



Universidad Autónoma de Madrid

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**Estudio clínico-genético de patologías asociadas a malformaciones linfáticas: Síndrome CLAPO y Anomalía Linfática Generalizada.**

TESIS DOCTORAL

**Lara Rodríguez Laguna**

MADRID, 2019



Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid

# **Estudio clínico-genético de patologías asociadas a malformaciones linfáticas: Síndrome CLAPO y Anomalía Linfática Generalizada.**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

**Lara Rodríguez Laguna**

Licenciada en Biotecnología

DIRECTORES DE TESIS:

**Dr. Víctor Martínez González**

**Dr. Juan Carlos López Gutiérrez**

TESIS REALIZADA EN:

Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario La Paz

Dr. **Víctor Martínez González**, Investigador CIBERER (U753), responsable de la Sección de Malformaciones Vasculares en el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA:

Que Doña **Lara Rodríguez Laguna**, Licenciada en Biotecnología por la Universidad Francisco de Vitoria, ha realizado la presente Tesis Doctoral “**Estudio clínico-genético de patologías asociadas a malformaciones linfáticas: Síndrome CLAPO y Anomalía Linfática Generalizada**”, y que a su juicio reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al **Grado de Doctor en Biociencias Moleculares**, a cuyos efectos será presentada en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido realizado bajo mi dirección autorizando su presentación ante el tribunal calificador.

Y para que conste, se extiende el presente certificado.

Madrid, 28 de Enero de 2019

Fdo: Director de Tesis

Dr. Víctor Martínez González

Dr. **Juan Carlos López Gutiérrez**, especialista en el área de cirugía pediátrica y reconstructiva infantil, responsable de la unidad de Anomalías Vasculares Congénitas, del Hospital Universitario La Paz, jefe del servicio de cirugía pediátrica del hospital universitario Quirónsalud, Madrid.

CERTIFICA:

Que Doña **Lara Rodríguez Laguna**, Licenciada en Biotecnología por la Universidad Francisco de Vitoria, ha realizado la presente Tesis Doctoral “**Estudio clínico-genético de patologías asociadas a malformaciones linfáticas: Síndrome CLAPO y Anomalía Linfática Generalizada**”, y que a su juicio reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al **Grado de Doctor en Biociencias Moleculares**, a cuyos efectos será presentada en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido realizado bajo mi dirección autorizando su presentación ante el tribunal calificador.

Y para que conste, se extiende el presente certificado.

Madrid, 28 de Enero de 2019

Fdo: Director de Tesis

Dr. Juan Carlos López Gutiérrez

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM-CIBERER-IdiPAZ) del Hospital Universitario La Paz entre los años 2015 y 2019, bajo la supervisión del Dr. Víctor Martínez-Glez y el Dr. Juan Carlos López Gutiérrez.

Este trabajo fue financiado en su mayor parte por el proyecto de investigación "*Genetic and genomic analysis in patients affected by Gorham-Stout Disease and General Lymphatic Anomalies*" (referencia PI-1407) obtenido a través del Instituto de Malformaciones Linfáticas de EE. UU. (LMI-Lymphatic Malformation Institute). Dicho proyecto ha sido gestionado por el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ).

Asimismo, las siguientes financiaciones y ayudas también han contribuido a su desarrollo:

- El proyecto de investigación "*Genetics of vascular and lymphatic malformations*", financiado con fondos obtenidos a partir de las donaciones recaudadas por la Asociación Ultrafondo y el Villareal FC (Ref. ER15PE46, ER15PE49), y gestionado por el Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER).
- El proyecto de investigación "*PIK3CA-Todos Somos Raros*" (referencia PI-17) obtenido a través de la convocatoria competitiva "Todos Somos Raros", financiada por 3 entidades promotoras dentro del Telemaratón RTVE: Fundación Isabel Gemio, Federación ASEM y la Federación Española de Enfermedades Raras. Dicha financiación ha sido gestionada por el Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER).

*A mis padres y a mi hermano.*

*A Chema.*

*A Rusty.*

***“Aprende como si fueras a vivir toda la vida  
y vive como si fueras a morir mañana”***

**Charles Chaplin (1889-1977)**

# ***AGRADECIMIENTOS***



## **AGRADECIMIENTOS**

Pues sí, al final ha llegado el momento. Parecía que no llegaría nunca, pero después de 4 años se cierra una etapa llena de experiencias, emociones y mucho trabajo. Ahora toca volver la vista atrás para recordar y agradecer a todas y cada una de las personas que me han acompañado en este camino, porque, aunque mi nombre es el que figura en la portada, sin ellas esto no habría sido posible.

En primer lugar, quiero dar las gracias a Pablo Lapunzina, la persona que me dio la oportunidad de vivir esta experiencia inigualable, de poder trabajar en un centro tan puntero, innovador y con tantas posibilidades como es el INGEMM. Aún recuerdo el día que llegué a la puerta del laboratorio, recién licenciada, un poco perdida y sin tener claro que quería hacer, ni hacia donde enfocar mi futuro. Empecé trabajando como asistente voluntario en el departamento de Genómica, una etapa bonita a la vez que dura, en la que pude aprender de grandes profesionales de la genética, que me hicieron crecer tanto profesional como personalmente. Gracias Pablo por brindarme esta oportunidad, te estaré siempre muy agradecida.

En segundo lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, Víctor y Juan Carlos, todo el tiempo, esfuerzo y dedicación que habéis invertido en mí, sin vosotros yo no estaría hoy escribiendo estas líneas. Gracias Víctor por apostar por mí, por motivarme desde el primer día, por guiarme durante esta etapa y por enseñarme todo lo que hoy sé. Gracias Juan Carlos por enseñarme la parte clínica de la investigación, por acercar a los pacientes y a las familias a la genética, por tu motivación, por esas ideas que siempre acaban en un nuevo descubrimiento y, principalmente, por el trato tan cercano y amable que has tenido siempre conmigo. Sin ti este proyecto nunca habría sido posible, gracias por confiar en nosotros.

Gracias también al resto de mis compañeros del grupo de vascular, o como nosotros lo llamamos MALVA, a Paloma, Gema, Gloria, Gonzalo. Gracias por compartir conmigo esta etapa tan importante, y en especial gracias a Noe, porque llegaste en el mejor momento, porque tener una postdoc ayudándote en los últimos años de tesis, no tiene precio. Gracias por todo lo que me has enseñado, por las risas, por los consejos, por el tiempo que has dedicado a este trabajo. Gracias por brindarme la oportunidad de dar una clase en la universidad, por esos experimentos de criolipólisis, por el adosado que algún día nos compraremos, por las dietas

que nunca cumplimos y porque, aunque tengamos momentos en los que estamos “asquerositas”, siempre acabamos el día riendo.

Siempre he escuchado que hay que elegir un buen lugar de trabajo, que te brinde oportunidades de crecer, que sea innovador... pero después de estos años, me he dado cuenta de que lo que de verdad importa es la gente que trabaja en él, y tengo que reconocer que he tenido muchísima suerte. Gracias a todos mis compañeros del GEF, esa gran familia con la que he compartido 6 años de mi vida, llena de profesionales que me han enseñado y buenos compañeros que me han ayudado. María, Julián, M<sup>a</sup> Ángeles, Víctor, Luís, Elena, Inma, Carol, Sol, Vicky, Héctor, Pilar, Mariví, Rocío, Rubén, Noe, Vir, Marta...y todo el resto de Geferos, ¡muchas gracias! ¡Y gracias también por aguantar mis propuestas navideñas y por esos desayunos de los viernes!

No podían faltar unas palabras para mis reinas, mis chicas, porque esto no sería igual sin esos “ratitos” en los desayunos, con nuestras confesiones, desahogos, gritos, lloros, risas, cotilleos, planes,... porque nos cuesta quedar en Madrid, pero en Praga se nos da de vicio. Gracias por vuestro apoyo, vuestros ánimos, vuestro ejemplo, por todos esos empujones para seguir luchando,... simplemente ¡gracias por ser tan especiales!

Vicky, Elena, Rubén, mis pepitillos, esas tres personitas desconocidas que han llegado a convertirse en imprescindibles de mi día a día. No recuerdo bien como empezó nuestra amistad, supongo que fue la “magia del cubano” la que consiguió que nos volviésemos inseparables. Aún recuerdo nuestro primer congreso en Palma, ¡en el que no vimos ni la playa!, y nuestro rincón en el GEF, que se convirtió en centro de reuniones y descansos de todo el INGEMM. Los “ratos” en masiva, los viajes, las salidas improvisadas,... Aunque no todo han sido fiestas, también me acuerdo de las tardes/noches que pasamos en el INGEMM preparando pósters para los congresos, las presentaciones, las charlas, los nervios, nuestros queridos alemanes y el curso de array, nuestras tardes de terapia con nachos y copas... Bueno chicos creo que sobran las palabras, solo quiero agradecer todo lo que habéis hecho por mí a nivel profesional y personal, porque esta tesis es tanto mía como vuestra, ¡gracias por formar parte de ella, os quiero!

No me quiero olvidar de mi otro chico de NGS, el que no se acordaba de mí cuando entré, pero que ha conseguido que yo no me olvide de él. Muchas gracias amigo, por todo lo que me has enseñado, por esos largos días en el cuarto de arrays, por tantas PCRs y secuenciaciones, por aguantarme en mis mejores y peores momentos, por indignarte conmigo

cuando algo no me gustaba, ... por todo, ¡gracias Héctor! ¡Ah! ¡Y por esas croquetas y empanadillas que nos preparas!

Aún quedan muchos compañeros a los que quiero agradecer el haber compartido conmigo todos estos años, porque todos vosotros habéis aportado algo a esta etapa, sobre todo muchos buenos momentos: Irene, Patri, Pili, Adela, Alberta, Alfonso, Carol, Pedro, Rosa, Sixto, Fer, Ángela, Mario, Paloma, Carmen, Charo, Ascen, Asun, Inma...¡gracias a todos!

También quiero dar las gracias a los bioinformáticos del INGEMM, a los que tanto me ha costado entender y a los que tanto he dado la lata. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y en especial a Kristina, gracias por tu tiempo, por tu paciencia, por ayudarme incluso cuando no estabas en España, y porque sin ti este trabajo nunca habría podido llevarse a cabo. Gracias por esas ganas de trabajar, de conseguir tus objetivos, por transmitir esa energía y buen rollo, porque contigo es fácil trabajar y hablar, ¡gracias amiga!

Carlos, no me olvido de ti, el bioinformático de la silla molona, el otro miembro de nuestro equipo de salidas, farinatos, entrenos, risas, cenas de navidad...gracias por ayudarme, por aguantar mi inutilidad con los ordenadores, por tus charlas y por siempre tener una sonrisa.

También agradecer a todas esas personas que han hecho posible este trabajo mediante colaboraciones y estancias en sus laboratorios: el grupo del IIB del Dr. Víctor Ruíz, en especial a sus chicos Adri, Cris y Elisa, gracias por enseñarme lo que es un *Western-Blot* y acogerme en vuestro laboratorio como una más; al departamento de genética de la FJD, a la Dra. Carmen Ayuso, a Ana Bustamante y a Cristina Villaverde, por enseñarnos la ddPCR, por permitirnos trabajar allí y por ayudarnos con todas nuestras dudas; al departamento de Anatomía Patológica del Hospital La Paz, y en especial a María Beato, por el análisis histológico de las muestras de tejido parafinado; al Dr. Michael Dellinger de Dallas, por su modelo de ratón, por compartir su experiencia, conocimientos y datos con nosotros, por colaborar estrechamente con este y otros trabajos, por su confianza, y por ese trato cercano y amable.

Por supuesto agradecer a todas las familias y pacientes que voluntariamente han querido participar en este estudio, por su comprensión, su compromiso y por su apoyo, porque sin ellos nada de esto tendría sentido, ¡gracias por confiar en nosotros!

No me olvido de mis amigos, de los de toda la vida, los de Badajoz, los que todavía no entienden a que me dedico, pero escuchan con atención todo lo que les cuento. Mis amigas de

Madrid, las de la universidad, a todas es@s amig@s que me sacan de casa cuando tengo un mal día, que están para lo bueno y para lo malo, gracias por todo.

A mi familia, mis tíos, mis primos, mi abuelo, y en especial a mis padres porque aun estando en Badajoz son capaces de trasmitirme esa fuerza que necesito. Gracias por aconsejarme estudiar Biotecnología, por permitirme estudiar fuera de casa, por el apoyo que siempre he recibido y por estar ahí para todo lo que he necesitado. Esta tesis es vuestra, sin vosotros yo no estaría hoy donde estoy, gracias por vuestra dedicación, paciencia, cariño, ánimo y motivación. Porque siempre me empujáis a seguir avanzando y seguir creciendo ¡gracias, os quiero!

A mi hermano, el futuro médico, gracias por aguantarme, por las risas, las confiancias, las peleas, los planes, por esos momentos vividos, porque al final siempre estás cuando se te necesita y eso es lo importante, ¡gracias enano!

Y por último quiero dar las gracias a Chema, el que más me ha sufrido esta tesis, mi compañero de viajes, mi pareja, mi amigo. Por fin acaba esta etapa de nervios, agobios, noches sin dormir, gracias por tu paciencia, por encargarte de todo, por hacerme reír, por aguantar mis cambios de humor, por solucionar mis liadas, por apoyarme, quererme y comprenderme siempre. ¡Prueba superada, te quiero!

***RESUMEN/ABSTRACT***

## RESUMEN

Las malformaciones vasculares son anomalías congénitas que se clasifican en función del tipo de vaso afectado en: capilares, linfáticas, venosas y arteriovenosas. El Síndrome CLAPO (*Capillary malformation of the lower lip, Lymphatic malformation predominant on the face and neck, Asymmetry, and Partial/generalized Overgrowth*) y la Anomalía Linfática Generalizada o GLA (*Generalized Lymphatic Anomaly*), son dos enfermedades raras de etiologías desconocidas que presentan malformaciones linfáticas como una de sus características clínicas principales. Ambas enfermedades presentan un patrón segmentario de manifestaciones clínicas y una alta heterogeneidad fenotípica, que apuntan a la presencia de un mosaicismo somático (mutaciones post-cigóticas) como mecanismo patogénico.

En la presente tesis, se evaluó clínica y molecularmente dos cohortes de pacientes con diagnóstico de CLAPO y GLA con el objetivo de ampliar el conocimiento clínico, describir su causa genética, y desarrollar un protocolo experimental para el estudio de patologías causadas por alteraciones en mosaico somático. Para ello, se llevó a cabo el estudio retrospectivo de los pacientes incluidos en la cohorte, y se analizaron muestras pareadas sangre/tejido de 11 pacientes con CLAPO y 9 pacientes con GLA, utilizando paneles de genes de secuenciación masiva y un algoritmo bioinformático específico para la detección de variantes en mosaico. Además, se desarrolló un protocolo para el aislamiento y caracterización de células endoteliales linfáticas (LECs), y se generó un modelo de ratón para el estudio específico de la patología GLA.

La reevaluación fenotípica de los pacientes con CLAPO y GLA permitió definir mejor las características clínicas y criterios diagnósticos, así como establecer posibles pautas de seguimiento. Gracias a los estudios moleculares se identificaron por primera vez mutaciones patogénicas activantes, en forma de mosaicismo somático, en el gen *PIK3CA*, en el 64% de los pacientes con CLAPO y el 56% de los pacientes con GLA. El aislamiento y caracterización de LECs a partir de tejido linfático, así como la generación del primer modelo animal específico de GLA, permitió validar funcionalmente los resultados genéticos y proporcionar evidencia preclínica y clínica para apoyar el uso de Rapamicina, para el tratamiento en pacientes GLA.

Por último, se desarrolló un protocolo experimental y bioinformático para el estudio genético de pacientes con patologías asociadas a malformaciones vasculares que pudo ser extrapolado tanto al diagnóstico asistencial, como a la investigación, de patologías causadas por mutaciones en forma de mosaicismo somático.

## ABSTRACT

Vascular malformations are congenital vascular defects produced during the embryological development of the vascular system. They can be divided according to the type of affected vessel into capillary, lymphatic, venous, and arteriovenous malformations. CLAPO syndrome (**C**apillary malformation of the lower lip, **L**ymphatic malformation predominant on the face and neck, **A**symmetry, and **P**artial/generalized **O**vergrowth) and GLA (**G**eneralized **L**ymphatic **A**nomaly), are two complex diseases that present lymphatic malformations as one of their main clinical features. The etiology of both diseases is unknown. However, the segmental pattern of clinical manifestations in addition to the high phenotypic heterogeneity observed, seem to point towards somatic mosaicism (post-zygotic alterations) as the pathogenic mechanism.

In this project, two cohorts of patients with CLAPO and GLA were clinically and molecularly evaluated with the aim of expanding the clinical knowledge, describing their genetic cause, and developing an experimental protocol for the study of diseases caused by somatic mosaicism. Hence, we analyzed paired blood/tissue samples from 11 and 9 patients with CLAPO and GLA respectively, using custom high-throughput sequencing panels and an inhouse bioinformatic algorithm for the detection of mosaic variants. In addition, a specific protocol for the isolation of lymphatic endothelial cells (LECs) from lymphatic tissues was developed, and a mouse model was generated for the functional analysis of variants.

The phenotypic re-evaluation of the patients with CLAPO and GLA allowed us to better define the clinical features and guided the development of follow-up guidelines. Molecular studies identified for the first time activating pathogenic mutations in the *PIK3CA* gene in 64% and 56% of patients with CLAPO and GLA respectively. All variants were detected in the form of somatic mosaicism. The isolation and characterization of LECs, as well as the generation of a specific animal model of GLA, allowed the functional validation of our genetic results, and provided preclinical and clinical evidences to support the use of rapamycin, a specific inhibitor of mTOR, for the treatment in GLA.

Finally, a combined experimental and bioinformatic protocol for the genetic study of patients with pathologies associated with vascular malformations has been developed and tested, and it could be extrapolated to the study of somatic mosaicism disorders.

# ***ÍNDICE***



## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	17
RESUMEN .....	23
ABSTRACT.....	24
CLAVE DE ABREVIATURAS .....	33
1. INTRODUCCIÓN .....	41
1.1 Anomalías vasculares .....	41
1.2 Malformaciones linfáticas .....	44
1.2.1 El sistema linfático.....	45
1.2.2 Desarrollo embrionario del sistema linfático .....	46
1.2.3 Moléculas reguladoras de la linfangiogénesis.....	47
1.3 Anomalia Linfática Generalizada (GLA) y Síndrome CLAPO .....	48
1.3.1 Malformaciones vasculares asociadas a otras anomalías: El Síndrome CLAPO	48
1.3.2 Malformaciones vasculares linfáticas: Anomalia Linfática Generalizada (GLA)	49
1.4 Mosaicismo somático.....	52
1.4.1 Técnicas de detección de mosaicismos somáticos.....	54
1.5 Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR.....	56
1.5.1 <i>PIK3CA</i> y Síndromes de Sobrecrecimiento Asociados a <i>PIK3CA</i> (PROS).....	59
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	63
2.1 HIPÓTESIS.....	63
2.2 OBJETIVOS.....	63
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
3.1 Lugar de trabajo .....	67
3.2 Pacientes .....	67
3.3 Tratamiento de las muestras biológicas y extracción de ADN.....	69
3.3.1 Inmunohistoquímica e histología básica .....	71
3.4 Secuenciación Masiva .....	72

3.4.1	Diseño de los paneles .....	72
3.4.2	Protocolo de secuenciación.....	75
3.5	Bioinformática y análisis de datos.....	76
3.5.1	Análisis bioinformático – Algoritmo germinal.....	77
3.5.2	Análisis bioinformático - Herramienta mOsAiC.....	78
3.5.3	Análisis de datos.....	79
3.6	Validación de los resultados.....	80
3.6.1	Secuenciación Sanger .....	80
3.6.2	Pirosecuenciación.....	81
3.6.3	Droplet-digital PCR .....	83
3.7	Aislamiento de células endoteliales linfáticas.....	84
3.7.1	Gradiente de Percol y selección magnética (MACS) .....	84
3.7.2	Inmunofluorescencia.....	85
3.8	Estudios de expresión .....	86
3.8.1	Plásmido y Mutagénesis.....	86
3.8.2	Líneas celulares y transfección.....	89
3.8.3	Extracción de proteínas.....	90
3.8.4	Cuantificación de proteínas.....	91
3.8.5	Western-blot .....	91
3.9	Análisis estadísticos.....	93
3.10	Ensayos funcionales <i>In vivo</i> .....	93
3.10.1	Modelo murino.....	93
3.10.2	Cepa PROX1-Cre-ER <sup>T2</sup> .....	94
3.10.3	Cepa R26-LSL- <i>PIK3CA</i> <sup>His1047Arg</sup> .....	94
3.10.4	Ratones mT/mG.....	95
3.10.5	Genotipado.....	96
3.10.6	Tratamiento farmacológico .....	97

3.10.7	Ensayo de proliferación celular .....	98
3.10.8	Inmunofluorescencia <i>whole-mount</i> .....	98
3.10.9	Inmunohistoquímica de hueso .....	99
3.10.10	Análisis estadístico de los resultados.....	99
4.	RESULTADOS.....	103
4.1	Síndrome CLAPO .....	103
4.1.1	Base de datos y revisión fenotípica .....	103
4.1.2	Mutaciones en <i>PIK3CA</i> .....	108
4.1.3	Caracterización funcional de las variantes no descritas.....	113
4.2	Anomalia Linfática Generalizada (GLA).....	114
4.2.1	Base de datos y revisión fenotípica .....	114
4.2.2	Aislamiento de células endoteliales linfáticas (LECs) .....	119
4.2.3	Mutaciones en <i>PIK3CA</i> .....	120
4.3	Modelo murino .....	123
4.3.1	Estructura de los vasos linfáticos .....	124
4.3.2	Presencia de vasos linfáticos en el hueso.....	125
4.3.3	Tratamiento con Rapamicina .....	127
5.	DISCUSIÓN .....	131
5.1	Revisión fenotípica de los pacientes con Síndrome CLAPO y con GLA .....	131
5.1.1	CLAPO .....	132
5.1.2	GLA.....	134
5.2	Estudio molecular y diagnóstico genético de las dos enfermedades .....	135
5.2.1	CLAPO .....	136
5.2.2	GLA.....	140
5.3	Extrapolación de los resultados al diagnóstico clínico asistencial .....	142
6.	CONCLUSIONES .....	147
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	151

ANEXO I. Genes incluidos en los paneles de NGS .....	161
ANEXO II. Criterios para la clasificación de las variantes según la ACMG.....	167
ANEXO III. Artículos científicos.....	171

## ***CLAVE DE ABREVIATURAS***

## CLAVE DE ABREVIATURAS

μl	Microlitros
μM	Micromolar
4EBP1	Del inglés, <i>Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1</i>
ABD/p85-BD	Del inglés, <i>Adaptor-Binding Domain / p85-Binding Domain</i>
ACMG	Del inglés, <i>American Collage of Medical Genetics and Genomics</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AFA	Del inglés, <i>Adaptive Focused Acoustics technology</i>
AKT1	Del inglés, <i>AKT serine/threonine kinase 1</i>
AKT2	Del inglés, <i>AKT serine/threonine kinase 2</i>
AKT3	Del inglés, <i>AKT serine/threonine kinase 3</i>
Aminoácido Arg	Arginina
Aminoácido Cys	Cisteína
Aminoácido Gln	Glutamina
Aminoácido Glu	Glutamato
Aminoácido His	Histidina
Aminoácido Leu	Leucina
Aminoácido Lys	Lisina
Aminoácido Phe	Fenilalanina
Aminoácido Ser	Serina
Aminoácido Thr	Treonina
ARN	Ácido ribonucleico
AVAF	Frecuencia de la variante alternativa (del inglés, <i>Alternative Variant Allele Frequency</i> )
BAM	Del inglés, <i>Binary Alignment/Map format file</i>
BCL	Del inglés, <i>Base Call file</i>
BEC	Célula endotelial sanguínea (Del inglés, <i>Blood vascular Endothelial Cell</i> )
Biot	Biotina
BSA	Albúmina sérica bovina (del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CADD	Del inglés, <i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
cADN	ADN codificante
CD31	Del inglés, <i>cluster of differentiation 31 protein</i>

CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
CL	Abreviatura adoptada por nosotros como ID de CLAPO
CLAPO	Síndrome CLAPO (del inglés, <i>Capillary malformation of the lower lip, Lymphatic malformation predominant on the face and neck, Asymmetry, and Partial/generalized Overgrowth</i> )
CLOVES	Síndrome CLOVES (del inglés, <i>Congenital Lipomatous, Overgrowth, Vascular malformation and Epidermal Nevi and Spinal/Skeletal Anomalies and/or Scoliosis</i> )
COSMIC	Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (del inglés, <i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i> )
COUP-TFII	El factor de transcripción COUP2 (del inglés, <i>COUP transcription factor 2</i> )
DAPI	Marcador fluorescente 4',6-diamino-2-fenilindol
dbSNP	Del inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
ddPCR	PCR digital (del inglés, <i>Droplet Digital PCR</i> )
DMEM	Del inglés, <i>Dulbecco's Modification of Eagle Medium</i>
E.coli	Escherichia coli
EC	Célula endotelial (del inglés, <i>Endothelial Cell</i> )
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGM	Medio de crecimiento endotelial (del inglés, <i>Endothelial Growth Medium</i> )
ER <sup>T2</sup>	Receptor de estrógenos modificado para reaccionar únicamente con la unión de tamoxifeno (del inglés, <i>estrogen receptor</i> )
EVS	Del inglés, <i>Exome Variant Server</i>
ExAC	Del inglés, <i>the EXome Aggregation Consortium</i>
FAV	Fistula arteriovenosa
FBS	Suero Fetal Bovino (del inglés, <i>Fetal Bovine Serum</i> )
FFPE	Tejido fijado en formol y embebido en parafina (del inglés, <i>Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded tissue</i> )
FISH	Hibridación fluorescente in situ (del inglés, <i>Fluorescence in situ hybridization</i> )
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés, <i>Fluorescein IsoTioCyanate</i> )
FLT4	Del inglés, <i>Fms reLated Tyrosine kinase 4 gene</i>
GATK	Del inglés, <i>Genome Analysis Toolkit</i>

GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i> )
GLA	Anomalía Linfática Generalizada (del inglés, <i>Generalized Lymphatic Anomaly</i> )
GRCh37 / Hg19	Genoma de referencia hg19 (del inglés, <i>Genome Reference Consortium Human Build 37</i> )
GSD	Enfermedad de Gorham-Stout (del inglés, <i>Gorham-Stout Disease</i> )
H.U.	Hospital Universitario
HEK293T	Células embrionarias de riñón humano (del inglés, <i>Human Endothelial Kidney cell line 293</i> )
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés, <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HPO	Del inglés, <i>Human Phenotype Ontology</i>
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés, <i>Horseradish Peroxidase</i> )
ID	Identificador
Igs	Inmunoglobulinas
IGV	Del inglés, <i>Integrative Genomics Viewer</i>
IMR	Del inglés, <i>The Induced Mutant Resource</i>
INGEMM	Instituto de Genética Médica y Molecular
ISSVA	Del inglés, <i>International Society for the Study of Vascular Anomalies</i>
ITU	Infecciones Tracto Urinario
kDa	KiloDalton
kg	Kilogramos
KLA	Linfangiomas Kaposiforme (del inglés, <i>Kaposiform Lymphangiomas</i> )
LB	Medio de cultivo denominado Caldo de lisogenia (del inglés, <i>Lysogeny Broth</i> )
LEC	Célula endotelial linfática (del inglés, <i>Lymphatic Endothelial Cell</i> )
LMI	Instituto de Malformaciones Linfáticas (del inglés, <i>Lymphatic Malformation Institute</i> )
loxP	Secuencia de reconocimiento loxP (del inglés, <i>Locus Of X-over P1</i> )
LR-PCR	Del inglés, <i>Long-Range PCR</i>
LSL	loxP-STOP-loxP
LYVE1	Del inglés, <i>Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan receptor 1</i>
MACS	Del inglés, <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>



MALVA	Malformaciones Vasculares
MAV	Malformación Arteriovenosa
MC	Malformación Capilar
MCAP / M-MC	Macrocefalia-Malformación Capilar (del inglés, <i>Megalencephaly-Capillary Malformation</i> )
mG	Secuencia de la proteína fluorescente GFP
MICCAP	Microcefalia malformación capilar
MIM	OMIM (del inglés, <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> )
ML	Malformación Linfática
mL	Mililitros
MLC	Malformación linfática capilar
Mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
mT	Proteína tdTomato
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos (del inglés, <i>Mammalian Target Of Rapamycin</i> )
mTORC1	Complejo mTOR de tipo 1 (del inglés, <i>mTOR complex 1</i> )
mTORC2	Complejo mTOR de tipo 2 (del inglés, <i>mTOR complex 2</i> )
mut	Mutado
MV	Malformación Vascular
MVAC	Malformación venosa-arterial-capilar
MVALC	Malformación venosa-arterial-linfática-capilar
MVC	Malformación venosa-capilar
MVL	Malformación venosa-linfática
MVLC	Malformación venosa-linfática-capilar
ng	Nanogramos
NGS	Secuenciación masiva (del inglés, <i>Next Generation Sequencing</i> )
NIH	Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos de América (del inglés, <i>National Institute of Health EE. UU.</i> )
O/N	Durante toda la noche (del inglés, <i>OverNight</i> )
OGLYVAS	Del inglés, <i>OverGrowth-LYmphhatic-Vascular Syndromes</i>
ORPHA	Del inglés, <i>Orphanet</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato alcalino (del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i> )

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDK-1	Proteína quinasa piruvato deshidrogenasa tipo 1 (del inglés, <i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1</i> )
PDPN	Podoplanina (del inglés, <i>Podoplanin</i> )
PFA	Paraformaldehído (del inglés, <i>Paraformaldehyde</i> )
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa (del inglés, <i>phosphatidylinositol 3 Kinase</i> )
<i>PIK3CA</i>	Fosfatidilinositol 3 quinasa, subunidad catalítica alfa (del inglés, <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase, Catalytic, Alpha</i> )
<i>PIK3R1</i>	Fosfatidilinositol 3 quinasa, subunidad reguladora 1 (del inglés, <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase, regulatory subunit 1</i> )
PIP2	Fosfatidilinositol 3, 4, 5-bifosfato (del inglés, <i>Phosphatidylinositol 3,4,5 biphosphate</i> )
PIP3	Fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (del inglés, <i>Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate</i> )
PKS	Abreviatura adoptada por nosotros para designar al plásmido pBlueScript
PPi	Pirofosfato
PROS	Espectro de Sobrecrecimientos Asociados a <i>PIK3CA</i> (del inglés, <i>PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum</i> )
PROX1	Del inglés, <i>Prospero homeobox protein 1</i>
PTEN	Proteína fosfatasa homóloga a fosfato y tensina (del inglés, <i>Phosphatase and tensin homolog</i> )
R26	Receptor Rosa26
RBD / Ras BD	Dominio de unión a proteínas Ras (del inglés, <i>Ras Binding Domain</i> )
RT	Temperatura ambiente (del inglés, <i>Room Temperature</i> )
S6	Proteína ribosomal S6
S6K1	Del inglés, <i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>
SBW	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
SC	Sobrecrecimiento
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> )
SEM	Error estándar de la medida (del inglés, <i>Standard Error of the Mean</i> )

---

SNP	Polimorfismo de nucleótido simple (del inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
SOX18	Factor de transcripción SRY-box 18 (del inglés, <i>SRY-related HMG-box 18</i> )
TBS	Tris buffer salino (del inglés, <i>Tris-buffered saline</i> )
Tej.	Tejido
TSC1	Complejo esclerosis tuberosa 1 (del inglés <i>Tuberous sclerosis complex 1</i> )
TSC2	Complejo esclerosis tuberosa 2 (del inglés <i>Tuberous sclerosis complex 2</i> )
TTBS	Tris buffer salino con tween (del inglés, <i>Tween-Tris buffered saline</i> )
VCF	Archivo de variantes anotadas (del inglés <i>Variant Calling File</i> )
VEGF-C	Factor de crecimiento endotelial C (del inglés, <i>Vascular endothelial growth factor C</i> )
VEGF-D	Factor de crecimiento endotelial D (del inglés, <i>Vascular endothelial growth factor D</i> )
VEGFR-3	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 3 (del inglés, <i>Vascular endothelial growth factor receptor 3 protein</i> )
VUS	Variante de significado incierto, del inglés <i>Variant of uncertain significance</i>
WES	Del inglés, <i>Whole Exome Sequencing</i>
WGS	Del inglés, <i>Whole Genome Sequencing</i>
wt	Del inglés, <i>wild type</i>

# ***INTRODUCCIÓN***

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Anomalías vasculares

Las anomalías vasculares comprenden un heterogéneo grupo de patologías producidas por un desarrollo anormal de la vasculatura tanto sanguínea como linfática, que da lugar a un amplio espectro de alteraciones que varían desde anomalías asintomáticas, con un compromiso meramente estético, hasta afectaciones graves, que pueden poner en riesgo la vida del paciente (1, 2). Teniendo en cuenta las propiedades proliferativas de las lesiones, la presentación histológica y las manifestaciones clínicas, John B. Mulliken y Julie Glowacki establecieron en 1982 una clasificación de las anomalías vasculares que las dividía en dos grupos principales, los tumores y las malformaciones vasculares (3, 4). En 1996, la Sociedad Internacional para el Estudio de las Anomalías Vasculares (ISSVA- *International Society for the Study of Vascular Anomalies*) adoptó esta clasificación y estableció un nuevo esquema de división actualizado y basado en ella (1). El propósito principal de esta clasificación fue la estandarización de la terminología, para establecer una nomenclatura universal que permitiese mejorar el seguimiento y asesoramiento de los pacientes y establecer una guía para el tratamiento de las anomalías vasculares. Actualmente, la clasificación de la ISSVA recoge tanto las características clínicas como la información genética asociadas a las diferentes patologías vasculares (1). Esta clasificación es revisada y actualizada periódicamente para adecuarse a los nuevos hallazgos clínicos, genéticos e histopatológicos, así como para incorporar posibles nuevas entidades clínicas. Las últimas actualizaciones tuvieron lugar en 2014 (Melbourne) (1, 5) y en 2018 (Ámsterdam) (6). Cada subtipo de anomalía vascular presenta características propias que ayudan a orientar en su seguimiento y tratamiento, por ello, la utilización de una terminología y clasificación común es de vital importancia para llevar a cabo un correcto diagnóstico y asesoramiento de las lesiones vasculares, en función de sus características clínicas, radiológicas e histopatológicas (4, 7, 8).

La clasificación actual de la ISSVA (2018) mantiene la distinción original entre tumores y malformaciones (4, 9) (**Tabla 1**). Los tumores vasculares, dentro de los cuales el hemangioma infantil es el más frecuente, son neoplasias vasculares que presentan una tasa de proliferación de células endoteliales muy elevada, además de hiperplasia (4, 9). Los tumores vasculares se presentan clínicamente después del nacimiento y tienen un período de crecimiento acelerado. El 90% de estos tumores aparecen en la infancia y engloban el hemangioma proliferativo, los hemangiomas congénitos, el angioma en penacho y el hemangioendotelioma kaposiforme.

**Tabla 1. Clasificación general de las anomalías vasculares según la ISSVA (2018)**

Anomalías vasculares				
Tumores vasculares	Malformaciones vasculares			
	Simples	Combinadas	Principales vasos	Asociadas a otras anomalías
Benignos	Malformación capilar			
Agresivos	Malformación linfática	MVC, MLC,	* Ver detalles	* Ver clasificación detallada
	Malformación venosa	MVL, MVLC,		
	Malformación arteriovenosa	MVAC,		
Malignos	Fístula arteriovenosa	MVALC, otras		

Abreviaturas: MVC: Malformación venosa-capilar; MLC: Malformación linfática-capilar; MVL: Malformación venosa-linfática; MVLC: Malformación venosa-linfática-capilar; MVAC: Malformación venosa-arterial-capilar; MVALC: Malformación venosa-arterial-linfática-capilar. Tabla traducida de la clasificación actualizada de la ISSVA 2018 (6). \*Los detalles referentes a estas categorías se encuentran recogidos en diferentes tablas dentro de la clasificación ISSVA (2018).

Por otro lado, las malformaciones vasculares aparecen a consecuencia de errores producidos durante el desarrollo embriológico del sistema vascular, dando lugar a la formación de canales vasculares morfológicamente anómalos que generan masas tortuosas y progresan acompañando al crecimiento natural del paciente, sin involución espontánea y con una tasa de proliferación celular normal (9, 10). Se originan entre la cuarta y la décima semana de desarrollo fetal, aunque pueden no ser evidentes hasta semanas, meses o años posteriores al nacimiento. Estas malformaciones persisten durante toda la vida como lesiones localizadas de tejido vascular. Situaciones como la pubertad, el embarazo o un traumatismo, pueden provocar un crecimiento puntual acelerado de estas malformaciones, de forma que se hagan evidentes clínicamente (10).

Las malformaciones vasculares, a su vez se clasifican según el tipo de vaso predominante en: malformaciones capilares, malformaciones linfáticas, malformaciones venosas o malformaciones arteriales (9). También pueden dividirse en función de la hemodinámica de la malformación, en lesiones de bajo flujo (venosas, linfáticas, capilares) o de alto flujo (arteriovenosas) (9, 11), y según si se presentan de forma aislada (simples) o de forma combinada con otras malformaciones vasculares diferentes (complejas) (9).

Dentro de las malformaciones vasculares, la clasificación de la ISSVA también incluye una subcategoría que engloba las malformaciones vasculares asociadas a otras anomalías (6) o malformaciones sindrómicas (Tabla 2). Este grupo de patologías presentan un componente vascular asociado a diferentes anomalías vasculares o no vasculares entre las que predominan el sobrecrecimiento óseo o de partes blandas, las alteraciones esqueléticas y las anomalías

viscerales. Existen diferentes Síndromes genéticos recogidos dentro de este apartado, algunos de ellos ampliamente conocidos y estudiados como el Síndrome de Sturge Weber (12), y otros recientemente reconocidos e incluidos en la clasificación de la ISSVA (2018) como el Síndrome CLAPO (13). En ocasiones, el diagnóstico de estas patologías sindrómicas resulta muy complejo dado que existe un solapamiento fenotípico frecuente entre diferentes Síndromes, así como una baja prevalencia de estas enfermedades, que dificulta la obtención de datos clínicos significativamente relevantes y específicos (14).

**Tabla 2. Subcategoría dentro de la clasificación de la ISSVA (2018): malformaciones vasculares asociadas a otras anomalías**

<b>Malformaciones vasculares asociadas a otras anomalías</b>		
Síndrome de Klippel-Trenaunay	MC + MV +/-ML + Sobrecrecimiento en extremidad	<i>PIK3CA</i>
Síndrome de Parkes Weber	MC + FAV + sobrecrecimiento en extremidad	<i>RASA1</i>
Síndrome Servelle-Martorell	MV en extremidad + hipotrofia ósea	
Síndrome Sturge-Weber	MC facial y leptomeninge + anomalías oculares +/- sobrecrecimiento óseo y de partes blandas	<i>GNAQ</i>
CM + Sobrecrecimiento congénito no progresivo en extremidad		<i>GNA11</i>
Síndrome de Maffucci	MV +/- hemangioma de células fusiformes + encondroma	<i>IDH1/IDH2</i>
Macrocefalia-MC (M-MC/MCAP)	MC + sobrecrecimiento + ML + MV	<i>PIK3CA</i>
Microcefalia-MC (MICCAP)		<i>STAMBP</i>
Síndrome de CLOVES	ML + MV +MC +/- MAV + sobrecrecimiento lipomatoso	<i>PIK3CA</i>
Síndrome de Proteus	MC, MV y/o ML + sobrecrecimiento somático asimétrico	<i>AKT1</i>
Síndrome Bannayan-Riley-Ruvalcaba	MAV + MV+ macrocefalia + sobrecrecimiento lipomatoso	<i>PTEN</i>
Síndrome CLAPO	MC del labio inferior + ML en cara y cuello + asimetría + sobrecrecimiento parcial/generalizado	<i>PIK3CA*</i>

Abreviaturas: MC: Malformación Capilar; MV: Malformación Venosa; ML: Malformación linfática; FAV: Fistula arteriovenosa; MAV: Malformación arteriovenosa. Tabla traducida de la clasificación actualizada de la ISSVA 2018 (6). \* El gen *PIK3CA* ha sido incluido en la clasificación de 2018 de la ISSVA, como causante del Síndrome CLAPO, gracias al trabajo derivado de la presente tesis doctoral.

Para una gran parte de las malformaciones vasculares, ya han sido identificados y descritos uno o varios genes causantes de las manifestaciones clínicas, la mayoría de ellos pertenecientes a las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR y RAS/BRAF/MAPK/ERK (15). Además, en términos de mecanismo patogénico, existe un alto porcentaje de estas malformaciones que están causadas por mutaciones post-cigóticas y que dan lugar a un mosaicismo somático (15, 16). Estas mutaciones somáticas explican en parte por qué existen

diferentes patologías vasculares causadas por alteraciones en el mismo gen y que, sin embargo, varían ampliamente en severidad y localización. En estos casos la manifestación clínica dependerá del tipo celular afectado y del momento del desarrollo embrionario en el que se produzca la mutación (17).

La presente tesis doctoral se centra en dos Síndromes genéticos en los que las malformaciones vasculares linfáticas son una característica principal: el Síndrome CLAPO, incluido en el apartado de la clasificación de la ISSVA de malformaciones vasculares asociadas a otras anomalías (**Tabla 2**), y la Anomalía Linfática Generalizada (GLA), incluida en el apartado de malformaciones linfáticas (**Tabla 3**).

## **1.2 Malformaciones linfáticas**

Las malformaciones linfáticas (MLs) son lesiones vasculares de bajo flujo producidas por un desarrollo anormal de los vasos linfáticos que provocan defectos en el desarrollo, maduración y/o función del sistema linfático (2, 18). Las MLs se manifiestan, a menudo, como masas blandas o quistes compuestos por vasos dilatados cubiertos de endotelio linfático y repletos de linfa, que pueden presentarse de forma focal, multifocal o difusa (19). La localización más frecuente es el área cervical (80% casos) debido a la complejidad y extensión del sistema linfático en esta región. Otras localizaciones típicas son axila, mediastino e ingle (20). En el 70% de los casos, las MLs son evidentes y diagnosticadas en el momento del nacimiento, y en el 30% restante éstas se manifiestan y diagnostican en la primera década de vida (21). Sin embargo, existe un grupo reducido de casos en los que las MLs aparecen en etapas posteriores a la primera década de vida del paciente, pudiendo ser diagnosticadas en la edad adulta (21, 22). La severidad de la malformación dependerá del tamaño, localización y profundidad de ésta (23). Además, cuando aparecen eventos hemorrágicos intraquisticos, éstos provocan que la coloración de la piel que recubre la malformación se vuelva azulada-rojiza (23).

Morfológicamente, las MLs se dividen en tres tipos: 1) las malformaciones macroquisticas, anteriormente denominadas higromas quísticos, y que constituyen grandes masas bien delimitadas (>2 cm. diámetro); 2) las malformaciones microquisticas, que se manifiestan como pequeñas vesículas (<2 cm diámetro) translúcidas con bordes mal definidos; y 3) las malformaciones mixtas, que albergan ambos tipos micro y macroquisticas (2, 24) (**Tabla 3**).



**Tabla 3. Clasificación de las malformaciones linfáticas según la ISSVA (2018)**

<b>Malformaciones vasculares simples</b>	
<b>Malformaciones linfáticas (ML)</b>	
ML quísticas	<i>PIK3CA</i>
Macro-quísticas	
Micro-quísticas	
Mixtas	
Anomalía Linfática Generalizada (GLA)	
Linfangiomatosis kaposiforme (KLA)	
ML en la enfermedad de Gorham-Stout (GSD)	
ML del conducto torácico	
Linfangioma	
Linfedema primario (diferentes tipos)	
Otras	

Abreviaturas: GLA: Anomalía Linfática Generalizada, del inglés *Generalized Lymphatic Anomaly*; GSD: enfermedad de Gorham-Stout, del inglés *Gorham-Stout disease*; KLA: Linfangiomatosis Kaposiforme, del inglés *Kaposiform Lymphangiomatosis*. Tabla traducida de la clasificación actualizada de la ISSVA 2018 (6).

Las MLs están presentes en un amplio espectro de trastornos que van, desde malformaciones aisladas o acompañadas de otras malformaciones vasculares, a afectaciones sistémicas como ocurre por ejemplo en la enfermedad de Gorham-Stout (GSD) o en la Anomalía Linfática Generalizada (GLA) (25). No se conocen con exactitud los mecanismos patogénicos que desencadenan la aparición de las MLs, sin embargo, las evidencias actuales acerca de su etiología apuntan a la desregulación de la vía de señalización PI3K/AKT causada por mutaciones somáticas en el gen *PIK3CA* (15, 17, 25, 26). Como se ha descrito en diferentes artículos, mutaciones en este gen, que provocan la sobre-activación de la ruta PI3K/AKT, están presentes en un 90% de los pacientes con MLs aisladas y de aparición esporádica (15, 17, 25-27). Estas mutaciones se localizan en las células endoteliales linfáticas (LECs; del inglés *Lymphatic Endothelial Cells*) causando un aumento de la tasa de proliferación celular y en consecuencia generando canales anómalos y desorganizados (26, 27).

