

## Producto 2.2

# Panel de genes GHELP (GHELP-OTOV02)

### PROYECTO GHELP

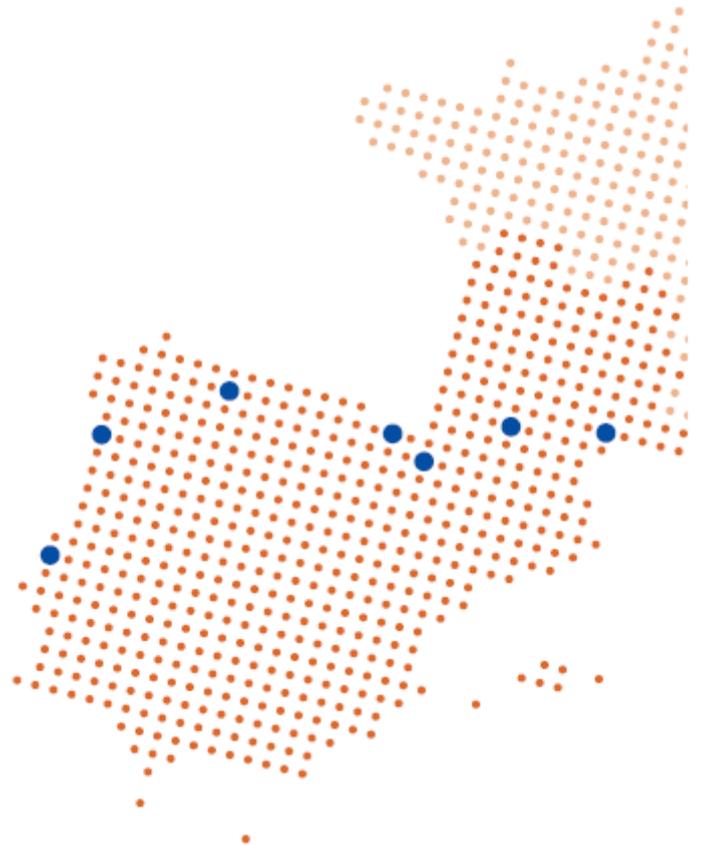
Impulsando la innovación en la detección precoz de la hipoacusia infantil en el espacio SUDOE: Hacia una medicina personalizada basada en herramientas genómicas de diagnóstico  
SOE2/P1/E0751



Universidad  
de Navarra



**biodonostia**  
osasun ikerketa institutua  
instituto de investigación sanitaria



Proyecto financiado por el Programa Interreg Sudoe  
a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)

## ÍNDICE

## Página

1. Introducción.....	2
2. Proceso de desarrollo del panel GHELP.....	3
3. Descripción del panel.....	5
4. Validación del panel: Estudios con población prospectiva y retrospectiva. Resultados.....	6
5. Sensibilidad del panel GHELP.....	10

## 1. INTRODUCCION

El presente documento tiene **como principal objetivo presentar públicamente uno de los principales productos desarrollados en el marco del proyecto GHELP y que es el panel de diagnóstico genético de la hipoacusia<sup>1</sup> GHELP** (referencia oficial GHELP-OTOV02).

**La pérdida de audición es un problema de salud pública** no solo por la repercusión que tiene en el desarrollo cognitivo, emocional, académico y social del niño, sino también, por los elevados costes que genera en los sistemas sanitarios. Epidemiológicamente, la hipoacusia afecta a 5 de cada 1.000 niños (OMS).

En el Sudoeste de Europa (en adelante, SUDOE) se estima que en 2014 hubo una población potencial afectada de 264.334 niños.

Los programas actuales de detección precoz de la hipoacusia infantil están basados en el uso de exploraciones audiométricas y no ofrecen un diagnóstico sobre su causa. Conocer esta causa, es clave para poder combatir la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los pacientes y de sus familias.

Aproximadamente, entre el 60-80% de las sorderas son genéticas. **La hipoacusia está causada principalmente por la alteración de un único o muy pocos genes, de manera que los test genéticos son muy útiles, tanto para su diagnóstico como para predecir su naturaleza, evolución y establecer tratamientos personalizados.** Además, estas pruebas evitan realizar otras más caras y prolongadas en el tiempo, suponiendo un ahorro de costes y aportando importantes ventajas para los pacientes.

A pesar de este potencial, hoy en día, no se dispone de herramientas genéticas validadas y los programas actuales de detección precoz universal de la hipoacusia infantil, aun no siendo 100% eficaces, no han sido mejorados en años.

