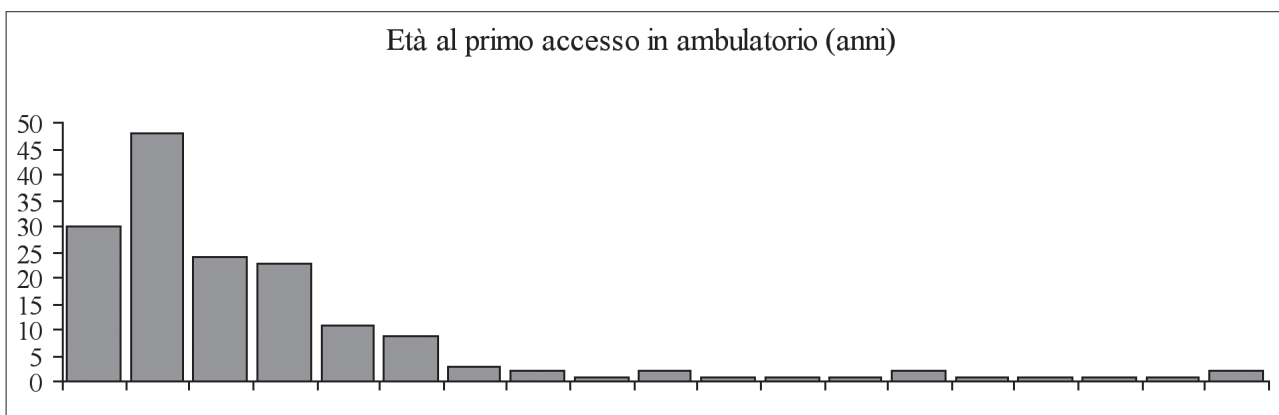


TABELLA 3

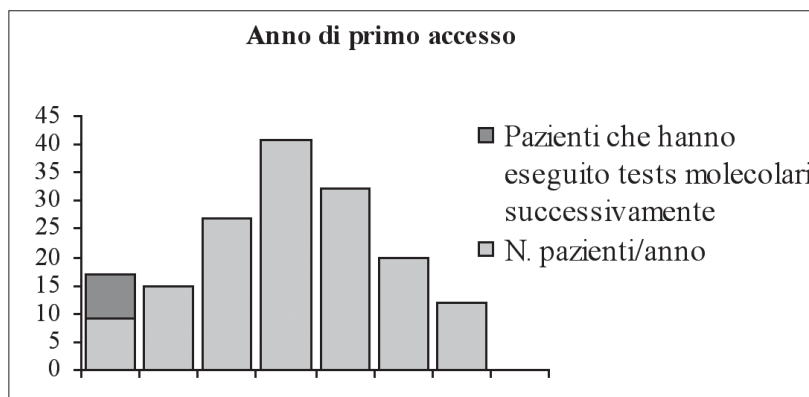


TABELLA 4

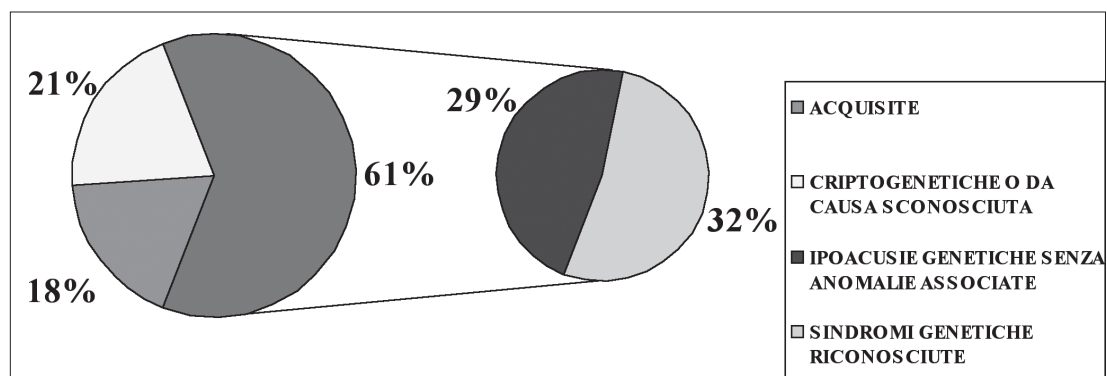


TABELLA 5

Eziologia dell'ipoacusia	Dereymaeker	Kiese-Himmel	Walch	Morzaria	Silan	Riga	Attuale
GENETICA	27,57%	34,2%	f. 18%	30,7%	62,90%	48%	60,98%
Non sindromica	23,77%	f. 15,9%	-	27,2%	44,90%	36%	29,27%
Sindromica	3,80%	18,3%	-	3,5%	18,00%	11%	31,71%
SCONOSCIUTA	27,09%	38,6%	44%	41,5%	17,63%	15%	20,73%
ACQUISITA	45,34%	27,3%	38%	27,8%	19,45%	38%	18,29%
Prenatale	18,46%	2,3%	7%	11,5%	2,18%	-	5,49%
Perinatale	12,15%	11,4%	20%	9,7%	1,46%	-	11,59%
Postnatale	14,73%	13,6%	11%	6,6%	15,81%	-	1,22%

mitocondriali (A1555G e A7445G).