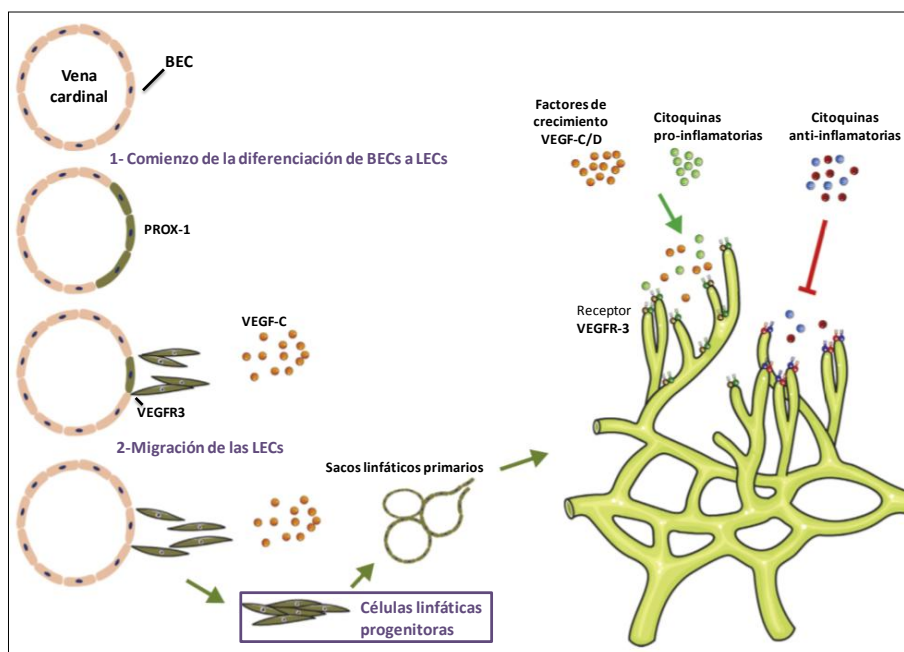
### 1.2.1 El sistema linfático

El sistema vascular linfático es un sistema circulatorio abierto compuesto por una red de vasos y órganos linfáticos que conectan los espacios intersticiales con la circulación sanguínea (28). Este sistema juega un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis tisular, el transporte de células inmunitarias y en la absorción de grasas y proteínas de gran tamaño. El funcionamiento del sistema linfático se basa en el transporte unidireccional de un líquido incoloro denominado linfa, junto con las macromoléculas absorbidas en los capilares linfáticos, hasta la circulación sanguínea (28, 29).

### 1.2.2 Desarrollo embrionario del sistema linfático

El proceso de formación de los vasos linfáticos se denomina linfangiogénesis, aunque algunos autores utilizan el término angiogénesis para referirse a él (30, 31). La linfangiogénesis tiene lugar al comienzo de la semana 6 de desarrollo embrionario cuando el sistema sanguíneo ya se encuentra formado (32). El proceso engloba la formación y maduración de los vasos linfáticos (30) y está regulado por la interacción de diversos factores de transcripción entre los que destacan: PROX-1, VEGFR-3, LYVE-1 o Podoplanina (33, 34).

En vertebrados, el inicio de la linfangiogénesis es evidente cuando una población de células endoteliales sanguíneas (BEC; del inglés *Blood Endothelia Cell*) de las venas cardinales, comienzan a expresar la proteína homeobox PROX-1 diferenciándose y originando las células endoteliales linfáticas (LECs) (**Figura 1**) (35, 36). Tras este proceso de diferenciación, el factor de crecimiento VEGF-C se une al receptor VEGFR-3 y da comienzo la migración de las LECs desde las venas cardinales hasta el tejido mesenquimal circundante para formar los plexos linfáticos iniciales y los sacos linfáticos primarios. La migración da lugar a la formación del sistema linfático primitivo, que prolifera y produce la migración de las LECs desde estas estructuras a todo el embrión, para fusionarse entre sí y dar lugar a los vasos linfáticos que rodearán los tejidos y órganos (35, 37, 38).



**Figura 1. Proceso de linfangiogénesis embrionaria.** Diferenciación de las células endoteliales sanguíneas (BECs) en células endoteliales linfáticas (LECs) en respuesta a la expresión de la proteína PROX-1. Migración de las LECs para formar los sacos linfáticos primarios mediante la activación de la proteína VEGFR-3 por la unión del ligando VEGF-C y maduración de la estructura para dar lugar al sistema linfático. Figura adaptada de la publicación de Sainz-Jaspeado M, et al. (32).

Este proceso de linfangiogénesis o de generación de vasos linfáticos fue descrito por primera vez en 1902 por Florence Sabin (39), quien observó mediante la inyección de tinta en embriones de cerdos, cómo las LECs que forman los vasos linfáticos brotan a partir de las grandes venas para formar sacos primarios, a partir de los cuales se desarrolla todo el sistema linfático (33, 39). Esta teoría se denominó “origen venoso” de los vasos linfáticos y fue apoyada y corroborada por múltiples hallazgos posteriores en diferentes animales (38-40).

### 1.2.3 Moléculas reguladoras de la linfangiogénesis

Existe una amplia familia de proteínas implicadas en la linfangiogénesis. Dentro de las moléculas más importantes se encuentran las proteínas PROX-1, LYVE-1, Podoplanina y VEGFR-3, ya que a su vez se utilizan como marcadores específicos para el aislamiento y caracterización de las LECs (34).

**PROX-1:** La proteína PROX-1 es un factor de transcripción nuclear esencial en la regulación de la diferenciación de BECs a LECs. PROX-1 es necesario para que las células mantengan la identidad de LECs pudiendo ser reprogramadas a BECs mediante la regulación negativa de PROX-1. Ratones deficientes en esta proteína no desarrollan sistema linfático, generándose un fenotipo letal. Sin embargo, ratones mutantes heterocigotos sí desarrollan vasculatura linfática, pero con una estructura desorganizada y sin integridad, lo que reduce su funcionalidad (41-43).

**Podoplanina:** La Podoplanina es una proteína transmembrana que se expresa en las LECs, actuando como marcador linfático, aunque también se expresa en osteoblastos, músculo esquelético, placenta, corazón y pulmón. Esta proteína es codificada por el gen *PDPN* y es requerida para llevar a cabo la separación total entre los vasos linfáticos y venosos ya formados. Ratones con mutaciones heterocigotas en *PDPN* presentan alteraciones patológicas del sistema linfático, y ratones *knockout* presentan un fenotipo letal debido a linfedema y fallo respiratorio (28, 44, 45).

**LYVE-1:** Es un receptor de membrana que se une al ácido hialurónico. Se expresa en las primeras etapas del desarrollo embrionario, incluso antes que PROX-1, y es altamente específico de LECs, aunque también puede expresarse en BECs de la dermis. LYVE-1 no es esencial para el desarrollo de los vasos linfáticos, ya que ratones deficientes en esta proteína desarrollan una red linfática normal (33, 43, 44).

**VEGFR-3:** Es un receptor de superficie celular tirosina quinasa específico para los factores de crecimiento endotelial vascular de tipo C y D (VEGF-C y VEGF-D). La ruta de señalización mediada por VEGFR-3 es esencial no solo para la formación inicial de los vasos y sacos linfáticos primarios durante el desarrollo embrionario, sino también para el mantenimiento de la vasculatura linfática en cualquier estadio de la vida. VEGFR-3 se expresa inicialmente en los vasos sanguíneos antes de la formación de la vasculatura linfática, pero según avanza el desarrollo embrionario disminuye su expresión en las BECs y gradualmente aumenta en las LECs hasta encontrarse restringida únicamente a ellas. Los ratones mutantes homocigotos que carecen de VEGFR-3 presentan una ausencia completa de sistema linfático (33, 35, 41, 43).

### 1.3 Anomalía Linfática Generalizada (GLA) y Síndrome CLAPO

La presente tesis doctoral, se centra en el estudio del Síndrome CLAPO y de la Anomalía Linfática Generalizada (GLA), dos enfermedades clínicamente diferentes que comparten una misma característica clínica principal dentro de su fenotipo, la presencia de malformaciones linfáticas (MLs). A pesar de ser dos enfermedades de muy baja prevalencia, el Hospital Universitario (H.U.) La Paz es centro de referencia tanto nacional como internacional para ambas patologías.

#### 1.3.1 Malformaciones vasculares asociadas a otras anomalías: El Síndrome CLAPO

El Síndrome CLAPO (del inglés, *Capillary malformation of the lower lip, Lymphatic malformation predominant on the face and neck, Asymmetry, and Partial/generalized Overgrowth*) es una enfermedad rara, descrita en 2008 por Juan Carlos López-Gutiérrez y Pablo Lapunzina (13), del H.U. La Paz, en seis pacientes no emparentados (MIM: 613089; ORPHA: 168984). El acrónimo CLAPO hace referencia a las principales manifestaciones clínicas presentes en estos pacientes y que incluyen, una malformación capilar en el labio inferior (*Capillary malformation of the lower lip*), acompañada de malformaciones linfáticas (*Lymphatic malformations*) presentes predominantemente en el área cervicofacial, asimetría (*Asymmetry*) facial y de las extremidades, y sobrecrecimiento parcial (*Partial Overgrowth*) o generalizado (*Generalized*) (**Figura 2**). Se trata, por tanto, de una combinación de malformaciones vasculares (principalmente capilares y linfáticas), que provocan la aparición de asimetría, asociadas a otras anomalías no vasculares como es el sobrecrecimiento.



**Figura 2. Principales características clínicas asociadas al Síndrome CLAPO.** A) Malformación capilar del labio inferior presente en el 100% de los pacientes. Es la característica clínica más relevante para el diagnóstico. B) Características fenotípicas asociadas a la MC del labio inferior, entre las que destacan las malformaciones linfáticas presentes en el área facial y lingual, y las malformaciones venosas. En algunos pacientes también se observa sobrecrecimiento parcial. Imágenes obtenidas de la cohorte de pacientes con Síndrome CLAPO del H.U. La Paz.

La malformación capilar (MC) del labio inferior es la manifestación clínica más característica y relevante para el diagnóstico del Síndrome CLAPO, dada su fácil visualización (13, 46-49). Dentro de las malformaciones vasculares, las MCs son el tipo más común de lesión y pueden presentarse de forma aislada, asociada con otras anomalías, o como ocurre en este caso formando parte de un conjunto de características clínicas que definen un Síndrome (50).

Actualmente, existen muy pocos casos de pacientes con Síndrome CLAPO reportados en la literatura (13, 46-49), por lo que los datos sobre posibles tratamientos o enfoques terapéuticos son muy escasos. El tratamiento se basa en el seguimiento y cuidado paliativo de las manifestaciones clínicas, e incluye la escleroterapia para disminuir el volumen de las MLs y la cirugía para la resección de las malformaciones muy localizadas o para tratar asimetrías óseas causadas por el sobrecrecimiento segmentario (51).

El mecanismo exacto por el cual se produce la combinación de alteraciones vasculares presentes en el Síndrome CLAPO se desconoce, sin embargo, el patrón irregular de manifestación clínica que presentan los pacientes, junto con la heterogeneidad fenotípica de la enfermedad, apunta a la presencia de un mosaicismo somático como posible causa genética.

### 1.3.2 Malformaciones vasculares linfáticas: Anomalia Linfática Generalizada (GLA)

La Anomalia Linfática Generalizada (GLA-*Generalized Lymphatic Anomaly*), anteriormente denominada linfangiomatosis, es un trastorno linfático congénito caracterizado por la presencia de MLs difusas o múltiples (ORPHA: 141209). Estas MLs tienden a infiltrar

tejidos adyacentes comprometiendo diferentes vísceras, entre las que destacan los pulmones, corazón, hígado, bazo, piel, tejidos blandos, y el hueso, pudiendo causar osteólisis en este último caso (52).

La sintomatología en GLA es inespecífica ya que depende de los tejidos afectados por la ML. Por tanto, la enfermedad presenta un fenotipo muy heterogéneo y una evolución clínica directamente relacionada con las áreas afectadas y la extensión de la enfermedad (52, 53). Las manifestaciones clínicas pueden aparecer a cualquier edad, aunque por lo general es más común que se diagnostique en las dos primeras décadas de vida (54).

Una de las áreas más comúnmente afectadas es la cavidad torácica (**Figura 3**), que puede estar acompañada de displasia del conducto torácico y a su vez originar quilotórax o quilopericardio, por el reflujo del quilo a los linfáticos intercostales o pericárdicos. En ambos casos, el pronóstico para estos pacientes empeora con posibles consecuencias letales en comparación con aquellos con otro tipo de afectación visceral (55, 56).



**Figura 3. Radiografía torácica.** La imagen muestra la presencia de una malformación linfática en la cavidad torácica acompañada de quilotórax. También se observa una disminución en el tamaño de las costillas del lado izquierdo causada por osteólisis del hueso. Imagen del paciente GLA053.

La afectación ósea se manifiesta con lesiones líticas en diferentes puntos del esqueleto en las que el hueso es reemplazado por tejido fibroso (**Figura 4**). Histológicamente, las imágenes de los pacientes con GLA muestran la presencia de vasos linfáticos en la médula ósea del hueso sin afectación cortical, suceso que no se observa en individuos sanos (57). La presencia de múltiples focos de osteólisis y la disminución en la densidad ósea se acompaña de dolor y/o movilidad reducida, producida por las fracturas patológicas que se generan a consecuencia de la debilidad del hueso. Las áreas más comúnmente afectadas son las costillas, cráneo, clavícula, columna dorsal, humero y fémur (58).



**Figura 4. Radiografía pélvica.** En la imagen se observan múltiples lesiones óseas que afectan a diferentes puntos de la pelvis y de las vértebras. En la cresta ilíaca izquierda se observa una pérdida de parte del hueso junto con una disminución de la densidad ósea. Imagen del paciente GLA011.

Dependiendo de la severidad de la enfermedad y de los síntomas predominantes, existen diferentes alternativas terapéuticas para tratar a los pacientes. La cirugía y la radioterapia se han utilizado para reducir los derrames pleurales y estabilizar las regiones afectadas del esqueleto (54, 59). Existen compuestos farmacológicos que reducen la proliferación celular y que han sido utilizados para el tratamiento de estos pacientes, como el Propanolol (inhibidor de la angiogénesis) (60, 61) o la Rapamicina (inhibidor de mTOR) (62-64).

El diagnóstico diferencial de los pacientes con GLA presenta ciertas limitaciones dado que existe un solapamiento fenotípico entre GLA y otras patologías, como la enfermedad de Gorham-Stout (*GSD-Gorham Stout Disease*) y la Linfangiomatosis Kaposiforme (*KLA-Kaposiform Lymphangiomatosis*) (**Tabla 4**).

La enfermedad de GSD (ORPHA: 73; MIM: 123880) es una patología rara, con una clínica muy similar a la enfermedad de GLA, que se caracteriza por la presencia de un aumento en la proliferación y dilatación de los vasos linfáticos en zonas adyacentes al tejido óseo, lo que provoca la aparición de una osteólisis muy agresiva que destruye el área cortical ósea y provoca la desaparición del hueso (57, 59). Al igual que en GLA, las MLs también pueden aparecer de forma difusa por diferentes partes del cuerpo y afectar a diferentes vísceras. Sin embargo, en GSD, estas MLs suelen aparecer en áreas localizadas y en menor número que en GLA (59), afectando con mayor agresividad al hueso, tanto al área medular como cortical (59).

Por su parte KLA (ORPHA: 464329), definida en 2013 como una variante del fenotipo GLA (65), se caracteriza por la presencia de malformaciones linfáticas difusas que presentan acúmulos de LECs fusiformes en sus canales (66). KLA afecta a diferentes vísceras, aunque presenta un claro predominio torácico, frecuentemente asociado a derrames pleurales y hemorragias pericárdicas (67), con un peor pronóstico (59, 65). Los pacientes con KLA

muestran de forma característica células linfáticas fusiformes, coagulación intravascular diseminada, un recuento bajo de plaquetas, una elevación del valor del dímero D, trombocitopenia y múltiples hematomas (66, 68). También se observan lesiones óseas que al igual que en GLA respetan el área cortical (69).

Diagnóstico diferencial			
	GLA	GSD	KLA
<b>Afectación ósea</b>	Múltiples focos de osteólisis compuestos por áreas líticas confinadas en la cavidad medular y que afectan a diferentes huesos	Osteólisis localizada por lo general en un único hueso, progresiva, muy agresiva y que afecta tanto a la zona medular como cortical del hueso provocando su reabsorción y desaparición	Múltiples focos de osteólisis compuestos por áreas líticas confinadas en la cavidad medular y que afectan a diferentes huesos
<b>Afectación torácica</b>	Derrames pleurales y cardíacos más frecuentes que en GSD	Derrames pleurales y cardíacos menos frecuentes que en GLA y KLA	Eventos hemorrágicos frecuentes, trombocitopenia, elevación de los niveles plasmáticos de dímero D, aumento de la agregación plaquetaria, masas en el mediastino y engrosamiento pleural
<b>Histopatología</b>	Canales linfáticos malformados y dilatados cubiertos por una monocapa de células endoteliales	Canales linfáticos malformados y dilatados cubiertos por una monocapa de células endoteliales	Canales linfáticos malformados y dilatados cubiertos por una monocapa de células endoteliales, focos de células fusiformes, plaquetas, glóbulos rojos extravasados, hemosiderina y fibrosis

**Tabla 4. Diagnóstico diferencial.** Características clínicas distintivas utilizadas para llevar a cabo el diagnóstico diferencial de la enfermedad de GLA, GSD y KLA (58, 66, 70). Abreviaturas: GLA-Anomalia linfática generalizada; GSD-enfermedad de Gorham-Stout; KLA- Linfangiomatosis kaposiforme.

A la dificultad del diagnóstico diferencial, se suma que la etiología por la cual se producen estas tres enfermedades, y en especial GLA que es nuestra patología de estudio, se desconoce. Sin embargo, al igual que ocurre en el Síndrome CLAPO, el patrón de manifestación de las características clínicas, junto con la falta de segregación familiar indican que GLA podría estar causado por mutaciones en forma de mosaicismo somático.

#### 1.4 Mosaicismo somático

El mosaicismo genético se define como el evento biológico por el cual un individuo derivado de un único óvulo fertilizado presenta dos o más poblaciones celulares con diferentes genotipos (71). Este fenómeno se produce a consecuencia de la aparición de alteraciones post-cigóticas durante la reparación o replicación del ADN, que cambian la composición genómica de una o varias células. Estas alteraciones pueden ser mutaciones puntuales, es decir cambios de un nucleótido por otro; variaciones estructurales del genoma, que incluyen duplicaciones,



deleciones y grandes cambios cromosómicos; alteraciones epigenéticas, como pueden ser cambios en el patrón de metilación; o reversiones espontáneas de mutaciones heredadas, aunque éstas últimas presentan una frecuencia de aparición muy baja (72).

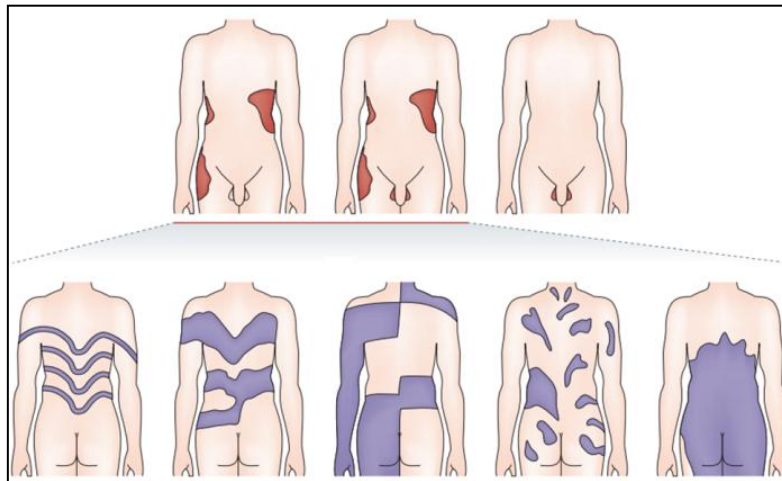
La distribución y el efecto fenotípico del mosaicismo variarán dependiendo del momento en el que se produzca la mutación, el lugar donde tenga lugar, es decir el gen/es afectados y el tejido donde se localice (73). Existen diferentes tipos de mosaicismos en función del tipo celular afectado. Si el cambio se produce antes de la diferenciación de las células germinales, la mutación estará presente tanto en los tejidos somáticos como en los germinales, denominándose mosaicismo gonosomal (74). Por el contrario, las mutaciones que ocurren después de este momento del desarrollo, se limitarán a los linajes celulares somáticos (mosaicismo somático) o germinales (mosaicismo germinal) (75). El mosaicismo germinal, afecta únicamente al tejido germinal (óvulo y espermatozoide) y tiene como consecuencia que las mutaciones sean transmitidas a la descendencia y expresadas de forma constitutiva por las siguientes generaciones (76). Por su parte, el mosaicismo somático, puede afectar a cualquier tejido somático (todos los tejidos del organismo a excepción del tejido germinal), y la consecuencia fenotípica dependerá del tipo y el número de células afectadas (73). Existen mutaciones que únicamente son detectadas en forma de mosaicismo somático, como ocurre con diversas variantes de ganancia de función en genes asociados a malformaciones vasculares (*PIK3CA*, *GNAQ*, *AKT1*, etc.). En este caso, se asume que en general su estado constitutivo (presente en todas las células del individuo) no es compatible con la vida y por tanto el riesgo de transmisión a la descendencia es ínfimo, ya que estos embarazos no serían viables (72).

Recientemente, se ha definido un nuevo subtipo de mosaicismo denominado constitutivo, que se caracteriza por la presencia de una variante en mosaico en todos los tipos celulares de un individuo (77). Este fenotipo puede producirse por diferentes mecanismos como la reversión espontánea de una variante patogénica en la línea germinal, la conversión génica debida a recombinación mitótica que restablece la secuencia de aminoácidos o por la adquisición de una ventaja selectiva de las células sanas de un embrión ante la presencia de un mosaicismo somático de aparición temprana (77).

Genótipicamente, dos individuos con la misma mutación somática pueden presentar fenotipos diferentes (76). Si la mutación tiene lugar en un tejido, donde la expresión del gen mutado no es relevante para la funcionalidad de dicho tejido, el fenotipo resultante no será patológico. De la misma forma, si la mutación se produce en estadios tempranos del desarrollo

embrionario, las manifestaciones clínicas variarán con respecto a una mutación que tenga lugar en edad avanzada del paciente (71). Por tanto, el momento y el lugar en el que se produce la mutación son decisivos para explicar el amplio espectro de manifestaciones clínicas que pueden surgir a partir de una misma mutación somática (78).

Fenotípicamente, es más fácil detectar la presencia de un mosaicismo somático cuando existe afectación cutánea (79). En este caso, el mosaicismo somático puede manifestarse como alteraciones epiteliales simples, diseminadas o parcheadas, o puede seguir patrones segmentarios derivados del desarrollo embrionario como ocurre con los patrones asociados a las líneas epiteliales de Blaschko, la distribución tipo tablero de ajedrez, la distribución filoide o la distribución parcheada sin separación de la línea media del cuerpo (75, 80, 81) (**Figura 5**).



**Figura 5. Mosaicismo somático con afectación cutánea.** Patrones de manifestación epitelial causados por mutaciones en mosaico somático. Figura adaptada de la publicación de Biesecker LG y Spinner NG (75).

Por otra parte, las mutaciones somáticas no se limitan únicamente al desarrollo embrionario si no que puede aparecer en cualquier momento de la vida, ya que forman parte del proceso natural de envejecimiento, reportándose un aumento de las mutaciones somáticas con la edad en una amplia variedad de genes (82, 83). Estas mutaciones somáticas son las causantes de patologías como, por ejemplo, el cáncer (83, 84).

#### 1.4.1 Técnicas de detección de mosaicismos somáticos

El diagnóstico genético o molecular de los pacientes afectados por mosaicismos somáticos resulta complejo debido a los diferentes porcentajes de células afectadas, el tipo de muestra a analizar y las especificaciones técnicas requeridas (85). El estudio molecular, parte de la obtención de una muestra biológica de la cual se extrae ADN. Las muestras biológicas más fácilmente obtenibles son la sangre y la saliva, ya que no se precisan técnicas muy

invasivas para su extracción. Sin embargo, cuando estudiamos mosaicismos somáticos, por lo general las mutaciones causantes de la patología únicamente se encuentran presentes en determinadas células y por tanto, el estudio aislado de las muestras de sangre/saliva puede conducir a falsos resultados negativos, que deben ser complementados con muestras de tejido afecto (85, 86).

En cuanto a la metodología, existen diferentes técnicas que pueden ser utilizadas para llevar a cabo el diagnóstico genético con niveles de sensibilidad y especificidad que varían. La secuenciación Sanger, los array-CGH o el cariotipo, comúnmente utilizados para llevar a cabo el diagnóstico genético, presentan limitaciones en el estudio de las patologías causadas por mosaicos, ya que los umbrales de detección no permiten capturar variantes presentes en porcentajes muy bajos. La estrategia diagnóstica consistirá por tanto en la utilización de técnicas de nueva generación, dentro de las que se encuentran la secuenciación masiva (NGS; del inglés *Next-Generation Sequencing*), la pirosecuenciación o la PCR digital (ddPCR; del inglés *droplet digital PCR*), entre otras (87).

La NGS es capaz de determinar simultáneamente la secuencia de millones de fragmentos de ADN de varios individuos, de manera rápida, económica y detectando variantes presentes hasta en un 1% de mosaicismo (85, 88). Existen tres aproximaciones que se pueden llevar a cabo mediante NGS: 1) la secuenciación del genoma completo (*WGS-Whole Genome Sequencing*), que incluye las regiones codificantes y no codificantes; 2) la secuenciación del exoma completo (*WES-Whole Exome Sequencing*), que engloba todas las regiones exónicas (codificantes) del genoma; y 3) la secuenciación de paneles de genes específicos, diseñados por el propio investigador para capturar las regiones de interés seleccionadas previamente (89, 90). Esta última aproximación es la más utilizada dado que disminuye el coste de la secuenciación, reduce el tiempo de diagnóstico y facilita el análisis posterior. Además, el estudio de los mosaicismos requiere de la obtención de profundidades de lectura muy altas (número de veces que se realiza una lectura en una misma posición del genoma), que permitirán detectar variantes presentes en porcentajes bajos (89). Para poder obtener grandes profundidades es necesario reducir el tamaño del panel, es decir el número de regiones que se desean capturar, y/o disminuir el número de pacientes que son secuenciados simultáneamente (91). Por ello, el uso de paneles de genes resulta muy beneficioso a la hora de estudiar las patologías causadas por mosaicismo somático, dado que el tamaño total de las regiones a secuenciar es mucho menor que en WES o en WGS, y por tanto es posible secuenciar paralelamente un mayor número de muestras.

Otra de las técnicas de nueva generación es la pirosecuenciación, capaz de detectar variantes presentes en más de un 5% de mosaicismo. Esta técnica se basa en la síntesis *de novo* de una secuencia de ADN a tiempo real. Durante la reacción, los nucleótidos se dispensan secuencialmente liberándose un pirofosfato (PPi) cada vez que un nucleótido es incorporado a la cadena de ADN, y generando a su vez una señal lumínica que es detectada, medida y cuantificada por la cámara del pirosecuenciador (92, 93). Las limitaciones asociadas a esta técnica incluyen la secuenciación de fragmentos de tamaño reducido, la necesidad de diseñar *primers* individuales para cada reacción, y un umbral de detección del 5%, por debajo del cual no es posible detectar las mutaciones. Sin embargo, resulta una técnica muy útil para la validación de los resultados previamente obtenidos mediante NGS.

La PCR digital o ddPCR por sus siglas en inglés *Droplet Digital PCR*, permite llevar a cabo la detección y cuantificación absoluta de los nucleótidos presentes en una determinada posición dentro de una muestra de ADN (94). Durante el desarrollo de esta técnica, el ADN original es dividido en 20,000 gotas/particiones que son amplificadas y marcadas individualmente con un fluoróforo específico para la secuencia de referencia y otro para la secuencia mutada. Las gotas portadoras de la secuencia de referencia y las gotas que presenten la secuencia mutada son cuantificadas de forma diferencial, logrando una detección muy precisa y sensible, con capacidad de visualizar variantes presentes en porcentajes de mosaicismo muy bajos (a partir de 0.1%) (95). Al igual que en la pirosecuenciación, la PCR digital es una técnica de análisis dirigido que requiere de sondas y *primers* diseñados específicamente para el estudio de una región genómica concreta, por lo que el análisis de un gen completo resultaría costoso en tiempo y dinero. Sin embargo, es una técnica muy útil para el *screening* de regiones *hotspot* de un gen o para confirmar resultados previos (95, 96).

### 1.5 Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR

La proliferación tisular es un proceso estrechamente regulado desde el desarrollo embrionario hasta la edad adulta. Alteraciones en este proceso pueden provocar diferentes patologías que incluyen entre otras el cáncer, Síndromes de sobrecrecimiento y anomalías vasculares (17, 97). Una de las principales vías involucrada en la regulación de la proliferación celular es la ruta PI3K/AKT/mTOR, diana terapéutica de múltiples agentes farmacológicos (97-99). La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, es una ruta biológica intracelular de vital importancia que puede ser activada por numerosos estímulos diferentes. La activación de los receptores de membrana desencadena una cascada de señalización que activa diferentes

proteínas involucradas en la transmisión de señales y que finaliza en la generación de crecimiento, proliferación, angiogénesis y supervivencia celular (97) (**Figura 6**). Las principales moléculas que componen la cascada de señalización son la proteína PI3K, la proteína AKT, la proteína PTEN y el complejo proteico mTOR (mTORC1 y mTORC2).

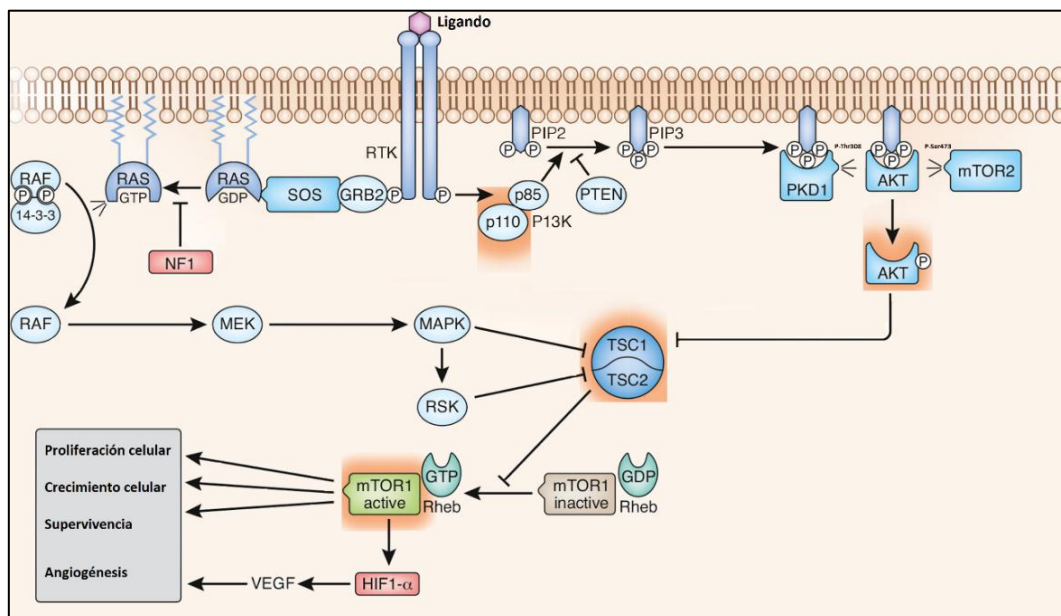
La fosfoinositol 3-quinasa (**PI3K**), uno de los primeros componentes de la cascada, es una proteína quinasa lipídica encargada de la transducción de señales y el tráfico vesicular. PI3K se divide en tres clases diferentes dependiendo de su estructura y la especificidad de sustrato que reconoce. La Clase I, es el subtipo más importante a nivel de activación de la vía PI3K/AKT/mTOR y está compuesta por un heterodímero formado por la subunidad catalítica p110 (cuya subunidad más expresada es la *alpha*, codificada por el gen *PIK3CA*) y la subunidad reguladora p85 (codificada por el gen *PIK3R1*). En condiciones basales, la subunidad catalítica p110 se halla en el citoplasma y su actividad se encuentra modulada negativamente por la unión del heterodímero p85/p110. Al recibir un estímulo, se produce la activación de los receptores de membrana y el reclutamiento del dímero p85/p110 desde el citoplasma a la membrana plasmática. Una vez en la membrana, el dímero se separa y la subunidad p110 cataliza la conversión del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) mediante su fosforilación. PIP3 actúa como mensajero lipídico activando a las proteínas PDK-1 y AKT, que son trasladadas desde el citoplasma a la membrana plasmática. Una vez en la membrana plasmática, AKT será activado y continuará la señalización (100, 101).

**AKT** y PDK-1 son quinasas que actúan a través de PI3K. Existen tres isoformas de AKT, estructuralmente similares, y que se expresan en la mayoría de los tejidos: AKT1, AKT2 y AKT3. PDK-1, una vez en la membrana plasmática, activará específicamente a la isoforma AKT1 fosforilándola en el residuo treonina 308 (Thr308). Para su completa activación, AKT1 debe ser fosforilado también en el residuo serina 473 (Ser473). Esto puede ser llevado a cabo por diferentes moléculas entre las que destaca mTORC2, que forma parte del complejo mTOR. Una vez activada la proteína AKT, la señal se propaga y un amplio número de efectores intracelulares son regulados para llevar a cabo diferentes funciones celulares (100, 101).

Uno de los efectores más importantes que regula la síntesis proteica favoreciendo el crecimiento y proliferación celular es la proteína quinasa **mTOR**, una serina-treonina quinasa que actúa transmitiendo la señal de la activación de PI3K/AKT. Esta quinasa, se divide en dos complejos proteicos mTORC1 y mTORC2, que difieren en su composición, sensibilidad a tratamiento farmacológico y su actividad. mTORC2 actúa a nivel de AKT1, fosforilando el

residuo Ser473 y favoreciendo la activación de AKT1. Por otro lado, mTORC1 activado, lleva a cabo la fosforilación de las proteínas 4EBP1 y S6K1, dando lugar a la síntesis de proteínas, crecimiento y supervivencia celular. Para que se produzca la activación de mTORC1, AKT1 debe fosforilar previamente a TSC2, inhibiendo la actividad del complejo TSC1/TSC2 que se encuentran regulando negativamente al complejo mTORC1. La activación de mTORC2 es dependiente de otros factores adicionales (100, 101).

Entre las fuentes de regulación negativa, además de TSC1/TSC2, destaca la proteína **PTEN** (*Phosphatase and Tensin homolog*) que actúa como un antagonista de la función de PI3K, favoreciendo la conversión de PIP3 a PIP2 mediante su desfosforilación. Se trata de una fosfatasa con actividad dual en lípidos y proteínas que disminuye la activación de AKT (100).



**Figura 6. Ruta biológica PI3K/AKT/mTOR.** Principales proteínas implicadas en la ruta molecular y las principales consecuencias biológicas implicadas en sobrecrecimiento y desarrollo de vasculatura sanguínea y linfática (angiogénesis). Imagen adaptada del artículo de Vahidnezhad H, et al. (102).

La desregulación de la vía PI3K/AKT/mTOR conduce a una respuesta proliferativa y anti-apoptótica que está asociada con múltiples patologías. Mutaciones patogénicas, de ganancia o pérdida de función, en los genes de esta ruta han sido descritas en pacientes con leucemia mieloide aguda (103), cáncer gástrico (104) o cáncer de mama (105), entre otros tumores sólidos y hematológicos. También se han descrito mutaciones en diferentes genes de la vía que están asociadas con malformaciones vasculares aisladas, como las malformaciones venosas (106) o linfáticas (17) (*PIK3CA*), o con patologías asociadas a sobrecrecimiento como el Síndrome Proteus (107) (*AKT1*), el Síndrome de Smith-Kingsmore (108) (*mTOR*), o el espectro de Síndromes de sobrecrecimiento asociados a *PIK3CA* (109) (*PIK3CA*). En concreto, la

subunidad catalítica p110 $\alpha$  de la proteína PI3K, es la que presenta una mayor implicación en tumorigénesis y en malformaciones vasculares, debido a la aparición de mutaciones somáticas en el gen *PIK3CA*, que codifica esta subunidad.

### 1.5.1 *PIK3CA* y Síndromes de Sobrecrecimiento Asociados a *PIK3CA* (PROS)

El gen *PIK3CA* (MIM 171834), localizado en el brazo largo del cromosoma 3 (3q26.32), se expresa en todas las células del cuerpo. Este gen codifica la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de la proteína PI3K, que junto con la subunidad reguladora p85 llevan a cabo la transducción de señales y la comunicación celular mediada por PI3K. La subunidad catalítica p110 $\alpha$  se compone de cinco dominios (**Figura 7**): un dominio de unión a la subunidad reguladora denominado dominio ABD o p85 BD, un dominio de unión a proteínas Ras denominado dominio RBD o Ras BD, un dominio C2 de unión a los lípidos de la membrana, un dominio helicoidal y un dominio quinasa (110).

**Figura 7. Dominios del gen *PIK3CA***

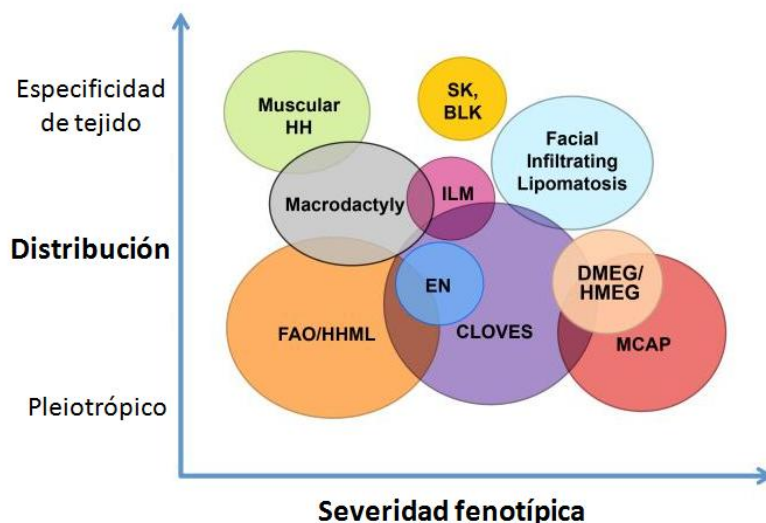


Se han identificado mutaciones a lo largo de todo el gen en diferentes tipos de tumores, y en Síndromes de sobrecrecimiento (111). Aunque las mutaciones se encuentran distribuidas por todo el gen, existen zonas de mayor recurrencia también denominadas *hotspots* donde es más frecuente que se produzca la mutación. Estas zonas se localizan en el exón 10, situado en el dominio helicoidal (Glu542Lys y Glu545Lys), y en el exón 21, correspondiente con el dominio quinasa (His1047Arg). Más del 80% de las mutaciones en *PIK3CA* tienen lugar en estas regiones *hotspots*, las cuales se ha demostrado que incrementan la actividad quinasa de la proteína PI3K, provocando un aumento de la señalización y en consecuencia un incremento del crecimiento celular (84, 111). Hay que tener en cuenta que la secuencia del gen *PIK3CA* que codifica para el dominio helicoidal (exones 10-14), presenta una alta homología (>95%) con otra región del genoma localizada en el cromosoma 22 (112, 113).

Además de su gran implicación en cáncer (111), este gen es causante del espectro de Síndromes de sobrecrecimiento asociados a *PIK3CA*, denominado PROS por sus siglas en inglés *PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum* (114). El espectro PROS, se compone de fenotipos que varían desde patologías leves, hasta malformaciones severas. Aunque algunas de las entidades

dentro del espectro PROS comparten características fenotípicas solapantes, se pueden reconocer como entidades clínicas diferenciadas (85) (**Figura 8**). La decisión de agrupar un amplio número de entidades clínicamente diferentes bajo el mismo nombre, fue el hecho de que todas ellas están causadas por mutaciones somáticas de ganancia de función en el gen *PIK3CA*. Dentro del espectro PROS se incluyen: A) fenotipos sindrómicos, complejos y con un alto grado de afectación, como es el Síndrome de Macrocefalia-Malformación Capilar (85) (M-MC; MIM #602501); y B) fenotipos aislados con compromiso menos extenso, como la macrodactilia (115) (MIM #155500). Clínicamente, los pacientes con PROS se caracterizan por presentar un sobrecrecimiento congénito o manifestado de forma temprana en la infancia, de aparición esporádica (sin historia familiar) y distribución en mosaico (afectación segmentaria) (85). Todos los Síndromes incluidos en el espectro PROS son considerados enfermedades raras, definidas por la Unión Europea como aquellas con menos de 5 casos por cada 10.000 habitantes.

La etiología común de estos Síndromes consiste en mutaciones post-cigóticas en el gen *PIK3CA*, que dependiendo del lugar y el momento del desarrollo embrionario en el que se produzcan, darán lugar a un fenotipo u otro. Estas mutaciones siempre se presentan en forma de mosaico somático, ya que el fenotipo resultante de la expresión constitutiva no es compatible con la vida (fenotipo letal constitutivo) (72).



**Figura 8. Síndromes y patologías incluidas dentro del espectro PROS.** Diagrama que representa el solapamiento existente entre los Síndromes incluidos en el espectro PROS según las características fenotípicas. Abreviaturas: MCAP, Macrocefalia-Malformación Capilar; DMEG, megalencefalia displásica; HMEG, Hemimegalencefalia; CLOVES, Síndrome CLOVES; EN, Nevus epidérmico; ILM, Malformaciones linfáticas aisladas; SK, Queratosis seborreica; HH, Hemihiperplasia muscular; FAO, Sobrecrecimiento fibroadiposo; HHML, Hemihiperplasia múltiple lipomatosa. Imagen obtenida de la publicación de Keppler-Noreuil KM, Biesecker LG et al. (85).



## ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 HIPÓTESIS

- A. Tanto el Síndrome CLAPO como GLA son dos enfermedades raras, en las que las malformaciones linfáticas son una de las características clínicas principales. Su patrón de distribución segmentario y su especificidad de tejido, es similar al observado en otras malformaciones o Síndromes vasculares causadas por mutaciones somáticas activantes en la vía PI3K/AKT/mTOR. Por ello, CLAPO y GLA podrían estar causadas también por mutaciones somáticas que provoquen la activación de esta ruta molecular.
- B. La utilización combinada de metodologías de secuenciación a grandes profundidades de lectura, en muestras pareadas sangre/tejido, junto con la utilización de un algoritmo bioinformático, específico para la detección de mutaciones somáticas en mosaicos bajos, permitirá identificar por primera vez mutaciones patogénicas en estas dos enfermedades raras.
- C. La descripción de la causa genética y de las rutas moleculares involucradas en estas dos patologías permitirá establecer nuevos protocolos diagnósticos extrapolables a la práctica clínica de patologías vasculares, así como orientar en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para su tratamiento.

### 2.2 OBJETIVOS

1. Evaluar clínica y molecularmente dos cohortes de pacientes con diagnóstico clínico de CLAPO y de GLA, con el objetivo de describir su causa genética y patrón de herencia. (Hipótesis A)
2. Utilizar la técnica de secuenciación masiva (NGS-*Next Generation Sequencing*) y desarrollar un algoritmo bioinformático específico, que permita la detección de mutaciones somáticas en mosaicos bajos en muestras pareadas sangre/tejido. (Hipótesis B)
3. Desarrollar un protocolo experimental y bioinformático de secuenciación masiva, que sea aplicable en la práctica clínica para el diagnóstico de pacientes con CLAPO, GLA y malformaciones vasculares. (Hipótesis C)
4. Caracterizar mediante ensayos de expresión y modelos *In vivo*, el impacto funcional de las variantes detectadas y extrapolar los resultados para el uso de nuevas dianas terapéuticas en CLAPO y GLA. (Hipótesis C)

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar de trabajo**

El proyecto se desarrolló de forma conjunta entre la Sección de Malformaciones Vasculares del Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) del H.U. La Paz (Madrid), dirigida por el Dr. Víctor Martínez-Glez, y la Unidad de Anomalías Vasculares del mismo hospital, dirigida por el Dr. Juan Carlos López Gutiérrez. Hoy en día el H.U. La Paz es centro de referencia en las dos patologías objeto de este proyecto y posee el mayor número de pacientes diagnosticados a nivel nacional y europeo. A su vez, el hospital cuenta con un servicio de anatomía patológica con el que el INGEMM mantiene una estrecha colaboración desde hace varios años, así como un departamento de bioinformática que trabaja en contacto directo con los investigadores.

Además, durante el transcurso del proyecto, se llevó a cabo una estancia temporal colaborativa en un centro de investigación independiente, con recursos necesarios para el desarrollo de experimentos funcionales, el Instituto de Investigación Biomédica “Alberto Sols”, bajo la dirección del Dr. Víctor Luíz Ruiz. Así mismo, el modelo de ratón utilizado para la caracterización de las variantes se desarrolló en el laboratorio del Dr. Michael Dellinger en el Centro Médico de la Universidad de Southwestern en Dallas, Texas (EE. UU.). Gracias a esta colaboración, actualmente existe un vínculo estable de trabajo entre ambos laboratorios, con numerosos proyectos de caracterización de malformaciones linfáticas que están generando resultados prometedores.