En este contexto, **en abril de 2018, se pone en marcha GHELP, un proyecto de cooperación transnacional desarrollado por ocho entidades de siete regiones europeas con el reto común de innovar en el campo de la detección y diagnóstico precoz y el tratamiento de la hipoacusia: aunar conocimiento y tecnología para pasar de una medicina basada en el tratamiento de los síntomas a una medicina personalizada y dirigida a combatir la enfermedad.**

**El proyecto está cofinanciado por el [Programa Interreg SUDOE](#) de la Unión Europea**

Uno de los objetivos específicos del proyecto GHELP ha sido desarrollar y demostrar la utilidad de un panel genético de 180 genes ya relacionados clínicamente con la enfermedad y analizados mediante tecnología NGS<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> Pérdida de audición

<sup>2</sup> Next Generation Sequencing

Para más información a este respecto, emplazamos al lector a contactar con el Dr. Manuel Manrique Rodríguez, director del Departamento de Otorrinolaringología en la Clínica Universidad de Navarra y coordinador científico del proyecto GHELP y con el Dr. Gorka Alkorta Aramburu, genetista, especialista en tecnología NGS y codirector del área de Genética de tumores sólidos y hereditarios de CIMALAB diagnostics de la Clínica Universidad de Navarra (en adelante, CUN).

CIMA LAB Diagnostics es el laboratorio de diagnóstico genético y fenotípico integral de la CUN<sup>3</sup>.

## 2. PROCESO DE DESARROLLO DEL PANEL GHELP

El proceso de desarrollo del panel GHELP fue realizado por [CIMA LAB Diagnostics](#), centro ubicado en Pamplona, con amplia experiencia en el diseño de paneles genéticos de diagnóstico en colaboración con la empresa española [Dreamgenics](#), ubicada en Oviedo y que desarrolla herramientas bioinformáticas propias que ofrecen soluciones genómicas y bioinformáticas de calidad adaptados a las necesidades de cada proyecto como es el caso de las necesidades planteadas por el proyecto GHELP.

El **primer paso** que dio CIMA LAB Diagnostics para el desarrollo del panel fue una **selección inicial de los genes** a incluir en el panel tras una exhaustiva investigación documental, que permitió identificar aquellos genes cuya relación con la hipoacusia es más sólida.

El procedimiento seguido para esta selección fue:

- 1) Revisión de información disponible para cada gen candidato tanto en bases de datos (*Human Gene Mutation Database, PubMed, OMIM, Orphanet*), como en documentos específicos, artículos científicos publicados o paneles comerciales ya disponibles.
- 2) Clasificación en base al fenotipo (sindrómico o no sindrómico) y al patrón de herencia (autosómica dominante, autosómica recesiva, ligada al cromosoma X o mitocondrial).
- 3) Determinación de los diferentes tipos de alteraciones que afectan a los genes (HGMD, Varsome, bases de datos específicas y PubMed);
- 4) Revisión de otros productos similares disponibles en otros centros, principalmente fuera de la Unión Europea.

---

<sup>3</sup> Número de Código Centro según el Registro General de centros, servicios y establecimientos sanitarios del Ministerio de Sanidad: 1531000733.

Basándose en su experiencia tanto en el diseño, como en la implementación de paneles de NGS, CIMA LAB Diagnostics siguió las mismas pautas y la misma metodología que utiliza habitualmente para el estudio de otras enfermedades constitucionales que se benefician de la buena calidad y cantidad de ácido nucleico extraídos de 5-10 ml de sangre en EDTA.

Primero, CIMA LAB Diagnostics y Dreamgenics diseñaron un set de sondas (GHELP-OTOv01) dirigidos a las regiones genómicas de interés. Tras la fabricación de las sondas de enriquecimiento de las regiones de interés por parte de Agilent, CIMA LAB Diagnostics realizó la primera validación técnica incluyendo la secuenciación de las regiones de interés con el equipo MiSeq de Illumina disponible en el laboratorio.



*Equipo MiSeq de Illumina utilizado*

Después, Dreamgenics analizó los resultados obtenidos que fueron buenos. Aun así, en una segunda fase, CIMA LAB Diagnostics cambió dos pasos claves del procesado de las muestras consiguiendo así mejorar la cobertura media de 250x a 429x.

Con estos datos, Dreamgenics identificó las regiones mejor y peor cubiertas del GHELP-OTOv01 donde se podrían redistribuir sondas para el desarrollo de un nuevo diseño (GHELP-OTOv02) de cara a obtener coberturas más uniformes. En una tercera tanda de procesado de muestras con las condiciones de la segunda fase se vio que la mejora era estable y, por tanto, se desarrolló un nuevo diseño (GHELP-OTOv02) que fue el diseño final del panel GHELP.

GHELP-OTOV02 fue validado bioinformáticamente por DREAMGenics. A tal fin, se utilizó la herramienta software Agilent Sure Design para el diseño insilico de las sondas de enriquecimiento.

El diseño final del panel GHELP-OTOv02 contiene 24239 sondas con un tamaño de 809,57kb. CIMALAB Diagnostics de la Universidad de Navarra solicitó a Agilent la síntesis de las sondas correspondientes con la tecnología SureSelect XT.