Dall'analisi dei dati della popolazione studiata, le ipoacusie genetiche rappresentano il 61% del totale, le forme acquisite il 18%, mentre le criptogenetiche o da causa sconosciuta il 21% del totale, in linea con i dati della Letteratura. All'interno delle forme genetiche invece le NSSNHL rappresentano il 48% (29% del totale delle ipoacusie), mentre le sindromi genetiche, tra cui le più rappresentate sono le sindromi di Waardenburg, costituiscono il 52% (32% del totale) (Tabella 4).

Quest'ultimo dato, spiegabile in parte con la selezione dei pazienti inviati presso la Struttura Semplice di Genetica Clinica e confrontato con i principali studi della Letteratura (percentuali variabili dal 3,5%, all'11% al 18,3% sul totale delle ipoacusie) (7-12), dimostra peraltro che l'applicazione di un protocollo clinico è molto utile per

la diagnosi delle forme sindromiche e per selezionare accertamenti molecolari mirati (Tabella 5).

A seconda dell'eziologia, le ipoacusie sono state classificate in forme genetiche (61% del campione), forme acquisite (18%) e forme ad eziologia sconosciuta (21%). Nell'ambito delle forme genetiche, sono state rilevate 18 diverse Sindromi o anomalie genetiche, suddivise e studiate a seconda della modalità di trasmissione (Tabella 6).

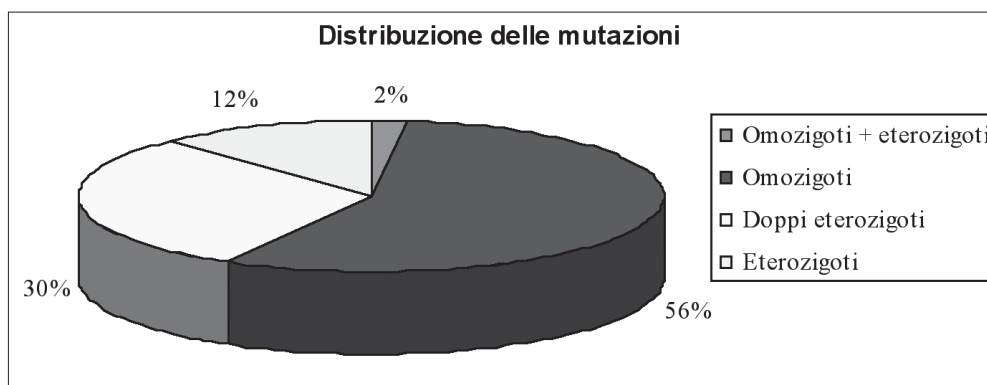
Il 42% dei soggetti esaminati, ha riportato alterazioni molecolari per i geni delle connessine. Di questi soggetti, il 2% sono omozigoti + eterozigoti, il 56% sono omozigoti, il 30% doppi eterozigoti (o eterozigoti composti) ed il 12% eterozigoti (Tabella 7).

Le mutazioni riscontrate sono tutte autosomiche recessive e coinvolgono esclusivamente il gene GJB2 della connessina 26; salvo una sola delezione del gene GJB6 della connessina 30, presente in doppia eterozigosi con