#### **3.2 Pacientes**

Actualmente, contamos con un registro que recoge un total de 17 pacientes con Síndrome CLAPO, y una base de datos con 69 casos de GLA. De estas cohortes, el estudio molecular se llevó a cabo en 11 pacientes con Síndrome CLAPO y en 9 pacientes con GLA, seleccionados tras una reevaluación clínica exhaustiva, y una recopilación de muestras biológicas (**Figura 9**). Los criterios de inclusión de los pacientes en el estudio molecular fueron los siguientes:

- 1) Pacientes diagnosticados y/o en seguimiento en el H.U. La Paz con afectación linfática asociada a una de las características clínicas específicas para cada patología: malformación capilar del labio inferior para CLAPO; afectación ósea/visceral para pacientes con GLA.

2) Diagnóstico clínico claro, sin presencia de elementos difusos o manifestaciones clínicas solapantes con otros Síndromes genéticos.

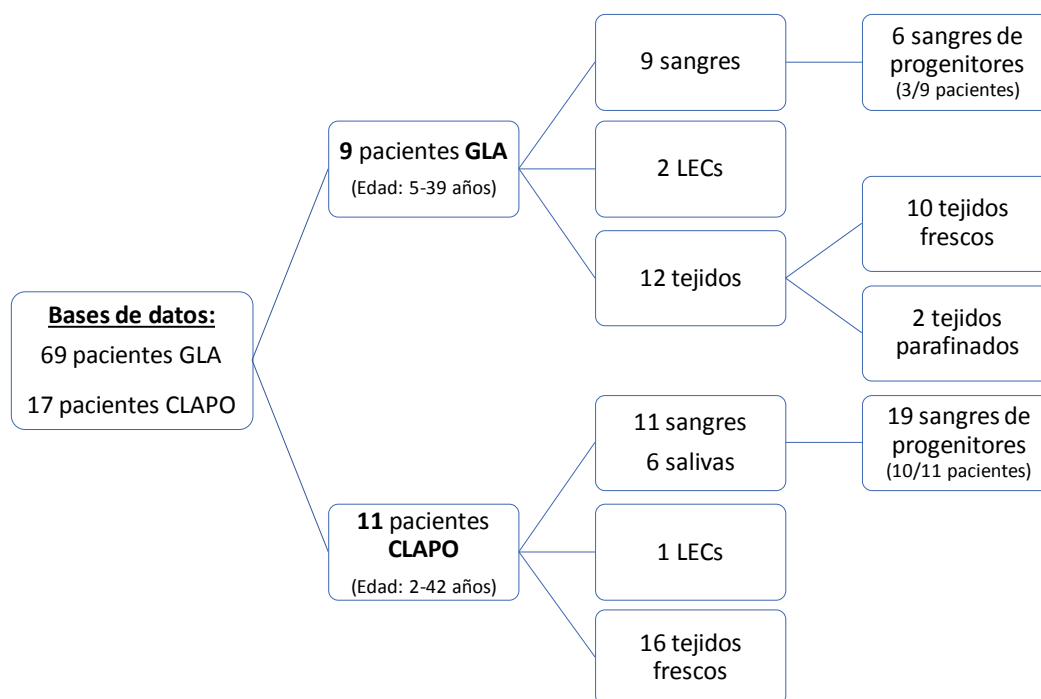
3) Consentimiento informado actualizado y firmando por el paciente o por su tutor en caso de tratarse de menores de edad.

4) Disposición de muestra de tejido afecto, es decir, con presencia de malformación vascular y/o sobrecrecimiento. Este requisito supuso la principal limitación a la hora de escoger a los pacientes, ya que la obtención de muestras de tejido afecto sólo es posible mediante intervención quirúrgica indicada para el tratamiento.

Todos los pacientes seleccionados (11 CLAPO y 9 GLA) son de ámbito nacional y presentan edades comprendidas entre 2 y 42 años, con una media de 12,1 años para los pacientes con CLAPO y 20,4 años para los pacientes con GLA (**Figura 9**). Antes de comenzar del estudio, se llevó a cabo una segunda reevaluación fenotípica en el INGEMM de los pacientes seleccionados, en la que se recogieron datos clínicos, evolutivos, fotografías clínicas, valoración minuciosa de las manifestaciones fenotípicas tabuladas mediante codificación internacional HPO (*Human Phenotype Ontology*), datos genealógicos, muestras biológicas disponibles y resultados previos de estudios realizados. La codificación HPO es una clasificación numérica que establece una nomenclatura estandarizada de las manifestaciones fenotípicas presentes en una patología (116).

De estos pacientes, contamos con 20 muestras de sangre, 6 de saliva, 28 de tejido obtenidos de forma retrospectiva (muestras embebidas en parafina) o prospectiva (por medio de biopsia cutánea, o durante procedimientos quirúrgicos programados dentro de los tratamientos habituales), 3 muestras de células endoteliales linfáticas (LECs), aisladas a partir de malformaciones linfáticas (MLs), y 25 muestras de sangre de 13/20 progenitores (**Figura 9**).

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario la Paz (Referencia PI-1919 para los pacientes con Síndrome CLAPO; Referencia PI-1409 para los pacientes con GLA).



**Figura 9. Pacientes y muestras seleccionadas para llevar a cabo el estudio clínico y molecular.** Pacientes con CLAPO y GLA seleccionados de la base de datos según los criterios especificados, dentro de los cuales la disposición de muestra de tejido afecto supone la limitación más importante (9/69 pacientes con GLA y 11/17 pacientes con CLAPO). Muestras disponibles de cada grupo de pacientes en las cuales se llevará a cabo el estudio molecular (23 muestras biológicas de pacientes con GLA y 34 muestras de pacientes CLAPO; sin contar muestras de progenitores).

### 3.3 Tratamiento de las muestras biológicas y extracción de ADN

Para llevar a cabo los estudios moleculares fue necesario obtener el ADN de las muestras biológicas de los pacientes. Se recogieron 4 tipos de muestras diferentes: sangre, saliva, tejido fresco y tejido embebido en parafina; cada una de las cuales fue procesada siguiendo protocolos independientes, específicos para el tipo de muestra.

Las muestras de sangre periférica fueron recogidas en tubos EDTA de 3 ml y almacenadas a 4°C durante un máximo de 7 días hasta su extracción. El ADN fue extraído de los linfocitos circulantes siguiendo el protocolo estándar establecido en el INGEMM, que incluye la utilización del kit comercial Chemagic MSM I (ChemaGen, PerkinElmer, EE. UU.), según las recomendaciones del fabricante.

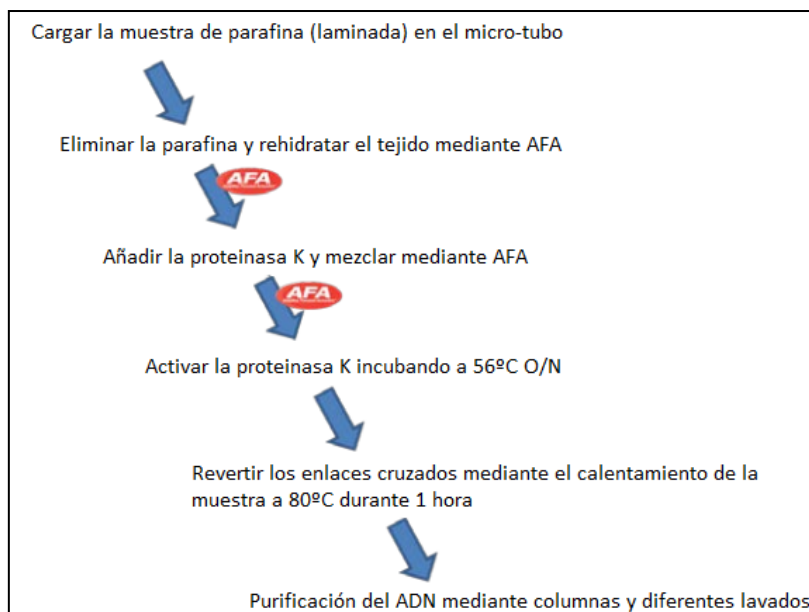
En el caso de las muestras de tejido fresco, estas fueron transportadas desde el quirófano en medio de cultivo basal Ham F-10 (Gibco #11550043, ThermoFisher, EE. UU.), hasta el INGEMM. El procesamiento se realizó en el menor tiempo posible, aproximadamente dentro de los 30 min posteriores a su resección quirúrgica. Se ha establecido un protocolo personalizado para el procesamiento de las muestras de tejido fresco.

Para ello antes de extraer el ADN, la pieza de tejido es lavada con tampón fosfato alcalino (PBS; ThermoFisher, EE. UU.), y dividida en tres fragmentos: uno de ellos destinado a la extracción directa de ADN; el segundo fragmento embebido en solución ARN-*later* (#AM7024 Ambion, ThermoFisher, EE. UU.), y congelado para ser utilizado en futuros experimentos de expresión, para nuevas extracciones de ADN, etc.; el último fragmento destinado a la realización de cultivos celulares primarios para la obtención de una nueva fuente de ADN, realización de estudios funcionales o llevar a cabo el aislamiento de tipos celulares específicos. En el caso de las malformaciones linfáticas el tipo celular seleccionado para su aislamiento fueron las LECs. En todos los casos, el ADN fue extraído utilizando el kit comercial Epicentre (Illumina, EE. UU.), siguiendo las especificaciones del proveedor.

En los casos en los que la muestra no procedía del H.U. La Paz, ésta fue embebida directamente en solución ARN-*later*, para evitar su degradación, y enviada al INGEMM para su posterior congelación y extracción directa de ADN. En este caso no es posible llevar a cabo cultivos celulares. La solución ARN-*later* es un reactivo acuoso estabilizador, utilizado para el almacenamiento de tejidos, que penetra rápidamente en la muestra protegiendo el ARN celular de su degradación.

Las muestras de saliva fueron recogidas mediante torundas en tubos específicos del kit Oragene (OG-575) de DNA-Genotek (OraSure Technology, EE. UU.) y extraídas siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

El último tipo de muestra biológica es el tejido embebido en parafina (FFPE-*Formalin Fixed Paraffin Embedded*). Únicamente han sido procesados los bloques que histológicamente presentaban componente de malformación vascular suficiente y un tamaño adecuado para poder obtener una cantidad de ADN adecuada. Antes de la extracción, el departamento de Anatomía Patológica del H.U. La Paz llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico para determinar la zona de la parafina donde existía un mayor porcentaje de afectación vascular. Una vez seleccionada el área con mayor porcentaje de tejido afecto, se realizaron cortes de 15  $\mu\text{m}$  utilizando un microtomo Leica RM2125 RTS (Leica Biosystems, Alemania). Las muestras fueron desparafinadas utilizando el ultrasonicador M220 de Covaris (EE. UU.), siguiendo las especificaciones del kit TruXTRAC FFPE ADN microTUBE Kit (Covaris, EE. UU.) para la extracción del ADN genómico (**Figura 10**).



**Figura 10. Protocolo de extracción de ADN a partir de FFPE.** Opción C para la extracción del ADN genómico total de la muestra de FFPE según el kit TruXTRAC FFPE ADN microTUBE. Abreviatura, AFA: del inglés, *Adaptive Focused Acoustics*; O/N: durante la noche, del inglés *OverNight*.

Una vez extraídas todas las muestras de sangre, tejido y saliva, éstas fueron cuantificadas utilizando el lector Infinite M200 (Tecan, Suiza) y posteriormente almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 3.3.1 Inmunohistoquímica e histología básica

Las muestras parafinadas, correspondientes a los tejidos de malformación linfática, utilizadas para llevar a cabo los estudios moleculares fueron preevaluadas por el departamento de Anatomía Patológica del H.U. La Paz. Para el estudio histopatológico, se realizaron cortes de  $5\mu\text{m}$  que fueron teñidos con hematoxilina y eosina para visualizar los núcleos de las células del tejido analizado. Una patóloga experimentada revisó y evaluó de forma independiente la histología de cada uno de los tejidos según los protocolos estándar y los criterios preestablecidos.

Tras esto se llevó a cabo el estudio inmunohistoquímico de las muestras utilizando el marcador específico linfático D2-40 (Anticuerpo monoclonal Podoplanina, MA1-83884 ThermoFisher, EE. UU. ). Para ello se utilizaron nuevos cortes de  $3\mu\text{m}$  de cada bloque de parafina que fueron desparafinados e hidratados utilizando el tampón de la casa comercial DAKO (Agilent, EE. UU.) y el sistema PTLINK (DAKO, EE. UU.). El protocolo se realizó según las especificaciones técnicas y protocolos estandarizados por la sección de Anatomía Patológica. Los cristales con los cortes de parafina fueron bloqueados e incubados con el anticuerpo



primario D2-40 (1:1000) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se aplicó el anticuerpo secundario (1:20000) conjugado con la peroxidasa (HRP), y se visualizó la reacción mediante el cromógeno diaminobencidina (DAKO, EE. UU.) en un microscopio óptico.

### 3.4 Secuenciación Masiva

Los experimentos de secuenciación masiva (NGS-*Next Generation Sequencing*) fueron realizados en el INGEMM, en un total de 57 muestras (sin contar progenitores), procedentes de 11 pacientes con Síndrome CLAPO y 9 pacientes con GLA. Para llevar a cabo el estudio, se utilizaron un total de 5 paneles diferentes (OGLYVAS, MALVA, LMI, Mosaicos, Ampliseq) que incluían genes específicos asociados a malformaciones vasculares y Síndromes de sobrecrecimiento. La decisión de utilizar paneles de diseño personalizado en lugar de exomas completos se basó en la necesidad de obtener profundidades de lectura muy altas para poder detectar variantes en mosaicos a partir del 1%.

#### 3.4.1 Diseño de los paneles

Todos los paneles fueron diseñados durante el transcurso del proyecto por nuestra Sección de Malformaciones Vasculares con apoyo de la Sección de Genómica Estructural y Funcional del INGEMM, a excepción del panel OGLYVAS diseñado anteriormente. Dentro de los paneles utilizados existen dos metodologías de trabajo, la captura de las regiones de interés mediante la hibridación de sondas específicas, y la generación de amplicones utilizando *primers* específicos de las regiones candidatas (**Figura 11**). Para los paneles de hibridación, las sondas se diseñaron utilizando las herramientas SureSelect (<https://earray.chem.agilent.com/sureselect/index.htm>) de Agilent (EE. UU.), Nimblegen design (<https://design.nimblegen.com>) de Roche (Suiza), y el genoma de referencia hg19/GRCh37 (Refseq, NCBI, EE. UU.). Previamente al comienzo del ensayo, todos los diseños fueron testados *in silico* por la Sección de Bioinformática del INGEMM, comprobándose que todas las regiones incluidas en el panel estaban correctamente cubiertas con las sondas diseñadas. Se obtuvo una eficiencia *in silico* para todos los paneles de >98%. Adicionalmente, todos los diseños incluyeron 26 SNPs de genotipado y 13 regiones localizadas en los cromosomas sexuales (5 en el cromosoma X y 8 en el cromosoma Y), con el fin de utilizarlos como marcadores de trazabilidad de las muestras introducidas. En el caso del panel de amplicones el diseño de los *primers* se realizó con el programa comercial DesignStudio de Illumina (EE. UU.), basado en las especificaciones del kit TruSeq Custom Amplicon Low-Input dual-pool de Illumina (EE. UU.).

El primer panel de genes utilizado fue el panel “OGLYVAS” (*OverGrowth-Lymphatic-VAscular Syndromes*). Este panel fue diseñado y testado en el INGEMM para la detección de mutaciones en las regiones codificantes de 301 genes (**Anexo I**) asociados a Síndromes de Sobrecrecimiento, malformaciones linfáticas y malformaciones vasculares. En este panel se analizaron 11 muestras (7 sangres, 4 tejidos) de 7 pacientes con Síndrome CLAPO (CL01, CL02, CL04, CL06, CL07, CL08, CL09) disponibles en el momento de comienzo del proyecto (2015) y 1 muestra de sangre del paciente GLA002. La profundidad de lectura media obtenida fue de 300x, lo que dificultó la detección de mosaicos somáticos bajos, y no se obtuvieron resultados positivos por lo que se decidió diseñar y utilizar un panel diferente para continuar con el estudio.

El segundo panel utilizado se denominó “LMI”, de las siglas en inglés *Lymphatic Malformation Institute*, ya que fue diseñado con fondos del Instituto de Malformaciones Linfáticas (LMI, Bethesda, EE. UU.). El panel contenía la región codificante de 1375 genes (**Anexo I**), que fue diseñado para el estudio específico de patologías asociadas a malformaciones linfáticas, en especial para GLA y la enfermedad de Gorham-Stout. El panel incluía genes relacionados con malformaciones vasculares y genes pertenecientes a las rutas de señalización más importantes asociadas tanto a linfangiogénesis como a osteogénesis, como por ejemplo la ruta PI3K/Akt/mTOR, la ruta RANKL/RANK, o la ruta Notch, entre otras. La profundidad de lectura media obtenida fue de 500x. Este panel se utilizó como herramienta de cribado para llevar a cabo una primera búsqueda de variantes candidatas. En este panel se secuenciaron 12 muestras (5 sangres, 6 tejidos y 1 células) correspondientes a 8 pacientes con GLA (GLA002, GLA006, GLA011, GLA022, GLA038, GLA051, GLA053, GLA054) y 9 muestras (3 sangres y 6 tejidos) correspondientes a 8 pacientes con CLAPO (CL01, CL02, CL04, CL06, CL07, CL09, CL10, CL13).

El tercer panel, que surgió a raíz del panel OGLYVAS, se llamó “MALVA” (MALformaciones VAsculares) y contenía la región codificante de 108 genes (**Anexo I**) asociados a malformaciones vasculares. Este panel fue diseñado para obtener profundidades de lectura medias de 1000x y de esta forma poder estudiar tanto las mutaciones germinales como los mosaicismos somáticos. Dentro de los pacientes de nuestro proyecto se han secuenciado en este panel 20 muestras (6 sangres, 6 salivas, 7 tejidos y 1 células) de 10 pacientes con CLAPO (CL01, CL02, CL04, CL07, CL08, CL09, CL010, CL11, CL13, CL15) y 9 muestras (3 sangres, 5 tejidos y 1 células) de 7 pacientes con GLA (GLA002, GLA006, GLA011, GLA022, GLA053, GLA054, GLA061).

Los dos paneles restantes utilizados fueron el panel “Mosaicos” y el panel “Ampliseq”, ambos basados en el estudio de la región codificante de 20 genes (**Anexo I**) asociados con la ruta de PI3K/AKT/mTOR. En el caso específico del panel “Mosaicos”, se incluyó la secuencia completa del gen *PIK3CA*, región exónica e intrónica. La función principal de estos paneles fue la búsqueda dirigida de mutaciones en el gen *PIK3CA* y principales genes asociados a este. En el caso del panel Mosaicos, la profundidad media obtenida fue de 500x, mientras que en el panel Ampliseq se obtuvo una profundidad media de 7000x. Este último panel, cuya metodología se basa en la generación de amplicones, incluía la tecnología *dual-pool* gracias a la cual se generan dos librerías a partir de la misma muestra que son secuenciadas de forma paralela y posteriormente combinadas mediante la herramienta bioinformática Amplicon DS (Illumina, EE. UU.). Esta tecnología es de gran utilidad para estudiar variantes en porcentajes muy bajos o muestras embebidas en parafina, ya que reduce el porcentaje de artefactos o falsos resultados positivos al secuenciar por duplicado cada muestra. El panel Mosaicos fue diseñado específicamente para estudiar pacientes con Macrocefalia-Malformación Capilar (M-MC), CLOVES y macrodactilia por lo que únicamente se introdujeron 4 muestras de tejido de pacientes con CLAPO (CL02, CL04, CL06, CL07). Por otro lado, en el panel Ampliseq se secuenciaron 11 muestras (10 tejidos y 1 células) de los 9 pacientes con GLA (GLA002, GLA006, GLA011, GLA022, GLA038, GLA051, GLA053, GLA054, GLA061) y otras 4 muestras de tejido de 4 pacientes con CLAPO (CL04, CL08, CL011, CL015).

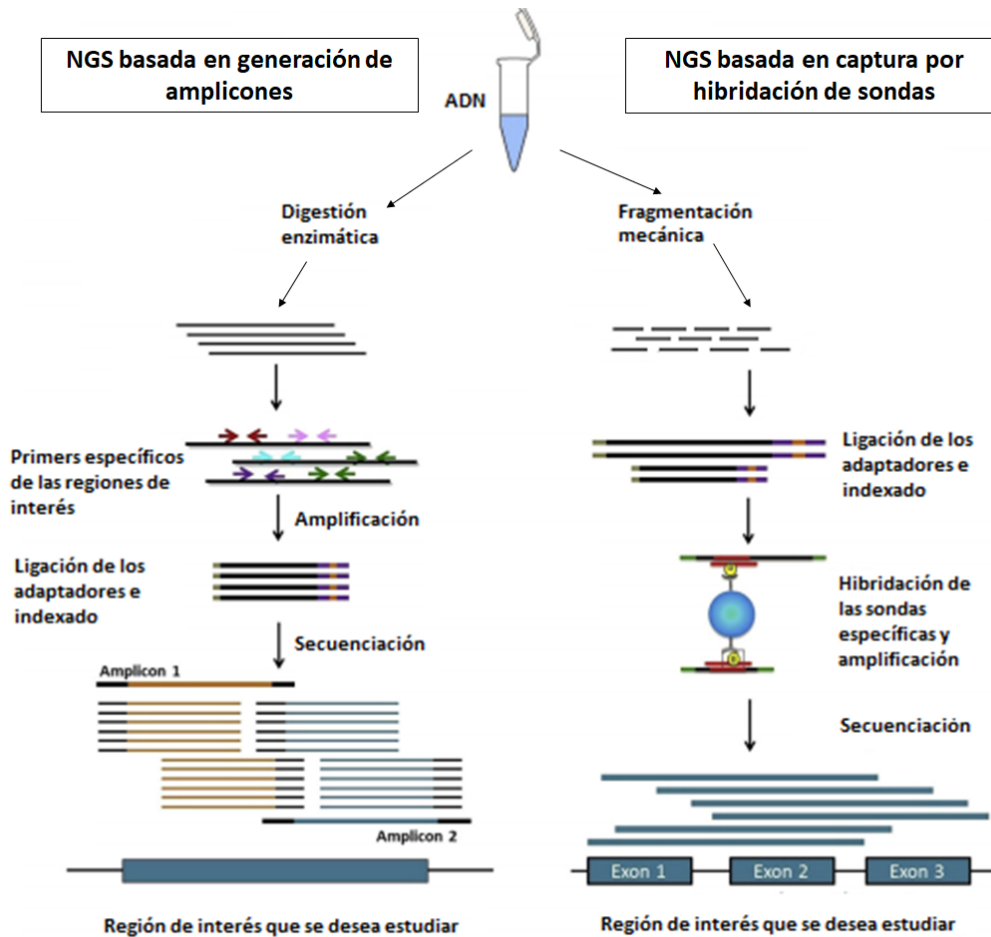
Paneles diseñados	
<b>OGLYVAS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 301genes</li> <li>• 300x de profundidad media</li> <li>• 7 pacientes con Síndrome CLAPO (CL01, CL02, CL04, CL06, CL07, CL08, CL09)</li> </ul>
<b>LMI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1375 genes</li> <li>• 500x de profundidad media</li> <li>• 8 pacientes con CLAPO (CL01, CL02, CL04, CL06, CL07, CL09, CL10, CL13)</li> <li>• 8 pacientes con GLA (GLA002, GLA006, GLA011, GLA022, GLA038, GLA051, GLA053, GLA054)</li> </ul>
<b>MALVA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 108 genes</li> <li>• 1000x de profundidad media</li> <li>• 10 pacientes con CLAPO (CL01, CL02, CL04, CL07, CL08, CL09, CL010, CL11, CL13, CL15)</li> <li>• 7 pacientes con GLA (GLA002, GLA006, GLA011, GLA022, GLA053, GLA054, GLA061)</li> </ul>
<b>Mosaico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 genes (incluye la secuencia exónica e intrónica de <i>PIK3CA</i>)</li> <li>• 500x de profundidad media</li> <li>• 4 de pacientes con CLAPO (CL02, CL04, CL06, CL07)</li> </ul>
<b>Ampliseq</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 genes</li> <li>• 7000x de profundidad media</li> <li>• 4 pacientes con CLAPO (CL04, CL08, CL011, CL015)</li> <li>• 9 pacientes con GLA (GLA002, GLA006, GLA011, GLA022, GLA038, GLA051, GLA053, GLA054, GLA061)</li> </ul>

**Figura 11. Paneles diseñados y utilizados para el estudio molecular con CLAPO y GLA.** El panel Ampliseq es el único basado en la metodología de amplicones. El resto de los paneles se basan en la hibridación por sonda. La profundidad varía en función del tamaño del panel y el número de muestras introducidas por carrera.

### 3.4.2 Protocolo de secuenciación

Todos los paneles, a excepción del panel Ampliseq, fueron procesados con los mismos reactivos, protocolos e instrumentos. Todas las muestras fueron fragmentadas mecánicamente utilizando el ultrasonificador Covaris M220 (Covaris, EE. UU.). El proceso de generación de librerías (*paired-end*, 2x150 pb) se llevó a cabo siguiendo los protocolos estándares establecidos por los fabricantes de los kit KAPA HTP Library Preparation (Roche, Suiza), para la secuenciación de librerías en las plataformas de Illumina (EE. UU.), SeqCap EZ Library SR (Roche, Suiza) kit para la captura de los fragmentos, y NEXTflex-96 Pre Capture Blocker and Adapters Kit (Bioo Scientific, PerkinElmer, EE. UU.) para el indexado de las muestras. La generación de los *clústeres* y la secuenciación de las regiones capturadas se llevó a cabo en el secuenciador NextSeq™ 500 (Illumina, EE. UU.), utilizando el cartucho y los reactivos del kit MID Output v2 de 300 ciclos, de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Illumina, EE. UU.). Los datos brutos obtenidos (archivos BCL) fueron enviados a la Sección de Bioinformática del INGEMM para su procesamiento (**Figura 12**).

Por otra parte, el protocolo de secuenciación basado en amplicones se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del kit comercial TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit (Illumina, EE. UU.). La cantidad de ADN de partida necesaria fue de 90 ng para las muestras de tejido fresco y de 200 ng para las muestras embebidas en parafina. Una vez fueron capturadas las regiones específicas, mediante la hibridación y elongación de los *primers*, estas fueron amplificadas y purificadas. Para la secuenciación, se utilizó el instrumento NextSeq™ 500 (Illumina, EE. UU.), y los cartucho y reactivos del kit MID Output v2 de 300 ciclos, de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Illumina, EE. UU.). Los datos obtenidos fueron enviados entonces a la Sección de Bioinformática del INGEMM para un procesamiento (**Figura 12**).



**Figura 12.** Protocolo de secuenciación masiva (NGS) basada en la generación de amplicones y basada en captura por hibridación de sondas. Las diferencias más significativas son el tipo de fragmentación utilizada, el uso de sondas o primers específicos de las regiones de interés, y el orden de indexado y amplificación de las muestras.

### 3.5 Bioinformática y análisis de datos

El análisis de los datos crudos obtenidos del secuenciador requiere de un procesamiento previo de filtrado y anotación de la información, llevado a cabo por la Sección de Bioinformática. Dado que la hipótesis principal del proyecto es la existencia de un mosaicismo somático como causa genética de GLA y CLAPO, fue necesario adecuar el análisis bioinformático para detectar variantes tanto constitutivas (germinales) como variantes somáticas, presentes además en mosaicos bajo. Para este propósito se utilizaron dos algoritmos diferentes diseñados en colaboración con la Sección de Bioinformática del INGEMM, uno de ellos denominado "algoritmo germinal" y utilizado de forma rutinaria para la detección y diagnóstico de alteraciones por NGS en el INGEMM; y un segundo algoritmo denominado mOsAiC (<https://github.com/kibanez/mOsAiC>), que fue diseñado en el marco de este proyecto, para la detección de variantes con porcentajes de mosaico a partir del 1%.

Ambas aproximaciones utilizan herramientas estándares, validadas por la comunidad científica y de libre acceso a su código fuente, sobre las cuales se introdujeron algunas modificaciones.

### 3.5.1 Análisis bioinformático – Algoritmo germinal

El procesamiento bioinformático consiste en el alineamiento, filtrado y *variant calling* o detección de variantes, de las secuencias obtenidas mediante NGS. De forma resumida, el proceso se basa en la conversión de los archivos BCL generados por el secuenciador en archivos demultiplexados denominados FastQ, utilizando el software bcl2fastq-v2.15.0.4 (Illumina, EE. UU.). Seguidamente, los datos contenidos en el archivo FastQ son alineados frente al genoma de referencia hg19/GRCh37 utilizando la herramienta Bowtie-2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>). Los duplicados generados a consecuencia de los procesos de amplificación por PCR también son eliminados en este paso utilizando la función Picard-tool 1.106 (<https://broadinstitute.github.io/picard/index.html>). Paralelamente, las secuencias resultantes son re-alineadas nuevamente y separadas en función del índice (secuencia de nucleótidos conocida que es añadida específicamente a cada paciente y utilizada como codificación única para su posterior identificación y separación) específico para cada paciente utilizando las herramientas Realigner Target Creator e Indel Realigner (GATK), basada en los estándares establecidos por la herramienta de análisis genómico GATK (<https://software.broadinstitute.org/gatk>). Como resultado se genera el primer tipo de archivo que utilizaremos para el análisis posterior, el archivo BAM, que contiene las secuencias alineadas y filtradas con los duplicados marcados, aunque no eliminados. El proceso continúa con la anotación o detección de variante (*variant calling*), mediante el cual las variantes son clasificadas funcionalmente utilizando UnifiedGenotyper y HaplotypeCaller (GATK) y anotadas posteriormente con el software Annovar (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>). Este proceso genera un nuevo tipo de archivo utilizado para el análisis posterior, denominado archivo VCF (*Variant Call Format*). Seguidamente, este archivo VCF es complementado con información de bases de datos como dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), predictores de patogenicidad como CADD (<https://cadd.gs.washington.edu/score>), bases de datos de frecuencia poblacional como el servidor Exome Variant (EVS, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), o predictores de conservación como PhyloP (<https://ccg.epfl.ch//mga/hg19/phyloP/phyloP.html>). Con todo esto, la Sección de Bioinformática genera unos archivos finales que incluyen toda la información recogida en el VCF, enriqueciendo cada variante con su correspondiente localización cromosómica, tipo de

variante, efecto que produce sobre la secuencia de aminoácidos resultante, consecuencia a nivel de *splicing*, conservación, frecuencias poblacionales y predictores de patogenicidad.

### 3.5.2 Análisis bioinformático - Herramienta mOsAiC

La herramienta mOsAiC, empleada para la detección específica de mutaciones en mosaico somático, es una herramienta diseñada a partir del algoritmo germinal sobre el cual se han introducido modificaciones. mOsAiC parte de los archivos BAM generados en la primera fase del análisis germinal para realizar el *variant calling*. A diferencia del algoritmo germinal, mOsAiC es menos restrictivo en cuanto a los criterios de calidad de las variantes asignadas, con el objetivo de incluir todas las posiciones genómicas que presenten algún alelo alternativo, independientemente del número y de la calidad de las lecturas (valor de anotación del nucleótido y alineamiento). Aunque con esta estrategia inicialmente se obtiene una gran cantidad de falsos positivos, se detectan variantes que con los algoritmos habituales serían descartadas. Por eso, el filtrado de variantes se realiza a *posteriori* tomando la ventaja de comparar muestras pareadas.

Para extraer la información genómica de cada posición se utiliza la herramienta *mpileup-SAMtools v1.319* (<http://samtools.sourceforge.net/mpileup.shtml>). La frecuencia mínima del alelo alternativo se estableció en 1% y la calidad de la anotación de cada base (*q\_value*) fue configurada a 0. Tras esto el proceso de anotación de variantes se realizó de forma similar al algoritmo germinal. Como resultado se obtienen archivos VCF que contienen todo el conjunto de variantes, tanto germinales como somáticas en mosaicos bajos, y por tanto una cantidad mucho mayor de datos. El siguiente paso para la identificación específica de variantes somáticas se basa en la combinación de los archivos VCF obtenidos del algoritmo mOsAiC de las muestras tanto de sangre como de tejido del mismo paciente, para diferenciar entre variantes germinales (presentes en sangre y en tejido) de las variantes somáticas (presentes únicamente en las muestras de tejido, o en sangre en un porcentaje menor del 15%).

Para facilitar el filtrado posterior, se utilizan 2 parámetros adicionales específicos de la herramienta mOsAiC: el valor AVAF (del inglés, *Alternative Variant Allele Frequency*) y el valor denominado *SamplesRun*. AVAF hace referencia al porcentaje de lecturas del alelo alternativo en una posición determinada, es decir, el número de lecturas obtenidas para la base correspondiente al alelo alternativo frente al número total de lecturas en dicha posición (suma de las lecturas del alelo de referencia y del alelo mutado). Por otro lado, el valor *SamplesRun*

señala la recurrencia de aparición de una variante en una posición genómica específica a lo largo de todas las muestras incluidas en un mismo experimento. Este valor es esencial para descartar artefactos, falsos positivos o variantes muy recurrentes, y por tanto probablemente poblacionales y benignas, ya que permite observar el número de veces que un mismo cambio aparece en una cohorte de muestras secuenciadas de forma paralela.

### 3.5.3 Análisis de datos

Todos los datos resultantes del análisis bioinformático, tanto germinal como somático, fueron posteriormente filtrados manualmente, analizados y clasificados para establecer las variantes patogénicas candidatas. Para ello, partiendo del fichero final de variantes, el primer paso fue filtrar los resultados en función de los siguientes parámetros:

1. La frecuencia poblacional calculada a partir de los datos recogidos en el proyecto de los 1000 genomas (<http://www.internationalgenome.org/>), en el servidor de variantes EVS ([http:// evs. gs.washington.edu/EVS](http://evs.gs.washington.edu/EVS)), y en el catálogo de variantes genéticas ExAc (ExAC; <http://exac.broadinstitute.org>). Todas aquellas variantes presentes en >1% serán descartadas, ya que las dos patologías estudiadas son enfermedades raras, y por tanto poco recurrentes.
2. El valor SamplesRun, filtrando todas aquellas variantes presentes en más del 30% de las muestras de una misma carrera.
3. Predictores de patogenicidad *in silico* que predicen la consecuencia de la mutación a nivel proteico y clínico (ClinVar, CADD, SIFT, MutationTester). Todas aquellas variantes descritas como benignas por más del 50% de los predictores fueron eliminadas del análisis.
4. Pautas de recomendación de clasificación de variantes del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG, del inglés *American College of Medical Genetics and Genomics*) que clasifican las variantes en patogénicas, probablemente patogénicas, benignas, probablemente benignas o inciertas (En el **Anexo II** se recogen los criterios para la clasificación de las variantes según la ACMG, en formato original (inglés)).
5. Revisión de la literatura científica para buscar evidencias que relacionen los genes alterados o las mutaciones encontradas, con las patologías de estudio. A

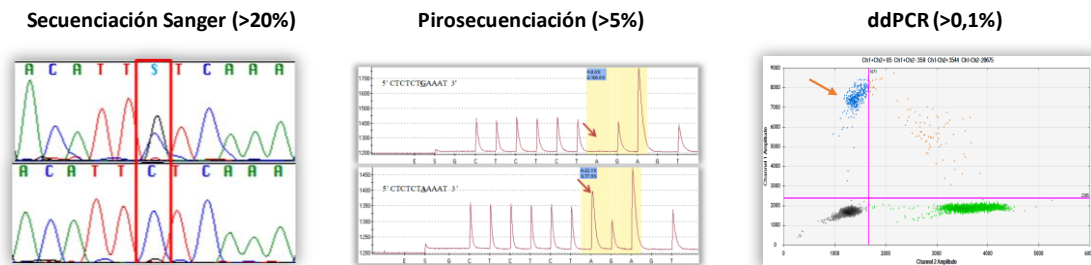


partir de esta revisión, priorizamos las variantes candidatas por orden de relevancia con las patologías y sus características clínicas.

El siguiente paso fue la visualización de las variantes candidatas utilizando los archivos BAM en la herramienta IGV (*Integrative Genomics Viewer*), para verificar que los cambios estaban correctamente anotados y no se trataba de artefactos de la técnica. Tras esto se realizó otro análisis de patogenicidad *in silico* utilizando el software Alamut V2.6-1 (SOPHiA Genetics, Suiza), y por último se llevó a cabo la validación experimental de las variantes candidatas utilizando diferentes técnicas independientes en las muestras del paciente y de los progenitores.

### 3.6 Validación de los resultados

La validación de las variantes candidatas obtenidas mediante NGS se realizó utilizando diferentes técnicas (Secuenciación Sanger, Pirosecuenciación, PCR digital) según el porcentaje de mosaico de la variante alternativa (valor AVAF) (**Figura 13**). Aunque hoy en día se discute la necesidad de validar variantes germinales por una segunda técnica (generalmente secuenciación Sanger), este proceso es todavía necesario siempre que se estudien variantes presentes en mosaicos bajos, ya que, la tasa de error aumenta considerablemente.



**Figura 13. Diferentes técnicas utilizadas para la validación de las variantes candidatas.** La secuenciación Sanger se utilizó para validar todos aquellos cambios en los que la variante alternativa presentaba un porcentaje de mosaico (valor AVAF) mayor del 20%; la pirosecuenciación se utilizó cuando el valor AVAF era mayor del 5%; y la PCR digital o ddPCR, por sus siglas en inglés droplet digital PCR, se aplicó en todas aquellas variantes con valores AVAF mayores del 0,1%.

#### 3.6.1 Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger es la técnica estándar para la validación de los resultados de NGS. El umbral de detección de la técnica se encuentra en un 15% de mosaico, por debajo de este valor la técnica pierde sensibilidad. El proceso de secuenciación se realizó según las especificaciones del proveedor Applied Biosystems (ThermoFisher, EE. UU.) y utilizando el sistema de electroforesis capilar Applied Biosystems 3730xl ADN Analyzer (ThermoFisher, EE.

UU.). Los *primers* utilizados fueron diseñados manualmente, y sintetizados por la casa comercial Sigma Aldrich (EE. UU.), actual Merck (Alemania). Las imágenes obtenidas por el escáner fueron procesadas utilizando el software comercial Sequencher 5.1 (Gene Codes, EE. UU.). Mediante esta técnica llevamos a cabo la validación de las variantes detectadas en las muestras de 3 pacientes (CL013, GLA054-LEC, y GLA061-LEC), utilizando los *primers* que se detallan a continuación (**tabla 5**).

Gen	Exón	Forward (5' a 3')	Reverso (3' a 5')
<i>PIK3CA</i>	2	GCCTAATCAAGTCAAACCTATGGAAA	CGAAGGTATTGGTTTAGACAGAAA
<i>PIK3CA</i>	10	TGGTTCTTTCCTGTCTCTGAAAA	ACATGCTGAGATCAGCCAAA
<i>PIK3CA</i>	21	TGGGGTAAAGGGAATCAAAA	ATCAAACCCTGTTTGCCTTT

**Tabla 5. Primers utilizados en secuenciación Sanger**, para validar las mutaciones p.Gln546Lys (exón 10, paciente GLA054), p.Glu542Lys (exón 10, paciente GLA061) y p.His1047Leu (exón 21, paciente CL13).

Para la validación de las mutaciones presentes en la región de alta homología del gen *PIK3CA* (exones 10-14) fue necesario incluir un paso adicional para su validación. Se introdujo una PCR *long-range* (LR-PCR) con *primers* específicos para las regiones adyacentes a los exones 10-14 y se utilizaron los reactivos y protocolos establecidos en el kit Expand long range dNTPack (Roche, Suiza) que incluye la enzima de alta afinidad *pfu* y un total de 35 ciclos de amplificación. Tras esto se realizó el proceso normal de secuenciación Sanger utilizando como ADN de partida el producto de la LR-PCR. De esta forma aseguramos la amplificación y secuenciación de la región del cromosoma 3 (*PIK3CA*) y no del 22 (secuencia homóloga).

### 3.6.2 Pirosecuenciación

Para la detección de variantes por debajo del 15% de mosaico existen diferentes técnicas que pueden ser utilizadas, y dentro de ellas destaca como técnica de referencia la pirosecuenciación. El umbral de detección de esta técnica se encuentra establecido por encima del 5%, aunque en nuestra experiencia este umbral se encuentra al 7, por debajo del cual pierde sensibilidad. La pirosecuenciación se utilizó para validar todas aquellas variantes que no podían ser detectadas mediante secuenciación Sanger y que no se encontraban por debajo del umbral 5%. El proceso se realizó siguiendo las especificaciones de la casa comercial QIAGEN (Países Bajos), utilizando los reactivos y accesorios específicos del Pyromark Q96 MD (QIAGEN, Países Bajos). Los *primers* utilizados para llevar a cabo el proceso de amplificación y secuenciación se diseñaron utilizando el software PyroMark (QIAGEN, Países Bajos) al igual que el análisis posterior de los resultados. Mediante este abordaje llevamos a cabo la validación de las mutaciones presentes en las muestras de tejido/células correspondientes a 5

pacientes con síndrome CLAPO (CL01, CL02, CL06, CL09, CL13) y 3 pacientes con GLA (GLA002, GLA006, GLA054).

Los *primers* utilizados están incluidos en la **tabla 6**. Se utilizan un total de 3 *primers* por cada variante, los dos primeros son utilizados para la amplificación de la región que contiene la secuencia a analizar (F o R) y el tercero es utilizado para la secuenciación. Al menos uno de los dos primeros *primers* debe estar marcado con una molécula de biotina en el extremo 5' la cual se une específicamente a las bolas de estreptavidina en el proceso de purificación y lavado. El tercer *primer*, denominado de secuenciación, se utiliza para la síntesis *de novo* a tiempo real de la secuencia a analizar llevada a cabo en el pirosecuenciador.

Gen	Mutación	Primers		Secuencia para analizar
PIK3CA	p.Phe83Ser	F	ACTCAAGAAGCAGAAAGGGAAGAA	TTT <b>Y</b> TGATGAAACAAGACGACTT <b>T</b> GTGACCT T
		R- biot	GTTGAAAAAGCCGAAGGTCACA	
		S	AGCAGAAAGGGAAGAAT	
PIK3CA	p.Arg115Pro	F- biot	CAACCGTGAAGAAAAGATCCTC	TCT <b>S</b> GATTGAGGATCTTTTCTT <b>C</b> ACGGTTGC
		R	TTTAGAAAAGGGACAACAGTTAAGC	
		S	GATATTGTATCATACCAATT	
PIK3CA	p.Cys420Arg	F	GAATTTTCCTTTGGGGAAGA	GAACAC <b>Y</b> GTCCATTGGCATGGGGAAATATA AACTT
		R- biot	ACAAGTTTATATTTCCCATGCC	
		S	ATTTTCTTTGTTTTTAAG	
PIK3CA	p.Gln546Lys	F	AAGGGAAAATGACAAAGAACAGCT	AG <b>M</b> MAGGAGAAAGATTTTCTATGGAGTCAC A
		R- biot	GCACTTACCTGTGACTCCATAGAA	
		S	CCTCTCTGAAATCACTG	
PIK3CA	p.His1047Leu	F	AGCAAGAGGCTTTGGAGTATTC	GCAC <b>W</b> TCATGGTGGCTGGACAACAAAAAT GGA
		R- biot	TGCTGTTAATTGTGTGGAAGATC	
		S	CATGAAACAAATGAATGAT	
PIK3CA	p.His1047Arg	F	AGCAAGAGGCTTTGGAGTATTC	GCAC <b>R</b> TCATGGTGGCTGGACAACAAAAATG GAT
		R- biot	TGCTGTTAATTGTGTGGAAGATC	
		S	CATGAAACAAATGAATGAT	

**Tabla 6.** *Primers* utilizados en la técnica de pirosecuenciación, para la validación de las variantes, p.Phe83Ser, p.Arg115Pro, p.Cys420Arg, p.Gln546Lys, p.His1047Leu y p.His1047Arg. Los cambios que se desean estudiar aparecen representados en la secuencia a analizar (letras en negrita) con un código de ambigüedad universal: K=T/G; M=A/C; R=G/A; S=C/G; W=A/T; Y=T/C. Abreviaturas, Biot: biotina; F: *primer* sentido directo (Forward); R: *primer* sentido reverso (Reverse); S: *primer* Secuenciación.

### 3.6.3 Droplet-digital PCR

La última técnica utilizada para la validación de los resultados de NGS fue la PCR digital o ddPCR de sus siglas en inglés *Droplet Digital PCR*. La ddPCR es la técnica más sensible, capaz de cuantificar el porcentaje absoluto de una variante presente en una muestra a partir del 0,1% de mosaico. La metodología escogida se basa en la utilización de sondas Taqman de la casa comercial Applied Biosystem (ThermoFisher, EE. UU) para diferenciar dentro de una misma muestra entre el alelo de referencia (marcado en VIC) y el alelo alternativo (marcado en FAM), y así cuantificar el porcentaje de cada uno de ellos. De forma resumida la técnica se basa en la emulsión de la muestra de ADN en miles de gotas/particiones que son marcadas y amplificadas individualmente mediante una sonda Taqman específica de cada alelo. Las gotas son entonces leídas mediante un lector de gotas y los datos analizados utilizando el programa QuantaSoft de Bio-Rad (EE. UU.) (Figura 14). Los reactivos e instrumentos utilizados para llevar a cabo este proceso fueron el sistema QX200 de Bio-Rad (EE. UU.) que incluye el generador y lector de gotas, y los reactivos incluidos en el kit. La técnica se realizó siguiendo los protocolos establecidos por el fabricante Bio-Rad, y las sondas Taqman utilizadas se diseñaron específicamente para las variantes: p.Phe83Ser, p.Arg115Pro, p.Cys420Arg, p.Glu542Lys, p.Gln546Lys, p.Glu726Lys, p.His1047Arg, p.His1047Leu. Mediante la ddPCR se validaron las muestras de sangre, tejido y células de todos los pacientes CLAPO (8 muestras de tejido y 1 muestra de sangre) y GLA (5 muestras de tejido y 2 muestras de células) en los cuales se habían detectado alguna mutación mediante NGS. Todas las validaciones realizadas mediante esta técnica se llevaron a cabo gracias a la colaboración establecida con el grupo de investigación de la Dra. Carmen Ayuso, directora de la sección de genética de la Fundación Jiménez Díaz.