Recibidas las sondas sintetizadas, preparó y secuenció las librerías genómicas y envió los archivos FASTQ de secuencias a la empresa española DREAMgenics, socio del proyecto GHELP, para su análisis a través de un servidor FTP.

### 3. DESCRIPCIÓN DEL PANEL

El panel GHELP (GHELP- OTOV02) incluye todos los genes y todas las regiones genómicas que albergan las mutaciones descritas como responsables de hipoacusia hereditaria. El panel es capaz de identificar las mutaciones causadas por cambios únicos de nucleótidos (SNVs: single nucleotide variants), por inserciones y deleciones (InDels) y por variantes estructurales (SVs) o variaciones en el número de copias (CNVs).

El panel incluye 180 genes. De esos 180 genes, 9 (5%) están localizados en el ADN mitocondrial y 171 (95%) en el ADN nuclear. La mayoría, 99 (55%) presentan un patrón de transmisión autosómico recesivo, 40 (22,7%) autosómico dominante, 19 (10,5%) presentan ambos patrones, 9 (5%) herencia mitocondrial, 9 (5%) herencia ligada a X y 4 (2,2%) presentan otros tipos de herencia. Clínicamente, encontramos 92 (51,1%) genes responsables de hipoacusias no síndrómicas, 73 (40,55%) de hipoacusias síndrómicas y 15 (8,33%) genes que pueden desarrollar tanto hipoacusias síndrómicas como no síndrómicas.

El listado de los 180 genes de GHELP-OTOV02 es el siguiente:

ABHD12, ACTB, ACTG1, ACTG2, ADGRV1, AIFM1, ALMS1, ANKH, AP1S1, ATP1A3, ATP6V1B1, BCAP31, BCAP32, BCS1L, BDP1, BRAF, BSND, CABP2, CACNA1D, CATSPER2, CCDC50, CD164, CDC14A, CDH23, CEACAM16, CHD7, CIB2, CISD2, CLCNA, CLCNKB, CLDN14, CLIC5, CLPP, CLRN1, COCH, COL11A1, COL11A2, COL2A1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, COL9A1, COX1, CRYL1, CRYM, DCAF17, DCDC2, DDX11, DFNA5, DFNB31, DFNB59, DIABLO, DIAPH1, DIAPH3, DNMT1, ECHS1, EDN3, EDNRB, ELMOD3, EPS8, EPS8L2, ESPN, ESRRB, EYA1, EYA4, FGF3, FGFR3, FOXI1, FTO, GATA3, GIPC3, GJB2, GJB3, GJB6, GPSM2, GRHL2, GRXCR1, HARS2, HGF, HOMER2, HOXA1, HOXB1, HSD17B4, ILDR1, JAG1, KARS, KCNE1, KCNJ10, KCNQ1, KCNQ4, KITLG, LARS2, LHFPL5, LHX3, LOXHD1, LRP2, LRTOMT, MARVELD2, MASP1, MCM2, MIR96, MITF, MSRB3, MYH14, MYH9, MYO15A, MYO3A, MYO6, MYO7A, NARS2, NDP, NLRP3, OPA1, OSBPL2, OTOA, OTOF, OTOG, OTOGL, P2RX2, PAX3, PCDH15, PDZD7, PEX1, PEX2, PEX26, PEX3, PEX5, PEX6, PMP22, PNPT1, POU3F4, POU4F3, PRPS1, PTPN11, PTPRQ, RAF1, RDX, RMND1, RNR1, S1PR2, SERAC1, SERPINB6, SIX1, SIX5, SLC17A8, SLC19A2, SLC26A4, SLC26A5, SLC33A1, SLC52A2, SLC52A3, SLITRK6, SMPX, SNAI2, SOX10, SPATA5, STRC, SYNE4, TBC1D24, TECTA, TIMM8A, TJP2, TMC1, TMIE, TMPRSS3, TMPRSS5, TPRN, TRIOBP, TRNE, TRNH, TRNK, TRNL1, TRNS, TSPEAR, USH1C, USH1G, USH2A, WFS1, XYLT2

#### 4. VALIDACIÓN DEL PANEL: ESTUDIOS CON POBLACIÓN PROSPECTIVA Y RETROSPECTIVA. RESULTADOS

Para la validación clínica del panel GHELP, se realizó el análisis de aproximadamente 500 personas afectas de hipoacusia de causa no adquirida, divididas en dos grupos poblacionales y procedentes de las distintas regiones europeas participantes en el proyecto:

- Un grupo retrospectivo (GT1) formado por personas que han desarrollado la hipoacusia durante los primeros 18 años de vida y han concluido su diagnóstico y recibido tratamiento.
- Un grupo prospectivo (GT2) formado por niños estudiados en el cribado auditivo, y

La Figura 1 se describe el flujo de trabajo para los grupos retrospectivo y prospectivo. Como primer paso, se incluyeron aquellos sujetos que cumplían los criterios que se indican en la figura para ambos grupos.