TABELLA 6

Eziologia dell'ipoacusia	Sospetto/Diagnosi clinica	Conferma molecolare
GENETICA	100 (60,98%)	
NON SINDROMICA	48 (29,27%)	48
SINDROMICA	52 (31,71%)	
<u>Sindromica AD</u>	21 (12,80%)	
Sindrome di Waardenburg	13 (7,93%)	4
<i>Sindrome di Waardenburg di tipo I</i>	5 (3,05%)	3
<i>Sindrome di Waardenburg di tipo II</i>	8 (4,88%)	1
Sindrome BOR (branchio-oto-renale)	1 (0,61%)	0
Sindrome di Stickler	2 (1,22%)	Test in corso
Piebaldismo forma AD	1 (0,61%)	No test
Sindrome da delezione Cr.22 (del22q11)	3 (1,83%)	2
Sindrome Oculo-dento-digitale	1 (0,61%)	Test in corso
<u>Sindromica AR</u>	13 (7,93%)	
Sindrome di Pendred	7 (4,27%)	2
Sindrome di Usher	5 (3,05%)	No test
Sindrome MCA/MR non precisata	1 (0,61%)	No test
<u>Sindromica X-Linked</u>	1 (0,61%)	
Sindrome di Opitz G/BBB	1 (0,61%)	Test in corso
<u>Altre Sindromi ed anomalie congenite</u>	17 (10,37%)	
Sindrome di Wildervanck	1 (0,61%)	Test in corso
Sindrome di Goldenhar	6 (3,66%)	No test
Sindrome di Myhre	1 (0,61%)	No test
Otosclerosi	1 (0,61%)	No test
Associazione CHARGE	2 (1,22%)	Test in corso
Microtia	3 (1,83%)	No test
Microcefalia	2 (1,22%)	No test
Labiopalatoschisi	1 (0,61%)	No test
SCONOSCIUTA (CRIPTOGENETICA)	34 (20,73%)	-
PRENATALE	9 (5,49%)	
INFEZIONI CONGENITE	9 (5,49%)	
<u>Rosolia</u>	3 (1,83%)	
<u>Cytomegalovirus (CMV)</u>	3 (1,83%)	-
<u>Toxoplasma</u>	1 (0,61%)	
Altri	2 (1,22%)	
PERINATALE	19 (11,59%)	
SEPSI NEONATALE	1 (0,61%)	
SOFFERENZA PERINATALE	4 (2,44%)	
<u>Sofferenza fetale acuta</u>	1 (0,61%)	
<u>Giri di funicolo attorno al collo</u>	1 (0,61%)	-
<u>Oligoidramnios</u>	2 (1,22%)	
PREMATURITÀ	14 (8,54%)	
POSTNATALE	2 (1,22%)	
MENINGITE	2 (1,22%)	-

TABELLA 7



una delezione 167delT (Tabella 8).

Secondo la Letteratura, la mutazione più frequente nella popolazione caucasica è la 35delG del gene della connesina 26^[4,5,6]; il presente studio conferma tale dato, poiché la mutazione maggiormente riscontrata è appunto 35delG, la quale ha una frequenza allelica del 69,5%.

Inoltre, un recente studio multicentrico terminato nel 2005^[13], afferma che le mutazioni autosomiche recessive dei geni delle connesine causano ipoacusie più severe rispetto alle mutazioni autosomiche dominanti; la severità varia a seconda della presenza di mutazioni in eterozigosi o in omozigosi, quindi i pazienti omozigoti dovrebbero presentare le forme di ipoacusia più gravi. Si è quindi condotto uno studio analogo nella popolazione risultata positiva per mutazioni dei geni delle connesine ed i dati ottenuti confermano la Letteratura (Tabella 9): tutti i pazienti anacusici hanno mutazioni in omozigosi. I pazienti con omozigosi non-35delG riportano un'ipoacusia profonda. Per i doppi eterozigoti, vi è una distribuzione verso forme di ipoacusia più lievi (alcuni di essi presentano infatti una ipoacusia medio – grave), pur avendo la maggior parte di essi un'ipoacusia profonda. Contrariamente a quanto atteso, non vi sono soggetti eterozigoti con ipoacusia medio – grave, ma ciò è probabilmente dovuto allo scarso numero di soggetti eterozigoti nel campione. Analogamente ci si sarebbe attesa un'ipoacusia profonda, se non addirittura un'anacusia, nel soggetto che presenta sia una mutazione in omozigosi che un'alterazione in eterozigosi; ma per poter correttamente valutare l'ipoacusia in questo soggetto, bisognerebbe confrontarlo con altri aventi le stesse associazioni alleliche.

TABELLA 8

OMOZIGOTI + ETEROZIGOTI	1
L90P/L90P + delE120	1
OMOZIGOTI	28
35delG/35delG	26 (2 fratelli; 2 sorelle)
W24X/W24X	2 (2 sorelle)
DOPPI ETEROZIGOTI	15
35delG/W133X	2
35delG/E47X	2
35delG/-3170G A	2
35delG/35insG	2 (2 fratelli)
35delG/delE120	1
35delG/V95M	1
35delG/R184W	1
35delG/290-291insA	1
35delG/L90P	1
35delG/A40G	1
167delT/del(GJB6-D13S1830)	1
ETEROZIGOTI	4
W133X	1
167delT	1
V156I (non segnalata in Letteratura)	1
G224A (non segnalata in Letteratura)	1

CONCLUSIONI

I dati ottenuti dal presente studio confermano i dati della Letteratura mondiale.