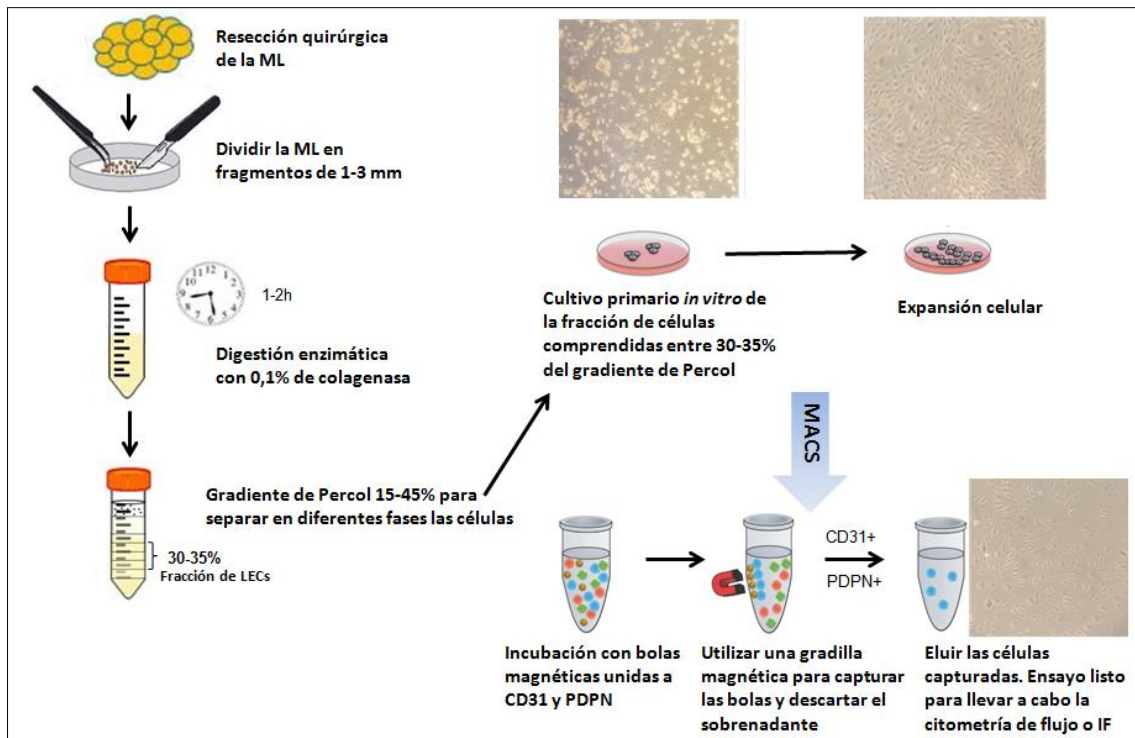
**Figura 14. Protocolo de PCR digital (ddPCR) de la casa comercial Biorad.** Proceso de generación de gotas a partir de una muestra de ADN, amplificación y marcaje de las mismas, y lectura y análisis de los resultados.

### **3.7 Aislamiento de células endoteliales linfáticas**

El aislamiento de las células endoteliales linfáticas (LECs), células candidatas a estar involucradas en la patología de GLA y/o CLAPO, se llevó a cabo a partir de las muestras de tejido fresco de malformación linfática obtenidas. Durante el transcurso del proyecto recibimos dos tejidos de malformación linfática de dos pacientes con GLA y una muestra de malformación linfática de un paciente CLAPO (CL02), que fueron intervenidos quirúrgicamente debido a complicaciones médicas. Los tejidos fueron recogidos en medio basal F-10 y transportados inmediatamente al laboratorio.

#### **3.7.1 Gradiente de Percoll y selección magnética (MACS)**

El protocolo para el aislamiento de LECs se realizó siguiendo la metodología diseñada y optimizada por la Sección de Malformaciones Vasculares del INGEMM para este tipo de muestras (**Figura 15**). La técnica consistió en la disección mecánica del tejido en piezas de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> y su digestión con la enzima colagenasa (Sigma Aldrich #68335, Merck, Alemania) al 0,1% en PBS (ThermoFisher, EE. UU.), durante 1-2 horas a 37°C. Tras esto, el tejido digerido fue filtrado a través de una membrana de nylon de 70 µm. La solución resultante fue centrifugada a 300xg durante 10 min para precipitar la fracción celular, y el sobrenadante resuspendido en medio EGM-2MV (#3CC-3202 Cultek, España), medio específico para el crecimiento endotelial. Mediante un gradiente de Percoll (GE Healthcare, EE. UU.) (del 5-45%), se separaron los diferentes tipos celulares según la densidad celular en fracciones de 5 ml, y un volumen total de 50 ml. La fracción de células situada entre el 30-35% del gradiente es específica de las LECs. Esta región intermedia fue separada, recogida, centrifugadas y resuspendida (pellet) en medio EGM-2MV suplementado con 10 ng/µl de VEGF-C (#9199-VC-025 R&D Systems, EE. UU.). La solución resultantes fue entonces sembrada en placas multiwell de 24 pocillos previamente tratada con fibronectina (Sigma Aldrich #F1141-2MG, Merck, Alemania).



**Figura 15. Protocolo de aislamiento de células endoteliales linfáticas.** Abreviaturas, ML: malformación linfática, MACS: Magnetic Activated Cell Sorting, PDPN: Podoplanina.

Según el protocolo específico del gradiente de Percol, la fracción celular sembrada debería estar constituida únicamente por LECs, sin embargo, para aumentar la pureza de la población celular obtenida se llevó a cabo un protocolo de MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*). Una vez expandido el cultivo primario las células fueron levantadas mediante el uso de acutasa (#A1110501 ThermoFisher, EE. UU.). La solución fue entonces centrifugada para separar la fracción celular y resuspendida en 90  $\mu$ l de BSA 2% (#B4287, Sigma Aldrich, Merck, Alemania) para evitar uniones inespecíficas. Tras esto se añadieron 20  $\mu$ l de bolas magnéticas unidas a los anticuerpos CD31+ (#11155D, ThermoFisher, EE. UU.) y Podoplanina para la unión específica de las LECs. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 4°C y se colocó en una gradilla magnética para capturar las bolas unidas a las LECs. Estas bolas se resuspendieron en medio EGM-2MV y se volvieron a sembrar. Las bolas sembradas en la placa no interfieren con el crecimiento del cultivo y se fueron eliminando con los sucesivos lavados y cambios de medio.

### 3.7.2 Inmunofluorescencia

Para confirmar que las células aisladas eran LECs se realizó una tinción inmunofluorescente de las mismas con los anticuerpos PROX-1, LYVE-1, Podoplanina, VEGFR-3 y el marcador fluorescente DAPI. Para llevar a cabo el proceso en primer lugar se sembraron

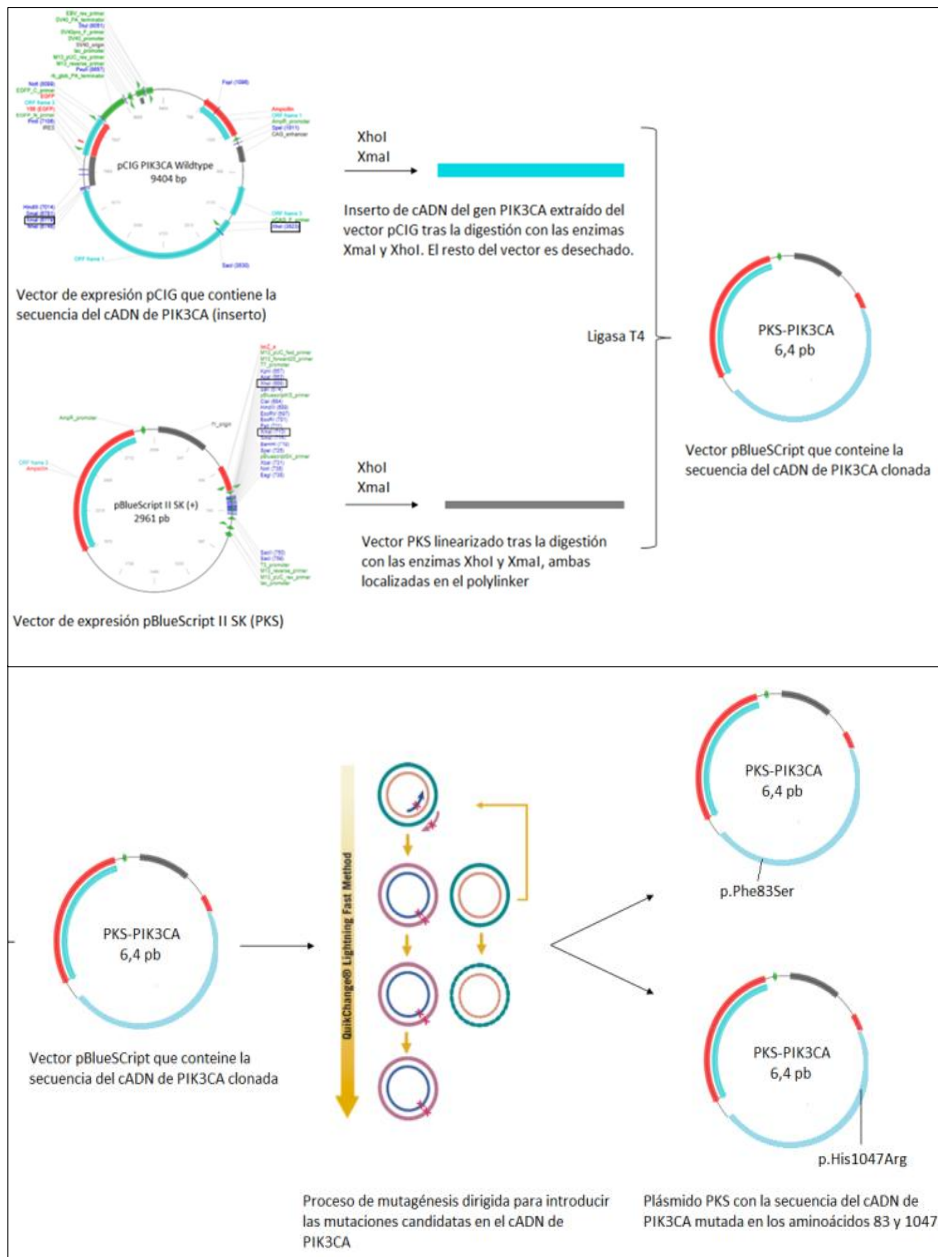
una pequeña cantidad de células en una placa especial denominada *Chambered cell Culture Slides* (ThermoFisher, EE. UU.) con fibronectina (Innoprot, España) y medio EGM-2MV y se incubaron a 37°C hasta obtener una confluencia del 70%. Tras esto se llevó a cabo la fijación de las células con paraformaldehído 2% en PBS (ThermoFisher, EE. UU.) y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados con PBS frío de 2 minutos cada uno y se permeabilizó la membrana celular añadiendo 200 µl de Tritón X-100 (Bio-Rad, EE. UU.) al 0,1%. Los cristales fueron incubados 3 minutos a temperatura ambiente y se repitieron los lavados con PBS frío. El siguiente paso consistió en bloquear las células para evitar uniones inespecíficas añadiendo BSA 2% durante 30 min a temperatura ambiente, y tras esto se incubó con los diferentes anticuerpos primarios (diluidos 1:1000, en PBS 2% BSA) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron los cristales y se añadieron los anticuerpos secundarios correspondientes, marcados con diferentes fluoróforos y el marcador fluorescente DAPI (1:1000); ThermoFisher, EE. UU.), y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar el proceso las células fueron fijadas con el reactivo ProLong (ThermoFisher, EE. UU.) y secadas a temperatura ambiente en oscuridad durante 24 horas. Finalmente, el resultado fue analizado al microscopio de fluorescencia.

### **3.8 Estudios de expresión**

#### **3.8.1 Plásmido y Mutagénesis**

Dado que no disponemos de células de tejido afecto de todos nuestros pacientes, el primer paso para llevar a cabo los ensayos de expresión es la de introducir las variantes candidatas en vectores de expresión. El vector escogido fue el plásmido comercial pCIG *PIK3CA* Wildtype (#73056, Addgene, EE. UU.), que contiene la secuencia codificante (cADN) del gen *PIK3CA*. Se trata de un vector de expresión en mamíferos de 9404 pb con un gen de resistencia a ampicilina y numerosas dianas de restricción. Al tratarse de un plásmido tan grande, la eficiencia de los experimentos posteriores de mutagénesis dirigida se vio disminuida por lo que decidimos llevar a cabo un abordaje intermedio (**Figura 16**) que consistía en extraer el inserto de cADN e introducirlo en un plásmido más pequeño para facilitar la reacción de mutagénesis. El plásmido escogido para llevar a cabo este proceso fue el vector pBluescript II KS+ (nombrado por nosotros como PKS) de 2961 pb y resistencia a ampicilina, de la casa comercial Stratagene (Agilent Technology, EE. UU.). Ambos plásmidos se crecieron a 37°C en agitación durante toda la noche (O/N) en medio LB suplementado con ampicilina (1:1000) y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit High Pure Plasmid Isolation de la casa comercial Roche (Suiza). El

clonaje del inserto de cADN (3,4 Kb) desde el plásmido pCIG al vector PKS se realizó mediante la digestión de ambos plásmidos con las enzimas de restricción *XhoI* y *XmaI* y la posterior ligación utilizando la ligasa T4. Seguidamente, se llevó a cabo la mutagénesis para introducir los cambios puntuales de interés en el vector PKS-*PIK3CA* utilizando el kit comercial Quikchange Lightning site-directed mutagénesis (Figura 16) de la casa comercial Agilent Technology (EE. UU.).



**Figura 16. Protocolo de mutagénesis.** Digestión de los vectores pCIG y PKS con las enzimas de restricción *XhoI* y *XmaI* para su posterior ligación y formación del plásmido PKS-*PIK3CA*. Mediante el proceso de mutagénesis según las especificaciones del kit Quikchange Lightning site-directed se introducen las mutaciones candidatas en el cADN del gen *PIK3CA*. Abreviaturas, Ser: serina; Phe: Fenilalanina; His: Histidina; Arg: Arginina; cADN: región codificante de ADN; PKS: vector pBluescript II KS.



Este protocolo utiliza *primers* que portan la variante en el medio de su secuencia introduciéndola en el plásmido al hibridar con él y ser amplificado (**Tabla 7**). Los *primers* fueron diseñados manualmente de acuerdo a las especificaciones del protocolo Quikchange:

1. Ambos *primers* deben contener la mutación deseada, y anillar en la secuencia del plásmido en la cual se desea introducir la mutación. Las secuencias de ambos *primers* deben ser totalmente complementarias entre sí y con la cadena molde, excepto en la base que se desea modificar.
2. La longitud debe ser de entre 25-45 bases con la mutación colocada en el medio, aproximadamente 10-15 bases a ambos lados.
3. El porcentaje mínimo recomendado de porcentaje de bases GC para cada *primer* debe ser del 40% y la última base del extremo 5' debe contener una o más bases G/C.
4. La temperatura de *melting* debe ser mayor o igual a 78°C.
5. La purificación de los *primers* puede llevarse a cabo por desalinización, excepto en regiones complejas en las que se recomienda utilizar HPLC (cromatografía líquida) o SDS-PAGE (electroforesis de poliacrilamida).

Nombre del vector	Mutación	Cambio	Primers
pCIG-PIK3CA-Phet83Ser	p.Phe83Ser	T>C	F: TACTCAAGAAGCAGAAAGGGAAGAATTTTCTGATGAAACAAGACG
			R: CGTCTTGTTTCATCAGAAAATTCTTCCCTTCTGCTTCTTGAGTA
pCIG-PIK3CA-His1047Arg	p.His1047Arg	A>G	F: CAAATGAATGATGCACGTCATGGTGGCTGGCAAC
			R: GTTGTCCAGCCACCATGACGTGCATCATTATTG

**Tabla 7. Secuencia de los *primers* utilizados para realizar la mutagénesis.** Abreviaturas, F: *primer* sentido (Forward), R: *primer* anti sentido (Reverse), A: adenina, G: Guanina, T: Timina, C: citosina, Phe: Fenilalanina, Ser: Serina, His: Histidina, Arg: Arginina.

El producto resultante del proceso de mutagénesis fue amplificado mediante la transformación de las células competentes DH5 $\alpha$  (ThermoFisher, EE. UU.). Las células DH5 $\alpha$  son células de la cepa de E.coli muy utilizadas de forma rutinaria para el clonaje, ya que proporcionan una alta eficacia de transformación y son económicas.

Para confirmar la eficacia del proceso de mutagénesis y para descartar que se hayan introducido cambios inespecíficos en la secuencia, el plásmido amplificado fue secuenciado mediante secuenciación Sanger utilizando *primers* que cubren la región completa del cADN (**Tabla 8**). Una vez confirmada la mutación del inserto (cADN del gen *PIK3CA*), éste fue devuelto al plásmido original pCIG, utilizando la misma estrategia de digestión y ligación, y se

volvió a realizar la secuenciación completa del inserto mediante secuenciación Sanger, para confirmar la eficacia del clonaje y descartar otros cambios inespecíficos.

Nombre del primer	Secuencia del primer	Nombre del primer	Secuencia del primer
Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.1	CTCTGCTAACCATGTTTCATGC	Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.8	CGAAATTCTACCCAAATTGC
Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.2	CCTCCATCAACTTCTTCAAG	Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.9	CTAATCAAAGGATTGGGCAC
Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.3	CCAGTAGGCAACCGTGAAGAAAAG	Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.10	GGCTTTCTGTCTCCTCTAAAC
Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.4	CTTCACCAGAATTGCCAAAGCAC	Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.11	GTGACTGTGTGGGACTTATTG
Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.5	GATGCCCAATTTGATGTTGATG	Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.12	GTGTAGCTACCTTCATTTGG
Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.6	CGAACAGGTATCTACCATGGAGG	Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.13	GATGCTTGGCTCTGGAATGC
Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.7	GGTGTACTGGATCAAATCC	Plasmido_ <i>PIK3CA</i> _F.14	GACCTGCAGGCTAGCGAATTC

**Tabla 8. Secuencia de los primers** utilizados para secuenciar el cADN del gen *PIK3CA* clonado tanto en el vector PKS como en el pCIG. Abreviaturas, F: primer sentido (Forward).

### 3.8.2 Líneas celulares y transfección

Los estudios de expresión se llevaron a cabo en la línea celular HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293T*) derivadas de células de riñón de embrión humano. Las células HEK293T se cultivaron a 37°C (CO<sub>2</sub> al 5%), en medio DMEM (#11995065 ThermoFisher, EE. UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, #F4135 Sigma Aldrich, Merck, Alemania), 100 µg/mL de penicilina (Sigma Aldrich, Merck, Alemania) y 100 µg/mL de estreptomycin (Sigma Aldrich, Merck, Alemania). El día previo a la transfección, las células se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos con una densidad de 2x10<sup>5</sup> células/pocillo, para obtener una confluencia del 70-80% en el momento del experimento. Para cada transfección, se incubó 1,5 µl de Lipofectamina-2000 (1µg/µl; #L3000001 ThermoFisher, EE. UU.) en 25 µl de medio DMEM 0,2% FBS durante 5 minutos a temperatura ambiente (RT; del inglés *Room Temperature*). A continuación, se añadieron 2 µl de reactivo p300 (incluido en el kit, #L3000001 ThermoFisher, EE. UU.) disuelto en 25 µl de medio DMEM 0,2% FBS y 1 µg de ADN, a la Lipofectamina. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos ADN-Lipofectamina. A continuación, se agregó el mix de reacción a cada pocillo, con las células al 70% de confluencia, y se incubó O/N a 37°C (CO<sub>2</sub> al 5%). En total se sembraron 5 experimentos que incluían un pocillo de células sin transfectar, con todos los reactivos a excepción del ADN, y 4 pocillos de células transfectadas que incluían: el plásmido vacío (sin el inserto de *PIK3CA*) denominado pCIG y utilizado como control negativo; el plásmido *wildtype* (*wt*) (cADN *PIK3CA*, sin mutación introducida) denominado

pCIG-*PIK3CA*-wt; el plásmido pCIG mutado con la variante p.Phe83Ser no descrita previamente y que se denominó pCIG-*PIK3CA*-Phe83Ser; y el plásmido pCIG con la mutación p.His1047Arg, variante *hotspot* del gen *PIK3CA* utilizado como control positivo ya que posee el mayor efecto de ganancia de función conocido sobre la proteína, y denominado pCIG-*PIK3CA*-His1047Arg.

A la mañana siguiente de la transfección, se cambió el medio DMEM completo por medio de cultivo bajo en suero (DMEM 0,2% FBS), y se incubaron las células otras 24 horas hasta completar las 48 horas óptimas de expresión proteica. Este paso se realizó con la intención de reproducir unas condiciones de escasez de nutrientes en las cuales la actividad basal de las células disminuyese y de esta forma las diferencias entre las células mutadas y no mutadas se acentuasen para poder comparar la función de la proteína PI3K con mayor claridad. Al disminuir la actividad basal de las células, la señal de fondo obtenida en los estudios de Western Blot se redujo y de esta forma no se enmascararon los resultados pudiéndose analizar correctamente las diferencias de expresión entre las células mutadas y no mutadas.

Paralelamente, realizamos un ensayo con las mismas condiciones indicadas anteriormente pero en los que añadimos el reactivo LY-294002 (#440202 Sigma Aldrich, Merck, Alemania), inhibidor de *PIK3CA*, para comparar la expresión proteica de las células mutadas frente a las no mutadas en diferentes condiciones. Para ello tras las primeras 24 horas después de la transfección el medio fue reemplazado por DMEM 0,2% FBS suplementado con LY-294002 (20  $\mu$ M) e incubado a 37°C las 24 horas restantes.

### **3.8.3 Extracción de proteínas**

Pasadas 48 horas de incubación tras la transfección, las células fueron lisadas para extraer las proteínas. El momento elegido para la extracción de las proteínas se basó en una curva de expresión en la cual se extrajo proteína a las 16 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas posteriores a la transfección. El punto de mayor expresión proteica fue a las 48 horas. Para llevar a cabo la extracción de las proteínas las células fueron lisadas utilizando el buffer de lisis RIPA (#89900, ThermoFisher, EE. UU.) suplementado con un inhibidor de fosfatasa (1:1000; #P0044 Sigma Aldrich, Merck, Alemania) y un inhibidor de proteasas (1:000; #P8340 Sigma Aldrich, Merck, Alemania). Cubrimos el pocillo con buffer RIPA y mediante sucesivos pipeteos y raspado del fondo de la placa con la punta de la pipeta levantamos las células del pocillo. El contenido del pocillo fue traspasado a un eppendorf e incubado 15 minutos a 4°C. Tras esto,

cada eppendorf se centrifugó a 4°C durante 15 min a 12,000 rpm y el sobrenadante (fracción proteica) fue traspasado a un nuevo tubo esteril y almacenado a -20°C hasta su utilización.

### **3.8.4 Cuantificación de proteínas**

La cuantificación de las proteínas obtenidas se realizó mediante un ensayo Bradford en el cual se incubaron 5 µl de la solución proteica diluída 1/10 junto con 200 µl de reactivo Bradford (Bio-Rad, EE. UU.). La actividad de este reactivo se basa en la presencia de azul de Coomassie G-250, que en ambiente ácido torna del color rojo al azul por la unión a proteínas. Mediante un lector de placas Infinite M200 (Tecan, Suiza) a una absorbancia de 595 nm, este cambio colorimétrico fue detectado y medido. Para la cuantificación de las muestras se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA, #B4287, Sigma Aldrich, Merck, Alemania) (1-12 µg/mL) en las que se interpolaron las medidas de las absorbancias obtenidas para nuestras proteínas.

### **3.8.5 Western-blot**

Los estudios de expresión proteicos se realizaron mediante la técnica de *Western-blot*, siguiendo las especificaciones del proveedor BioRad (EE. UU.). La técnica de *Western-blot* consiste en la determinación directa de proteínas mediante su reconocimiento por anticuerpos específicos, que llevan conjugados un compuesto cuya actividad es detectable mediante quimioluminiscencia.

El proceso comienza con la separación de las proteínas mediante una electroforesis SDS-PAGE, que las separa en función de su peso molecular. Para ello se utilizaron geles de poli(acrilamida) Mini-Protean TGX (Bio-Rad, EE. UU.) de 10 pocillos. Las proteínas se cargaron en cada uno de los pocillos de forma separada, junto con un marcador de peso molecular (Precisión Plus Protein Dual Color Standard, Bio-Rad, EE. UU.), que se añadió en el primer pocillo vacío. Se cargaron un total de 20 µg de cada proteína por pocillo, junto con buffer de carga con dTT, y previamente desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas se separaron aplicando un potencial de 100-120 V durante 1 hora. El buffer de carga contiene azul de bromofenol utilizado para monitorizar el progreso de la electroforesis. Una vez concluida la separación, las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de PVDF en tampón de transferencia, utilizando el pack Trans-blot Turbo transfer (Bio-Rad, EE. UU.). La transferencia se realizó en un equipo de transferencia semiseca (Trans-Blot Turbo Transfer, Bio-Rad, EE. UU.) a temperatura ambiente durante 30 min a 15 V.

Seguidamente, la membrana fue bloqueada para evitar uniones inespecíficas, incubándola en agitación 1 hora en BSA al 5% disuelta en TBS-Tween (Thermo Scientific, EE. UU.). Dado que la detección de las proteínas específicas incluye proteínas fosforiladas, utilizamos BSA en lugar de leche para llevar a cabo el bloqueo de la membrana al igual que la dilución de los anticuerpos, ya que la leche contiene fosfoproteínas que favorecen la aparición de señales inespecíficas.

A continuación, la membrana bloqueada se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 9**) durante toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 4°C en agitación.

Proteína	Origen	Tamaño	Dilución de trabajo	Casa comercial
Fosfo-Akt (Ser 473)	Conejo	60 kDa	1:2000	#4060-Cell Signaling Technology (EE. UU.)
Fosfo -Akt (Thr 308)	Conejo	60 kDa	1:2000	#4056-Cell Signaling Technology (EE. UU.)
Akt	Conejo	60 kDa	1:2000	#9272-Cell Signaling Technology (EE. UU.)
PI3K p110 $\alpha$	Conejo	110 kDa	1:2000	#4255-Cell Signaling Technology (EE. UU.)
Fosfo -p70 S6 Kinase (Thr 389)	Conejo	70, 85	1:2000	#9205-Cell Signaling Technology (EE. UU.)
p70 S6 quinasa	Conejo	70, 85	1:2000	#9202-Cell Signaling Technology (EE. UU.)
Fosfo -PDK1 (Ser 241)	Conejo	58 a 68	1:2000	#3438-Cell Signaling Technology (EE. UU.)
PDK-1	Conejo	58 a 68	1:2000	#3062-Cell Signaling Technology (EE. UU.)
$\alpha$ -Tubulina	Ratón	60 kDa	1:2000	#CP06-Calbiochem (EE. UU.)

**Tabla 9. Anticuerpos primarios** utilizados para la detección específica de algunas de las proteínas de la vía de PI3K/AKT/mTOR.

Tras la incubación, la membrana fue lavada con TBS-Tween e incubada con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 10**) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. El anticuerpo secundario reconoce las inmunoglobulinas (Igs) del anticuerpo primario y se une a ellas. A su vez este anticuerpo lleva unido a HRP (peroxidasa de rábano) que al entrar en contacto con el reactivo de detección (Amersham™ ECL™, GE HealthCare, EE. UU.), genera una señal luminiscente en aquellos sitios de la membrana en los que se encuentre unido el anticuerpo secundario con el anticuerpo primario.

Origen	Reactividad Igs	Dilución de trabajo	Casa comercial
Cabral polyclonal	Ratón	1:50000	#31430 ThermoFisher, EE. UU.
Cabral policlona	Conejo	1:50000	#31460 ThermoFisher, EE. UU.

**Tabla 10. Anticuerpos secundarios** utilizados para detectar la cantidad de proteína presente en la membrana a través del sistema de imagen específico para la detección luminiscente.

Finalmente, la membrana se visualiza con el instrumento MicroChemi 4.2 (DNR Bio Imaging Systems, Israel) y se analiza con el programa Image J (NIH, EE. UU.).

El proceso se repitió para cada uno de los anticuerpos llevando a cabo el *stripping* o barrido de la membrana después de cada revelado, incubando para ello las membranas 30 min en ácido acético al 5%, para eliminar todos los anticuerpos unidos y poder empezar el proceso sin uniones inespecíficas. Antes de comenzar nuevamente el proceso, la membrana fue lavada mínimo 3 veces con TBS-Tween para eliminar todos los posibles restos de ácido acético, así como los residuos eliminados.

### 3.9 Análisis estadísticos

Las imágenes capturadas por el MicroChemi 4.2 (DNR Bio Imaging System, Israel) fueron analizadas con el programa Image J (NIH, EE. UU.) en el cual se cuantificaron las intensidades de las bandas de las proteínas resultantes del proceso de *Western-blot* correspondientes con cada uno de los anticuerpos analizados. Cada uno de los valores obtenidos se normalizaron utilizando el valor del gen constitutivo (tubulina) y la forma total (no fosforilada) de cada anticuerpo. Los datos resultantes se compararon utilizando la relación estadística T-Student que permite establecer relaciones entre dos muestras independientes que siguen una distribución normal y establecer si existen diferencias significativas. De esta forma se determinó si existía diferencia entre los valores obtenidos para el plásmido *wtk* y los valores obtenidos para las proteínas del plásmido pCIG-*PIK3CA*-Phe83Ser y pCIG-*PIK3CA*-His1047Arg.

### 3.10 Ensayos funcionales *In vivo*

#### 3.10.1 Modelo murino

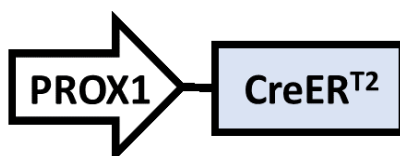
Todos los métodos experimentales realizados con animales durante el transcurso de este proyecto fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y utilización de Animales, del Centro Médico de la Universidad de Southwestern (Texas, EE. UU.). El modelo de ratón utilizado fue diseñado y generado por el Dr. Dellinger, gracias a una colaboración establecida con su laboratorio.

El modelo utilizado consta de un ratón transgénico PROX1-CreER<sup>T2</sup>; R26-LSL-*PIK3CA*<sup>His1047Arg</sup> generado a partir del cruce de dos ratones modificados genéticamente, el primero de ellos compuesto por el sistema PROX1-CreER<sup>T2</sup> y el segundo compuesto por los elementos R26-LSL-*PIK3CA*<sup>His1047Arg</sup>. Los ratones se mantuvieron en jaulas con ventilación aislada, y se alimentaron con una dieta estándar ilimitada, con nidos e iglúes como elementos de enriquecimiento.

### 3.10.2 Cepa PROX1-Cre-ER<sup>T2</sup>

La primera cepa utilizada para generar los ratones transgénicos de este proyecto fue el linaje PROX-1-CreER<sup>T2</sup> (Figura 17) cedido por el laboratorio del Dr. Guillermo C. Oliver y adquiridos a través de los laboratorios Jackson (JAX stock #022075 Bar Harbor, ME). Estos animales se mantuvieron en homocigosis PROX-1-CreER<sup>T2(+/+)</sup>, con un tallaje, fertilidad y viabilidad normales, sin mostrar alteraciones en la morfología o el comportamiento.

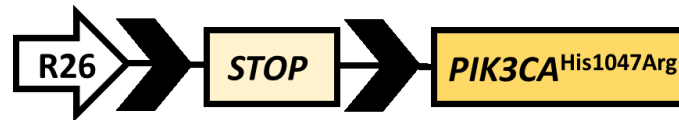
Estos ratones expresan la recombinasa Cre en aquellos tejidos que presentan el marcador específico PROX-1, entre los que destacan las LECs como grupo más representativo. Por otra parte, la proteína de fusión ER<sup>T2</sup> constituye un receptor de estrógenos modificado que reconoce específicamente la molécula de tamoxifeno, y no reacciona ante estrógenos endógenos. La exposición a tamoxifeno provoca la translocación de la Cre-ER<sup>T2</sup> desde el citoplasma al núcleo celular donde la recombinasa Cre actúa reconociendo y escindiendo las secuencias LoxP.



**Figura 17.** Representación gráfica del sistema PROX-1-CreER<sup>T2</sup>, compuesto por los elementos PROX-1 que determina el tipo celular en el que se expresará la recombinación, la recombinasa Cre que lleva a cabo el proceso de recombinación (escisión de los elementos loxP), y el receptor ER<sup>T2</sup> que se activa en presencia de tamoxifeno y permite a la recombinasa llevar a cabo su función.

### 3.10.3 Cepa R26-LSL-*PIK3CA*<sup>His1047Arg</sup>

La siguiente cepa de ratones utilizada en este proyecto fue la R26-LSL-*PIK3CA*<sup>His1047Arg</sup> (Figura 18). Los ratones fueron generados por el Dr. Sean E. Egan y adquiridos a través de los laboratorios Jackson (JAX stock #016977; Bar Harbor, ME). Estos ratones se mantuvieron en homocigosis y eran fértiles con niveles normales de proteína PI3K.



**Figura 18.** Esquema representativo del sistema R26-LSL-*PIK3CA*<sup>His1047Arg</sup>. Este sistema se compone del promotor Rosa26 (R26), que lleva a cabo la transcripción de los elementos situados justo a continuación, dos elementos loxP (representados como flechas negras) que son reconocidos por la recombinasa Cre, un codón de *STOP* que determina la terminación de la transcripción mediada por R26, y la secuencia del gen *PIK3CA* con la mutación His1047Arg.

Los ratones R26-LSL-*PIK3CA*<sup>His1047Arg</sup> se componen de dos regiones loxP que flanquean la secuencia correspondiente a un codón de *stop*. Tras el segundo sitio de reconocimiento loxP se sitúa la secuencia correspondiente al gen *PIK3CA* mutado en la posición c.3140A>G; p.His1047Arg. Además, la estructura está precedida del locus correspondiente al promotor ROSA26 (R26) que se expresa de forma constitutiva en todos los tejidos y permite la transcripción de toda la secuencia situada a continuación. R26 se expresa endógenamente de forma ubicua en todas las células del ratón, lo cual permite evitar el silenciamiento del inserto por la estructura de la cromatina. Cuando la recombinasa Cre escinde la región comprendida entre las dos regiones loxP (la secuencia del codón de *stop*), el promotor R26 lleva a cabo la transcripción del gen *PIK3CA* mutado. De esta forma se controla el momento en el cual se expresa la proteína mutante, mediante la administración de tamoxifeno.

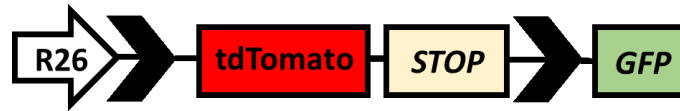
### 3.10.4 Ratones mT/mG

El tercer tipo de ratón utilizado fue el mT/mG (**Figura 19**). Se trata de un ratón reportero que permite detectar la actividad de la recombinasa Cre a nivel tisular. Estos ratones presentan fluorescencia roja de forma constitutiva en la membrana de todas sus células y fluorescencia verde en aquellas células en las cuales se produce la recombinación de ADN mediada por la enzima Cre. El ratón mT/mG utilizado en este proyecto fue generado por el IMR (*The Induced Mutant Resource*) de los laboratorios Jackson (JAX stock #007676; Bar Harbor, ME). Estos ratones mT/mG se mantuvieron en homocigosis +/+ y eran fértiles con ausencia de alteraciones morfológicas o de comportamiento.

Este sistema se compone del promotor R26, que lleva a cabo la transcripción de todos los elementos que se sitúan seguidos a él; la secuencia de la proteína tdTomato (mT) seguida de un codón de *stop*, ambos flanqueados por regiones loxP; y, por último, situada después de la segunda región loxP, la secuencia de la proteína fluorescente GFP (mG), seguida de una cola de poli-adeninas (pA) para la estabilización del sistema. Tanto la proteína mT como mG fueron



modificadas para localizarse en la membrana celular. El resultado son ratones que expresan mT (fluorescencia roja) en todas sus células de forma constitutiva y mG (fluorescencia verde) únicamente en aquellas que han sufrido recombinación mediada por Cre, o que derivan de células recombinadas.



**Figura 19. Esquema representativo del sistema mT/mG.** Este sistema se compone del promotor Rosa26 (R26), que lleva a cabo la transcripción de los elementos situados justo a continuación, dos elementos loxP (representados como flechas negras) que son reconocidos por la recombinasa Cre, la secuencia de la proteína tdTomato que emite fluorescencia roja, un codón de Stop que determina el final de la transcripción, y la secuencia de la proteína GFP (mG) que emite fluorescencia verde.

Tras la activación de la recombinasa y su actuación durante el tiempo estipulado, la actividad de la recombinasa Cre fue medida mediante la evaluación por separado de cada uno de los órganos diana de interés. Para ello el ratón fue sacrificado y los órganos fijados en paraformaldehído para conservar la estructura del tejido. Se realizan cortes de los tejidos y se midió la fluorescencia emitida a 568 nm (pico de excitación de la proteína mT) y a 488 (pico de excitación de la proteína mG). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal Olympus FV 1000 y el programa FV10-ASW (Olympus). Durante todo el proceso fue importante evitar largas exposiciones a la luz para conservar la fluorescencia. Aquellos tejidos en los que la recombinasa no esté actuando emitirán fluorescencia roja mientras que en aquellos en los que haya llevado a cabo la recombinación emitirán luz verde.

### 3.10.5 Genotipado

El genotipado de los ratones se realizó a los 21 días de vida cuando fueron sexados y destetados. Para ello se tomó una biopsia de la cola, con el animal anestesiado con isoflurano. El tejido biopsiado fue digerido y extraído el ADN, el cual se analizó mediante una PCR y separación electroforética en gel de agarosa. Los *primers* utilizados para llevar a cabo la PCR, así como la información sobre el tamaño de las bandas estimadas, se recogen en la **tabla 11**. Las bandas obtenidas fueron visualizadas mediante tinción con SYBR-Safe (Invitrogen, ThermoFisher, EE. UU.).

Cepa de ratón	Primers	Tamaño de la banda
PROX-1-CreER <sup>T2</sup>	5'-GTGGAAAGGAGCGTACACTGA-3' 5'-CACACACACACACGCTTGC-3' 5'-GCCAGAGGCCACTTGTGTAG-3'	Wt: 370 pb Mut: 267 pb
LSL- <i>PIK3CA</i> <sup>H1047R</sup>	5'-GCGAAGAGTTTGCCTCAACC-3' 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3' 5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'	Wt: 650 pb Mut: 340 pb
mT/mG	5'-CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT-3' 5'-CGAGGCGGATCACAAGCAATA-3' 5'-TCAATGGGCGGGGTCGTT-3'	Wt: 330 pb Mut: 250 pb

**Tabla 11. Primers utilizados para genotipar a los ratones.** Abreviaturas, wt: *wildtype*, ratón no modificado; mut: mutado, ratón modificado; mT: proteína tdTomato; mG: proteína GFP; LSL: Secuencia LoxP-STOP-LoxP; Cre: recombinasa Cre; ER<sup>T2</sup>: receptor de estrógeno fusionado a la recombinasa Cre.

### 3.10.6 Tratamiento farmacológico

**Tamoxifeno.** Para llevar a cabo el estudio se utilizó el receptor de estrógenos fusionado a la recombinasa Cre (Cre-ER<sup>T2</sup>) para controlar el momento en el cual llevar a cabo la expresión del gen *PIK3CA* mutado, mediante la administración del fármaco tamoxifeno. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 100 µl de tamoxifeno en los días postnatales P31, P33, P35, P39.

Para la preparación del fármaco, se disolvieron 20 mg del stock de tamoxifeno en polvo (#T5648; Sigma-Aldrich, Merck, Alemania) en una solución compuesta por 100 µl de etanol (#E7023; Sigma-Aldrich, Merck, Alemania) y 900 µl de aceite de girasol (#W530285; Sigma-Aldrich, Merck, Alemania). Como control negativo, un grupo de ratones recibieron una inyección del preparado de etanol y aceite de girasol sin tamoxifeno, de esta forma quedó asegurado que la inducción de la recombinasa Cre tuvo lugar por la unión del tamoxifeno al receptor ER<sup>T2</sup> y no por la unión de estrógenos endógenos.

**Rapamicina.** Actualmente 7 de los 9 pacientes GLA incluidos en el estudio se encuentran en tratamiento farmacológico con Rapamicina y por este motivo fue el fármaco seleccionado para llevar a cabo los estudios funcionales en animales. Para su preparación, se disolvió el stock de Rapamicina en polvo (#BML-A275-0025; Enzo Life Science, Biochem, EE. UU.) en etanol hasta obtener una concentración de 50 mg/ml. Seguidamente se realizaron diluciones a 1 mg/ml en una solución salina compuesta por polietilenglicol al 5% (#88440; Sigma-Aldrich, Merck, Alemania) y Tween-80 al 5% (#P4780; Sigma-Aldrich, Merck, Alemania) y se inocularon a cada ratón 100 µl de la mezcla (5 mg/kg), 5 veces a la semana mediante una inyección intraperitoneal.

### 3.10.7 Ensayo de proliferación celular

Ki-67 es una proteína nuclear codificada por el gen *MKI67* que juega un papel importante en la regulación del ciclo celular. Esta proteína se encuentra ausente en células en fase estacionaria o sin replicación y alcanza niveles máximos de expresión durante la mitosis. Dado que esta proteína se encuentra asociada a la proliferación celular, es utilizada como marcador proliferativo para medir el crecimiento de una determinada población celular.

Para el ensayo de proliferación celular con Ki-67 se realizó un análisis inmunohistoquímico fluorescente del tejido linfático seccionado de la oreja de cada ratón, utilizando anticuerpos específicos de LYVE1 (1:250; #AF2125; R&D Systems, EE. UU.), para la detección de LECs, y Ki-67 (1:400; #12202S; Cell Singalin Technology, EE. UU.), para la cuantificación de la proliferación. Las imágenes se visualizaron en un microscopio DMD-108 (Leica Biosystems, Alemania), y se calculó el porcentaje de núcleos positivos para Ki-67 frente al número total de núcleos de cada campo capturado con el microscopio utilizando el programa Image J (Wayne Rasband, NIH, EE. UU.). Se capturaron un total de 4 imágenes de cada muestra y se cuantificó el número total de LECs-Ki67 positivas frente al número total de LECs negativas.

### 3.10.8 Inmunofluorescencia *whole-mount*

La inmunofluorescencia puede utilizarse como técnica de visualización de estructuras biológicas tanto seccionadas en láminas como estructuras completas. En este caso se llevó a cabo la visualización de las LECs que componen los vasos linfáticos de la estructura completa de los canales (*whole-mount*). Para ello, una vez sacrificado el animal, se extrajo el tejido linfático de la oreja y se fijó en paraformaldehído al 1%, durante toda noche a 4 °C. A la mañana siguiente se lavó el tejido con una solución compuesta por PBS, TX-100 al 0,3% y Aquablock al 20%, para bloquear el tejido y evitar uniones inespecíficas. A continuación, las muestras se incubaron O/N con el anticuerpo anti LYVE-1 (1:1000; #AF2125, R&D Systems, EE. UU.). Tras la incubación, se llevó a cabo un nuevo lavado con la solución compuesta por PBS y TX-100 0,3% (esta vez sin Aquablock) durante 40 minutos, tres veces consecutivas. Seguidamente las muestras se incubaron nuevamente O/N con el anticuerpo secundario específico (1:500, anti-cabra) conjugado con FITC (Isocianato de fluoresceína). Antes de la preparación del tejido para su visualización, estos fueron nuevamente lavados durante 40 minutos, 3 veces consecutivas y posteriormente se utilizó fijación con ProLong Gold y el

marcador fluorescente DAPI (#P36935, Invitrogen, ThermoFisher, EE. UU.) para su montaje y visualización en el microscopio.

### **3.10.9 Inmunohistoquímica de hueso**

El proceso para llevar a cabo la inmunohistoquímica del hueso del ratón constó de dos partes, por un lado, la inclusión de la muestra ósea en bloques de parafina para poder realizar cortes y, por otro lado, la tinción con los anticuerpos específicos para su detección. El hueso escogido para el estudio óseo fueron los fémures de los ratones que fueron extraídos, fijados en paraformaldehído al 4% y descalcificados en EDTA el 10%. Tras esto se procedió a la inclusión de los tejidos fijados en bloques de parafina siguiendo protocolos de parafinación estándar y se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  que fueron colocados en portas.