A partir de dicho momento, se procedió a la firma del consentimiento informado, la recolección de datos clínicos, la extracción de la muestra de sangre y el envío de ambos elementos a CIMA LAB Diagnostics de la Universidad de Navarra para su análisis genético y posterior correlación con los rasgos fenotípicos.

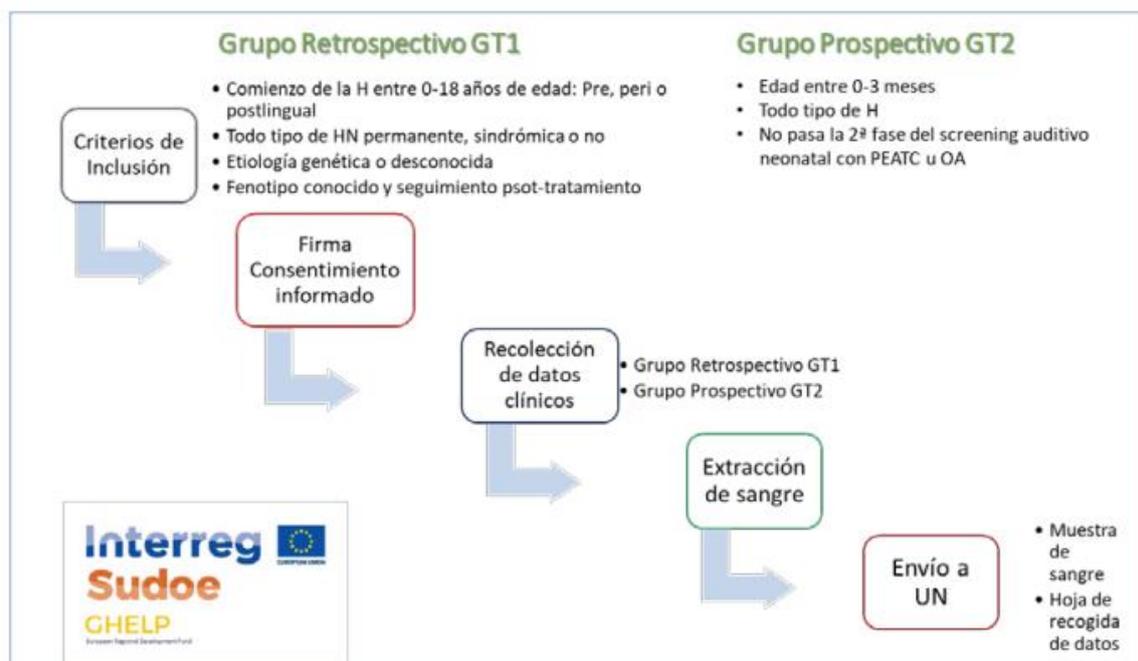


Figura 1: Esquema de flujo que muestra el proceso seguido desde la inclusión del sujeto hasta la recepción de las muestras para análisis genético

La comparación entre los resultados del GT1 y GT2 permite determinar los rasgos clínicos causados por una determinada mutación genética. Esta información es determinante para llegar a un diagnóstico etológico y preciso, con gran precocidad, lo que facilitará establecer un tratamiento precoz y personalizado. Metodológicamente, como se indica en la Figura 2, utilizamos los datos clínicos recogidos en el grupo retrospectivo del GT1 para correlacionarlos con los resultados del estudio genético, obtenidos en los grupos retrospectivo y prospectivo del GT1 y GT2.

Por otra parte, los resultados de esta correlación han permitido establecer los niveles de sensibilidad del panel GHELP y además, facilitarán la introducción de mejoras en los protocolos de los programas de detección de la hipoacusia, cuyos rasgos se han recogido en la hoja de recogida de datos del grupo prospectivo del GT2.