La diminuita frequenza delle forme di ipoacusia ad eziologia sconosciuta che si è osservata confrontando gli altri studi riflette probabilmente l'uso incrementato dei test molecolari.

L'ipoacusia genetica non sindromica è estremamente eterogenea; la maggior parte delle mutazioni genetiche AR si trovano nel gene GJB2 sito sul cromosoma 13, implicato nella produzione della proteina connessina 26. Le mutazioni AR di questo gene sono responsabili di circa la metà delle ipoacusie non sindromiche; la mutazione più comune è la 35delG. La misura relativamente piccola del gene della connessina 26 e l'esistenza di mutazioni più comuni facilitano il test genetico. La presenza delle mutazioni di GJB2 in omozigosi determina un'ipoacusia neurosensoriale bilaterale da severa a profonda.

L'infezione congenita è un'eziologia meno comune rispetto agli studi precedenti, e questo declino è verosimilmente dovuto alla maggior prevenzione e cura durante la gravidanza. La maggior parte delle ipoacusie acquisite si sono verificate in epoca perinatale e sono dovute soprattutto alla prematurità.

La maggior parte delle ipoacusie infantili sono quindi genetiche (61%), in particolare sindromiche (32%), mentre le non sindromiche hanno minor prevalenza (29%). Le ipoacusie genetiche sono seguite da un'importante percentuale di ipoacusie criptogenetiche (21%), dalle ipoacusie insorte in epoca perinatale (12%), prenatale (5%) e postnatale (1%).

Lo studio attuale sottolinea quindi l'importanza dei test genetici specifici, soprattutto per le sospette ipoacusie non sindromiche (cx26, cx30 e mutazioni mitocondriali) per stabilire l'eziologia dell'ipoacusia neurosensoriale e mista nei bambini. Altrettanto importante è l'applicazione sistematica di un protocollo che preveda una valutazione clinica accurata, perché è dalla clinica che deve scaturire la diagnostica differenziale di queste condizioni così eterogenee anche dal punto di vista genetico.

Da una diagnosi corretta derivano grandi vantaggi per il bambino, sia in senso riabilitativo che di prevenzione delle complicanze, ma anche per la famiglia, alla quale si potrà offrire un'adeguata consulenza genetica.

BIBLIOGRAFIA

1. Connexin and Deafness Homepage, <http://davinci.crg.es/deafness/>.
2. Hereditary Hearing Loss Homepage, <http://www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>.
3. Fischel-Ghodsian N. *Mitochondrial deafness mutations reviewed*. Hum Mutat. 1999; 13:261-70.
4. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N et al. *Connexin-26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans*. Hum Mol Genet. 1997; 9:1605-9.
5. Zlotogora J. *Deafness and mutations in the connexin 26 gene*. N Eng J Med. 1999; 340:1288.
6. Kenna MA, Wu B-L, Cotanche DA, Korf BR, Rehm HL. *Connexin 26 Studies in Patients With Sensorineural Hearing Loss*. Arch Otorhinolaryngol Head Neck Surg. 2001 127:1037-42.
7. Kiese-Himmel C, Schroff J, Kruse E. *Identification and diagnostic evaluation of hearing impairments in early childhood in German speaking infants*. Eur Arch Otorhinolaryngol. 1997; 254:133-9.
8. Walch C, Anderhuber W, Kole W, Berghold A. *Bilateral sensorineural hearing disorders in children: etiology of deafness and evaluation of hearing test*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2000; 53:31-8.
9. Dereymaeker AM, Fryns JP, Ars P, Andrescous J, Van den Berghe H. *On the etiology of hearing loss in a population of 155 institutionalized children*. Acta Otorhinolaryngol Belg. 1991; 45:283-91.
10. Morzaria S, Westerberg BD, Kozak FK. *Systematic review of the etiology of bilateral sensorineural hearing loss in children*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2004; 68:1193-8.
11. Riga M, Psarommatis I, Lyra Ch, Douniadakis D, Tsakanikos M, Neou P, Apostolopoulos N. *Etiological diagnosis of bilateral, sensorineural hearing impairment in a pediatric Greek population*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2005; 69:449-55.
12. Silan F, Demirci L, Egeli A, Egeli E, Onder HI, Ozturk O, Unal ZS. *Syndromic etiology in children at school for the deaf in Turkey*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2004; 68:1399-406.
13. Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J et al. *GJB2 Mutations and Degree of Hearing Loss: A Multicenter Study*. Am J Hum Genet. 2005; 77:945-57.

Corrispondenza a:

Dott.ssa Livia Garavelli, Struttura Complessa di Pediatria, Arcispedale S Maria Nuova, Viale Risorgimento n 80, 42100 Reggio Emilia
@mail: garavelli.livia@asmn.re.it