Para poder llevar a cabo el estudio inmunohistoquímico, los cortes fueron desparafinados en xileno y rehidratados con diferentes lavados en etanol a concentraciones descendentes. Los cortes fueron bloqueados para evitar uniones inespecíficas utilizando solución de bloqueo compuesta por TTBS y Aquablock 20% (#PP82-T3082; East Coast Biologics, EE. UU.) e incubados con el anticuerpo primario Podoplanina (1:1000; #ab11936; Abcam, UK) durante toda la noche. A la mañana siguiente, se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario anti-ratón (1:500) conjugado con HRP, y se visualizó la reacción mediante el cromógeno diaminobencidina (#SK4105; Vector labs, Maravai LifeScience, EE. UU.) en un microscopio óptico.

### **3.10.10 Análisis estadístico de los resultados**

Los resultados obtenidos para cada uno de los procedimientos inmunohistoquímicos en los ratones se analizaron estadísticamente utilizando el software de análisis GraphPad Prism (Versión 7.0, EE. UU.). Se evaluó la significancia de los resultados obtenidos utilizando la prueba de T-Student que permite establecer relaciones entre dos muestras independientes y establecer si existían diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los resultados se expresaron utilizando como medida  $\pm$  SEM (error estándar de la medida), para reflejar la precisión de la medida.

## ***RESULTADOS***

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Síndrome CLAPO

#### 4.1.1 Base de datos y revisión fenotípica

La base de datos de pacientes con Síndrome CLAPO fue creada en 2015, al comienzo de este proyecto. En ella se recogen los informes médicos y moleculares de los pacientes junto con un registro de las muestras biológicas disponibles. Actualmente, la base de datos incluye 17 pacientes con fenotipo CLAPO y se compone de un total de 7 hombres y 10 mujeres, de edades comprendidas entre 2 y 42 años, siendo la edad media en el momento del diagnóstico de 8 años (0,6 a 30,4 años) (**Tabla 12**). A excepción de 2 pacientes, todos son de origen caucásicos con padres originales de la península Ibérica. Los dos pacientes de origen no caucásicos presentan origen árabe con padres nacidos en Marruecos (P6 y P15). Ninguno de los pacientes presenta una historia familiar relevante compatible con la patología.

Al comienzo de este proyecto, y una vez recopilada toda la información, se llevó a cabo un análisis retrospectivo del fenotipo de los pacientes mediante la reevaluación de las historias clínicas y evaluaciones médicas presenciales realizadas de forma conjunta entre el INGEMM y la Unidad de Anomalías Vasculares. De los 17 casos incluidos en la base de datos, los 6 primeros se corresponden con los pacientes descritos en el artículo original, a partir de los cuales se describió el Síndrome. La reevaluación fenotípica de estos 6 pacientes nos ha permitido llevar a cabo un seguimiento de la evolución de la enfermedad varios años después de su diagnóstico. Esta evolución clínica observada se detalla a continuación junto con cada una de las manifestaciones clínicas presentes en nuestra cohorte de pacientes.

ID	Edad	Sexo	Origen	MC del labio inferior (HPO:0025104)	ML (HP:0100764)	SC parcial (HPO:0001528) o generalizado (HPO:0001548)	MV (HPO:0012721)	Asimetría facial (HPO:0000324) y de las extremidades (HPO:0100559)	Muestras biológicas
CLP001	42	Hombre	España	Labio completo	Linfedema bilateral con predominio pie-rodilla	Hemihipertrofia del lado derecho del cuerpo. Macrodactilia 2-3º dedo de ambos pies y mano	Piernas y tronco	Asimetría de las extremidades	Sangre; Saliva; Sangre madre; Tej. Biopsia piel afecta
CLP002	18	Mujer	España	2 cm.	Miembro inferior izquierdo con afectación cutánea	Hemihipertrofia pierna izquierda y brazo derecho	—	Asimetría de las extremidades	Sangre; Sangre padres; Tej. ML; Tej. Sano; LECs
CLP003	21	Hombre	España	Labio completo	Lengua y región mandibular	Generalizado	Cuello	Asimetría facial	Sangre
CLP004	21	Mujer	España	8 cm.	Cara, cuello y lengua	—	Cuello	Asimetría facial	Sangre; Saliva; sangre padres; Tej ML; Tej MC
CLP005	17	Mujer	España	4 cm.	Lengua y mejilla derecha	—	Cuello	—	Sangre; Sangre padres
CLP006	12	Mujer	Árabe	2.8 cm.	Lengua y mejilla derecha	—	Cuello	Asimetría facial	Sangre; Sangre padres; Tej. ML; Tej. Sano
CLP007	19	Mujer	España	Labio completo	Región intraoral del labio inferior	—	—	—	Sangre; Saliva; Sangre padres; Tej. Úlceras y MC
CLP008	13	Hombre	España	3 cm.	Cuello, mejilla, lengua, glúteo	—	—	Asimetría facial	Sangre; Saliva; Sangre padres; Tej. ML; Tej. Sano
CLP009	5	Mujer	España	3 cm.	—	Miembro inferior derecho	Región mandibular derecha	Asimetría facial	Sangre; Sangre padres; Tej. MC
CLP010	3	Mujer	España	Labio completo	Región facial derecha y lengua	Miembro inferior derecho	Cuello	Asimetría facial	Sangre; Saliva; Sangre padres; Tej. ML

ID	Edad	Sexo	Origen	MC del labio inferior (HPO:0025104)	ML (HP:0100764)	SC parcial (HPO:0001528) o generalizado (HPO:0001548)	MV (HPO:0012721)	Asimetría facial (HPO:0000324) y de las extremidades (HPO:0100559)	Muestras biológicas
CLP011	6	Hombre	España	Labio completo	Mejilla izquierda	—	Cuello y región mandibular	Asimetría facial	Sangre; Saliva; Sangre padres; Tej. ML
CLP012	5	Hombre	España	8 cm.	Lengua y mejilla derecha	—	Cuello	Asimetría facial	Sangre; Saliva; Sangre padres
CLP013	8	Mujer	España	Frenillo y encía	Lengua y mandíbula	—	Lengua y encía	Asimetría facial	Sangre; Sangre padres; Tej. ML
CLP014	5	Mujer	España	Labio completo	—	Hemihipertrofia del lado derecho del cuerpo. Macrodactilia 1-2º dedo del pie izquierdo	—	Asimetría de las extremidades	Sangre
CLP015	6	Hombre	Árabe	Labio completo	Cuello, lengua y mandíbula	—	—	Asimetría facial	Sangre; Tej. ML; Tej. MC
CLP016	2	Hombre	Bélgica	Labio completo	—	—	Cuello, mandíbula y cuero cabelludo	—	Sangre
CLP017	3	Mujer	España	Labio completo	Lengua, cuello y región maxilar izquierda	—	Lengua, cuello y región maxilar izquierda	Asimetría facial	—

**Tabla 12. Resumen de la información contenida en la base de datos de pacientes con Síndrome CLAPO.** Abreviaturas, ID: identificador; MC: malformación capilar; ML: malformación linfática; MV: malformación venosa; SC: Sobrecrecimiento; Tej: Tejido; HPO: *Human Phenotype Ontology*, nomenclatura numérica estandarizada sobre las manifestaciones clínicas.



Dentro de los principales hallazgos clínicos, la malformación capilar (MC) del labio inferior es la única manifestación clínica congénita visible en todos los pacientes en el momento del nacimiento (17/17; 100%). Presenta una distribución simétrica en la línea media del labio, con bordes bien definidos y una longitud que varía entre 2 y 12 cm. (Tabla 12). La coloración de las lesiones va desde un tono rojizo hasta una coloración marrón/púrpura. Además, dentro de nuestra cohorte hemos observado tres patrones diferentes de MC en la línea media labial (Figura 20): (1) el primero se encuentra presente en 9 pacientes y afecta a todo el labio inferior (CL01, CL03, CL07, CL10, CL11, CL14-17) y a la región de piel situada justo debajo del bermellón; (2) el segundo tipo se presenta en 7 de los pacientes (CL02, CL04,-06, CL08, CL09, CL12) y en ellos la MC se encuentra acotada a la línea media sin afectación del labio completo; (3) el último patrón observado, se corresponde con un único paciente (CL13) en el cual la MC se encuentra en la línea media del área intraoral del labio inferior, sin afectación del bermellón. A pesar de que las MC afectan a la línea media facial y que ha sido descrita una asociación de ésta con alteraciones neurológicas (117), el desarrollo cognitivo e intelectual de todos los pacientes es normal.

Gracias al seguimiento llevado a cabo en los 6 pacientes originales (CL01-06) se ha establecido una evolución favorable de las MC del labio inferior, en el que se observa un aclaramiento progresivo de la malformación, aunque siempre incompleto, en cuatro (CL01-03, CL06) de los seis pacientes analizados, entre los 6 y 28 meses de edad.



**Figura 20. Diferentes patrones de MC en el labio inferior.** A) Afectación del labio inferior completo y parte de la piel situada justo debajo (CL11); B) afectación del labio inferior sin extenderse hasta las comisuras labiales (8 cm.) (CL12); C) afectación delimitada a la línea media (CL06); D) afectación del labio inferior en la zona intraoral (frenillo, encía y labio) sin alterar el bermellón (CL13).

Por otra parte, las malformaciones linfáticas (ML) aparecen predominantemente en la zona de la mucosa oral y la lengua, y se observan en 14 de los 17 pacientes (CL01-08, CL10-13, CL15, CL17). Entre estas ML, uno de los pacientes presenta un linfedema asociado en la extremidad inferior derecha (CL01), mientras que en el resto de los casos la región lingual es la zona más comúnmente afectada. Entre las complicaciones asociadas a estas ML, se incluye la necesidad de realizar una traqueotomía en los pacientes CL08 y CL15, debido a obstrucción de las vías aéreas por la ML.

En cuanto a la evolución de las MLs, se ha observado una progresión de las lesiones de la lengua con la edad que cursa con agravamiento de los síntomas debido a la aparición de eventos hemorrágicos con episodios de inflamación aguda y aumento del área de la lengua afectada y del grosor de ésta (**Figura 21**). Esta progresión dinámica de las MLs se ha observado en 4 de los 6 pacientes analizados (CL03-06). Además, gracias al seguimiento de estos pacientes, hemos observado un caso en el que la ML, a pesar de estar presente en el momento del nacimiento, no se hizo evidente hasta años después. Se trata del paciente CL02, en el cual la ML, situada en la cara interna de la región femoral izquierda, no fue detectada hasta los 15 años. Se trata de una ML con afectación dérmica que provoca la aparición de pequeñas máculas rojizas en la piel.



**Figura 21.** Evolución de las ML de la lengua del paciente CL05. La lengua presenta una malformación capilar en la zona media y afectación linfática que aumenta el grosor. La evolución de la lesión cursa con un agravamiento de la malformación linfática con eventos hemorrágicos que requieren intervención quirúrgica y un aumento del tamaño lingual que causa problemas de deglución.

Siguiendo con las características que definen el Síndrome CLAPO y considerando sobrecrecimiento como la presencia de hipertrofia ósea y de tejidos blandos, únicamente 6 (CL01-03, CL09, CL10, CL14) de los 17 pacientes presentan un verdadero sobrecrecimiento, siendo en uno de los casos generalizado (CL03). Hemos descartado otras causas de aumento de volumen como puede ser la presencia de malformaciones vasculares o linfedema. Al comienzo, el Síndrome CLAPO fue descrito como un nuevo Síndrome de sobrecrecimiento en el que se observaban diferentes malformaciones vasculares asociadas. Sin embargo, tras el seguimiento de estos pacientes y la incorporación de nuevos casos, hemos observado que se

trata de una característica clínica minoritaria que no se encuentra presente en todos los pacientes (35,3% de los casos) y que, por tanto, no debe ser considerado un criterio determinante para llevar a cabo un diagnóstico de pacientes con Síndrome CLAPO.

La asimetría observada y descrita en el acrónimo CLAPO es una consecuencia directa de la presencia de las ML en la zona facial, observada en 10 de los 17 pacientes (CL03, CL04, CL06, CL08, CL10-13, CL15, CL17), o de la presencia de sobrecrecimiento segmentario en una de las extremidades que provoca la aparición de una asimetría bilateral, observada en 5 de los 17 pacientes (CL01, CL02, CL09, CL10, CL14).

Por último, existe un tercer tipo de malformación vascular observada en 12 de los 17 (70.6%) pacientes (CL01, CL03-06, CL09-13, CL16, CL17), la malformación venosa (MV). Estas MVs no están incluidas dentro del acrónimo CLAPO ni fueron descritas en el artículo original, sin embargo, gracias a las revisiones fenotípicas realizadas, junto con la incorporación de nuevos pacientes y la publicación de nuevos casos, se ha observado que se trata de una manifestación muy recurrente en los pacientes con Síndrome CLAPO. Estas MVs, por lo general, se asocian a las MLs y aparecen de forma combinada, como se observa en las lesiones linfático-venosas del cuello presentes en 9 de los 17 pacientes (CL03-06, CL10-12, CL16, CL17), o en las extremidades inferiores del paciente CL01, donde se observan venas dilatadas además de una malformación linfática (**Figura 22**).



**Figura 22. Malformaciones venosas presentes en nuestra cohorte.** Manifestación muy recurrente (70.6%) en los pacientes con Síndrome CLAPO, asociada frecuentemente a las MLs. A) CL03; B) CL11; C) CL12; D) CL01.

#### 4.1.2 Mutaciones en *PIK3CA*

El análisis molecular llevado a cabo mediante el abordaje de secuenciación masiva (NGS), ha permitido el estudio de un total de 34 muestras biológicas (**Tabla 13**) correspondientes a 11 pacientes con Síndrome CLAPO (CL01, CL02, CL04, CL06, CL07, CL08, CL09, CL10, CL11, CL13, CL15). El diseño específico del panel de genes de NGS, junto con la

utilización del algoritmo bioinformático (mOsAiC) diseñado para este proyecto, ha permitido estudiar e identificar tanto mutaciones en mosaico somático, como mutaciones germinales. Los parámetros de calidad obtenidos para todas las muestras (**Tabla 13**) incluyen una cobertura horizontal de >90%, es decir lecturas muy homogéneas (a excepción de los datos de una muestra del paciente CL06), y una cobertura vertical o profundidad de lectura de entre 133-1329x para los paneles de hibridación por sondas y entre 12482-22666x para el panel Ampliseq basado en amplicones. Las muestras con una cobertura vertical/horizontal menor de 100x fueron descartadas y secuenciadas de nuevo.

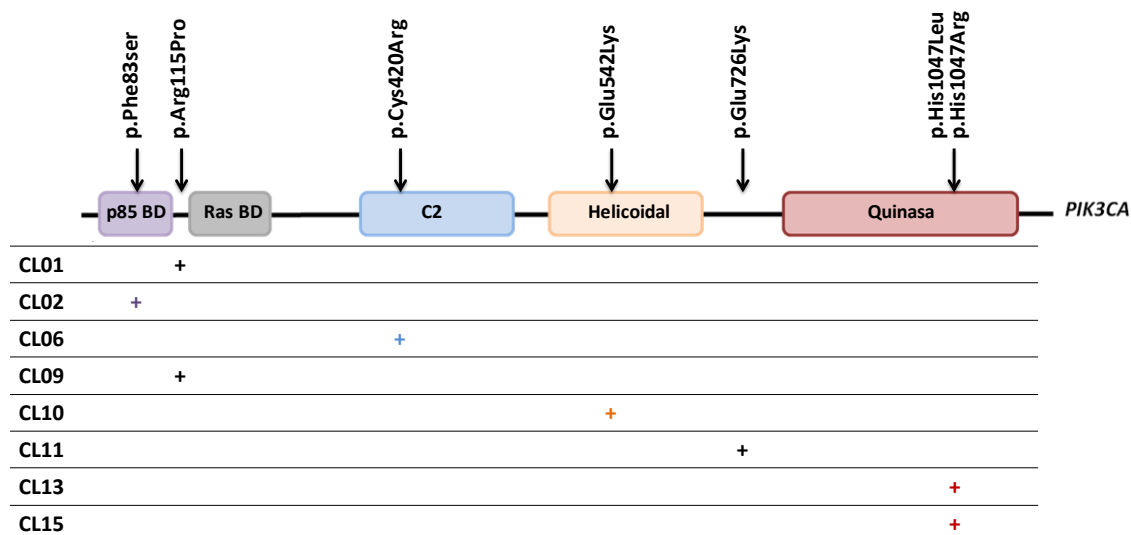
Paciente	Muestra biológica	Panel	Cobertura vertical	Cobertura horizontal
CL01	Sangre	OGLYVAS	183x	97,00%
		MALVA	446x	99,43%
	Saliva	MALVA	805x	97,48%
	Tej. Piel con SC	LMI	1329x	97,88%
CL02	Sangre	OGLYVAS	257x	96,86%
		LMI	250x	98,18%
	Tej. ML	Mosaicos	511x	93,77%
	Tej. Sano	MALVA	989x	96,61%
	LECs	MALVA	582x	95,44%
CL04	Sangre	OGLYVAS	307x	96,93%
		LMI	265x	98,31%
	Saliva	MALVA	409x	96,39%
	Tej. ML	LMI	518x	98,64%
	Tej. MC	OGLYVAS	190x	96,44%
		MALVA	398x	94,04%
		Ampliseq	12482x	92,40%
		Mosaicos	251x	93,14%
CL06	Sangre	OGLYVAS	14x	24,00%
		LMI	217x	98,12%
	Tej. ML	OGLYVAS	203x	96,81%
		Mosaicos	311x	93,76%
	Tej. Sano	OGLYVAS	248x	96,84%
CL07	Sangre	OGLYVAS	181x	96,53%
	Saliva	MALVA	188x	93,58%
	Tej. Úlceras labio con MC	OGLYVAS	73x	94,42%
		Mosaicos	407x	93,54%
		LMI	251x	98,17%
CL08	Sangre	OGLYVAS	226x	97,02%
	Saliva	MALVA	277x	96,71%
	Tej. ML	MALVA	324x	94,96%
		Ampliseq	20938x	90,58%
	Tej. Sano	MALVA	356x	95,33%

Paciente	Muestra biológica	Panel	Cobertura vertical	Cobertura horizontal
CL09	Sangre	OGLYVAS	208x	96,74%
		MALVA	268x	98,27%
	Tej. Piel con MC	LMI	1208x	96,90%
CL10	Sangre	MALVA	184x	96,78%
	Saliva	MALVA	767x	96,98%
	Tej. ML	MALVA	133x	93,50%
		LMI	320x	98,52%
CL11	Sangre	MALVA	523x	96,79%
	Saliva	MALVA	471x	95,82%
	Tej. ML	MALVA	417x	95,58%
		Ampliseq	22666x	93,35%
CL13	Sangre	MALVA	308x	96,93%
	Tej. ML	LMI	311x	97,59%
CL15	Sangre	MALVA	407x	94,75%
	Tej ML	Ampliseq	18361x	91,33%
	Tej MC	MALVA	704x	94,22%

**Tabla 13. Muestras correspondientes a pacientes con Síndrome CLAPO analizadas mediante NGS.** Abreviaturas, Tej: Tejido, ML: malformación linfática; MC: malformación capilar; SC: sobrecrecimiento; MALVA: Malformaciones Vasculares; LMI: *Lymphatic Malformation Institute*; OGLYVAS: *OverGrowth-Lymphatic-Vascular Syndromes*.

Gracias al filtrado manual y a la priorización de variantes candidatas, el número de alteraciones detectadas se redujo y fue posible identificar variantes de carácter patogénico en el gen *PIK3CA* (NM\_006218.2), en ocho de los once (64%) pacientes estudiados (CL01, CL02, CL06, CL09, CL10, CL11, CL13, CL15). Todas las variantes identificadas en este gen eran cambios puntuales de un nucleótido por otro que, en consecuencia, modificaban el aminoácido correspondiente sustituyéndolo por otro residuo diferente (*missense*). Las mutaciones fueron detectadas mediante NGS en las muestras de tejido afecto de todos los pacientes y en ningún caso en las muestras de saliva, ni en las LECs aisladas del paciente CL02. Únicamente fue posible detectar la mutación patogénica, previamente observada en tejido, en la muestra de sangre de un paciente (CL09). El resto de los casos no presentan la mutación patogénica en las muestras de sangre. Además, la muestra de LECs analizada del paciente CL02 tampoco muestra la presencia de mutaciones en *PIK3CA*, por lo que este subtipo celular parece no estar implicado en la patogénesis. Las variantes identificadas incluyen un total de 6 mutaciones diferentes en el gen *PIK3CA* (Tabla 14), entre las que se encuentran dos mutaciones *hotspot* (p.Glu542Lys; p.His1047Arg), dos variantes recurrentes y frecuentemente descritas en el espectro PROS y en cáncer (p.His1047Leu; p.Cys420Arg) (111, 118), una mutación descrita previamente en pacientes con macrodactilia (p.Arg115Pro) (119), una mutación descrita en pacientes con CLOVES y MCAP (p.Glu726Lys) (118) y por último una

mutación no descrita anteriormente en ningún trastorno del desarrollo (p.Phe83Ser), pero sí en la base de datos sobre mutaciones somáticas detectadas en cáncer (COSMIC). Todas las variantes identificadas y descritas presentan un mecanismo patogénico de ganancia de función que tiene como consecuencia la sobre activación de la ruta PI3K/AKT/mTOR.

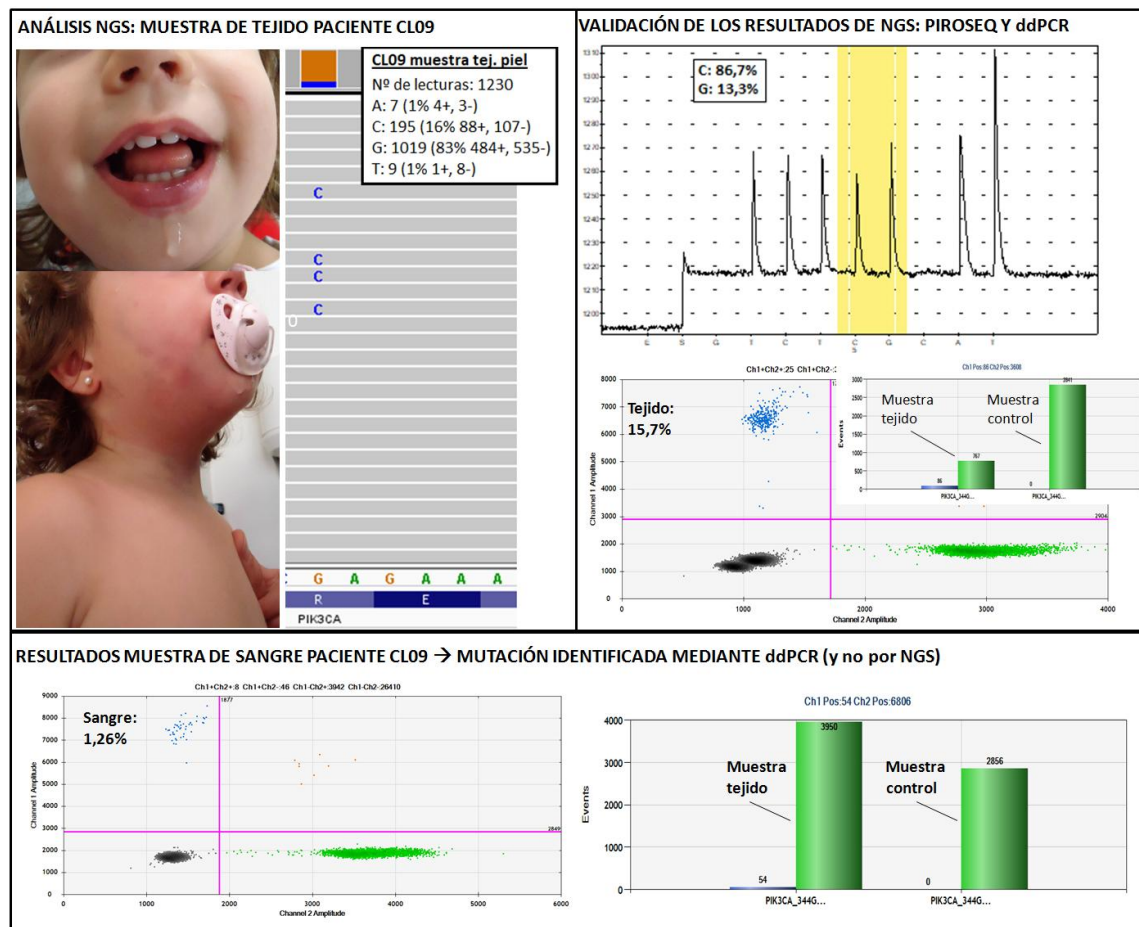


ID	Muestra biológica	Mutación	AVAF	Secuenciación Sanger	Piroseq	PCR digital
CL01	Tej. Piel SC	PIK3CA:c.344G>C;p.Arg115Pro	12%	--	7,50%	10,20%
CL02	Tej. ML	PIK3CA:c.248T>C;p.Phe83Ser	11%	--	9,50%	8,12%
CL06	Tej. ML	PIK3CA:c.1258T>C;p.Cys420Arg	12%	--	7,50%	10,30%
CL09	Tej. Piel MC	PIK3CA:c.344G>C;p.Arg115Pro	16%	--	13,30%	15,70%
	Sangre		--	--	--	1,26%
CL10	Tej. ML	PIK3CA:c.1624G>A;p.Glu542Lys	5%	--	--	3,04%
CL11	Tej. ML	PIK3CA:c.2176G>A;p.Glu726Lys	6,5%	--	--	7,6%
CL13	Tej. ML	PIK3CA:c.3140A>T;p.His1047Leu	16%	Confirmado	10%	7,2%
CL15	Tej. ML	PIK3CA:c.3140A>G;p.His1047Arg	4,3%	--	--	6%

**Tabla 14. Mutaciones identificadas en los pacientes con CLAPO.** AVAF: porcentaje de mosaicismo representado como el número de lecturas del alelo alternativo frente al número total de lecturas. Abreviaturas, piroseq: pirosecuenciación, ML: malformación linfática.

Las mutaciones encontradas en el gen *PIK3CA* fueron confirmadas y contrastadas por al menos una técnica diferente a la NGS, según el porcentaje de mosaicismo detectado (Tabla 14) y la disponibilidad de las técnicas. La presencia de la mutación quedó confirmada en todas las muestras de tejido afecto, así como en una muestra de sangre correspondiente al paciente CL09. En este paciente, la mutación en sangre periférica fue detectada gracias al uso de la PCR digital o ddPCR. Esta mutación no había sido detectada previamente en sangre mediante NGS, y según la técnica ddPCR se encuentra en un mosaico del 1,26% (Figura 23). La prueba fue

repetida por triplicado en dos ocasiones para corroborar que la variante se encontraba verdaderamente presente en la muestra de sangre y no se trataba de un artefacto de la técnica. Finalmente, la variante fue confirmada. Una vez obtenidos estos resultados, y utilizando la herramienta de visualización IGV, comprobamos cómo en el archivo BAM de la muestra de sangre del paciente CL09 aparecían 4 lecturas mutadas en dicha posición frente a 297 *wt*, aunque en el fichero de datos no se recogiese esta información debido a que la baja calidad de las lecturas provocó que dicha variante fuese filtrada. Es el único caso en el que la mutación detectada en tejido se identificó también en muestra de sangre periférica.



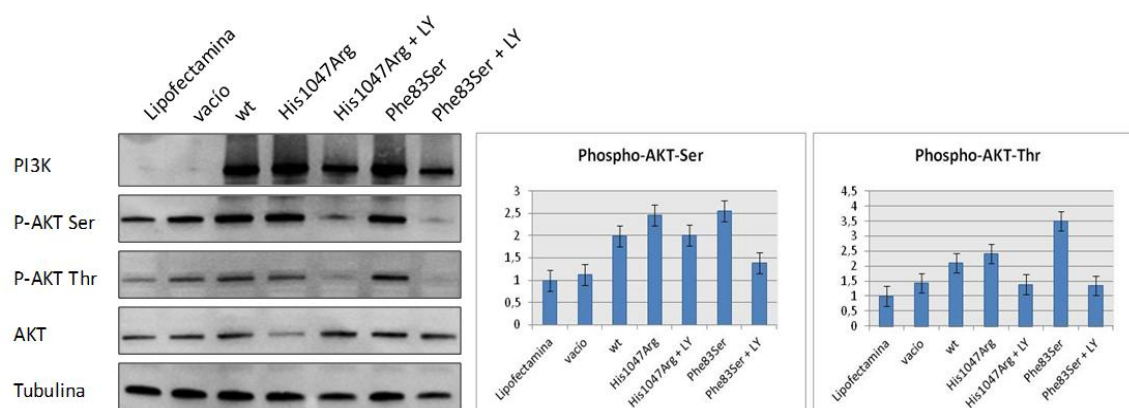
**Figura 23.** Mutación en el gen *PIK3CA* detectada en sangre y tejido del paciente CL09. (A) Paciente CL09 presenta la mutación p.Arg115Pro detectada por NGS en la muestra de tejido de piel afecta en un 16% de las lecturas. La mutación ha sido confirmada mediante pirosecuenciación y ddPCR en la muestra de tejido. (B) Mediante el uso de la ddPCR ha sido posible detectar la misma mutación identificada en el tejido, en muestra de sangre presente en un 1,26%. Es el único caso de un paciente con Síndrome CLAPO en el cual la variante patogénica es detectada tanto en muestra de sangre como de tejido.

En todos los casos en los que se disponía de muestra de sangre de los progenitores, se llevó a cabo el estudio para descartar la presencia de las variantes detectadas en el paciente. No se detectaron las variantes encontradas en muestras de tejido de los pacientes, en ninguno de los progenitores analizados.

### 4.1.3 Caracterización funcional de las variantes no descritas

De las 6 variantes diferentes identificadas en el gen *PIK3CA*, en los 8 pacientes con Síndrome CLAPO, únicamente la mutación p.Phe83Ser no había sido caracterizada funcionalmente. Esta variante ha sido descrita en la base de datos COSMIC (COSM5346970), en forma somática asociada a cáncer de endometrio y a cáncer colorrectal (120). Dada su implicación en cáncer, el efecto funcional de esta variante se presupone de ganancia de función, aumentando la señalización mediada por la ruta PI3K/AKT, sin embargo, esta teoría no había sido probada. Esta variante, a su vez, no había sido descrita asociada a malformaciones vasculares o Síndromes de sobrecrecimiento. Por ello realizamos el estudio de *Western Blot* en el que comparamos el efecto de la variante p.Phe83Ser, frente al gen *PIK3CA* wt. Así mismo, se introdujo en el ensayo la variante p.His1047Arg, como control positivo, ya que se conoce su efecto de ganancia de función en el gen *PIK3CA*. También se utilizó el inhibidor LY294002, específico de PI3K, para comparar el efecto de las mutaciones en dichas condiciones.

Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en cuanto al nivel de fosforilación de AKT en el residuo Serina y Treonina en las células transfectadas con las dos mutaciones (p.His1047Arg y p.Phe83Ser), en comparación con las células transfectadas con la proteína wt (**Figura 24**).



**Figura 24.** Inmunoblot y densitometría representativa del efecto de las mutaciones en el gen *PIK3CA* sobre la vía de señalización PI3K/AKT en células HEK293T. Activación de AKT por fosforilación en los residuos serina (Ser) 473 y treonina (thr) 308 de la proteína e inhibición producida por la administración de LY294002 (LY). Cada experimento se realizó por triplicado partiendo de nuevas transfecciones y los datos se normalizaron utilizando los valores de tubulina y AKT total.

Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando la expresión del gen constitutivo tubulina (*housekeeping gene*) y la forma total sin fosforilar de Akt. Los resultados normalizados



se compararon entre sí observándose diferencias en el nivel de fosforilación de Akt en las células transfectadas con el plásmido *wt*, frente a las mutaciones candidatas (**Figura 24**), confirmando el efecto de ganancia de función generado por la mutación p.Phe83Ser, no descrita previamente.

Además, se observa cómo la utilización del inhibidor LY provoca la disminución en la fosforilación de Akt mediante la inhibición de la proteína PI3K. La disminución observada en el caso del mutante p.Phe83Ser, es mucho mayor cuando se añade el LY comparado con el mutante *hotspot* p.His1047Arg. Esto parece indicar que el efecto de la mutación p.Phe83Ser sobre la proteína es menor que el generado por la mutación p.His1047Arg, aunque también sobreactive la ruta en comparación con la proteína silvestre. Por tanto, ambas mutaciones (Phe83Ser, His1047Arg) aumentan la fosforilación de Akt provocando una mayor activación de la ruta de señalización PI3K/AKT y por tanto una mayor proliferación.

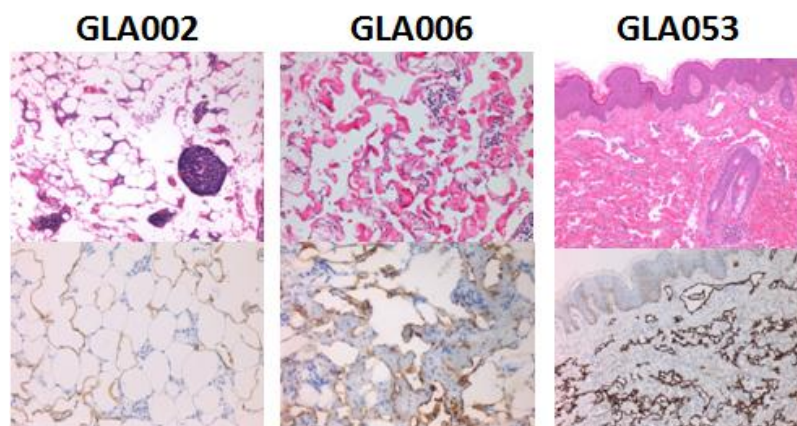
## 4.2 Anomalía Linfática Generalizada (GLA)

### 4.2.1 Base de datos y revisión fenotípica

La base de datos de pacientes con Anomalía Linfática Generalizada (GLA) fue creada en 2012, y actualmente incluye un total de 69 pacientes de los que se han recogido informes clínicos, radiológicos e histológicos. El fenotipo de GLA presenta un cuadro clínico muy heterogéneo que varía en función de la región afectada, por lo que en ocasiones el diagnóstico resulta difuso y es necesaria una revisión fenotípica periódica para confirmar la clasificación asignada y sus posibles variaciones. Por ello, a la hora de realizar este estudio decidimos acotar el número de pacientes a un grupo reducido de ellos los cuales presentaban, por un lado, un fenotipo asociado a GLA y, por otro disponían de muestras de tejido afecto, siendo este último el factor más limitante. Al igual que en los pacientes con Síndrome CLAPO, una vez seleccionados los casos se llevó a cabo un análisis retrospectivo del fenotipo de los pacientes mediante una reevaluación de las historias clínicas y evaluaciones médicas presenciales, realizadas de forma conjunta entre el INGEMM y la Unidad de Anomalías Vasculares, para recoger toda la información tanto clínica como molecular de cada uno de ellos. Fueron seleccionados un total de 9 pacientes, cuyas características clínicas se recogen en la **tabla 15**. La cohorte seleccionada incluye 5 mujeres y 4 hombres de edades comprendidas entre 5 y 39 años (siendo la media de 20,4 años). Todos son de origen caucásico con padres originales de la península ibérica y ninguno de ellos presenta una historial familiar relevante compatible con la patología. De todos los pacientes, se dispone de muestra de tejido afecto de ML obtenida

durante procedimientos quirúrgicos indicados para paliar los síntomas de su enfermedad o como consecuencia de posibles complicaciones.

La presencia de una o varias MLs es la característica principal de la enfermedad GLA, presente en el 100% (9/9) de los pacientes incluidos en nuestro estudio. Estas MLs se encuentran distribuidas por todo el cuerpo con componentes macroquísticos y microquísticos, y muestran un patrón generalizado o difuso. El área en el cual se localizan con mayor frecuencia es la cavidad torácica (GLA006, GLA011, GLA022, GLA053, GLA054, GLA061), seguido de la región pélvica y miembros inferiores (GLA002, GLA038, GLA051). Estas malformaciones son congénitas y en los 9 pacientes fueron evidentes en el momento del nacimiento. Histológicamente, las MLs presentan un incremento en el número de canales linfáticos con morfología irregular, de tamaño variable y que a menudo diseminan a través del colágeno o infiltran la dermis superficial (**figura 25**). Estos canales linfáticos están revestidos por células endoteliales positivas para la tinción D2-40, que reconoce la proteína transmembrana podoplanina presente en las LECs.



**Figura 25.** Imagen histológica de la ML de los pacientes GLA002, GLA006 y GLA053. Los vasos se tiñen con eosina-hematoxilina (imágenes de la parte superior), y con el anticuerpo D2-40 (marrón, imágenes de la parte inferior) que muestra canales irregulares con espacios anastomosantes y paredes finas.

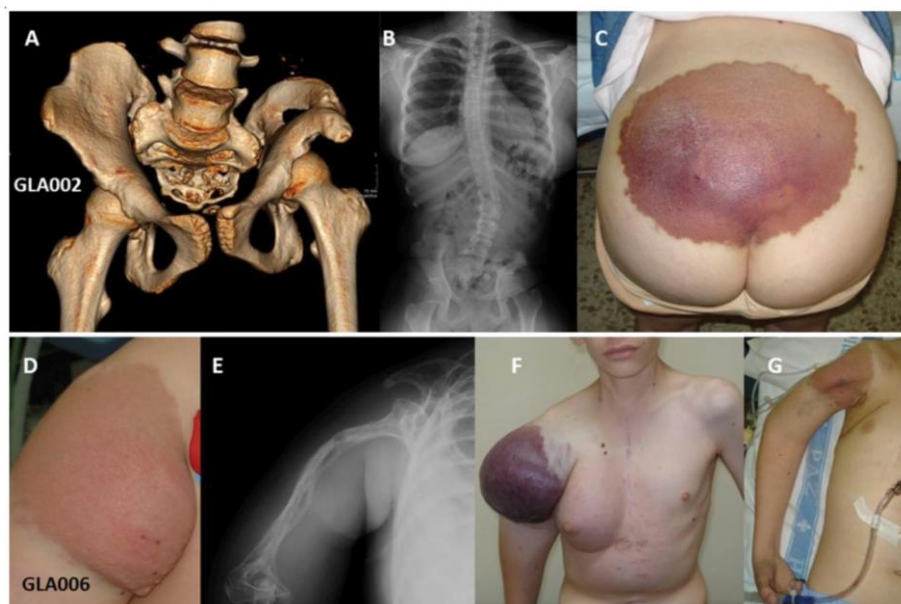
ID	Edad	Sexo	Origen	Lingangioma (HP:0025104)	Afectación visceral (HP:0100764)	Afectación ósea (HP:0002797)	Afectación torácica (HP:0010310; HP:0001698)	Otros hallazgos clínicos	Tratamiento	Muestras biológicas
GLA002	19	Mujer	España	ML (predominantemente microquística) a nivel de musculatura pélvica, región lumbosacra, glúteos y raíz proximal de ambos fémures	Órganos pélvicos y en especial afectación ovárica con hipogonadismo hipergonadotropo	Osteólisis masiva (axial y apendicular) en ambos huesos iliacos, vértebras sacro-coccígeas y cuerpo vertebral L5. Escoliosis lumbosacra de convexidad derecha	--	Disfunción ovárica secundaria. Hipertensión intracraneal idiopática. Hipertiroidismo. Dismetría Acortamiento distal del cúbito. Escoliosis. Retraso del crecimiento.	Rapamicina 1.5 mg/12h	Sangre; Hueso; Fascia; ML (FFPE)
GLA006	24 (Fallecido)	Hombre	España	ML (predominantemente microquística) en el brazo (piel, partes blandas y húmero), que cubre la axila derecha, el hombro y el hemitórax derecho (pleura, pericardio, mediastino anterior, timo, diafragma, costillas y vértebras) y en el bazo	Bazo	Osteólisis (axial y apendicular) en el húmero, la clavícula y las costillas derechas	Quilotórax y derrame pericárdico severo	Afectación cutánea de los miembros superiores	--	Sangre; ML; ML (FFPE)
GLA011	21	Hombre	España	ML macroquística en región cérvico-torácica izquierda con progresión mediastínica bilateral (hasta ventana aorto-pulmonar) y alrededor de las arterias vertebrales en la región craneal	Vena cava	Múltiples lesiones líticas (axiales y apendiculares) distribuidas por todo el esqueleto, aunque con mayor afectación en la columna vertebral dorsal y lumbar, la tercera costilla izquierda, la pelvis, húmero y las porciones proximales de ambos fémures	--	Múltiples infecciones de las ML cervicales	Rapamicina 1.5mg/12h	Sangre; ML

ID	Edad	Sexo	Origen	Lingangioma (HP:0025104)	Afectación visceral (HP:0100764)	Afectación ósea (HP:0002797)	Afectación torácica (HP:0010310; HP:0001698)	Otros hallazgos clínicos	Tratamiento	Muestras biológicas
GLA022	7 (Fallecida)	Mujer	España	ML mixta (microquística y macroquística) de las partes blandas localizadas en la región subclavicular derecha, hemitórax derecho y región mediastínica derecha con extensión torácica externa	Pulmones y vena cava superior	--	Quilotórax severo	Mucosidad muy frecuente. Desplazamiento de la tráquea debido a ML, obstrucción de la vía aéreas y atrofia del timo por compresión.	--	Sangre; ML
GLA038	16	Mujer	España	Múltiples ML macroquísticas en el retroperitoneo, que infiltran la columna vertebral, y ML microquística en los tejidos blandos de la cresta derecha	Bazo, retroperitoneo y gónadas	Múltiples lesiones líticas (axiales y apendiculares) en las vértebras D12, L1, L3, L4, L5, en el sacro y las crestas ilíacas	--	Síndrome de Insensibilidad androgénica completo (SIA). Hipogonadismo hipogonadotrópico. Ausencia de estructuras müllerianas y testículo displásico abdominal. Hernia umbilical. Osteopenia.	Rapamicina 1.5mg/12h	Sangre; ML
GLA051	36	Mujer	España	ML extensa y mixta (macroquística y microquística) en el retroperitoneo y miembro inferior derecho	Dilatación de la pelvis renal y ascitis quilosa	--	Ascitis quilosa	Enfermedad de Steinert. Linfedema secundario en pierna derecha. Dolor crónico severo en el área externa de la rodilla derecha. Hernia epigástrica. Pólipos en la vesícula biliar.	Rapamicina 1.5mg/12h	Sangre; Sangre padres; ML
GLA053	5	Hombre	España	LM torácica (predominantemente microquística) desde axila a flanco y fosa iliaca izquierda con afectación difusa de pleura y desplazamiento mediastínico	Pulmón izquierdo	Osteólisis (axial) severa en las costillas izquierdas, con desaparición de los arcos 11 y 12	Quilotórax y derrame pericárdico.	Insuficiencia respiratoria grave. Taponamiento cardíaco. Broncoespasmo. Retraso en el crecimiento en tamaño y peso. Gastrostomía y Port-a-Caht.	Rapamicina 0.3 mg/12 horas	Sangre; ML

ID	Edad	Sexo	Origen	Lingangioma (HP:0025104)	Afectación visceral (HP:0100764)	Afectación ósea (HP:0002797)	Afectación torácica (HP:0010310; HP:0001698)	Otros hallazgos clínicos	Tratamiento	Muestras biológicas
GLA054	39	Mujer	España	LM extensa y mixta (macroquística y microquística) en hemitórax izquierdo (con zonas de hemorragia) y miembro superior izquierdo	Cavidad pleural	--	Hemotórax	Prótesis mamaria izquierda. Alergia a contrastes yodados	Rapamicina 1.5mg/12h	Sangre; Sangre padres; ML; LECs
GLA061	17	Hombre	España	ML mixta (macroquística y microquística) cervicofacial y complejo torácico	Región facial y craneal	--	--	Parálisis facial izquierda postquirúrgica.	Rapamicina 1 mg/12h	Sangre; Sangre padres; ML; LECs

**Tabla 15. Datos clínicos y muestras disponibles de los pacientes GLA seleccionados para el estudio.** Las principales características clínicas recogidas incluyen la presencia de ML, la afectación torácica, con especial importancia la presencia de quilotórax, otro tipo de afectación visceral, afectación ósea y otras manifestaciones de interés. Abreviaturas, ML: malformación linfática; ITUs: Infecciones tracto urinario; FFPE: Tejido fijado en formol y embebido en parafina; LECs: células endoteliales linfáticas.

En cuanto a la afectación ósea, 5 de los 9 pacientes presentan lesiones líticas en hueso, siendo en dos casos muy severas (paciente GLA002 (**Figura 26**) y GLA053). Las lesiones óseas se observan a lo largo de todo el esqueleto, en las regiones axiales y apendiculares, afectando al área medular. Actualmente, la osteólisis presente en todos los casos se encuentra estable, sin progresión ni agravamiento.