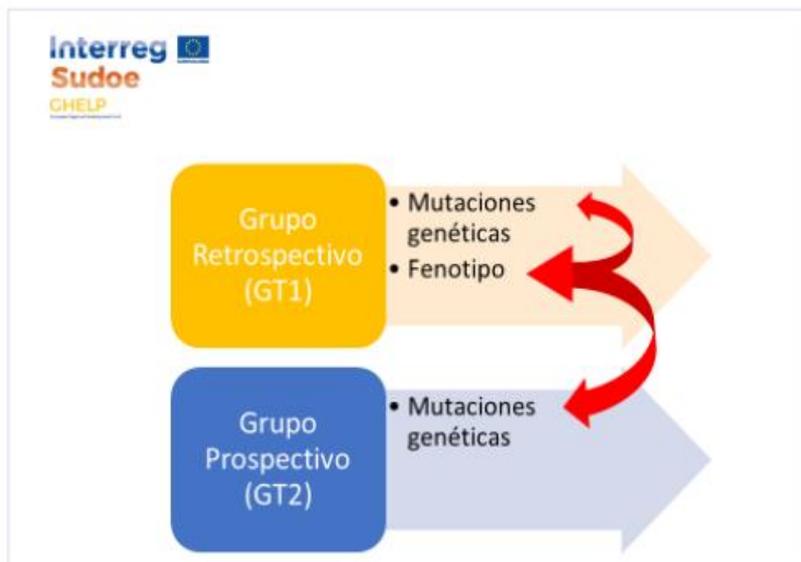


Figura 2: Planteamiento metodológico para comparar los resultados del GT1 Y GT2

#### Muestras y sujetos reclutados<sup>4</sup>:

En total, se han reclutado 493 sujetos, de los cuales 431 pertenecían al grupo retrospectivo y 62 al prospectivo.

<sup>4</sup> Para más información sobre los datos clínicos de los sujetos incluidos en los Grupos Retrospectivo y Prospectivo, referimos al lector a que contacte con las personas indicadas en la introducción del presente documento o consulte la web [www.ghelp.eu](http://www.ghelp.eu)

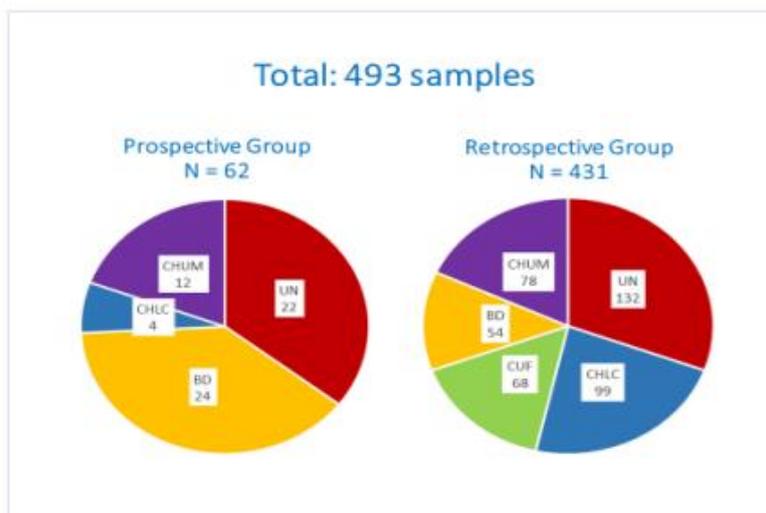


Figura 3: Número de muestras recogidas por cada centro participante : UN - Universidad de Navarra (España), BD - Biodonostia (España), CUF Hospital- CUF Porto (Portugal), CHLC- Centro Hospitalar Lisboa Central (Portugal), CHUM-T Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier (Francia) y Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse (Francia)

### Resultados del análisis genético con el panel GHELP clasificados según el grado de significado patológico<sup>5</sup>:

En 153 pacientes estudiados en la Universidad de Navarra (UN), se encontraron 1789 variantes genéticas en 169 genes de los 180 genes incluidos en el panel. Las variantes se clasificaron en: tipo 1 benigna, tipo 2, probablemente benigna, tipo 3 de significado incierto, tipo 4 probablemente patogénica y tipo 5 patogénica (*Richards, et al. 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. Genet Med 2015;17(5):405-24*)

De las 1789 variantes genéticas, 1250 (67,4%) son del tipo 1 y 2, 467 (26,1%) son de tipo 3 y 116 (6,5%) de tipos 4 y 5. En la Figura 4 se detallan los genes identificados con variantes genéticas en los 153 pacientes, clasificados por colores según el tipo de variante. De los 153 pacientes estudiados en UN, 50 presentaron un diagnóstico genético de certeza que explica su hipoacusia debido a la identificación de variantes patogénicas en 14 genes, tal y como se detalla en la Figura 5

<sup>5</sup> Para más información sobre los datos clínicos de los sujetos incluidos en los Grupos Retrospectivo y Prospectivo, referimos al lector a que contacte con las personas indicadas en la introducción del presente documento o consulte la web [www.ghelp.eu](http://www.ghelp.eu)

Nota aclaratoria: Datos UN: Numero de muestras 154. Pacientes 153. Estas cifras no coinciden porque de un paciente se recibieron dos muestras y se mantuvo en el análisis los datos de la muestra de mayor calidad.