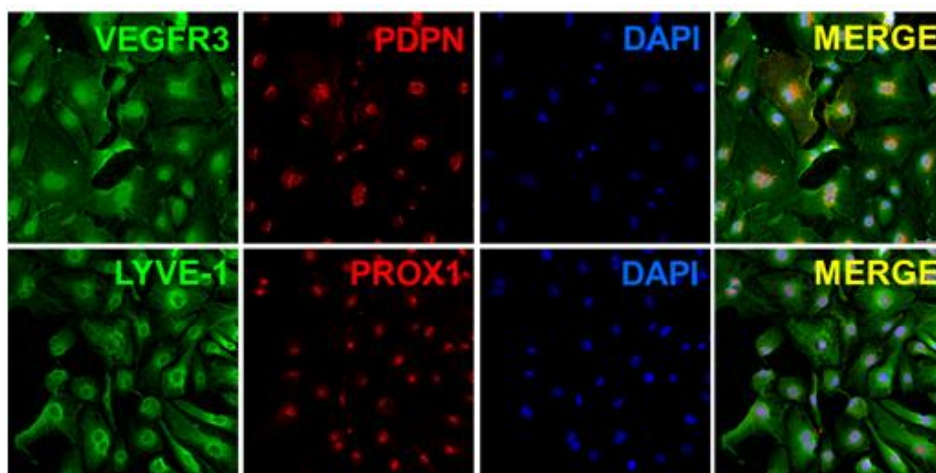
**Figura 26.** Afectación ósea observada en los pacientes GLA002 y GLA006. (A) El paciente GLA002, presenta una osteólisis que afecta a la pelvis (región apendicular) y produce la desaparición de parte de la cresta iliaca. (B) Además, debido a la presencia de la ML, el paciente GLA002 también presenta escoliosis severa (región axial), y (C) afectación cutánea. (D y F) El paciente GLA006 presenta una malformación linfática en el brazo derecho, y en la región del hemitórax que cursa con (E) osteólisis del hueso del húmero y las costillas derechas, con disminución de la densidad ósea. (G) El paciente fue intervenido para llevar a cabo la resección de la malformación (F y G).

Además del empleo de la cirugía para la resección de las MLs, 7 de los 9 pacientes se encuentran en tratamiento con Rapamicina, un fármaco que actúa sobre la proteína mTORC1, un efector de la ruta PI3K/AKT. El tratamiento es llevado a cabo mediante la administración vía oral de dosis de entre 0.3-1.5 mg del fármaco cada 12 horas, dependiendo del paciente y la severidad de los síntomas. Dado que no se trata de un ensayo clínico, sino de un tratamiento paliativo, no se disponen de datos estadísticos que confirmen la efectividad del fármaco y el posible efecto placebo, sin embargo, todos los pacientes tratados reportan una mejoría de los síntomas, disminución del dolor y sensación de alivio.

#### 4.2.2 Aislamiento de células endoteliales linfáticas (LECs)

Durante el desarrollo del proyecto se recibieron dos tejidos frescos correspondientes a dos MLs de pacientes con GLA. Los dos pacientes fueron intervenidos en el H.U. La Paz y sus

muestras fueron recogidas y transportadas al INGEMM. De cada uno de ellos se llevó a cabo el aislamiento de las células endoteliales linfáticas (LECs) utilizando el gradiente de Percoll y la selección mediante MACS con anticuerpos específicos CD31+ y Podoplanina (protocolo detallado en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos). El rendimiento obtenido en el aislamiento de las LECs totales fue menor del 10% para las dos muestras (aprox. 7,4%). Las células aisladas presentaban morfología en forma de adoquín, característica de las LECs (**Figura 27**), y su tinción/marcaje fue positiva para los anticuerpos específicos Podoplanina, LYVE, PROX-1, VEGFR-3 y DAPI (**Figura 27**). Mediante inmunofluorescencia se confirmó la pureza de las LECs aisladas.



**Figura 27.** Inmunocitoquímica fluorescente de las LECs aisladas de la ML del paciente GLA061. Las proteínas VEGFR-3 y LYVE-1 se localizan en la membrana celular o nuclear en el caso de la Podoplanina; mientras que la proteína PROX-1 se localiza en el núcleo de las LECs. El marcador fluorescente DAPI tiñe específicamente los núcleos de todas las células. La imagen denominada MERGE representa el solapamiento obtenido de la combinación de las tres imágenes anteriores.

El protocolo de aislamiento de LECs fue estandarizado de manera que la adaptación de este procedimiento a la rutina de la Sección de Malformaciones Vasculares quedó establecido para las muestras de tejido de pacientes con GLA, GSD, KLA o cualquier tipo de ML, ya sea aislada o sindrómica.

A su vez, también se recibió una muestra de ML de un paciente con Síndrome CLAPO, del cual se aislaron las LECs, siguiendo el mismo protocolo, y obteniéndose un porcentaje de células linfáticas del 7%.

#### 4.2.3 Mutaciones en *PIK3CA*

El estudio molecular mediante secuenciación masiva (NGS) se realizó en el ADN extraído de las muestras pareadas sangre/tejido de los 9 pacientes con GLA, que incluían 2 muestras de

tejido parafinado (GLA002, GLA006) y 10 muestras de tejido fresco (GLA011, GLA022, GLA038, GLA051, GLA053, GLA054, GLA061), además de 2 muestras de LECs (GLA054, GLA061). Se utilizaron diferentes paneles de NGS para estudiar las muestras biológicas, pero en todas ellas se obtuvo una cobertura horizontal de más del 80% con lecturas muy homogéneas, y una cobertura vertical o profundidad de lectura de entre 109-1598x para los paneles basados en hibridación por sondas y entre 2796-18013x para el panel Ampliseq basado en amplicones (Tabla 16).

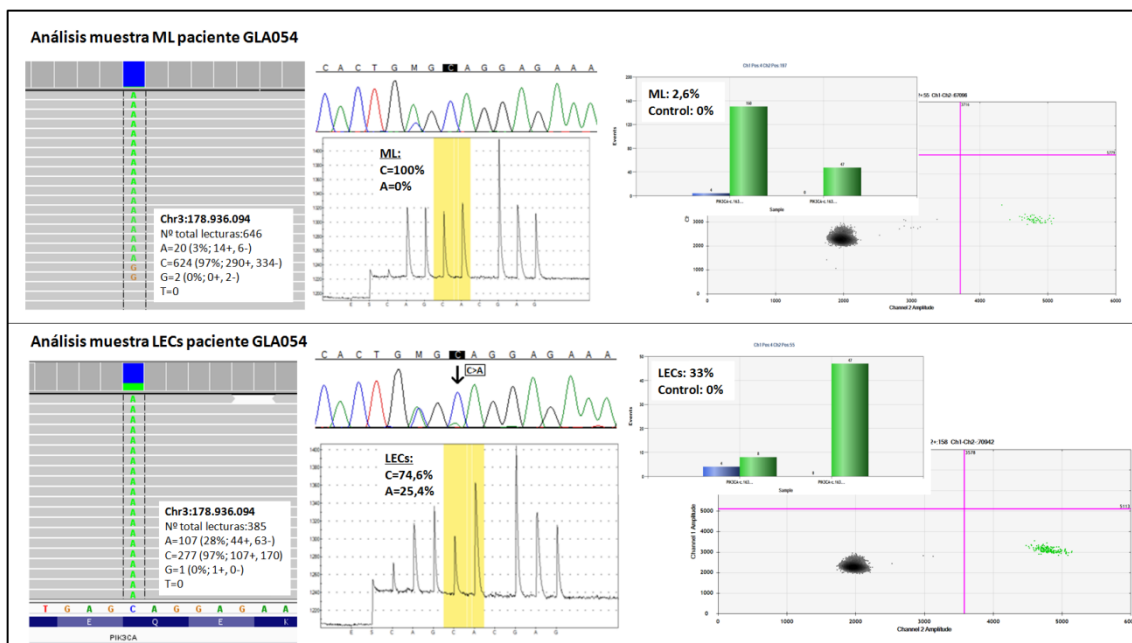
Paciente	Muestra biológica	Panel	Cobertura vertical	Cobertura horizontal
GLA002	Sangre	OGLYVAS	499x	97,24%
	Tej. Fascia	Ampliseq	14357x	85,39%
	Tej. Hueso	LMI	497x	98,56%
	FFPE (ML)	Ampliseq	6136x	84,22%
		Malva	120x	98,20%
GLA006	Sangre	LMI	195x	93,13%
	Tej. ML	LMI	229x	98,14%
	FFPE (ML)	Ampliseq	2796x	87,93%
		MALVA	109x	98,41%
GLA011	Sangre	LMI	241x	98,03%
	Tej. ML	Malva	966x	99,55%
		Ampliseq	13305x	81,56%
GLA022	Sangre	LMI	311x	97,95%
	Tej. ML	Malva	399x	98,94%
		Ampliseq	3149x	84,31%
GLA038	Sangre	LMI	244x	98,21%
	Tej. ML	LMI	518x	98,67%
		Ampliseq	17166x	83,40%
GLA051	Sangre	LMI	250x	98,24%
	Tej. ML	LMI	734x	98,79%
		Ampliseq	10879x	82,52%
GLA053	Sangre	Malva	337x	99,41%
	Tej. ML	Malva	1598x	99,59%
		LMI	703x	98,79%
		Ampliseq	16180x	84,32%
GLA054	Sangre	Malva	457x	98,94%
	Tej. ML	LMI	709x	99,52%
		Ampliseq	18013x	85,52%
	LECs	LMI	410x	95,58%



Paciente	Muestra biológica	Panel	Cobertura vertical	Cobertura horizontal
GLA061	Sangre	Malva	1133x	97,52%
	Tej. ML	Ampliseq	16149x	82,93%
	LECs	Malva	1118x	99,56%
		Ampliseq	12278x	83,78%

**Tabla 16.** Paneles de NGS utilizados para estudiar las diferentes muestras de pacientes con GLA. Las profundidades de lectura obtenidas se expresan como el número de lecturas totales del alelo alternativo frente al número total de lecturas en dicha posición.

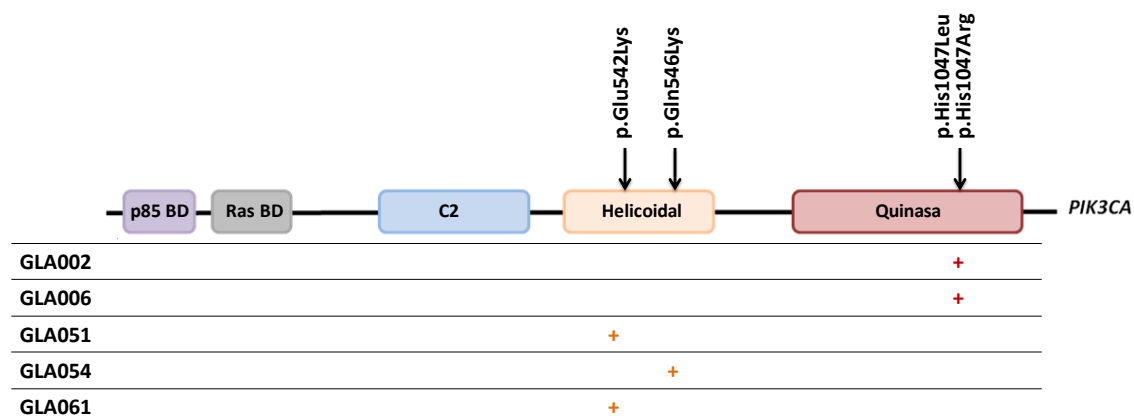
Mediante la utilización del algoritmo bioinformático mOsAiC fuimos capaces de detectar mutaciones en el gen *PIK3CA* en el ADN procedente de las muestras de tejido afecto de los pacientes con GLA. La primera muestra en la que se identificó una mutación en el gen *PIK3CA*, fue en las LECs del paciente GLA054. La calidad media de las lecturas obtenidas para esta mutación era de Q= 10 (2 órdenes de magnitud menor del Q>30 obtenido para la carrera global), y por tanto el algoritmo germinal filtraba dicho resultado al considerarlo un artefacto, por la baja calidad de las lecturas. Sin embargo, gracias a la utilización del algoritmo mOsAiC y a la visualización de la variante mediante el software IGV, confirmamos la presencia de la variante. Se trataba de la mutación p.Gln546Lys localizada en el exón 10 del gen *PIK3CA*. Para validar la presencia de la mutación se llevó a cabo una long-range PCR y la posterior secuenciación Sanger, Pirosecuenciación y PCR digital (**Figura 28**).



**Figura 28.** Mutación p.Gln546Lys en el gen *PIK3CA* identificada en el ADN de la ML y LECs del paciente GLA054. Validación de los resultados de NGS mediante secuenciación Sanger, pirosecuenciación y PCR digital. En la muestra de ML se confirma la presencia de la mutación mediante pirosecuenciación y PCR digital, y en la muestra de LECs se confirma por secuenciación Sanger, pirosecuenciación y PCR digital.

Una vez confirmada la mutación en el gen *PIK3CA* en las LECs y ML del paciente GLA054, se aplicó el algoritmo mOsAiC al resto de pacientes GLA y se detectaron mutaciones en el mismo gen en 5 de los 9 pacientes estudiados. El porcentaje de mosaicismo, calculado como el número de lecturas del alelo alternativo frente al total de lecturas, varía entre 1-3% para las muestras de tejido, entre 28-33% en las muestras de LECs, y entre 20-30% en las parafinas (Tabla 17). Todas las variantes detectadas fueron contrastadas y validadas por al menos una de las diferentes técnicas disponibles para ello, en función del porcentaje de mosaicismo.

En el caso de las muestras embebidas en parafina, el ADN se extrajo específicamente del área con mayor afectación de vasos linfáticos morfológicamente anómalos, según el estudio histológico realizado por el Departamento de Anatomía Patológica. Por esta razón, el porcentaje de mosaicismo observado en los tejidos parafinados es mayor en comparación con las muestras de tejido fresco (Tabla 17).



ID	Muestra biológica	Mutación	AVAF	Secuenciación Sanger	Piroseq	PCR digital
GLA002	FFPE	<i>PIK3CA</i> :c.3140A>G;p.His1047Arg	22%	--	19,3%	1%
GLA006	FFPE	<i>PIK3CA</i> :c.3140A>T;p.His1047Leu	18%	--	16%	1%
GLA051	Tej. ML	<i>PIK3CA</i> :c.1624G>A;p.Glu542Lys	1%	--	--	0.8%
GLA054	Tej. ML	<i>PIK3CA</i> :c.1636C>A;p.Gln546Lys	3%	--	--	2,6%
	LECs	<i>PIK3CA</i> :c.1636C>A;p.Gln546Lys	28%	Confirmado	25,4%	33%
GLA061	Tej. ML	<i>PIK3CA</i> :c.1624G>A;p.Glu542Lys	2%	--	--	1,68%
	LECs	<i>PIK3CA</i> :c.1624G>A;p.Glu542Lys	34%	Confirmado	--	27,7%

**Tabla 17. Mutaciones identificadas en los pacientes GLA.** AVAF: porcentaje de mosaicismo representado como el número de lecturas del alelo alternativo frente al número total de lecturas. Abreviatura: piroseq; pirosecuenciación; AVAF: *alternative variant allele frequency*.

### 4.3 Modelo murino

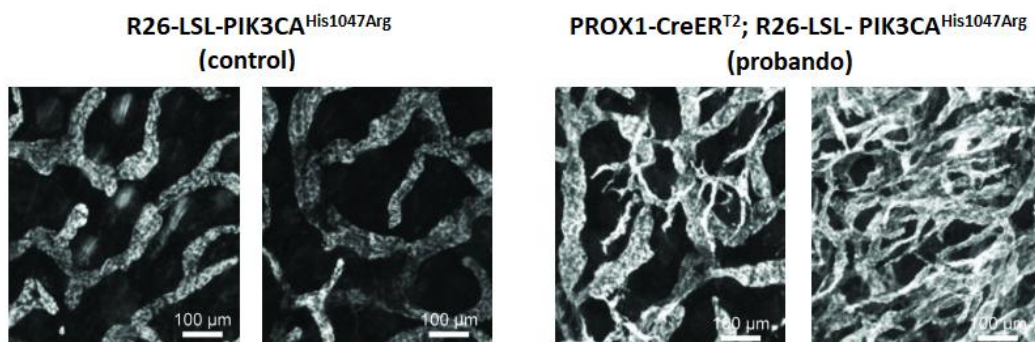
El estudio realizado en el modelo murino nos ha permitido caracterizar las LECs del animal cuando éstas expresan la mutación His1047Arg, ampliamente conocida por ser una de

las mutaciones *hotspot* de *PIK3CA* y presentar un efecto de ganancia de función sobre la ruta PI3K/AKT/mTOR (111, 118). Gracias al uso combinado del sistema reportero mT/mG y la cepa de ratón PROX1-CreER<sup>T2</sup>, observamos que el marcador PROX-1 se expresa en múltiples tejidos dentro del ratón. Para ello medimos la señal GFP o fluorescencia verde emitida, que se visualizaba en el riñón, corazón, pulmones, páncreas, periostio, piel y vasos linfáticos, por lo que dichos tejidos presentan LECs. También se observó fluorescencia verde en los cardiomiocitos, hepatocitos, islotes, neuronas y conductor pancreáticos.

Una vez confirmado que el sistema funciona y que se produce recombinación mediada por Cre en aquellos tejidos que presentan la proteína PROX-1, se utilizó el ratón transgénico PROX1-CreER<sup>T2</sup>; R26-LSL- *PIK3CA*<sup>His1047Arg</sup>, generado a partir del cruce de dos cepas mutantes (PROX1-CreER<sup>T2</sup> y R26-LSL-*PIK3CA*<sup>His1047Arg</sup>) para el estudio del efecto de la proteína PI3K mutante en la estructura y función de los vasos linfáticos. El sistema fue activado en los días 31, 33, 35, 39 y 42 del periodo postnatal mediante la administración de tamoxifeno, y se llevó a cabo el sacrificio de los animales a las 4 y 8 semanas después (día postnatal 70 y 98) para comparar el efecto de la mutación al mes y a los dos meses de su expresión.

#### 4.3.1 Estructura de los vasos linfáticos

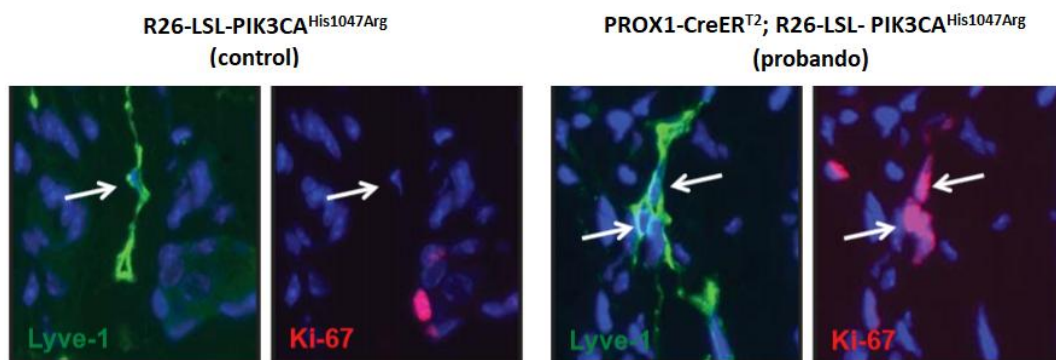
Se obtuvo el tejido linfático de la oreja del ratón y, mediante el estudio inmunofluorescente utilizando el anticuerpo LYVE1, se observó que existe un mayor número de vasos recubiertos de endotelio linfático (LECs) en los ratones transgénicos PROX1-CreER<sup>T2</sup>; R26-LSL-*PIK3CA*<sup>His1047Arg</sup> (probando) en comparación con los ratones controles R26-LSL-*PIK3CA*<sup>His1047Arg</sup> en los que no actúa la recombinasa Cre (**Figura 29**).



**Figura 29. Inmunofluorescencia del tejido linfático de la oreja del ratón.** Vasos linfáticos teñidos con el anticuerpo LYVE1 específico de LECs en los ratones control frente a los ratones transgénicos que expresan la proteína mutante (probando).

Se observa una estructura desorganizada, además de un incremento en el número de vasos (hiperplasia) linfáticos en el ratón que expresa la proteína PI3K mutada frente a los ratones controles en los que no se ha realizado ninguna modificación genética de la ruta de PI3K/AKT/mTOR. La presencia de la mutación provoca la aparición de canales anómalos, que aumentan en número en la semana 8 frente a la semana 4 tras la activación de la expresión del gen *PIK3CA* mutado.

Para comprobar que el incremento en el número de vasos linfáticos se debe a una mayor tasa de proliferación celular, se llevó a cabo la tinción del tejido con el anticuerpo Ki-67 y se observó cómo efectivamente en el ratón mutado existía un mayor número de LECs Ki-67 positivas (**Figura 30**). Por tanto, la proteína PI3K mutante induce la proliferación de las LECs y en consecuencia provoca la aparición de masas de tejido linfático desorganizado, con un mayor número de vasos.



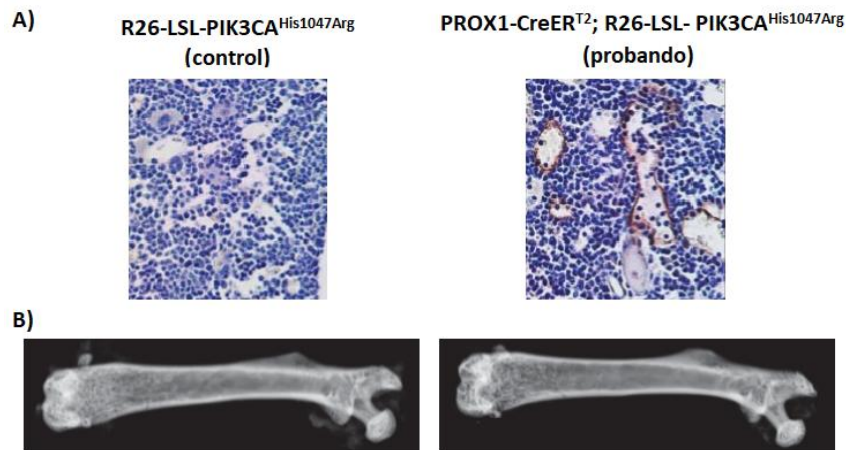
**Figura 30.** Tinción inmunofluorescente con el anticuerpo Ki-67 para estudio de proliferación celular. Se observa tinción fluorescente roja para el anticuerpo Ki-67 en las LECs (positivas LYVE1) en el ratón probando y no en el ratón control, por tanto, aunque no descartamos que exista proliferación en ambos, la tasa de células en división es mucho mayor en el ratón probando.

#### 4.3.2 Presencia de vasos linfáticos en el hueso

Para estudiar el evento osteolítico presente en la enfermedad de GLA, se extrajeron los fémures (por ser los huesos más grandes) de los ratones para su análisis. En condiciones normales (no patológicas) la estructura ósea del ratón no contiene vasos linfáticos. Los huesos fueron analizados mediante una inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo Podoplanina en la semana 8 tras la administración de la última dosis de tamoxifeno.

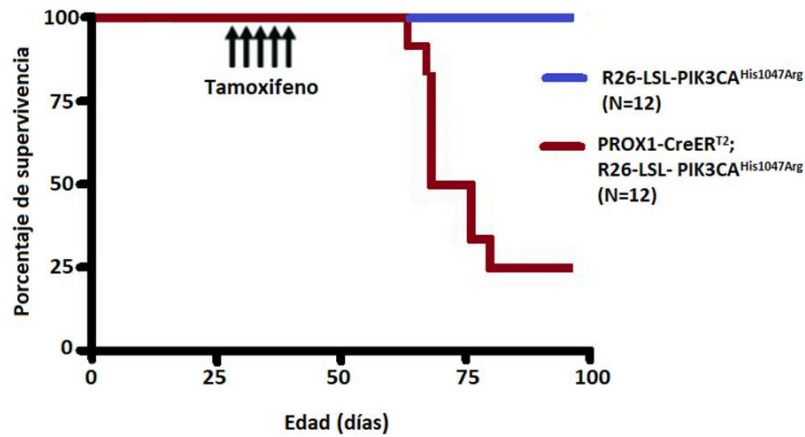
Observamos cómo en los ratones controles las muestras de hueso no presentaban vasos linfáticos. Sin embargo, en los ratones probando, observamos que el 40% (4/9) presentaban vasos linfáticos tanto en el área cortical como medular de los fémures (**Figura 31A**). A pesar de

que se localizaban vasos linfáticos dentro de la cavidad ósea, el hueso no mostraba anomalías estructurales, diferencias de densidad o indicios de lesiones líticas que puedan desembocar en osteólisis (**Figura 31B**).



**Figura 31. Inmunohistoquímica e imágenes de los fémures de los ratones control y mutado. A)** El anticuerpo Podoplanina tiñe las LECs de los vasos linfáticos observándose en color marrón. Únicamente los ratones que expresan la proteína PI3K mutada presentan vasos linfáticos en su cavidad ósea, ausentes en condiciones no patológicas. **B)** Aunque se observan vasos linfáticos en el hueso, la estructura y densidad de éstos no se ve afectado, siendo similares las imágenes óseas del ratón control frente al ratón mutado.

A raíz de estos hallazgos se decidió estudiar si el fenotipo observado en los huesos de los ratones mutantes empeoraba o se volvía más agresivo causando osteólisis transcurridas más semanas desde la activación del sistema con el tamoxifeno. Para ello se trató de alargar la vida de los ratones más allá de la semana 8. Sin embargo, todos los ratones mutantes PROX1-CreER<sup>T2</sup>; R26-LSL- *PIK3CA*<sup>His1047Arg</sup> murieron a causa de un derrame pleural antes de llegar a la semana 9 (**Figura 32**). La presencia por tanto de la proteína mutante PI3K en las LECs del ratón, genera la aparición de complicaciones linfáticas que provocan la muerte prematura del animal y en consecuencia no es posible observar qué ocurre en los huesos cuando se alarga la vida del animal.

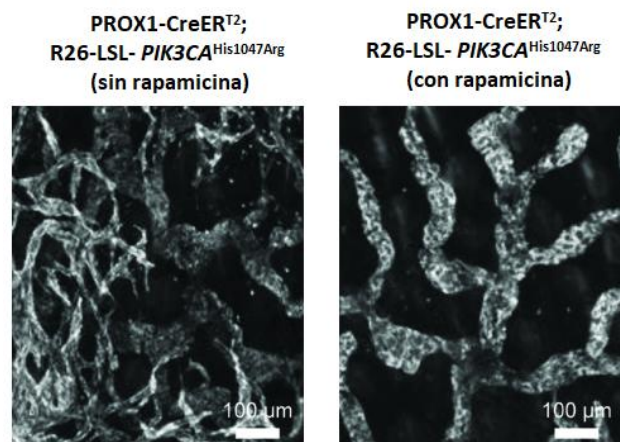


**Figura 32. Curva de supervivencia.** Se observa como los ratones control no varían en su tasa de supervivencia, sin embargo, los ratones mutados una vez activado el sistema (tamoxifeno) y transcurridas unas semanas comienzan a disminuir su tasa de supervivencia.

#### 4.3.3 Tratamiento con Rapamicina

Dado que 7 de los 9 pacientes con fenotipo GLA están siendo tratados con Rapamicina, se estudió el efecto de este fármaco en los ratones que expresan la mutación His1047Arg en sus LECs. Para ello, una vez activado el sistema mediante la inyección de tamoxifeno y transcurridas 24 horas tras su administración, se llevó a cabo una nueva inyección, esta vez de Rapamicina, durante un mes 5 veces por semana y se estudió nuevamente la estructura de los vasos linfáticos de la oreja del ratón.

Observamos cómo el patrón desorganizado y la hiperplasia observada en los ratones PROX1-CreER<sup>T2</sup>; R26-LSL- *PIK3CA*<sup>His1047Arg</sup> disminuye considerablemente y la estructura normal de los vasos linfáticos queda parcialmente restaurada tras el tratamiento con la Rapamicina (**Figura 33**).



**Figura 33. Inmunofluorescencia del tejido linfático de la oreja del ratón.** Tejido teñido con anticuerpo específico para LYVE1. Transcurridas 4 semanas tras la administración de la Rapamicina, se observa como disminuye tanto el patrón de desorganización de los vasos como la hiperplasia.

## ***DISCUSIÓN***

## 5. DISCUSIÓN

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el estudio clínico y molecular de dos cohortes de pacientes afectadas por dos enfermedades raras de etiología desconocida, que comparten como rasgo característico común la presencia de malformaciones linfáticas (MLs). Estas dos patologías incluyen el Síndrome CLAPO y la Anomalía Linfática Generalizada (GLA). Ambas enfermedades presentan características clínicas solapantes con otros Síndromes, como el espectro PROS para el Síndrome CLAPO, o la enfermedad de Gorham (GSD) para el caso de GLA. Por tanto, el primer objetivo desarrollado en este proyecto fue la caracterización clínica de nuestros pacientes incluidos en bases de datos específicas, para poder establecer un grupo de estudio acotado que presentase fenotipos únicos de la enfermedad de CLAPO y GLA.

El segundo objetivo perseguido en este proyecto ha sido la caracterización molecular de las dos patologías con el fin de dilucidar la causa genética que provoca la aparición de estas enfermedades. En ambos casos, hemos identificado variantes somáticas presentes en mosaico en el gen *PIK3CA*, todas ellas de carácter patogénico y que incrementan la actividad de la proteína PI3K codificada por dicho gen. A partir de los resultados obtenidos, se ha llevado a cabo la caracterización del efecto de una de las variantes no descrita previamente a nivel proteico (Síndrome CLAPO), y se ha desarrollado un modelo murino (enfermedad de GLA) para estudiar los efectos funcionales de las mutaciones en *PIK3CA*.

Por último, y como fruto del desarrollo de este proyecto, se ha desarrollado un protocolo diagnóstico para estudiar enfermedades causadas por mosaicismos somáticos que ha sido extrapolado a la práctica clínica habitual en el INGEMM, y que incluye: la recepción y tratamiento de muestras biológicas, especialmente de tejidos, un panel de diagnóstico de anomalías vasculares capaz de detectar variantes tanto germinales como somáticas mediante NGS, un algoritmo bioinformático para la identificación de variantes en mosaico somático, y por último un catálogo de diferentes técnicas que pueden ser utilizadas para validar y confirmar las alteraciones encontradas según el porcentaje de mosaicismo obtenido.

### 5.1 Revisión fenotípica de los pacientes con Síndrome CLAPO y con GLA

La revisión fenotípica llevada a cabo en ambos grupos de pacientes, junto con la creación de bases de datos específicas para cada una de las patologías permitió acotar el diagnóstico clínico, realizar una revisión fenotípica y obtener muestras biológicas del mayor número posible de pacientes. Para poder definir las características clínicas es necesario



adoptar una nomenclatura universal que defina cada una de las manifestaciones y que pueda ser interpretada por cualquier especialista. Para ello, utilizamos la nomenclatura europea HPO que se basa en una codificación numérica para referirse a cada una de las alteraciones fenotípicas, y la clasificación de la ISSVA (Ámsterdam 2018) para clasificar las patologías.

### **5.1.1 CLAPO**

Actualmente, contamos con la mayor base de datos de pacientes con Síndrome CLAPO descrita en la literatura. Dentro de esta cohorte y mediante sucesivas revisiones fenotípicas y consultas médicas, hemos profundizado en las características clínicas que presentan nuestros pacientes para definir mejor el perfil clínico, los criterios diagnósticos y el manejo de estos. El rasgo más característico y distintivo de los pacientes con Síndrome CLAPO es la presencia de una malformación capilar (MC) en el labio inferior, asociada a malformaciones linfáticas (MLs), sin presencia de compromiso intelectual. La MC en el labio inferior está presente en el 100% (17/17) de nuestros pacientes, desde el momento del nacimiento, y de todos aquellos casos descritos en la literatura y diagnosticados con Síndrome CLAPO (46-49). El patrón dermatológico de la MC del labio inferior es diferente al observado en otros Síndromes con malformaciones vasculares segmentarias, como el Síndrome de Sturge-Weber (121). En el caso de CLAPO, la MC varía de un color rojizo a morado y experimenta un aclaramiento (aunque incompleto) con el tiempo, en lugar de la evolución observada en las manchas vino de Oporto presentes en el Síndrome de Sturge-Weber, las cuales tienden a aumentar y engrosarse con la edad (122). La localización de la MC también ofrece información sobre posibles complicaciones asociadas. Por ejemplo, en pacientes con Síndrome de Klippel-Trenaunay la presencia de las MCs, localizadas frecuentemente en las extremidades inferiores, son un signo de riesgo de desarrollar otras posibles malformaciones vasculares asociadas, como las malformaciones linfáticas (MLs) que generarán complicaciones en las extremidades (123). De igual manera, la MC en el labio inferior presente en los pacientes con CLAPO, es un marcador de predisposición a desarrollar MLs de predominio facial y cervical, aunque estas no sean evidentes en el momento del nacimiento. Uno de los pacientes incluidos en la cohorte (CL02) fue diagnosticado a los 2 años de Síndrome CLAPO, pero no fue hasta los 15 años cuando mediante sucesivas revisiones se identificó la presencia de una ML que comenzaba a hacerse visible en la cara interna del fémur izquierdo. Esta malformación fue operada y extirpada antes de que evolucionase y provocase complicaciones. Apoyándonos en estos datos afirmamos que es necesario llevar a cabo un diagnóstico lo más precoz posible para establecer un seguimiento

periódico del paciente y así poder detectar alteraciones de aparición tardía, y prevenir futuras complicaciones.

Hasta el momento, se ha descartado la presencia de lesiones cerebrales o discapacidad intelectual en los pacientes con Síndrome CLAPO, a pesar de que las MC en la zona facial, sobre todo la zona media, están muy relacionadas con este tipo de alteraciones como ocurre en el Síndrome de Macrocefalia-Malformación capilar (M-MC) (124). La causa de esta ausencia de compromiso intelectual y anomalías de la región craneal probablemente se deban a los diferentes orígenes embrionarios (las 5 prominencias o segmentos) que conforman la cabeza (125). En el caso de M-MC, los pacientes presentan macrocefalia, discapacidad intelectual y MC en la línea media facial que incluye la glabella, surco nasolabial y labio superior. Estas MC están presentes en el segmento frontonasal, a diferencia de la MC del labio inferior del Síndrome CLAPO que se genera a partir de la prominencia mandibular, y no lleva asociada defectos neurológicos ni anomalías cerebrales, aunque sí ML cervicofaciales. Por tanto, aunque ambas MCs se localizan en la línea media facial, el diferente origen embrionario podría explicar por qué en el primer caso existe afectación neurológica mientras que, en el segundo caso, es decir en el Síndrome CLAPO, no.

Además de la característica MC del labio inferior hasta la fecha hemos reportado las siguientes características clínicas presentes en nuestra cohorte de pacientes: ML en el 82% (14/17) de nuestros pacientes, siendo la localización más frecuente el área mandibular y la lengua; MV presente en el 71% (12/17) de los pacientes, comúnmente asociadas a las ML del cuello; asimetría tanto facial como de las extremidades presente en el 88% (15/17) de los casos; y sobrecrecimiento parcial (5/17) en el 29% de los pacientes o generalizado (1/17) en el 6%. Es la primera vez que las MV aparecen definidas como un elemento principal del fenotipo CLAPO, dada su alta prevalencia de aparición.

A pesar de que el sobrecrecimiento es la característica minoritaria, ésta se encuentra dentro del acrónimo CLAPO, ya que fue descrita en 4 de los 6 pacientes originales a partir de los cuales se describió el Síndrome. Además, el Síndrome CLAPO comparte un solapamiento clínico con varias patologías incluidas dentro del denominado espectro PROS (*PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum*) que incluye diferentes entidades clínicas asociadas a Síndromes de sobrecrecimiento segmentario. Esta agrupación de diferentes patologías bajo el acrónimo PROS, se ha realizado a partir de los hallazgos moleculares en los que se ha probado que todas están causadas por mutaciones somáticas en el gen *PIK3CA*. En particular, el Síndrome CLAPO

presenta un mayor solapamiento fenotípico con el Síndrome M-MC (124), ya que ambas presentan MC en la línea media facial y con el Síndrome de CLOVES (126) por la presencia de ML.

### 5.1.2 GLA

Nuestra base de datos de pacientes con Anomalía Linfática Generalizada (GLA) cuenta con un total de 69 casos diagnosticados, que son revisados con periodicidad. Sin embargo, para llevar a cabo este proyecto elegimos un total de 9 pacientes clasificados con un fenotipo de GLA y que disponían de muestra de tejido afecto para llevar a cabo el estudio molecular. Este último requisito fue el más limitante y el que explica el bajo número de casos escogidos. Basándonos en nuestra experiencia en GLA y en los datos clínicos descritos en la literatura, nuestra cohorte de pacientes recogía los criterios diagnósticos necesarios (al menos dos de ellos) para ser agrupados bajo este diagnóstico, que incluyen los siguientes requisitos: 1) presencia de múltiples ML quísticas o ML generalizada y difusa, que se encontraban presentes en el 100% de los casos (9/9); 2) una alta incidencia de lesiones viscerales, que observamos en todos los pacientes 100% (9/9) y que afectan de forma predominante a los pulmones, corazón y hemitórax; 3) presencia de lesiones óseas en la cavidad medular del hueso que afectan tanto al esqueleto axial como apendicular y que están presentes en el 56% (5/9) de los casos; y 4) afectación cutánea debido a la ML, observada en el 33% (3/9) de nuestros pacientes (57, 59, 70). De esta forma realizamos un diagnóstico diferencial de nuestra cohorte de pacientes con GLA, que fue complementado con las pruebas radiográficas y estudios anatomopatológicos para poder distinguirlos de otros Síndromes como la enfermedad de Gorham (GSD) o la linfangiomatosis kaposiforme (KLA). Estas enfermedades presentan: una osteólisis progresiva del área cortical del hueso mucho más agresiva que en el caso de GLA y que afecta sobre todo al esqueleto axial (GSD); alteraciones en el tejido blando adyacente a los huesos afectados (GSD); acúmulos de células kaposiforme en los espacios linfáticos (KLA); y trastornos de la coagulación (KLA) (25, 58, 65, 70).

El patrón de manifestación de las ML observadas en nuestros pacientes presenta una combinación de malformaciones macroquísticas y microquísticas, a diferencia de lo descrito en la literatura en la que se describe una tendencia de MLs macroquísticas en estos pacientes (57, 60). Las paredes de los vasos linfáticos, revestidas con LECs, son finas y presentan un incremento en el número de canales anastomosantes. La mayor complicación observada, asociada a estas ML, es la infiltración de los tejidos adyacentes que causan problemas como los

derrames pleurales, presente en el 44% (4/9) de nuestros pacientes, y que generan las consecuencias más severas si no son tratadas a tiempo, llegando incluso a provocar la muerte del paciente como en dos de los casos de nuestra cohorte (GLA006, GLA022).

Otra de las zonas en las que más predominantemente encontramos vasos linfáticos infiltrados son los huesos, en los que aparecen múltiples lesiones líticas en las que el tejido óseo es reemplazado por tejido fibroso. Estas lesiones, provocan fracturas, así como disminución de la densidad del hueso, siendo las más agresivas las que afectan a la región del cráneo o a las vértebras. Sin embargo, esta osteólisis o lesiones líticas no progresan indefinidamente y alcanzan un umbral en el que se mantienen estables en el tiempo, por lo que no suponen una de las complicaciones más severas en el fenotipo GLA. Por el contrario, en la enfermedad de GSD la osteólisis progresa de forma continua hasta provocar la desaparición del hueso (52), con consecuencias mucho más severas.

La mayor parte de la información recogida sobre el diagnóstico de GLA proviene de los casos descritos en la literatura, en los que se presentan un amplio espectro de manifestaciones clínicas que pueden afectar a uno o varios órganos, siendo estos órganos los huesos, la cavidad torácica u otras vísceras, por lo que el diagnóstico se vuelve difuso en función de los órganos afectados. La revisión fenotípica de un mayor número de casos ayudará a definir mejor los criterios de diagnóstico, establecer una descripción clara de la enfermedad y predecir las posibles complicaciones que se observen. La enfermedad de KLA descrita en 2013 (65), fue propuesta un año después como una variante de GLA e incluida como tal en la clasificación de la ISSVA en el año 2018. Es de esperar que dentro del espectro de MLs difusas con afectación visceral y ósea, existan diferentes subtipos que estén aún por definir. Por ello, es necesario seguir profundizando en la enfermedad tanto de GLA como de GSD o KLA para poder identificar los posibles subtipos y clasificarlos adecuadamente.

## 5.2 Estudio molecular y diagnóstico genético de las dos enfermedades

Los resultados moleculares presentados en este trabajo reflejan la presencia de mutaciones somáticas activantes en el gen *PIK3CA* en pacientes con Síndrome CLAPO y con Anomalia Linfática Generalizada o GLA. Es la primera vez que mutaciones de carácter patogénico en este gen son identificadas en ambas patologías, de las cuales no se conocía la causa genética. Estas mutaciones tienen lugar durante el desarrollo embrionario, generando un mosaicismo somático que a su vez da lugar a la combinación de manifestaciones clínicas propias del Síndrome CLAPO y de GLA (76).

### 5.2.1 CLAPO

En este proyecto se ha realizado el estudio molecular de 11 de los 17 pacientes con Síndrome CLAPO incluidos en la base de datos, de los cuales se disponía de muestra de tejido afecto. Se han estudiado un total de 33 muestras que incluyen 11 sangres, 6 salivas, 1 LECs y 16 tejidos. El análisis de las secuencias revela variantes patogénicas en el gen *PIK3CA* en el 64% (8/11) de los pacientes. Las mutaciones únicamente se detectan en las muestras de tejido afecto y no en las muestras de sangre (a excepción del paciente CL09), saliva, LECs o tejido sano. Estas mutaciones son somáticas, ya que únicamente están presentes en las células que componen el tejido afecto, y presentan diferentes porcentajes de afectación o mosaico que varían entre un 5-12%. Todas las mutaciones identificadas presentan un efecto de ganancia de función sobre la proteína PI3K, aumentando la fosforilación de AKT y en consecuencia provocando una activación continuada en el tiempo de la ruta biológica PI3K/AKT/mTOR (114). Variantes patogénicas en este mismo gen han sido descritas previamente como causantes de fenotipos como M-MC y CLOVES (85), incluidos en el espectro PROS, malformaciones linfáticas (MLs) (17) aisladas o el Síndrome de Klippel-Trenaunay (123), entre otros. Todas estas patologías presentan características clínicas solapantes con la enfermedad de CLAPO, y un patrón de manifestación segmentario o en mosaico similar.

Dentro de las muestras de tejido analizadas se encuentran 8 muestras de tejido de ML, 4 muestras de tejido de malformación capilar (MC), 1 muestra de tejido con sobrecrecimiento y 3 muestras de biopsia de piel sana. El mayor porcentaje de detección de variantes se localiza en los tejidos de ML (75%; 6/8). Sin embargo, el tipo celular en el cual se localiza la mutación no se corresponde con las LECs, descritas como causantes de las MLs comunes, y que a priori pensamos que podrían estar a su vez involucradas en el Síndrome CLAPO. En el caso del paciente CL02 se llevó a cabo el protocolo de aislamiento de las LECs a partir de tejido de ML, y estas fueron analizadas mediante NGS al igual que la muestra en fresco. La mutación únicamente fue detectada, en un mosaico del 11%, en la muestra de tejido fresco en la que el porcentaje celular predominante eran fibroblastos dérmicos, y no se detectó en la muestra de LECs aisladas. Es el único caso de ML de paciente con Síndrome CLAPO en el que se ha podido llevar a cabo el protocolo de aislamiento de un tipo celular concreto, dado que del resto de muestras únicamente se obtuvo ADN o tejido congelado en *ARN-later*. Esta teoría se apoya con evidencias encontradas dentro del espectro PROS, que presenta muchas similitudes tanto clínicas como moleculares con el Síndrome CLAPO, y en el cual se han identificado mutaciones patogénicas en el gen *PIK3CA* en fibroblastos dérmicos obtenidas de biopsias de piel de los

propios pacientes (115, 127). Por tanto, y a pesar de sólo haber testado esta teoría en un paciente de nuestra cohorte, nuestros resultados apuntan a que las células portadoras de la mutación y causantes del fenotipo CLAPO son los fibroblastos y no las LECs, aunque es necesario expandir el estudio a un mayor número de muestras y diferentes células aisladas para confirmarlo.

Dentro de las muestras de saliva y sangre analizadas en los pacientes con Síndrome CLAPO, sólo ha sido posible detectar la mutación patogénica, previamente identificada en muestra de tejido afecto, en la muestra de sangre de un paciente (CL09). Dicha mutación se encuentra en un mosaico del 1,26% en la muestra de sangre y únicamente ha podido ser identificada mediante la técnica de la ddPCR, siendo indetectable mediante NGS. Es el único caso (6%; 1/17) en el que la mutación también se encuentra presente en la muestra de sangre. Sin embargo, en la enfermedad de M-MC este fenómeno ha sido observado en un 8% de los pacientes reportados en la literatura (117) y en un 17% de nuestros pacientes estudiados en el laboratorio. En el caso del paciente CL09, esta mutación en sangre por sí misma no nos habría permitido establecer el diagnóstico molecular en el paciente, ya que se encuentra por debajo de los límites de detección de la técnica de secuenciación masiva. La presencia de esta mutación en sangre podría explicarse por la filtración de células provenientes de la malformación al torrente sanguíneo y por ello el porcentaje es tan bajo. De esta forma, y partiendo de los resultados obtenidos, concluimos que el estudio molecular de los pacientes con Síndrome CLAPO debe ser realizado en las muestras de tejido afecto, aunque se recomienda estudiar las muestras de sangre y/o saliva para descartar posibles mosaicos bajos y completar el estudio.

Si mejoramos nuestros métodos diagnósticos lo suficiente, es posible que podamos evitar biopsias innecesarias en un porcentaje significativo de pacientes, por eso es importante seguir estudiando muestras de sangre y tejido para poder implementar los protocolos de detección. Sin embargo, no hay que olvidar la complejidad que conlleva el estudio de mosaicismos somáticos, la dificultad de establecer asociaciones entre el nivel de mosaicismo y el grado de severidad clínica en un paciente, o la dificultad para el asesoramiento genético, especialmente al estimar el riesgo de recurrencia.