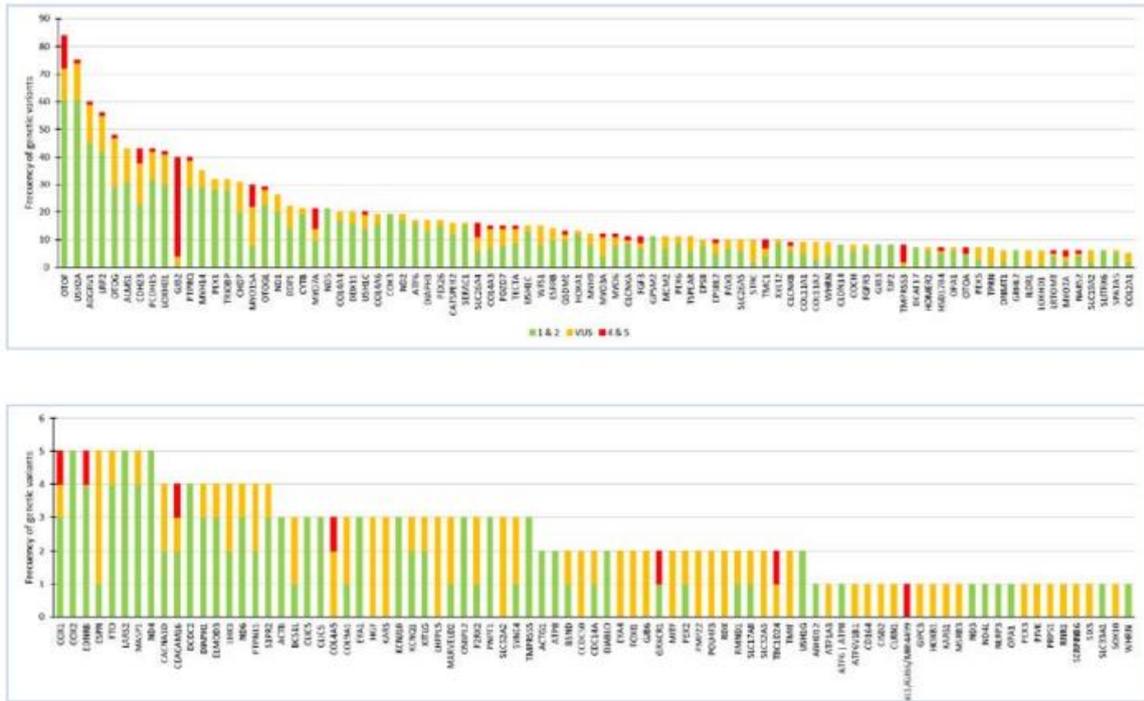


Figura 4: Genes con las variantes genéticas halladas, clasificadas por tipo de variante: en rojo tipos 4 y 5 (probablemente patogénica o patogénica), en naranja tipo 3 (significado incierto) y en verde tipos 1 y 2 (benignas o probablemente benignas)

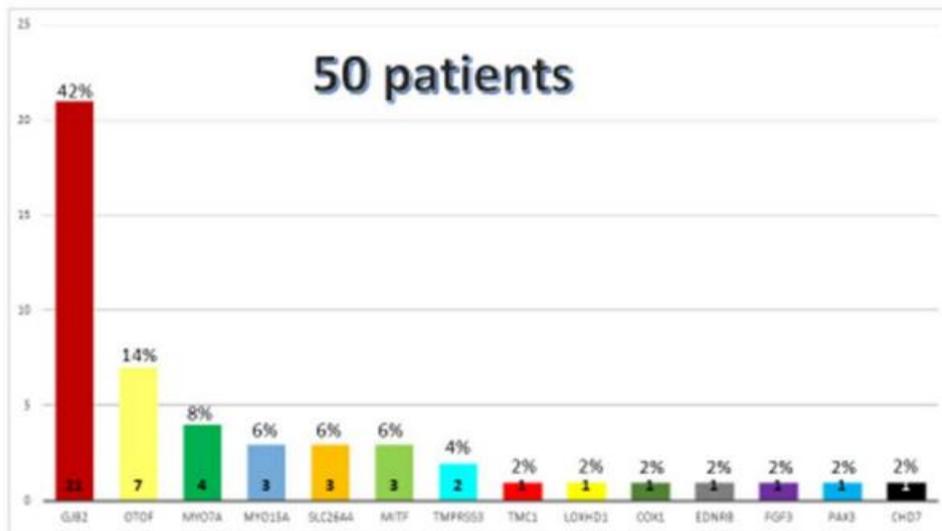


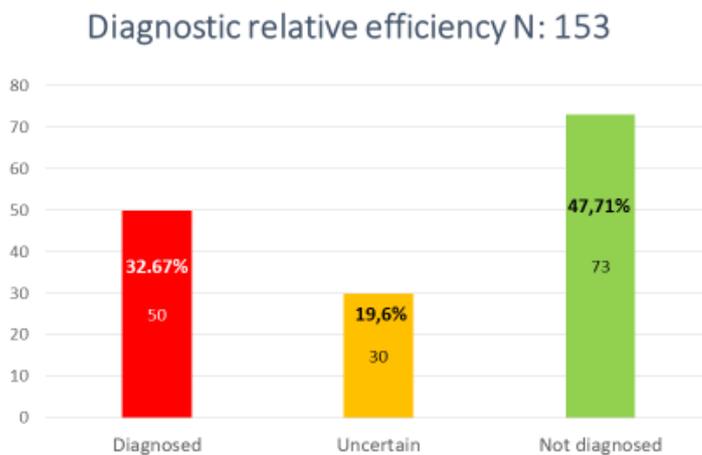
Figura 5: Frecuencia de genes hallados y responsables de la hipoacusia de un paciente. (GJB2: Conexina 26; OTOF: Otoferlina; MYO7A: Miosina 7a; MYO15: Miosina 15; SLC26A4: Pendrina; MITF: Factor de transcripción inductor de melanocitos; TMPPSS3: Proteasa transmembrana de serina 3; TMC1: Canal transmembrana tipo 1; LOXHD1: Dominio pesado de lipoxigenasa 1; COX1: Mitocondrial MT-RNR1; EDNRB: Receptor de Endotelina tipo B; FGF3: Fibroblastic growth factor 3; PAX3: Paired Box 3; CHD7: Proteína ligando de DNA cromodominio helicasa 7).

## 5. SENSIBILIDAD DEL PANEL GHELP

La sensibilidad es la capacidad de una determinada prueba para detectar una enfermedad en sujetos enfermos.

En los 153 niños estudiados en la UN con el panel GHELP, incluyendo los grupos retrospectivo y prospectivo, en 50 de ellos (33%) se alcanzó un diagnóstico de certeza (variantes 4 y 5), en 30 (19%) se identificaron variantes cuya relación con la hipoacusia no puede ser establecida de forma concluyente (variante 3) y en 73 (48%) no se identificaron variantes patológicas.

Si sumamos las variantes 4 y 5 podemos considerar que el grado de sensibilidad del panel GHELP es del 33%, tendríamos un 19% de casos inciertos o VOUS y un 48% de pacientes no diagnosticados (Figura 6).



*Figura 6. Clasificación de los casos en base al estudio genético con el panel GHELP de los pacientes estudiados en la Universidad de Navarra. Grupo Diagnosticado: Variantes 4 y 5 de significado patológico; Incierto: Variantes 3 de significado incierto; Negativo: Variantes 1 y 2 sin significado patológico.*

En la Figura 7 se describen los las variantes tipo 4 y 5 identificadas en el grupo de pacientes diagnosticados y posteriormente las variantes 3, 4 y 5 encontradas en el grupo de pacientes con un resultado incierto.

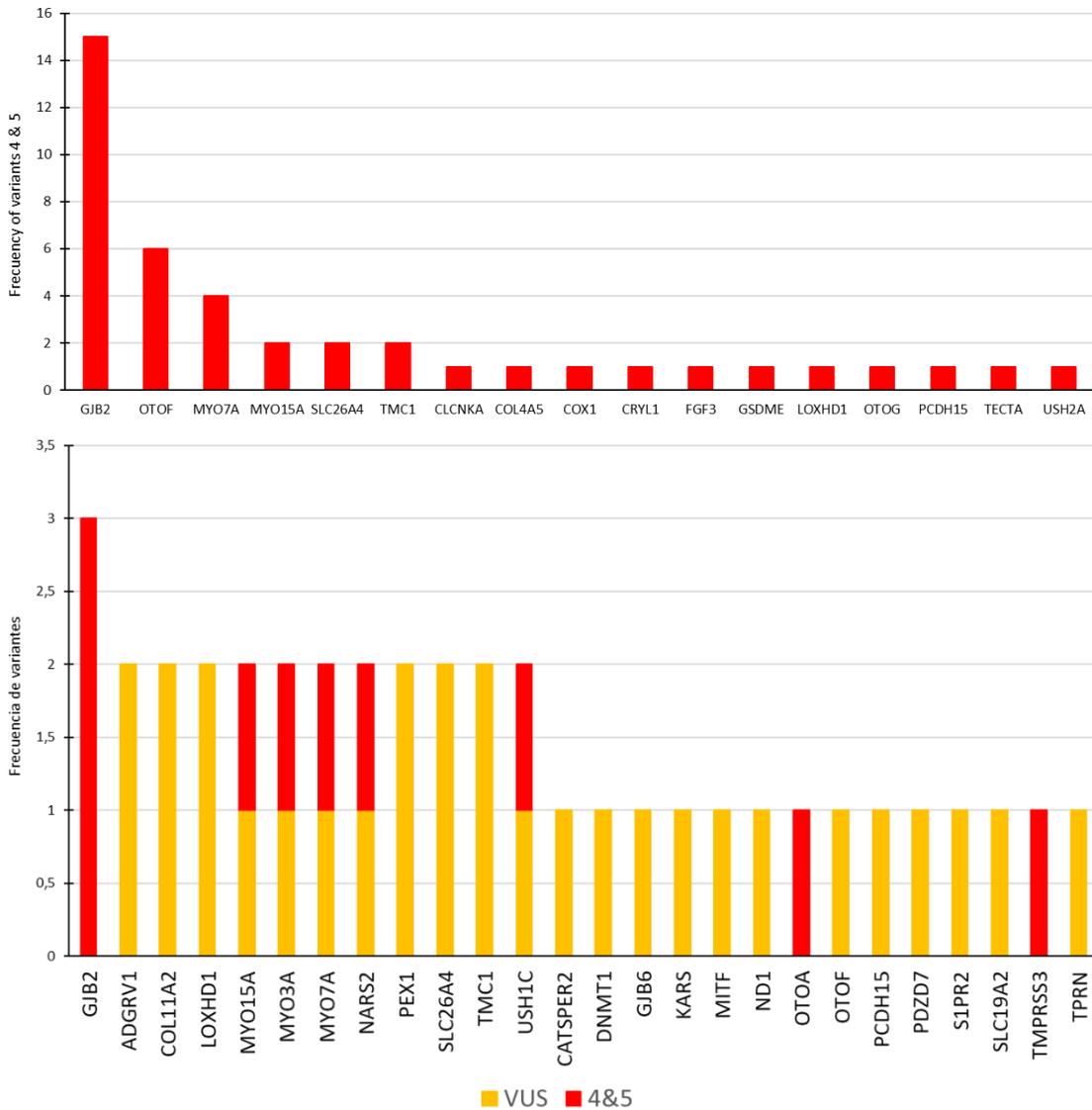


Figura 7. Selección de pacientes con resultado final incierto (hipoacusia no explicable por la genética sin ampliar el estudio). Variantes encontradas clasificadas como 3 (barras en naranja), 4 y 5 (barras en rojo).

Si clasificamos los resultados para los grupos retrospectivo y prospectivo, la sensibilidad del panel GHELP es del 29% y 52% para cada uno de ellos, respectivamente (Figura 8).

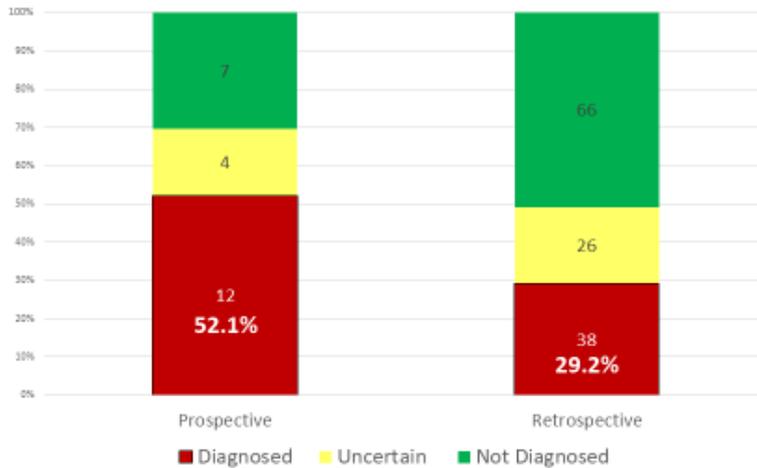


Figura 8. Distribución de pacientes diagnosticados, pacientes con diagnóstico incierto y no diagnosticados dividido según el tipo de estudio: Prospectivo y Retrospectivo.

**Resulta especialmente relevante la alta sensibilidad alcanzada en el grupo prospectivo, pues este grupo nos acerca mejor al modelo real de un programa de detección precoz de la hipoacusia en recién nacidos.**

Tratando de interpretar esta significativa diferencia entre la sensibilidad detectada entre ambos grupos encontramos **dos razones principales**. La **primera** está relacionada con las **diferencias intrínsecas entre un estudio prospectivo y retrospectivo**, de forma que en este último el tiempo transcurrido hace más difícil la recogida de información precisa. La **segunda** es el **elevado número de causas no detectadas al nacimiento**.

La infección por CMV es la segunda causa de hipoacusia infantil en nuestro medio. Es probable que un no despreciable porcentaje de niños del grupo retrospectivo presentaran esta etiología, sin que en su día fuera detectada en los estudios neonatales. Ello pudo incrementar el número de hipoacusias de origen desconocido y contribuir a la inclusión de candidatos dentro del grupo retrospectivo de este estudio GHELP reduciendo la sensibilidad del panel GHELP en este grupo de población.