En este trabajo se han identificado un total de 7 mutaciones diferentes en el gen *PIK3CA*, seis de ellas previamente descritas en pacientes con Síndromes de sobrecrecimiento segmentario (espectro PROS (114)), y en cáncer (COSMIC) (111). La variante p.Phe83Ser no

había sido descrita hasta el momento en pacientes con malformaciones vasculares aisladas, complejas, o en pacientes con Síndromes de sobrecrecimiento; aunque sí se había descrito la presencia de esta mutación en cáncer de intestino y endometrio (base de datos COSMIC, #COSM5346970). Por tanto, se trata de la primera vez que se describe la variante p.Phe83Ser en un paciente con una patología asociada a malformaciones vasculares, demostrándose a su vez el efecto de ganancia de función *in vitro*, caracterizado mediante experimentos de expresión proteica. Todas las mutaciones son variaciones de un único nucleótido (mutaciones *missense*) que provocan cambios en la secuencia de aminoácidos en la proteína PI3K. Estos cambios dan lugar a la síntesis de una subunidad p110 $\alpha$  modificada que provoca que PI3K se encuentre activada constitutivamente, generando una señalización desregulada que da lugar a una división y crecimiento celular descontrolado. El aumento de la proliferación celular provoca a su vez un crecimiento anormal del tejido en el que se localiza la mutación, en este caso los vasos sanguíneos, y/o tejidos blandos, que da lugar a la aparición de MCs, MLs y MVs en estos pacientes, y en algunos casos a sobrecrecimiento. A pesar de la implicación del gen *PIK3CA* en cáncer, los pacientes con Síndrome CLAPO *a priori* no presentan un riesgo elevado de desarrollar tumores. Se ha reportado un tumor (ganglioneuroma) en 1 de los 17 pacientes que contiene la cohorte. Es necesario estudiar un mayor número de casos con CLAPO para poder definir si existe un riesgo incrementado en estos pacientes de desarrollar tumores, sin embargo, todo apunta a que la frecuencia de aparición es baja como también ocurre en las patologías incluidas dentro del espectro PROS (111, 128).

Otra de las cuestiones que surgen a raíz de este trabajo es si el Síndrome CLAPO debería ser incluido dentro del espectro PROS. Tanto CLAPO como el resto de las entidades clínicas incluidas en el espectro presentan variantes patogénicas de ganancia de función en el gen *PIK3CA*, y un patrón de mosaicismo somático que provoca la aparición de un fenotipo segmentario caracterizado por la combinación de diferentes malformaciones que afectan únicamente a determinadas partes del cuerpo. Tradicionalmente, las diferentes patologías son clasificadas por sus características clínicas, si bien es cierto que cada vez más se usan criterios moleculares. En términos taxonómicos, la clasificación de CLAPO cambiaría si se decidiese incluir dentro del espectro PROS. Es necesario abordar la utilidad o no de mantener la distinción clínica de CLAPO o cambiar a su clasificación molecular desde el punto de vista tanto clínico como genético y siempre pensando en el beneficio del paciente más que en sus posibles ventajas en la generación de conocimiento.

La finalidad del espectro PROS es unificar bajo un mismo acrónimo todas aquellas patologías causadas por mutaciones activantes en mosaico en el gen *PIK3CA* y que presenten un fenotipo asociado a sobrecrecimiento segmentario. A nivel genético, incluir CLAPO dentro de PROS aumentaría el rendimiento del diagnóstico molecular ya que permitiría agrupar a estos pacientes junto con el resto del espectro PROS y emplear un estudio más dirigido, focalizado en el gen *PIK3CA* y la ruta PI3K/Akt/mTOR, de forma que se disminuyese el tiempo de diagnóstico, se redujese el coste, y esto a su vez permitiese el refinamiento de la técnica. Además, esto ayudaría a llevar a cabo estudios farmacogenéticos para la identificación y obtención de tratamientos personalizados que pudiesen ser utilizados en todas las patologías incluidas dentro del espectro PROS.

Desde el punto de vista clínico, existen limitaciones en la agrupación de CLAPO dentro del espectro PROS a la hora del manejo y seguimiento de los pacientes. Dicho espectro agrupa patologías muy diferentes que, a pesar de presentar elementos solapantes, muestran una evolución, pronóstico, y desarrollo clínico desiguales, y que requieren de un diagnóstico diferencial específico para el correcto tratamiento de cada paciente. Por ejemplo, los pacientes con macrodactilia (119) aislada asociada a *PIK3CA* presentan un cuadro clínico limitado y menos agresivo que un paciente con M-CM (124), quienes presentan un compromiso o afectación más generalizada, incluyendo afectación neurológica. Por ello, el diagnóstico clínico precisa de una taxonomía individualizada de estas patologías para poder abordar de forma adecuada su tratamiento, seguimiento, pronóstico y anticiparse a las posibles complicaciones.

En el caso específico de CLAPO, aunque el pronóstico es favorable, es necesario un seguimiento de dichos pacientes para descartar la aparición de ML que se manifiesten de forma tardía. Por tanto, desde el punto de vista clínico agrupar a estos pacientes bajo el acrónimo PROS dificultaría la identificación y distinción de un paciente con CLAPO, con las consiguientes consecuencias y posible falta de seguimiento.

Tras el desarrollo de este proyecto proponemos que CLAPO debe ser incluido en el espectro PROS, pero teniendo en cuenta que es necesario mantener la nomenclatura clínica. Mantener esta nomenclatura ayudará al neonatólogo en el diagnóstico precoz de la enfermedad y a establecer un seguimiento adecuado de las posibles anomalías asociadas, informando también a los familiares de las posibles complicaciones. Por otro lado, a nivel genético y práctico sí podemos realizar la agrupación de CLAPO junto con el espectro PROS para facilitar el diagnóstico e implementar las herramientas diagnósticas y de investigación.



### 5.2.2 GLA

En el caso de GLA, el estudio molecular se ha realizado en 9 pacientes seleccionados dentro de la base de datos de 69 pacientes, disponible actualmente. Estos pacientes seleccionados cuentan con muestra de tejido afecto para el estudio y presentan un diagnóstico clínico claro de patología GLA. De los 9 pacientes estudiados se ha llevado a cabo el análisis en paralelo de las muestras de sangre y de tejido. Entre las muestras de tejido se incluyen 8 tejidos frescos de ML, 2 tejidos parafinados de ML, 1 hueso y 1 fascia. Además, se ha llevado a cabo el aislamiento de las células endoteliales linfáticas (LECs) de dos de los pacientes con GLA de los que se obtuvo tejido fresco durante el transcurso de este proyecto. Las LECs son las principales células candidatas de ser portadoras de las alteraciones y por tanto de causar la patología de GLA.

El estudio molecular llevado a cabo mediante NGS en todas estas muestras biológicas ha permitido identificar mutaciones de carácter patogénico en el gen *PIK3CA* en el 56% de los pacientes estudiados. Como ocurría en el Síndrome CLAPO, el patrón de distribución segmentario de las manifestaciones clínicas apuntaba a un posible mosaicismo como causa de la patología. Esta teoría se confirma con los hallazgos moleculares en los que se observan las mutaciones en forma de mosaico somático, presentes únicamente en las muestras de tejido afecto y no en las muestras de sangre, con porcentajes de expresión del alelo alternativo que varían entre un 1-33% dependiendo del tipo de tejido estudiado y del paciente. La secuenciación y análisis de las LECs permitió además demostrar que estas células portan la mutación en un porcentaje mayor de mosaico que la muestra de tejido y por tanto se asocian con la patogénesis de la enfermedad, como se sospechaba.

Dado que no existen estudios previos en GLA, GSD o KLA, que identifiquen mutaciones en el gen *PIK3CA* en estas patologías, se decidió llevar a cabo el estudio *In vivo* del efecto de dichas mutaciones en un modelo murino. Para ello se expresó de manera dirigida en las LECs del ratón, una de las mutaciones más recurrentes de *PIK3CA* (His1047Arg), identificada en uno de los pacientes de nuestra cohorte. Mediante el uso del modelo animal que portaba la mutación y un modelo control en el que no se introdujo ningún cambio, fue posible observar la aparición de malformaciones extensas en los vasos linfáticos del ratón mutado causadas por una alta proliferación patogénica de las LECs que recubren los vasos, la presencia anómala de vasos linfáticos en la cavidad ósea, que no se encontraban presentes en el ratón control, y un descenso en la tasa de supervivencia del animal.

Los vasos linfáticos no están presentes en los huesos en condiciones normales, pero sí están presentes en los huesos en pacientes con GLA (58). Los ratones con la mutación H1047R expresada específicamente en LECs desarrollaron vasos linfáticos en sus huesos, aunque no mostraron pérdida ósea ni fracturas patológicas. Esto es probablemente debido a que los ratones murieron antes de tener una afectación ósea significativa. En el futuro, las LEC de estos ratones podrían aislarse e inyectarse en las tibias de ratones normales, un enfoque usado recientemente para mostrar que las LECs inducen la reabsorción ósea mediada por osteoclastos en ratones (129).

Además, al ratón probando se le administró Rapamicina, inhibidor específico de mTOR que forma parte de la ruta de PI3K, observándose que este fármaco prevenía la hiperplasia y la disfunción linfática en los ratones mutados que aún no manifestaban sintomatología, pero también restauraba parcialmente la función linfática en los ratones con la patología ya establecida, disminuyendo las masas linfáticas y en consecuencia aumentando la supervivencia. De esta forma, fue posible reproducir un fenotipo que se asemeja al de los pacientes con GLA, especialmente por la presencia de vasos linfáticos en los huesos y la formación de masas extensas de ML que pueden afectar a diferentes órganos. Además, aunque este trabajo no es un ensayo clínico controlado, se suma al creciente número de informes de que los pacientes con GLA responden al tratamiento con la Rapamicina (62, 68, 130), incluyendo 7/9 pacientes de nuestra cohorte. Curiosamente, encontramos que los pacientes en los que no detectamos una mutación en *PIK3CA* también respondieron a la Rapamicina. Esto podría deberse a que los pacientes presentan alteraciones en *PIK3CA*, pero aún no hemos sido capaces de identificarlas o que existan alteraciones en otros genes diferentes incluidos en la ruta PI3K/AKT/mTOR. Estudios futuros ayudarán a dilucidar cuál de estas posibilidades es la correcta.

Es la primera vez que se describen mutaciones de carácter patogénico en el gen *PIK3CA* en pacientes con GLA como causa genética de esta enfermedad, así como un modelo animal que sustente esta teoría. Artículos publicados recientemente señalan la presencia de variantes en el gen *NRAS* en un paciente descrito como GLA (131). Sin embargo, tras realizar un análisis en profundidad de las características clínicas del paciente descrito creemos que el diagnóstico clínico más probable es KLA y no GLA. Además, un nuevo hallazgo del grupo de investigación del hospital infantil de Boston (*Boston Children Hospital*) en colaboración con el hospital infantil Alberta y la universidad de Calgary en Canadá, en el que identifican la misma mutación

*hotspot* en el gen *NRAS* (p.Q61R) en 10 paciente con KLA, apoya la hipótesis de que *NRAS* es el gen, o al menos uno de los genes causantes de la patología KLA (132).

Es necesario señalar que mutaciones en el gen *PIK3CA* en forma de mosaico somático ya habían sido descritas previamente en ML aisladas que surgen de manera esporádica (17, 59) sin estar asociadas a otras anomalías. Por tanto, puede surgir la duda de si los pacientes en nuestra cohorte presentan un verdadero fenotipo GLA o por el contrario se trata de ML muy extensas. El mosaicismo somático por sí mismo puede ser una explicación plausible a esta pregunta, ya que dado que el lugar en el cual se produce la mutación *a priori* es el mismo (las LECs), el momento dentro del desarrollo embrionario podría provocar que se desarrollase un fenotipo u otro. Si las mutaciones ocurren en un momento muy temprano del desarrollo embrionario, en el cual los tejidos linfáticos están proliferando y expandiéndose a todo el cuerpo, el fenotipo resultante será más agresivo y podrá invadir diferentes estructuras como ocurre en los pacientes con GLA. Por su parte, en el caso de las ML aisladas la mutación podría tener lugar en un estadio posterior del desarrollo embrionario, cuando los vasos ya se encuentran expandidos por todo el organismo y la proliferación descontrolada afecte únicamente al lugar en el cual se produce la mutación. Para confirmar o rechazar esta posibilidad teórica serán necesarios experimentos *In vivo* con modelos animales en los cuales se induzca la expresión de la mutación a diferentes tiempos y se comparen los fenotipos resultantes. Además, también es posible que estén involucrados diferentes tipos celulares por lo que el aislamiento y caracterización de nuevos subtipos resultará muy beneficioso.

El descubrimiento de mutaciones en *PIK3CA* nos acerca a comprender la etiología de esta enfermedad y nos abre nuevas opciones de tratamiento para estos pacientes.

### 5.3 Extrapolación de los resultados al diagnóstico clínico asistencial

El mosaicismo somático es una realidad y cada vez se describen más patologías en las que se presentan variantes fenotípicas causadas por mutaciones en mosaico somático, como en el caso de patologías como la hipercolesterolemia familiar (133). Su detección supone un desafío dada la necesidad de adecuar los protocolos diagnósticos para la detección de alelos alternativos presentes en mosaicos bajos y únicamente en los tejidos afectados. Por ello, uno de los objetivos iniciales de este proyecto fue el diseño, desarrollo e implementación de un protocolo diagnóstico de enfermedades causadas por mosaicismos somáticos que pudiese ser aplicado a la rutina asistencial.

Para llevar a cabo este propósito nos basamos en las dos patologías objeto de estudio en este proyecto: el Síndrome CLAPO y GLA. El primer paso engloba la recepción y procesamiento de las muestras biológicas. En este punto es de vital importancia la colaboración multidisciplinar entre profesionales médicos y genetistas. El estudio de las patologías causadas por mosaicismos somáticos requiere de la obtención de muestras de tejido afecto que son extraídas durante procedimientos quirúrgicos requeridos por algún tipo de complicación o tratamiento de la enfermedad. Dado que no es fácil obtener estas muestras es imprescindible establecer una relación muy estrecha con los diferentes especialistas para no perder ninguna muestra potencial. Las muestras deben ser recogidas y procesadas lo más rápidamente posible y divididas en diferentes fragmentos destinados a 1) la extracción directa del ADN, 2) su congelación en ARN-*later*, para disponer de más ADN si fuese necesario en el futuro o realizar estudios de expresión, y 3) el cultivo de parte del tejido para poder aislar el tipo celular diana y de esta forma aumentar la sensibilidad diagnóstica, al enriquecer el porcentaje de mosaicismo.

El siguiente paso agrupa las metodologías disponibles para llevar a cabo el análisis de las alteraciones presentes en mosaicos bajos. La NGS resulta una herramienta muy útil para este proceso, pero es necesario adecuar el número de muestras y tamaño de los paneles de genes para obtener profundidades de lectura muy altas. Gracias a este proyecto se ha desarrollado y testado un panel específico para el estudio de anomalías vasculares denominado MALVA, que incluye 108 genes asociados a patologías vasculares que son revisados y actualizados periódicamente, y que ha sido extrapolado a la rutina clínica del laboratorio de malformaciones vasculares del INGEMM. Actualmente este panel se utiliza para realizar el diagnóstico molecular de más de 160 pacientes al año con un rendimiento diagnóstico superior al 75% cuando se dispone de muestra de tejido afecto. Otra tecnología de última generación que se puede emplear para la detección y/o confirmación de las variantes en mosaico es la PCR digital o ddPCR, muy utilizada en la detección de ADN fetal en sangre materna (95). Esta técnica permite detectar alteraciones específicas o llevar a cabo el *screening* de mutaciones *hotspot* de un determinado gen, y que ha demostrado tener una mayor sensibilidad que la NGS en estudios dirigidos a mutaciones candidatas.

La utilización de este protocolo experimental específico de mosaicismos ha permitido detectar variantes en mosaicos bajos en patologías como el Síndrome Smith-Kingsmore, causado por mutaciones en el gen *mTOR* (108); en la hipercolesterolemia familiar, causada por mutaciones en el gen *LDLR* (133); o en el Síndrome de Malformación Capilar-Arteriovenosa (CM-AVM; MIM#608354), causado por mutaciones en el gen *RASA1* (77).

Otro elemento indispensable en el estudio de los mosaicismos es el algoritmo bioinformático utilizado para analizar la información obtenida mediante NGS. Es necesario adecuar los procesos de detección, anotación y filtrado de las variantes para poder detectar mutaciones en mosaicos muy bajos. Sin este proceso computacional habría sido muy difícil analizar los resultados e identificar las mutaciones patogénicas en CLAPO y GLA. El algoritmo utilizado y desarrollado a partir de este proyecto por el departamento de bioinformática del INGEMM y en especial por la Dra. Kristina Ibáñez recibe el nombre de mOsAiC y su código se encuentra recogido en un repositorio público GitHub (<https://github.com/kibanez/mosaic/>) a la espera de ser publicado próximamente.

El último elemento del protocolo diagnóstico que se debe tener en cuenta es el asesoramiento genético realizado a estos pacientes, en especial con fines reproductivos, ya que estas patologías no han sido heredadas de ningún familiar y la posibilidad de que su descendencia la herede es muy baja, aunque dependerá del tipo de mosaicismo.

A pesar de haber identificado mutaciones en el gen *PIK3CA* en más del 50% de los casos, existen 3 pacientes con CLAPO y 4 pacientes con GLA en los que no hemos detectado mutaciones en este gen. Como ocurre en otras patologías como CLOVES o M-MC, existe un grupo de pacientes en los que el diagnóstico resulta negativo debido a la falta de muestra biológica adecuada para llevar a cabo el estudio, una fracción muy baja de células afectadas, o por la presencia de mutaciones en un gen diferente que aún no ha sido identificado. La presencia de un subgrupo de pacientes negativos en este proyecto no descarta la presencia de mutaciones en el gen *PIK3CA*, y dado que se trata de un proyecto de investigación, el procedimiento a seguir incluirá la obtención de nuevas muestras de tejido para descartar la falta de afectación tisular en el primer caso, el estudio de estos pacientes mediante secuenciación del exoma completo (WES – *Whole Exome Sequencing*), y otras aproximaciones que incluyen estudios de expresión mediante RNA-seq para tratar de identificar cambios en la expresión de genes que nos ayuden a entender el mecanismo patogénico o identificar nuevos genes que puedan estar alterados en estas patologías.

## ***CONCLUSIONES***

## 6. CONCLUSIONES

- 1) La revisión fenotípica de los pacientes con Síndrome CLAPO y GLA ha permitido aumentar el conocimiento acerca de las manifestaciones clínicas propias de cada patología, mejorar el diagnóstico clínico de estos pacientes y, en el caso del Síndrome CLAPO, aportar datos sobre el curso de la enfermedad.
- 2) Se han detectado, por primera vez, variantes patogénicas en forma de mosaicismo somático en el gen *PIK3CA* como causantes de patología en pacientes con CLAPO y GLA. Las mutaciones en *PIK3CA*, descritas previamente en el espectro PROS y en cáncer, provocan un efecto de ganancia de función que aumentan la fosforilación de AKT y activan la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR.
- 3) Se ha descrito por primera vez la variante Phe83Ser en el gen *PIK3CA* en un paciente con malformaciones vasculares complejas, y se confirma su efecto de ganancia de función.
- 4) Dado que tanto el Síndrome CLAPO como las patologías incluidas dentro del espectro PROS comparten características clínicas solapantes, así como la presencia de mutaciones somáticas activantes en el gen *PIK3CA*, CLAPO debería ser clasificado molecularmente bajo el término PROS. Sin embargo, también recomendamos mantener la nomenclatura clínica tradicional reflejada en el acrónimo CLAPO, lo que permitirá llevar a cabo un tratamiento y seguimiento adecuado de los pacientes.
- 5) El aislamiento y caracterización de LECs a partir de tejido afecto, apoyado con los estudios funcionales en el modelo de ratón, han permitido confirmar genética y funcionalmente que las LECs son las células diana en GLA.
- 6) Se ha generado por primera vez un modelo murino que se asemeja al fenotipo GLA. Este modelo, que desarrolla vasos linfáticos en los huesos y malformaciones linfáticas extensas gracias a la expresión dirigida de una forma activa de *PIK3CA* (His1047Arg) en las LECs del animal, ofrece un marco adecuado para el estudio de la etiopatogenia y la identificación de terapias específicas en GLA.
- 7) El descubrimiento de mutaciones en *PIK3CA*, sumado a que la Rapamicina reduce el dolor en pacientes con GLA y a que restaura parcialmente la función linfática en el modelo animal, nos ha permitido proporcionar evidencia preclínica y clínica para apoyar el uso de Rapamicina en estos pacientes.

- 8) El diagnóstico de enfermedades causadas por mosaicismos somáticos, como CLAPO y GLA, requiere del uso de muestras de tejido afecto, así como de tecnología de nueva generación (NGS, PCR digital) y algoritmos bioinformáticos específicos (mOsAiC) que permitan la detección de variantes presentes en mosaicos muy bajos.
- 9) Se ha desarrollado un protocolo experimental para el estudio de pacientes con patologías asociadas a malformaciones vasculares que ya se aplica en la rutina clínica diagnóstica, y que puede ser extrapolado al estudio de otras patologías causadas por mutaciones en forma de mosaicismo somático, tanto en diagnóstico asistencial como en investigación.



# ***BIBLIOGRAFÍA***

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Wassef M, Blei F, Adams D, Alomari A, Baselga E, Berenstein A, et al. Vascular Anomalies Classification: Recommendations From the International Society for the Study of Vascular Anomalies. *Pediatrics*. 2015;136(1):e203-14.
2. Carqueja IM, Sousa J, Mansilha A. Vascular malformations: classification, diagnosis and treatment. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*. 2018;37(2):127-42.
3. Mulliken JB, Glowacki J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. *Plastic and reconstructive surgery*. 1982;69(3):412-22.
4. Steiner JE, Drolet BA. Classification of Vascular Anomalies: An Update. *Seminars in interventional radiology*. 2017;34(3):225-32.
5. Merrow AC, Gupta A, Patel MN, Adams DM. 2014 Revised Classification of Vascular Lesions from the International Society for the Study of Vascular Anomalies: Radiologic-Pathologic Update. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*. 2016;36(5):1494-516.
6. Anomalies ISftSoV. ISSVA classification for vascular anomalies.
7. Pahl KS, Kim K, Sams C, Alvarez H, Smith SV, Blatt J. Inconsistency in classifying vascular anomalies: What's in a name? *Pediatric blood & cancer*. 2018;65(3).
8. Benzar I. A Diagnostic Program of Vascular Tumor and Vascular Malformations in Children According to Modern Classification. *Acta medica (Hradec Kralove)*. 2017;60(1):19-26.
9. Sadick M, Muller-Wille R, Wildgruber M, Wohlgemuth WA. Vascular Anomalies (Part I): Classification and Diagnostics of Vascular Anomalies. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin*. 2018;190(9):825-35.
10. Esposito F, Ferrara D, Di Serafino M, Diplomatico M, Vezzali N, Giugliano AM, et al. Classification and ultrasound findings of vascular anomalies in pediatric age: the essential. *Journal of ultrasound*. 2018.
11. Sierre S, Teplisky D, Lipsich J. Vascular malformations: an update on imaging and management. *Archivos argentinos de pediatria*. 2016;114(2):167-76.
12. Singh AK, Keenaghan M. Sturge-Weber Syndrome. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC.; 2018.
13. Lopez-Gutierrez JC, Lapunzina P. Capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation of the face and neck, asymmetry and partial/generalized overgrowth (CLAPO): report of six cases of a new syndrome/association. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(20):2583-8.
14. Ricci KW. Advances in the Medical Management of Vascular Anomalies. *Seminars in interventional radiology*. 2017;34(3):239-49.
15. Greene AK, Goss JA. Vascular Anomalies: From a Clinicohistologic to a Genetic Framework. *Plastic and reconstructive surgery*. 2018;141(5):709e-17e.
16. Nguyen HL, Boon LM, Vikkula M. Genetics of vascular malformations. *Seminars in pediatric surgery*. 2014;23(4):221-6.
17. Luks VL, Kamitaki N, Vivero MP, Uller W, Rab R, Bovee JV, et al. Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. *The Journal of pediatrics*. 2015;166(4):1048-54.e1-5.
18. Ramashankar, Prabhakar C, Shah NK, Giraddi G. Lymphatic malformations: A dilemma in diagnosis and management. *Contemporary clinical dentistry*. 2014;5(1):119-22.
19. Brouillard P, Boon L, Vikkula M. Genetics of lymphatic anomalies. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(3):898-904.

20. Peranteau WH, Iyob SD, Boelig MM, Khalek N, Moldenhauer JS, Johnson MP, et al. Prenatal growth characteristics of lymphatic malformations. *Journal of pediatric surgery*. 2017;52(1):65-8.
21. Shah GH, Deshpande MD. Lymphatic malformation in adult patient: a rare case. *Journal of maxillofacial and oral surgery*. 2010;9(3):284-8.
22. Abe A, Kurita K, Ito Y. Acquired lymphatic malformations of the buccal mucosa: A case report. *Clinical case reports*. 2018;6(10):1929-32.
23. Miceli A, Stewart KM. *Lymphangioma*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC.; 2018.
24. Gomez-Acevedo H, Dornhoffer JR, Stone A, Dai Y, Richter GT. Gene Expression Differences in Pediatric Lymphatic Malformations: Size Really Matters. *Lymphatic research and biology*. 2018;16(4):347-52.
25. Witte MH. Lymphangioleiomyomatosis and Gorham-Stout disease: Primary or secondary disorders of the lymphatic system? *Lymphology*. 2017;50(3):114-9.
26. Boscolo E, Coma S, Luks VL, Greene AK, Klagsbrun M, Warman ML, et al. AKT hyperphosphorylation associated with PI3K mutations in lymphatic endothelial cells from a patient with lymphatic malformation. *Angiogenesis*. 2015;18(2):151-62.
27. Osborn AJ, Dickie P, Neilson DE, Glaser K, Lynch KA, Gupta A, et al. Activating PIK3CA alleles and lymphangiogenic phenotype of lymphatic endothelial cells isolated from lymphatic malformations. *Human molecular genetics*. 2015;24(4):926-38.
28. Alderfer L, Wei A, Hanjaya-Putra D. *Lymphatic Tissue Engineering and Regeneration*. *Journal of biological engineering*. 2018;12:32.
29. Betterman KL, Harvey NL. The lymphatic vasculature: development and role in shaping immunity. *Immunological reviews*. 2016;271(1):276-92.
30. Lee HW, Yu P, Simons M. Recent advances in understanding lymphangiogenesis and metabolism. *F1000Research*. 2018;7.
31. Breslin JW, Yang Y, Scallan JP, Sweat RS, Adderley SP, Murfee WL. Lymphatic Vessel Network Structure and Physiology. *Comprehensive Physiology*. 2018;9(1):207-99.
32. Sainz-Jaspeado M, Claesson-Welsh L. Cytokines regulating lymphangiogenesis. *Current opinion in immunology*. 2018;53:58-63.
33. Ribatti D. Historical overview of lymphangiogenesis. *Current opinion in immunology*. 2018;53:161-6.
34. Lee SJ, Park C, Lee JY, Kim S, Kwon PJ, Kim W, et al. Generation of pure lymphatic endothelial cells from human pluripotent stem cells and their therapeutic effects on wound repair. *Scientific reports*. 2015;5:11019.
35. Potente M, Makinen T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2017;18(8):477-94.
36. Ma W, Oliver G. *Lymphatic Endothelial Cell Plasticity in Development and Disease*. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2017;32(6):444-52.
37. Escobedo N, Oliver G. Lymphangiogenesis: Origin, Specification, and Cell Fate Determination. *Annual review of cell and developmental biology*. 2016;32:677-91.
38. Ulvmar MH, Makinen T. Heterogeneity in the lymphatic vascular system and its origin. *Cardiovascular research*. 2016;111(4):310-21.
39. Kazenwadel J, Harvey NL. Lymphatic endothelial progenitor cells: origins and roles in lymphangiogenesis. *Current opinion in immunology*. 2018;53:81-7.
40. Srinivasan RS, Dillard ME, Lagutin OV, Lin FJ, Tsai S, Tsai MJ, et al. Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. *Genes & development*. 2007;21(19):2422-32.

41. Yu P, Wu G, Lee HW, Simons M. Endothelial Metabolic Control of Lymphangiogenesis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2018;40(6):e1700245.
42. Semo J, Nicenboim J, Yaniv K. Development of the lymphatic system: new questions and paradigms. *Development (Cambridge, England)*. 2016;143(6):924-35.
43. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *The EMBO journal*. 2002;21(7):1505-13.
44. Adamczyk LA, Gordon K, Kholova I, Meijer-Jorna LB, Telinius N, Gallagher PJ, et al. Lymph vessels: the forgotten second circulation in health and disease. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2016;469(1):3-17.
45. Sweet DT, Jimenez JM, Chang J, Hess PR, Mericko-Ishizuka P, Fu J, et al. Lymph flow regulates collecting lymphatic vessel maturation in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(8):2995-3007.
46. Kramer D, Cossio ML, Whittle C. CLAPO syndrome: case report. *Int J Dermatol*. 2016;55(10):1149-50.
47. Downey C, Lopez-Gutierrez JC, Roe-Crespo E, Puig L, Baselga E. Lower lip capillary malformation associated with lymphatic malformation without overgrowth: Part of the spectrum of CLAPO syndrome. *Pediatr Dermatol*. 2018;35(4):e243-e4.
48. Flores-Terry MA, Zamberk-Majlis P, Cortina-de la Calle MP, Garcia-Arpa M. CLAPO Syndrome. *Actas dermo-sifiliograficas*. 2018;109(2):180.
49. Rodriguez-Laguna L, Ibanez K, Gordo G, Garcia-Minaur S, Santos-Simarro F, Agra N, et al. CLAPO syndrome: identification of somatic activating PIK3CA mutations and delineation of the natural history and phenotype. *Genet Med*. 2018;20(8):882-9.
50. Happle R. Capillary malformations: a classification using specific names for specific skin disorders. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2015;29(12):2295-305.
51. Muller-Wille R, Wildgruber M, Sadick M, Wohlgemuth WA. Vascular Anomalies (Part II): Interventional Therapy of Peripheral Vascular Malformations. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin*. 2018.
52. Dellinger MT, Garg N, Olsen BR. Viewpoints on vessels and vanishing bones in Gorham-Stout disease. *Bone*. 2014;63:47-52.
53. Rossler J, Saueressig U, Kayser G, von Winterfeld M, Klement GL. Personalized Therapy for Generalized Lymphatic Anomaly/Gorham-Stout Disease With a Combination of Sunitinib and Taxol. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2015;37(8):e481-5.
54. Libby LJ, Narula N, Fernandes H, Gruden JF, Wolf DJ, Libby DM. Imatinib Treatment of Lymphangiomatosis (Generalized Lymphatic Anomaly). *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14(4):383-6.
55. Du H, Xiong M, Liao H, Luo Y, Shi H, Xie C. Chylothorax and constrictive pericarditis in a woman due to generalized lymphatic anomaly: a case report. *J Cardiothorac Surg*. 2018;13(1):59.
56. Ludwig KF, Slone T, Cederberg KB, Silva AT, Dellinger M. A New Case and Review of Chylothorax in Generalized Lymphatic Anomaly and Gorham-Stout Disease. *Lymphology*. 2016;49(2):73-84.
57. Lala S, Mulliken JB, Alomari AI, Fishman SJ, Kozakewich HP, Chaudry G. Gorham-Stout disease and generalized lymphatic anomaly--clinical, radiologic, and histologic differentiation. *Skeletal Radiol*. 2013;42(7):917-24.
58. Kato H, Ozeki M, Fukao T, Matsuo M. MR imaging findings of vertebral involvement in Gorham-Stout disease, generalized lymphatic anomaly, and kaposiform lymphangiomatosis. *Jpn J Radiol*. 2017;35(10):606-12.

59. Joshi M, Phansalkar DS. Simple lymphangioma to generalized lymphatic anomaly: role of imaging in disclosure of a rare and morbid disease. *Case Rep Radiol*. 2015;2015:603859.
60. Mori M, Dictor M, Brodzki N, Lopez-Gutierrez JC, Beato M, Erjefalt JS, et al. Pulmonary and pleural lymphatic endothelial cells from pediatric, but not adult, patients with Gorham-Stout disease and generalized lymphatic anomaly, show a high proliferation rate. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11(1):67.
61. Zhang L, Mai HM, Zheng J, Zheng JW, Wang YA, Qin ZP, et al. Propranolol inhibits angiogenesis via down-regulating the expression of vascular endothelial growth factor in hemangioma derived stem cell. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(1):48-55.
62. Wiegand S, Wichmann G, Dietz A. Treatment of Lymphatic Malformations with the mTOR Inhibitor Sirolimus: A Systematic Review. *Lymphatic research and biology*. 2018;16(4):330-9.
63. McCormick A, Rosenberg S, Trier K, Balest A. A Case of a Central Conducting Lymphatic Anomaly Responsive to Sirolimus. *Pediatrics*. 2016;137(1).
64. Dvorakova V, Rea D, O'Regan GM, Irvine AD. Generalized lymphatic anomaly successfully treated with long-term, low-dose sirolimus. *Pediatr Dermatol*. 2018;35(4):533-4.
65. Croteau SE, Kozakewich HP, Perez-Atayde AR, Fishman SJ, Alomari AI, Chaudry G, et al. Kaposiform lymphangiomatosis: a distinct aggressive lymphatic anomaly. *The Journal of pediatrics*. 2014;164(2):383-8.
66. Safi F, Gupta A, Adams D, Anandan V, McCormack FX, Assaly R. Kaposiform lymphangiomatosis, a newly characterized vascular anomaly presenting with hemoptysis in an adult woman. *Annals of the American Thoracic Society*. 2014;11(1):92-5.
67. Kato H, Ozeki M, Fukao T, Matsuo M. Chest imaging in generalized lymphatic anomaly and kaposiform lymphangiomatosis. *Pediatr Int*. 2018;60(7):667-8.
68. Wang Z, Li K, Yao W, Dong K, Xiao X, Zheng S. Successful treatment of kaposiform lymphangiomatosis with sirolimus. *Pediatric blood & cancer*. 2015;62(7):1291-3.
69. Goyal P, Alomari AI, Kozakewich HP, Trenor CC, 3rd, Perez-Atayde AR, Fishman SJ, et al. Imaging features of kaposiform lymphangiomatosis. *Pediatric radiology*. 2016;46(9):1282-90.
70. Ozeki M, Fujino A, Matsuoka K, Nosaka S, Kuroda T, Fukao T. Clinical Features and Prognosis of Generalized Lymphatic Anomaly, Kaposiform Lymphangiomatosis, and Gorham-Stout Disease. *Pediatric blood & cancer*. 2016;63(5):832-8.
71. Nathan N, Keppler-Noreuil KM, Biesecker LG, Moss J, Darling TN. Mosaic Disorders of the PI3K/Pten/Akt/TSC/mTORC1 Signaling Pathway. *Dermatologic clinics*. 2017;35(1):51-60.
72. Youssoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(10):748-58.
73. Lim YH, Moscato Z, Choate KA. Mosaicism in Cutaneous Disorders. *Annual review of genetics*. 2017;51:123-41.
74. Samuels ME, Friedman JM. Genetic mosaics and the germ line lineage. *Genes (Basel)*. 2015;6(2):216-37.
75. Biesecker LG, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nature reviews Genetics*. 2013;14(5):307-20.
76. Campbell IM, Shaw CA, Stankiewicz P, Lupski JR. Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. *Trends in genetics : TIG*. 2015;31(7):382-92.
77. Gordo G, Rodriguez-Laguna L, Agra N, Mendez P, Feito M, Lapunzina P, et al. Constitutional mosaicism in RASA1-related capillary malformation-arteriovenous malformation (CM-AVM). *Clinical genetics*. 2019.
78. Kuentz P, St-Onge J, Duffourd Y, Courcet JB, Carmignac V, Jouan T, et al. Molecular diagnosis of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) in 162 patients and recommendations for genetic testing. *Genet Med*. 2017;19(9):989-97.

79. Happle R. The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: Era of Mosaicism. *The Journal of investigative dermatology*. 2017;137(5):e73-e7.
80. Kouzak SS, Mendes MS, Costa IM. Cutaneous mosaicisms: concepts, patterns and classifications. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2013;88(4):507-17.
81. Molho-Pessach V, Schaffer JV. Blaschko lines and other patterns of cutaneous mosaicism. *Clinics in dermatology*. 2011;29(2):205-25.
82. Risques RA, Kennedy SR. Aging and the rise of somatic cancer-associated mutations in normal tissues. *PLoS genetics*. 2018;14(1):e1007108.
83. Vijg J. Somatic mutations, genome mosaicism, cancer and aging. *Current opinion in genetics & development*. 2014;26:141-9.
84. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science (New York, NY)*. 2004;304(5670):554.
85. Keppler-Noreuil KM, Rios JJ, Parker VE, Semple RK, Lindhurst MJ, Sapp JC, et al. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am J Med Genet A*. 2015;167a(2):287-95.
86. Dou Y, Gold HD, Luquette LJ, Park PJ. Detecting Somatic Mutations in Normal Cells. *Trends in genetics : TIG*. 2018;34(7):545-57.
87. Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome research*. 2005;15(12):1767-76.
88. Hert DG, Fredlake CP, Barron AE. Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis*. 2008;29(23):4618-26.
89. Chang F, Liu L, Fang E, Zhang G, Chen T, Cao K, et al. Molecular Diagnosis of Mosaic Overgrowth Syndromes Using a Custom-Designed Next-Generation Sequencing Panel. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2017;19(4):613-24.
90. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 2012;5(7):887-900.
91. Freed D, Stevens EL, Pevsner J. Somatic mosaicism in the human genome. *Genes (Basel)*. 2014;5(4):1064-94.
92. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2013;137(9):1296-303.
93. King CR, Marsh S. Pyrosequencing of clinically relevant polymorphisms. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2013;1015:97-114.
94. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry*. 2011;83(22):8604-10.
95. Perlado S, Bustamante-Aragones A, Donas M, Lorda-Sanchez I, Plaza J, Rodriguez de Alba M. Fetal Genotyping in Maternal Blood by Digital PCR: Towards NIPD of Monogenic Disorders Independently of Parental Origin. *PLoS one*. 2016;11(4):e0153258.
96. Orhant L, Rondeau S, Vasson A, Anselem O, Goffinet F, Allach El Khattabi L, et al. Droplet digital PCR, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the determination of fetal RHD genotype. *Annales de biologie clinique*. 2016;74(3):269-77.
97. De Santis MC, Sala V, Martini M, Ferrero GB, Hirsch E. PI3K Signaling in Tissue Hyper-Proliferation: From Overgrowth Syndromes to Kidney Cysts. *Cancers*. 2017;9(4).
98. Weigelt B, Downward J. Genomic Determinants of PI3K Pathway Inhibitor Response in Cancer. *Frontiers in oncology*. 2012;2:109.
99. Janku F. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway inhibitors in solid tumors: From laboratory to patients. *Cancer treatment reviews*. 2017;59:93-101.
100. Lux MP, Fasching PA, Schrauder MG, Hein A, Jud SM, Rauh C, et al. The PI3K Pathway: Background and Treatment Approaches. *Breast care (Basel, Switzerland)*. 2016;11(6):398-404.

101. Hassan B, Akcakanat A, Holder AM, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway. *Surgical oncology clinics of North America*. 2013;22(4):641-64.
102. Vahidnezhad H, Youssefian L, Uitto J. Molecular Genetics of the PI3K-AKT-mTOR Pathway in Genodermatoses: Diagnostic Implications and Treatment Opportunities. *The Journal of investigative dermatology*. 2016;136(1):15-23.
103. Horn S, Bergholz U, Jucker M, McCubrey JA, Trumper L, Stocking C, et al. Mutations in the catalytic subunit of class IA PI3K confer leukemogenic potential to hematopoietic cells. *Oncogene*. 2008;27(29):4096-106.
104. Kim JW, Lee HS, Nam KH, Ahn S, Kim JW, Ahn SH, et al. PIK3CA mutations are associated with increased tumor aggressiveness and Akt activation in gastric cancer. *Oncotarget*. 2017;8(53):90948-58.
105. Sharma VR, Gupta GK, Sharma AK, Batra N, Sharma DK, Joshi A, et al. PI3K/Akt/mTOR Intracellular Pathway and Breast Cancer: Factors, Mechanism and Regulation. *Current pharmaceutical design*. 2017;23(11):1633-8.
106. Limaye N, Kangas J, Mendola A, Godfraind C, Schlogel MJ, Helaers R, et al. Somatic Activating PIK3CA Mutations Cause Venous Malformation. *American journal of human genetics*. 2015;97(6):914-21.
107. Biesecker LG, Sapp JC. Proteus Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*(R). Seattle (WA): University of Washington, Seattle University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.
108. Gordo G, Tenorio J, Arias P, Santos-Simarro F, Garcia-Minaur S, Moreno JC, et al. mTOR mutations in Smith-Kingsmore syndrome: Four additional patients and a review. *Clinical genetics*. 2018;93(4):762-75.
109. Venot Q, Canaud G. [PIK3CA-related overgrowth syndrome (PROS)]. *Nephrologie & thérapeutique*. 2017;13 Suppl 1:S155-s6.
110. Chen L, Yang L, Yao L, Kuang XY, Zuo WJ, Li S, et al. Characterization of PIK3CA and PIK3R1 somatic mutations in Chinese breast cancer patients. *Nature communications*. 2018;9(1):1357.
111. Madsen RR, Vanhaesebroeck B, Semple RK. Cancer-Associated PIK3CA Mutations in Overgrowth Disorders. *Trends in molecular medicine*. 2018;24(10):856-70.
112. Baker CL, Vaughn CP, Samowitz WS. A PIK3CA pyrosequencing-based assay that excludes pseudogene interference. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2012;14(1):56-60.
113. Muller CI, Miller CW, Hofmann WK, Gross ME, Walsh CS, Kawamata N, et al. Rare mutations of the PIK3CA gene in malignancies of the hematopoietic system as well as endometrium, ovary, prostate and osteosarcomas, and discovery of a PIK3CA pseudogene. *Leukemia research*. 2007;31(1):27-32.
114. Kepler-Noreuil KM, Sapp JC, Lindhurst MJ, Parker VE, Blumhorst C, Darling T, et al. Clinical delineation and natural history of the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Am J Med Genet A*. 2014;164a(7):1713-33.
115. Loconte DC, Grossi V, Bozzao C, Forte G, Bagnulo R, Stella A, et al. Molecular and Functional Characterization of Three Different Postzygotic Mutations in PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum (PROS) Patients: Effects on PI3K/AKT/mTOR Signaling and Sensitivity to PI3K Inhibitors. *PloS one*. 2015;10(4):e0123092.
116. Robinson PN, Kohler S, Bauer S, Seelow D, Horn D, Mundlos S. The Human Phenotype Ontology: a tool for annotating and analyzing human hereditary disease. *American journal of human genetics*. 2008;83(5):610-5.

117. Mirzaa G, Conway R, Graham JM, Jr., Dobyns WB. PIK3CA-Related Segmental Overgrowth. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. GeneReviews((R)). Seattle (WA): University of Washington, Seattle University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.
118. Mirzaa G, Timms AE, Conti V, Boyle EA, Girisha KM, Martin B, et al. PIK3CA-associated developmental disorders exhibit distinct classes of mutations with variable expression and tissue distribution. *JCI insight*. 2016;1(9).
119. Rios JJ, Paria N, Burns DK, Israel BA, Cornelia R, Wise CA, et al. Somatic gain-of-function mutations in PIK3CA in patients with macrodactyly. *Human molecular genetics*. 2013;22(3):444-51.
120. Chang PY, Chen JS, Chang NC, Chang SC, Wang MC, Tsai SH, et al. NRAS germline variant G138R and multiple rare somatic mutations on APC in colorectal cancer patients in Taiwan by next generation sequencing. *Oncotarget*. 2016;7(25):37566-80.
121. Wu Y, Yu RJ, Lin XX, Guo WY. [Sturge-Weber syndrome in port-wine stain patients: a retrospective study on the clinical features and screening strategy]. [*Zhonghua yan ke za zhi*] Chinese journal of ophthalmology. 2017;53(10):753-7.
122. Shirley MD, Tang H, Gallione CJ, Baugher JD, Frelin LP, Cohen B, et al. Sturge-Weber syndrome and port-wine stains caused by somatic mutation in GNAQ. *The New England journal of medicine*. 2013;368(21):1971-9.
123. Vahidnezhad H, Youssefian L, Uitto J. Klippel-Trenaunay syndrome belongs to the PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Experimental dermatology*. 2016;25(1):17-9.
124. Martinez-Glez V, Romanelli V, Mori MA, Gracia R, Segovia M, Gonzalez-Meneses A, et al. Macrocephaly-capillary malformation: Analysis of 13 patients and review of the diagnostic criteria. *Am J Med Genet A*. 2010;152a(12):3101-6.
125. Arosarena OA. Cleft lip and palate. *Otolaryngologic clinics of North America*. 2007;40(1):27-60, vi.
126. Bloom J, Upton J, 3rd. CLOVES syndrome. *The Journal of hand surgery*. 2013;38(12):2508-12.
127. Ranieri C, Di Tommaso S, Loconte DC, Grossi V, Sanese P, Bagnulo R, et al. In vitro efficacy of ARQ 092, an allosteric AKT inhibitor, on primary fibroblast cells derived from patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Neurogenetics*. 2018;19(2):77-91.
128. Peterman CM, Vadeboncoeur S, Mulliken JB, Fishman SJ, Liang MG. Wilms tumor screening in diffuse capillary malformation with overgrowth and macrocephaly-capillary malformation: A retrospective study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2017;77(5):874-8.
129. Wang W, Wang H, Zhou X, Li X, Sun W, Dellinger M, et al. Lymphatic Endothelial Cells Produce M-CSF, Causing Massive Bone Loss in Mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2017;32(5):939-50.
130. Trenor CC, 3rd, Chaudry G. Complex lymphatic anomalies. *Seminars in pediatric surgery*. 2014;23(4):186-90.
131. Manevitz-Mendelson E, Leichner GS, Barel O, Davidi-Avrahami I, Ziv-Strasser L, Eyal E, et al. Somatic NRAS mutation in patient with generalized lymphatic anomaly. *Angiogenesis*. 2018;21(2):287-98.
132. Barclay SF, Inman KW, Luks VL, McIntyre JB, Al-Ibraheemi A, Church AJ, et al. A somatic activating NRAS variant associated with kaposiform lymphangiomatosis. *Genet Med*. 2018.
133. Rodriguez Novoa S, Alonso C, Rodriguez Jimenez C, Rodriguez-Laguna L, Gordo G, Martinez-Glez V, et al. Familial hypercholesterolemia: a single-nucleotide variant (SNV) in mosaic at the Low density lipoprotein receptor (LDLR). *BioRxiv*. 2018:266874.



134. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, 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.

***ANEXOS***

## ANEXO I. Genes incluidos en los paneles de NGS

### Genes incluidos en el panel OGLYVAS

A4GALT	CDHR3	FGFR2	KDR	NT5E	RPL11	TRAF3
ACAN	CDKN1B	FGFR3	KIF11	OTUD5	RPS6KB1	TRAF6
ACE	CDKN1C	FIGF	KIF7	PCDH12	RPTOR	TRIM25
ACR	CDY1	FLT1	KLF1	PCNA	RTBDN	TRIOBP
ACVRL1	COG5	FLT4	KMT2E	PDCD10	SALL3	TRMT1
ADAM17	COG5;HBP1	FLVCR2	KRAS	PDGFB	SARS2	TRMU
ADAMTS17	COL4A1	FOXC2	KRIT1	PDGFRB	SCO2	TSC1
ADNP2	CPQ	FOXF1	LGALS2	PGF	SCO2;TYMP	TSC2
ADSL	CREBBP	GAA	LHFPL3	PHF6	SERPINA3	TSHZ1
AGGF1	CST3	GADD45GIP1	LINC00237	PIAS1	SERPING1	TXNL4A
AGTR1	CTDP1	GALR1	LIPC	PIAS2	SETD2	TYMP
AGTR2	CUL4B	GATA2	LOC100130522	PIAS3	SHANK3	UBC
AGTRAP	CY5R3	GCDH	LOC100216545	PIAS4	SHOX	UBE2D1
AKT1	CYP2D6	GCDH;SYCE2	LPL	PIK3CA	SKI	UBE2D2
AKT2	DAK	GDF2	LYL1	PIK3CG	SLC2A10	UBE2D3
AKT3	DAND5	GHR	MAST1	PIK3R1	SMAD2	UBE2D4
ALG12	DDX58	GJA1	MAVS	PIK3R2	SMAD3	UBE2E2
ALK	DHX58	GJC2	MBP	PIK3R3	SMAD4	UBE2K
ANGPT1	DICER1	GLMN	MDM2	PLA2G6	SMAD9	UBE2L3
ANGPT2	DIS3L2	GNAQ	MEF2A	PLAGL1	SMARCA4	UBE2L6
ANTXR1	DNASE2	GNB3	MESP2	POLG	SMARCB1	UBE2N
APOA2	DNMT3A	GPC3	MIR17HG	PPARA	SOX10	UBE2U
APOB	DOCK6	GPC4	MKL1	PQLC1	SOX18	UBE2V1
APOC2	ECM1	GPC5	MLC1	PRKAR2B	SRD5A2	UBE2W
APOE	EFEMP2	GRB10	MTOR	PRPH2	SRPK2	UPK3A
ARHGAP31	EGFL7	H19	MYLK	PTCH1	SRY	VCAM1
ARHGEF9	EGFR	HBP1	NAGA	PTEN	STAM	VEGFA
ARSA	EIF4EBP1	HEPACAM	NAMPT	PTGIS	STAMBIP	VEGFB
ARX	ENG	HRAS	NF1	PTPN11	STK11	VEGF-C
ATM	ENPP1	IFIH1	NFATC1	PTPN14	SUPT4H1	VHL
ATP9B	EP300	IGF1	NFIA	PUS7	SUPT5H	VIMP
ATXN10	EPHA3	IGF1R	NFIX	RAC2	SYCE2	VPS33B
ATXN7L1	EZH2	IGF2R	NLRP2	RAD23A	SYPL1	WHSC1
BLM	F12	IGFBP7	NLRX1	RALGDS	TEK	WHSC1L1
BMPR2	FANCI	IKBKG	NOTCH3	RASA1	TGFB2	XDH
BRAF	FANCI;POLG	IL8	NPPB	RBFA	TGFB3	ZADH2
BRWD3	FARSA	IRF3	NPPC	RHEB	TGFBR1	ZBTB20
CALR	FBLN1	IRS1	NPR2	RICTOR	TGFBR2	ZFP57
CBS	FBLN5	ITPKC	NPR3	RINT1	TMEM173	ZFY
CCBE1	FBN1	KCNG2	NR3C2	RLBP1	TNFSF15	ZNF214
CCDC71L	FBN2	KCNK3	NRP1	RNF125	TOP3B	ZNF236

CCM2	FGF13	KCNQ1	NRP2	RNF135	TP53	ZNF407
CDH5	FGFR1	KCNQ1;LIT1	NSD1	RNF138	TRADD	ZNF516

### Genes incluidos en el panel LMI

AAK1	APC	C19orf55	CDC37	COL27A1	CXXC4	EFNA2
ABCA13	APOBEC3H	C21orf58	CDC42	COL2A1	CYBA	EFNA3
ABCA2	APOL4	C5AR1	CDC42BPB	COL4A1	CYBB	EFNA4
ABCB9	ARF6	C8orf44-SGK3	CDCP2	COL4A2	CYLD	EFNA5
ABCC4	ARSD	C8orf59	CDH5	COL4A3	CYP4F8	EGF
ABCC9	ARTN	CABIN1	CDK11B	COL4A4	DAG1	EGFL7
ABCF1	ASCC3	CACNA1A	CDK2	COL4A5	DARS	EGFR
ABL1	ASIC3	CACNA1B	CDK4	COL4A6	DCAF7	EIF2AK1
ABL2	ASMTL	CACNA1E	CDK6	COL5A1	DCDC5	EIF4B
ABO	ATF2	CACYBP	CDKN1A	COL5A2	DDHD1	EIF4E
ACAN	ATF4	CADM1	CDKN1B	COL5A3	DDIT4	EIF4E1B
ACE	ATF6B	CALCR	CDKN2AIP	COL6A1	DDX60L	EIF4E2
ACIN1	ATG9B	CALM1	CELA1	COL6A2	DEFB126	EIF4EBP1
ACP5	ATM	CALM2	CELSR1	COL6A3	DENND4B	EIF4G2
ACTN3	ATP2B2	CALM3	CELSR2	COL6A5	DGKB	ELK1
ACTRT2	ATP6V0A4	CALML3	CENPP	COL6A6	DGKD	ENAH
ACVRL1	ATP7B	CALML5	CEP135	COL7A1	DGKK	ENKUR
ADAM17	ATXN1	CALML6	CEP170B	COL9A1	DHX37	EP300
ADAM19	AXIN1	CALR	CEP290	COL9A2	DIAPH1	EPB41L4A
ADAM8	AXIN2	CAMK4	CEP89	COMP	DICER1	EPG5
ADARB1	B3GNT6	CAPN8	CER1	CPS1	DIXDC1	EPHA2
ADM	B9D1	CARD14	CFTR	CPZ	DKC1	EPO
ADRA2B	BAD	CASP7	CHAD	CR2	DKK3	EPOR
AK5	BAGE3	CASP9	CHD2	CREB1	DMD	ERBB4
AKAP12	BAMBI	CBL	CHD3	CREB3	DMXL1	ERI1
AKAP13	BCL2	CBLB	CHD6	CREB3L1	DNAAF1	ESCO1
AKAP9	BCL2L1	CCBE1	CHD7	CREB3L2	DNAH7	ETS1
AKNAD1	BCL2L11	CCDC129	CHD8	CREB3L3	DNAI1	ETS2
AKT1	BCL6B	CCDC168	CHI3L2	CREB3L4	DNHD1	EVC
AKT2	BCL9	CCDC179	CHRM1	CREB5	DNMT1	EXOC2
AKT3	BCL9L	CCDC180	CHRM2	CREBBP	DOCK4	F2R
ALDH3B1	BCLAF1	CCDC33	CHRM3	CRTC2	DOCK6	FAM109A
ALG9	BIRC6	CCDC38	CHUK	CSF1	DOCK9	FAM118B
ALLC	BLNK	CCDC57	CLTCL1	CSF1R	DOPEY2	FAM120A
ALMS1	BMP2K	CCDC66	CNDP1	CSF3	DPF3	FAM171B
ALOX15	BMPR2	CCDC88C	CNGB3	CSF3R	DROSHA	FAM174B
ALOX5AP	BRAP	CCND1	CNPY1	CSH1	DSP	FAM184A
ANGPT1	BRCA1	CCND2	CNTN5	CSH2	DSPP	FAM228B
ANGPT2	BRD8	CCND3	CNTNAP4	CSMD1	DST	FANCA
ANGPT4	BRWD3	CCNE1	COL11A1	CSNK2A3	DTX3	FANCF
ANK2	BTK	CCNE2	COL11A2	CSNK2B	DVL1	FASLG
ANKRD36	BTRC	CD109	COL12A1	CSPG4	DYNC2H1	FAT4

ANP32E	C11orf40	CD177	col18a1	CTNNB1	DYSF	FBLN5
AOAH	C14orf169	CD19	COL1A1	CTNNBIP1	EBLN1	FBN1
AOX1	C14orf180	CD226	COL1A2	CTNND2	EEA1	FBN2
AP3B1	C14orf80	CD24	COL24A1	CTSK	EEF2K	FBN3
AP5B1	C18orf25	CD48	COL26A1	CWC15	EFNA1	FBXL20
FBXL21	FN1	GNG10	HLA-DQB1	IKBKG	ITGAV	KRTAP19-6
FBXO18	FOS	GNG11	HLA-DQB2	IL17RB	ITGB1	KRTAP4-8
FCGBP	FOSB	GNG12	HLA-DRB1	IL1A	ITGB3	KRTAP7-1
FCGR1A	FOSL1	GNG13	HNRNPCL2	IL1B	ITGB4	KSR1
FCGR2A	FOSL2	GNG2	HOMEZ	IL1R1	ITGB5	KSR2
FCGR2B	FOXC2	GNG3	HRAS	IL2	ITGB6	L1CAM
FCGR2C	FOXD1	GNG4	HRC	IL20RB	ITGB7	LAMA1
FCGR3A	FOXO3	GNG5	HRNR	IL2RA	ITGB8	LAMA2
FCGR3B	FOXO4	GNG7	HSH2D	IL2RB	ITIH5	LAMA3
FGD1	FOXP2	GNG8	HSP90AA1	IL2RG	ITK	LAMA4
FGD5	FRAS1	GNGT1	HSP90AB1	IL3	ITPR2	LAMA5
FGF1	FRAT1	GNGT2	HSP90B1	IL3RA	ITPR3	LAMB1
FGF10	FRAT2	GON4L	HSPBP1	IL4	JAG1	LAMB2
FGF11	FRG1	GPATCH4	HSPG2	IL4R	JAK1	LAMB3
FGF12	FRG2B	GPC4	HSPH1	IL6	JAK2	LAMB4
FGF13	FRG2C	GPC5	HTR7	IL6R	JAK3	LAMC1
					JMJD7-	
FGF14	FRY	GPHB5	HTT	IL7	PLA2G4B	LAMC2
FGF16	FSIP2	GPR179	HUWE1	IL7R	JRK	LAMC3
FGF17	FYN	GPR56	IBSP	IL8	JUN	LAT
FGF18	FZD1	GPR98	IBTK	INPP5D	JUNB	LCE4A
FGF19	FZD2	GPRC6A	IFI27	INS	JUND	LCK
FGF2	FZD3	GPRIN2	IFNA1	INSR	KCNH1	LCP2
FGF20	FZD4	GPSM2	IFNA10	INSRR	KCNH2	LEF1
FGF21	FZD5	GRB10	IFNA13	INTS7	KCNJ12	LENG9
FGF22	FZD6	GRB2	IFNA14	INVS	KCNJ18	LEPREL2
FGF23	FZD9	GRIN1	IFNA16	IQGAP1	KCNK17	LETM1
FGF3	G6PC	GRIN2A	IFNA17	IQGAP3	KCNMB3	LHCGR
FGF4	G6PC2	GRIN2B	IFNA2	IQSEC1	KCNN2	LILRA1
FGF5	G6PC3	GRIN3B	IFNA21	IRF3	KCNN3	LILRA2
FGF6	GAB1	GRIP2	IFNA4	IRF5	KCNT1	LILRA3
FGF7	GAB2	GSAP	IFNA5	IRF7	KCP	LILRA4
FGF8	GABRR3	GSE1	IFNA6	IRF9	KCTD20	LILRA5
FGF9	GADD45GIP1	GSK3B	IFNA7	IRS1	KDM5C	LILRA6
FGFR1	GAS2L1	GSN	IFNA8	IST1	KDR	LILRB1
FGFR2	GATA2	GTF2IRD2	IFNAR1	ITGA1	KIAA1161	LILRB2
FGFR3	GCNT7	GYS1	IFNAR2	ITGA10	KIAA1211	LILRB3
FGFR4	GH1	GYS2	IFNB1	ITGA11	KIAA1430	LILRB4
FHL2	GH2	HACE1	IFNG	ITGA2	KIAA2018	LILRB5
FIG4	GHR	HAS1	IFNGR1	ITGA2B	KIF11	LIMD1
FIGF	GJC2	HAVCR1	IFNGR2	ITGA3	KIT	LINC00452
FIGNL2	GLI3	HDAC5	IGF1	ITGA4	KITLG	LNP1
FLG	GLMN	HDLBP	IGF1R	ITGA5	KIZ	LOR

FLNB	GNB1	HEATR1	IGF2R	ITGA6	KMT2C	LPAR1
FLT1	GNB2	HERC2	IGFN1	ITGA7	KMT2D	LPAR2
FLT4	GNB3	HGF	IGSF3	ITGA8	KRAS	LPAR3
FMN2	GNB4	HLA-A	IGSF9	ITGA9	KRT24	LPAR4
FMO2	GNB5	HLA-DQA2	IKBKB	ITGAM	KRT4	LPAR5
LPAR6	MED12	MYO9B	NOX3	OXCT2	PIEZO2	PLEC
LPIN2	MED13	MYPN	NPC1	PA2G4	PIGO	PLIN4
LRCOL1	MEF2A	NADK	NPEPPS	PABPC3	PIK3AP1	PLK5
LRP1	MEGF9	NANOG	NPHS1	PABPC4L	PIK3C2G	PLOD1
LRP1B	MET	NAP1L1	NR1H2	PADI6	PIK3CA	PNLIPRP2
LRP5	MGST2	NAT8B	NR2E3	PAK1	PIK3CB	PNPLA6
LRP8	MICA	NBAS	NR4A1	PAK2	PIK3CD	POC1B
LRRC49	MITF	NBEAL2	NRAP	PAK3	PIK3CG	POLDIP2
LTBP1	MLLT1	NBPF10	NRAS	PAK4	PIK3R1	POLI
LTBP2	MLLT4	NBPF11	NRIP1	PAK6	PIK3R2	POP1
LTBP3	MLST8	NBPF14	NRP1	PAK7	PIK3R3	PORCN
LTBP4	MMP12	NBPF4	NRP2	PARG	PIK3R5	POTEB
LTF	MMP28	NCAM1	NRXN1	PARP1	PIK3R6	POTEI
LTN1	MMP7	NCF1	NUMBL	PASK	PKD1L2	POU4F2
LURAP1L	MMP8	NCF2	NUTM2F	PCDH12	PKD1L3	PPARD
LYL1	MPDZ	NCF4	OBSCN	PCDP1	PKD2L2	PPARG
LYST	MPRIIP	NCOA3	OPLAH	PCED1A	PKHD1	PPIP5K2
MAGEE2	MRAS	NCOR2	OR11G2	PCGF2	PKN1	PPM1E
MAGEF1	MROH5	NDRG2	OR1D5	PCK1	PKN2	PPP1R9B
MAGI1	MROH8	NDUFAF7	OR2B11	PCK2	PKN3	PPP2CA
MAL2	MS4A14	NEFL	OR2T2	PCSK6	PLA1A	PPP2CB
MAMDC4	MSH6	NEK2	OR2T27	PDE11A	PLA2G10	PPP2R1A
MAML3	MST1L	NEMF	OR2T29	PDE4DIP	PLA2G12A	PPP2R1B
MAN2C1	MTCH2	NEUROD1	OR2T35	PDGFA	PLA2G12B	PPP2R2A
MAP2K1	MTCP1	NF1	OR2T4	PDGFB	PLA2G16	PPP2R2B
MAP2K2	MTOR	NFATC1	OR2T5	PDGFC	PLA2G1B	PPP2R2C
MAP2K3	MTUS1	NFATC2	OR4C3	PDGFD	PLA2G2A	PPP2R2D
MAP2K6	MUC12	NFATC2	OR4C45	PDGFRA	PLA2G2C	PPP2R3A
MAP2K7	MUC13	NFATC3	OR4X1	PDGFRB	PLA2G2D	PPP2R3B
MAP3K1	MUC16	NFATC4	OR51F1	PDHA1	PLA2G2E	PPP2R3C
MAP3K14	MUC19	NFKB1	OR51V1	PDLIM5	PLA2G2F	PPP2R5A
MAP3K4	MUC2	NFKB2	OR52A1	PDPK1	PLA2G3	PPP2R5B
MAP3K6	MUC22	NFKBIA	OR5K3	PDPN	PLA2G4A	PPP2R5C
MAP3K7	MUC3A	NGF	OR5P2	PDZRN3	PLA2G4B	PPP2R5D
MAPK1	MUC4	NGFR	OR6C1	PEBP4	PLA2G4C	PPP2R5E
MAPK10	MUC5B	NINL	OR7C2	PGF	PLA2G4D	PPP3CB
MAPK11	MUC6	NLK	OR8G2	PHF8	PLA2G4E	PPP3CC
MAPK12	MYB	NLRC3	OR8G5	PHIP	PLA2G4F	PPP3R2
MAPK13	MYC	NLRP3	OR9G1	PHLDA1	PLA2G5	PRAMEF11
MAPK14	MYH13	NOP16	OR9G9	PHLPP1	PLA2G6	PRAMEF13
MAPK3	MYH14	NOP9	ORAI1	PHLPP2	PLCD3	PRAMEF3
MAPK8	MYH15	NOS3	OSCAR	PIAS1	PLCE1	PRDM2
MAPK8	MYH3	NOTCH1	OSM	PIAS1	PLCG1	PRIM2

MAPK8IP2	MYH6	NOTCH2	OSMR	PIAS2	PLCG2	PRKAA1
MAPK9	MYH9	NOTCH3	OTOP1	PIAS3	PLCL2	PRKAA2
MCL1	MYO18B	NOTCH4	OTUD4	PIAS4	PLD1	PRKACA
MDM2	MYO1F	NOX1	OXA1L	PIEZO1	PLD2	PRKACB
PRKACG	RAPGEF5	RTTN	SLC22A20	STAT1	TFAP2B	TRIOBP
PRKCA	RASA1	RUNX1	SLC25A10	STAT2	TG	TRIP11
PRKCB	RASA2	RUNX2	SLC25A39	STAT3	TGFB1	TRIP12
PRKCG	RASA3	RUVBL1	SLC28A1	STAT4	TGFB2	TRPC4
PRKCSH	RASA4	RXRA	SLC35E2	STAT5A	TGFB3	TRPM6
PRKDC	RASA4B	RYR3	SLC37A4	STAT5B	TGFBR1	TRPV4
PRL	RASAL1	SAAL1	SLC38A10	STAT6	TGFBR2	TRPV5
PRLR	RASAL2	SALL3	SLC3A1	STK11	TGM2	TSC1
PRMT8	RASAL3	SARM1	SLC46A1	STK4	THBS1	TSC2
PROX-1	RASGRF1	SCAMP1	SLC7A11	SULT2B1	THBS2	TSGA10IP
PRSS3	RASGRF2	SCRIB	SLCO2A1	SUOX	THBS3	TSPAN10
PRSS56	RASGRP1	SCRN3	SLIT3	SV2B	THBS4	TSPAN5
PRUNE2	RASGRP2	SCUBE2	SMAD4	SVIL	THEM4	TSPAN8
PSEN1	RASGRP3	SEC22B	SMAD5	SWT1	TIAM1	TTC13
PSG7	RASGRP4	SEC63	SMAD9	SYK	TIE1	TTN
PSORS1C1	RASSF1	SEMA3B	SMG1	SYNE1	TIGD6	TUBD1
PTCHD3	RASSF5	SEN2	SMPD1	SYNE2	TIMM23	TYK2
PTEN	RBL2	SEPW1	SNAPC4	SYNGAP1	TLR10	TYMP
PTK2	RBM23	SERINC2	SOCS1	SYNGR1	TLR2	TYROBP
PTK7	RBX1	SERPINF1	SOCS3	SYNM	TLR4	TYW1B
PTPN11	REC8	SETD2	SON	SYNPO2	TMCO3	UBXN11
PTPN14	RECQL4	SFRP1	SOS1	SYT15	TMEM120A	UBXN8
PTPN2	REL	SFRP2	SOS2	SYTL3	TMEM184A	UHRF1
PTPN6	RELA	SFRP4	SOST	TAAR9	TMEM185B	UNC80
PTPRC	RELB	SFRP5	SOX10	TAB1	TMEM2	UNC93B1
PTPRD	RELN	SGK1	SOX17	TAB2	TMEM216	URI1
PTPRG	RET	SGK2	SOX18	TAPT1	TMEM218	USP20
PTPRQ	RFWD2	SGK3	SPAG17	TARP	TMEM37	USP6
PYGL	RGL1	SH3BGR	SPATA13	TASP1	TMIE	UTP6
			SPATA31D			
RAB5A	RGL2	SH3BP2	4	TBC1D23	TNC	VANGL1
RAB5B	RHEB	SH3PXD2B	SPC25	TBC1D26	TNF	VCAM1
RAB5C	RHOA	SHANK2	SPI1	TBK1	TNFRSF11A	VCAN
RAC1	RIBC2	SHANK3	SPON1	TBL1X	TNFRSF11B	VEGFA
RAC2	RICTOR	SHC1	SPP1	TBP	TNFRSF1A	VEGFB
RAC3	RIN1	SHC2	SPPL2B	TCEAL6	TNFSF11	VEGF-C
RAD17	RIN3	SHC3	SPTA1	TCF7	TNN	VLDLR
RAF1	RNF213	SHC4	SPTBN1	TCF7L1	TNR	VN1R5
RAI1	ROBO3	SHOC2	SPTBN2	TCF7L2	TNXB	VPS11
RALA	ROCK2	SIAH1	SPTBN5	TCL1A	TP53	VPS13B
RALB	RPS6	SIGLEC12	SQSTM1	TCL1B	TPTE	VPS13D
RALBP1	RPS6KB1	SIRPA	SRA1	TCOF1	TRAF2	VTN
RALGDS	RPS6KB2	SIRPB1	SRD5A2	TCP11X2	TRAF6	VWF
RAMP2	RPTOR	SIRPG	SRSF8	TDRP	TRAPPC9	WASF2

<i>RAMP3</i>	<i>RRAS</i>	<i>SKA3</i>	<i>SSC5D</i>	<i>TEC</i>	<i>TREH</i>	<i>WDFY3</i>
<i>RANBP2</i>	<i>RRAS2</i>	<i>SKIDA1</i>	<i>SSH1</i>	<i>TEK</i>	<i>TREM2</i>	<i>WDPCP</i>
<i>RAP1A</i>	<i>RTKN2</i>	<i>SKP1</i>	<i>SSPO</i>	<i>TENM4</i>	<i>TRIL</i>	<i>WDR19</i>
<i>RAP1B</i>	<i>RTL1</i>	<i>SLC16A2</i>	<i>STAMBP</i>	<i>TEX13A</i>	<i>TRIM64C</i>	<i>WDR62</i>
<i>WDR66</i>	<i>WNT3</i>	<i>YWHAQ</i>	<i>ZBTB40</i>	<i>ZFPM1</i>	<i>ZNF516</i>	<i>ZNF778</i>
<i>WHSC1</i>	<i>WNT4</i>	<i>YWHAH</i>	<i>ZC3H3</i>	<i>ZNF2</i>	<i>ZNF518A</i>	<i>ZNF81</i>
<i>WIF1</i>	<i>WNT6</i>	<i>YWHAQ</i>	<i>ZCCHC3</i>	<i>ZNF274</i>	<i>ZNF579</i>	<i>ZNF853</i>
<i>WNK1</i>	<i>WRN</i>	<i>YWHAZ</i>	<i>ZCCHC6</i>	<i>ZNF286B</i>	<i>ZNF595</i>	<i>ZNF880</i>
<i>WNT1</i>	<i>WWC1</i>	<i>ZAN</i>	<i>ZFAT</i>	<i>ZNF350</i>	<i>ZNF714</i>	<i>ZSCAN26</i>
<i>WNT11</i>	<i>XKR5</i>	<i>ZAP70</i>	<i>ZFC3H1</i>	<i>ZNF384</i>	<i>ZNF720</i>	
<i>WNT16</i>	<i>YWHAB</i>	<i>ZBTB11</i>	<i>ZFH3</i>	<i>ZNF480</i>	<i>ZNF735</i>	
<i>WNT2</i>	<i>YWHAH</i>	<i>ZBTB14</i>	<i>ZFP64</i>	<i>ZNF503</i>	<i>ZNF761</i>	

### Genes incluidos en el panel MALVA

<i>ACVRL1</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>FGFR3</i>	<i>IL6R</i>	<i>NR3C2</i>	<i>RAF1</i>	<i>STRADA</i>
<i>AGGF1</i>	<i>CDKN1C</i>	<i>FIGF</i>	<i>KAT2B</i>	<i>NRAS</i>	<i>RALGDS</i>	<i>TBC1D7</i>
<i>AKT1</i>	<i>COL3A1</i>	<i>FKBP1A</i>	<i>KDR</i>	<i>NRP1</i>	<i>RAP1A</i>	<i>TCF7L1</i>
<i>AKT1S1</i>	<i>CREB3L1</i>	<i>FLT1</i>	<i>KIF11</i>	<i>NRP2</i>	<i>RASA1</i>	<i>TEK</i>
<i>AKT2</i>	<i>CREBBP</i>	<i>FLT4</i>	<i>KRAS</i>	<i>PCDH12</i>	<i>RASA2</i>	<i>TIE1</i>
<i>AKT3</i>	<i>DICER1</i>	<i>FOXC2</i>	<i>KRIT1</i>	<i>PDCD10</i>	<i>RASA3</i>	<i>TNFSF15</i>
<i>ANGPT1</i>	<i>EGFL7</i>	<i>FOXO1</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>PIEZO1</i>	<i>RASA4</i>	<i>TP53</i>
<i>ANGPT2</i>	<i>EGFR</i>	<i>GAB1</i>	<i>MAP3K3</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>RHEB</i>	<i>TSC1</i>
<i>ANGPTL3</i>	<i>EIF2C2</i>	<i>GATA2</i>	<i>MAPKAP1</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>RICTOR</i>	<i>TSC2</i>
<i>ATM</i>	<i>EIF4E</i>	<i>GDF2</i>	<i>MDM2</i>	<i>PIK3R2</i>	<i>RPS6KB1</i>	<i>VEGFA</i>
<i>BMP2</i>	<i>EIF4EBP1</i>	<i>GJC2</i>	<i>MLST8</i>	<i>PIK3R3</i>	<i>RPTOR</i>	<i>VEGFB</i>
<i>CBL</i>	<i>EIF4G1</i>	<i>GLMN</i>	<i>MPK14</i>	<i>PIK3R5</i>	<i>RUNX1</i>	<i>VEGF-C</i>
<i>CCBE1</i>	<i>ENG</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MTOR</i>	<i>PIK3R6</i>	<i>RUNX2</i>	
<i>CCM2</i>	<i>EP300</i>	<i>HIF1A</i>	<i>NF1</i>	<i>PTEN</i>	<i>SMAD4</i>	
<i>CCND2</i>	<i>EPHA3</i>	<i>HRAS</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>SOX18</i>	
<i>CDH5</i>	<i>ERBB2</i>	<i>IL6</i>	<i>NPR3</i>	<i>PTPN14</i>	<i>STAMBP</i>	

### Genes incluidos en el panel Mosaico

<i>AKT1</i>	<i>CCND2</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MAP3K3</i>	<i>NRAS</i>	<i>PTEN</i>	<i>TSC1</i>
<i>AKT2</i>	<i>DICER1</i>	<i>HRAS</i>	<i>MTOR</i>	<i>PIK3CA*</i>	<i>PTPN11</i>	<i>TSC2</i>
<i>AKT3</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KRAS</i>	<i>NF1</i>	<i>PIK3R2</i>	<i>RASA1</i>	

\*Región exónica e intrónica

### Genes incluidos en el panel Ampliseq

<i>AKT1</i>	<i>CCND2</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MAP3K3</i>	<i>NRAS</i>	<i>PTEN</i>	<i>TSC1</i>
<i>AKT2</i>	<i>DICER1</i>	<i>HRAS</i>	<i>MTOR</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PTPN11</i>	<i>TSC2</i>
<i>AKT3</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KRAS</i>	<i>NF1</i>	<i>PIK3R2</i>	<i>RASA1</i>	



## ANEXO II. Criterios para la clasificación de las variantes según la ACMG

Imágenes obtenidas del artículo de Richards S, et al. sobre estándares y pautas para la interpretación de variantes obtenidas por secuenciación (134).

	Benign		Pathogenic			
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very strong
<b>Population data</b>	MAF is too high for disorder BA1/BS1 OR observation in controls inconsistent with disease penetrance BS2			Absent in population databases PM2	Prevalence in affecteds statistically increased over controls PS4	
<b>Computational and predictive data</b>		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product BP4 Missense in gene where only truncating cause disease BP1 Silent variant with non predicted splice impact BP7 In-frame indels in repeat w/out known function BP3	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product PP3	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before PMS Protein length changing variant PM4	Same amino acid change as an established pathogenic variant PS1	Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease PVS1
<b>Functional data</b>	Well-established functional studies show no deleterious effect BS3		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common PP2	Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation PM1	Well-established functional studies show a deleterious effect PS3	
<b>Segregation data</b>	Nonsegregation with disease BS4		Cosegregation with disease in multiple affected family members PP1	Increased segregation data →		
<b>De novo data</b>				De novo (without paternity & maternity confirmed) PM6	De novo (paternity and maternity confirmed) PS2	
<b>Allelic data</b>		Observed in trans with a dominant variant BP2 Observed in cis with a pathogenic variant BP2		For recessive disorders, detected in trans with a pathogenic variant PM3		
<b>Other database</b>		Reputable source w/out shared data = benign BP6	Reputable source = pathogenic PP5			
<b>Other data</b>		Found in case with an alternate cause BP5	Patient's phenotype or FH highly specific for gene PP4			

### Criteria for Classifying Pathogenic Variants

#### Very strong evidence of pathogenicity

**PVS1** Null variant (nonsense, frameshift, canonical +/-1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multi-exon deletion) in a gene where loss of function (LOF) is a known mechanism of disease

Caveats:

- Beware of genes where LOF is not a known disease mechanism (e.g. *GFAP*, *MYH7*)
- Use caution interpreting LOF variants at the extreme 3' end of a gene
- Use caution with splice variants that are predicted to lead to exon skipping but leave the remainder of the protein intact
- Use caution in the presence of multiple transcripts

#### Strong evidence of pathogenicity

**PS1** Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change

Example: Val->Leu caused by either G>C or G>T in the same codon

Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level

- PS2 *De novo* (both maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history  
 Note: Confirmation of paternity only is insufficient. Egg donation, surrogate motherhood, errors in embryo transfer, *etc.* can contribute to non-maternity
- PS3 Well-established *in vitro* or *in vivo* functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product  
 Note: Functional studies that have been validated and shown to be reproducible and robust in a clinical diagnostic laboratory setting are considered the most well-established
- PS4 The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared to the prevalence in controls  
 Note 1: Relative risk (RR) or odds ratio (OR), as obtained from case-control studies, is  $>5.0$  and the confidence interval around the estimate of RR or OR does not include 1.0. See manuscript for detailed guidance.  
 Note 2: In instances of very rare variants where case-control studies may not reach statistical significance, the prior observation of the variant in multiple unrelated patients with the same phenotype, and its absence in controls, may be used as moderate level of evidence.

#### **Moderate evidence of pathogenicity**

- PM1 Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (*e.g.* active site of an enzyme) without benign variation
- PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) (see [Table 6](#)) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes or ExAC  
 Caveat: Population data for indels may be poorly called by next generation sequencing
- PM3 For recessive disorders, detected in *trans* with a pathogenic variant  
 Note: This requires testing of parents (or offspring) to determine phase
- PM4 Protein length changes due to in-frame deletions/insertions in a non-repeat region or stop-loss variants
- PM5 Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before  
 Example: Arg156His is pathogenic; now you observe Arg156Cys  
 Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level
- PM6 Assumed *de novo*, but without confirmation of paternity and maternity

**Supporting evidence of pathogenicity**

- PP1 Co-segregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease  
Note: May be used as stronger evidence with increasing segregation data
- PP2 Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and where missense variants are a common mechanism of disease
- PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc)  
Caveat: As many *in silico* algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm should not be counted as an independent criterion. PP3 can be used only once in any evaluation of a variant.
- PP4 Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology
- PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation

**Criteria for Classifying Benign Variants****Stand-Alone evidence of benign impact**

- BA1 Allele frequency is above 5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes, or ExAC

**Strong evidence of benign impact**

- BS1 Allele frequency is greater than expected for disorder (see [table 6](#))
- BS2 Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder with full penetrance expected at an early age
- BS3 Well-established *in vitro* or *in vivo* functional studies shows no damaging effect on protein function or splicing
- BS4 Lack of segregation in affected members of a family  
Caveat: The presence of phenocopies for common phenotypes (*i.e.* cancer, epilepsy) can mimic lack of segregation among affected individuals. Also, families may have more than one pathogenic variant contributing to an autosomal dominant disorder, further confounding an apparent lack of segregation.

**Supporting evidence of benign impact**

- BP1 Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease
- BP2 Observed in *trans* with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder; or observed in *cis* with a pathogenic variant in any inheritance pattern

- BP3 In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function
- BP4 Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc)  
Caveat: As many *in silico* algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm cannot be counted as an independent criterion. BP4 can be used only once in any evaluation of a variant.
- BP5 Variant found in a case with an alternate molecular basis for disease
- BP6 Reputable source recently reports variant as benign but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation
- BP7 A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved

### Rules for Combining Criteria to Classify Sequence Variants

#### Pathogenic

1. 1 Very Strong (PVS1) AND
  - a.  $\geq 1$  Strong (PS1–PS4) OR
  - b.  $\geq 2$  Moderate (PM1–PM6) OR
  - c. 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 Supporting (PP1–PP5) OR
  - d.  $\geq 2$  Supporting (PP1–PP5)
2.  $\geq 2$  Strong (PS1–PS4) OR
3. 1 Strong (PS1–PS4) AND
  - a.  $\geq 3$  Moderate (PM1–PM6) OR
  - b. 2 Moderate (PM1–PM6) AND  $\geq 2$  Supporting (PP1–PP5) OR
  - c. 1 Moderate (PM1–PM6) AND  $\geq 4$  Supporting (PP1–PP5)

#### Likely Pathogenic

1. 1 Very Strong (PVS1) AND 1 Moderate (PM1–PM6) OR
2. 1 Strong (PS1–PS4) AND 1–2 Moderate (PM1–PM6) OR
3. 1 Strong (PS1–PS4) AND  $\geq 2$  Supporting (PP1–PP5) OR
4.  $\geq 3$  Moderate (PM1–PM6) OR
5. 2 Moderate (PM1–PM6) AND  $\geq 2$  Supporting (PP1–PP5) OR
6. 1 Moderate (PM1–PM6) AND  $\geq 4$  Supporting (PP1–PP5)

#### Benign

1. 1 Stand-Alone (BA1) OR
2.  $\geq 2$  Strong (BS1–BS4)

#### Likely Benign

1. 1 Strong (BS1–BS4) and 1 Supporting (BP1–BP7) OR
2.  $\geq 2$  Supporting (BP1–BP7)

\*Variants should be classified as Uncertain Significance if other criteria are unmet or the criteria for benign and pathogenic are contradictory.

## ANEXO III. Artículos científicos

A continuación se anexan los artículos publicados durante el transcurso de la presente tesis doctoral.

### Resultados directos:

Los dos primeros artículos derivan directamente de los resultados obtenidos a partir del presente trabajo, en el que se describen la causa genética de CLAPO y GLA.

1. *CLAPO syndrome: identification of somatic activating PIK3CA mutations and delineation of the natural history and phenotype.* Rodríguez-Laguna L, Ibañez K, Gordo G, García-Minaur S, Santos-Simarro F, Agra N, Vallespín E, Fernández-Montaño VE, Martín-Arenas R, Del Pozo Á, González-Pecellín H, Mena R, Rueda-Arenas I, Gomez MV, Villaverde C, Bustamante A, Ayuso C, Ruiz-Perez VL, Nevado J, Lapunzina P, Lopez-Gutierrez JC, Martinez-Glez V. *Genet Med.* 2018 Aug;20(8):882-889. doi: 10.1038/gim.2017.200. Epub 2018 Feb 15. PMID: 29446767
2. *Somatic activating mutations in PIK3CA cause generalized lymphatic anomaly.* Rodríguez-Laguna L, Agra N, Ibañez K, Oliva-Molina G, Gordo G, Khurana N, Hominick D, Beato M, Colmenero I, Herranz G, Torres Canizalez JM, Rodríguez Pena R, Vallespín E, Martín-Arenas R, Del Pozo Á, Villaverde C, Bustamante A, Ayuso C, Lapunzina P, Lopez-Gutierrez JC, Dellinger MT, Martinez-Glez V. *J Exp Med.* 2018 Dec 27. pii: jem.20181353. doi: 10.1084/jem.20181353. [Epub ahead of print] PMID: 30591517

### Resultados indirectos:

Los tres artículos restantes han sido generados gracias a la aplicación del protocolo de detección de variantes en mosaicos, desarrollado en esta tesis.

3. *mTOR mutations in Smith-Kingsmore syndrome: Four additional patients and a review.* Gordo G, Tenorio J, Arias P, Santos-Simarro F, García-Miñaur S, Moreno JC, Nevado J, Vallespín E, Rodríguez-Laguna L, de Mena R, Dapia I, Palomares-Bralo M, Del Pozo Á, Ibañez K, Silla JC, Barroso E, Ruiz-Pérez VL, Martinez-Glez V, Lapunzina P. *Clin Genet.* 2018 Apr;93(4):762-775. doi: 10.1111/cge.13135. Epub 2018 Feb 13. PMID: 28892148
4. *Constitutional mosaicism in RASA1-related capillary malformation-arteriovenous malformation (CM-AVM).* Gordo G, Rodríguez-Laguna L, Agra N, Mendez P, Feito M, Lapunzina P, Lopez-Gutierrez JC, Martinez-Glez V. *Clin Genet.* 2019 Jan 11. doi: 10.1111/cge.13499. [Epub ahead of print] PMID: 30635911
5. *Familial hypercholesterolemia: a single-nucleotide variant (SNV) in mosaic at the Low density lipoprotein receptor (LDLR).* Rodríguez Novoa S, Alonso C, Rodríguez Jimenez C, Rodríguez-Laguna L, Gordo G, Martinez-Glez V, et al. 2018 bioRxiv 266874; doi: <https://doi.org/10.1101/266874>

# CLAPO syndrome: identification of somatic activating *PIK3CA* mutations and delineation of the natural history and phenotype

Lara Rodriguez-Laguna, BSc, MSc<sup>1,9</sup>, Kristina Ibañez, PhD<sup>2,9</sup>, Gema Gordo, BSc, MSc<sup>1,3</sup>, Sixto Garcia-Minaur, MD, PhD<sup>3,4</sup>, Fernando Santos-Simarro, MD<sup>3,4</sup>, Noelia Agra, BSc, PhD<sup>1</sup>, Elena Vallespín, BSc, PhD<sup>3,5</sup>, Victoria E Fernández-Montaño, HNC<sup>5</sup>, Rubén Martín-Arenas, HNC<sup>5</sup>, Ángela del Pozo, PhD<sup>2</sup>, Héctor González-Pecellín, HNC<sup>5</sup>, Rocío Mena, BSc, PhD<sup>3,5</sup>, Inmaculada Rueda-Arenas, HNC<sup>5</sup>, María V. Gomez, HNC<sup>5</sup>, Cristina Villaverde, HNC<sup>3,6</sup>, Ana Bustamante, BSc, PhD<sup>3,6</sup>, Carmen Ayuso, MD, PhD<sup>3,6</sup>, Víctor L. Ruiz-Perez, BSc, PhD<sup>3,7</sup>, Julián Nevado, BSc, PhD<sup>3,5</sup>, Pablo Lapunzina, MD, PhD<sup>3,4</sup>, Juan C. Lopez-Gutierrez, MD, PhD<sup>8,9</sup> and Victor Martinez-Glez, MD, PhD<sup>1,3,9</sup>

**Purpose:** CLAPO syndrome is a rare vascular disorder characterized by capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation predominant on the face and neck, asymmetry, and partial/generalized overgrowth. Here we tested the hypothesis that, although the genetic cause is not known, the tissue distribution of the clinical manifestations in CLAPO seems to follow a pattern of somatic mosaicism.

**Methods:** We clinically evaluated a cohort of 13 patients with CLAPO and screened 20 DNA blood/tissue samples from 9 patients using high-throughput, deep sequencing.

**Results:** We identified five activating mutations in the *PIK3CA*

gene in affected tissues from 6 of the 9 patients studied; one of the variants (NM\_006218.2:c.248T>C; p.Phe83Ser) has not been previously described in developmental disorders.

**Conclusion:** We describe for the first time the presence of somatic activating *PIK3CA* mutations in patients with CLAPO. We also report an update of the phenotype and natural history of the syndrome.

*Genet Med* advance online publication 15 February 2018

**Key Words:** CLAPO; overgrowth; *PIK3CA*; somatic mosaicism; vascular malformation

## INTRODUCTION

Vascular anomalies represent a broad spectrum of disorders produced by abnormal embryological development of blood vessels. The manifestations of these disorders may be prenatal, congenital, or postnatal. In general, they manifest with a gradual increase in size or extent, proportionally greater than the growth of the patient.<sup>1</sup> Vascular anomalies frequently occur as part of recognizable, pleiotropic developmental syndromes,<sup>2</sup> which include overgrowth syndromes.<sup>3</sup>

CLAPO syndrome (OMIM 613089)—capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation of the face and neck, asymmetry and partial/generalized overgrowth—is a rare vascular disorder of unknown etiology first described in 2008 in six unrelated patients.<sup>4</sup> Only two additional patients have been described.<sup>5,6</sup> The tissue distribution of the clinical

manifestations in patients with CLAPO is similar to other vascular and overgrowth syndromes caused by somatic mutations such as Proteus syndrome caused by activating mutations in *AKT1*,<sup>7</sup> Sturge–Weber syndrome caused by activating mutations in *GNAQ*,<sup>8</sup> or PROS (*PIK3CA* related overgrowth spectrum) caused by activating mutations in *PIK3CA*.<sup>9</sup>

Somatic mosaicism is defined as the presence of more than one clone of cells with different genotypes, all of which are derived from a single cell. Mosaicism can contribute to variable clinical expressivity of a trait due to tissue-specific involvement. Consequently, the phenotypic spectrum of all these vascular and/or segmental overgrowth syndromes is heterogeneous and complex. Somatic mosaicism is a theoretical possibility in CLAPO, and even though it is a clinically

<sup>1</sup>Vascular Malformations Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, INGEMM-IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Bioinformatics Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, INGEMM-IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>3</sup>CIBERER, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, ISCIII, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Clinical Genetics Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, INGEMM-IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>5</sup>Structural and Functional Genomics Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, INGEMM-IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>6</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols,” CSIC-UAM, Madrid, Spain; <sup>7</sup>Department of Genetics, IIS-Fundación Jiménez Díaz UAM, Madrid, Spain; <sup>8</sup>Vascular Anomalies Center, Plastic Surgery, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain. Correspondence: Juan Carlos López-Gutiérrez or Victor Martinez-Glez (queminfantil.hulp@salud.madrid.org or vmartineglez@salud.madrid.org)

<sup>9</sup>The first two and the last two authors contributed equally to this work.

Submitted 29 September 2017; accepted 29 September 2017; advance online publication 15 February 2018. doi:10.1038/gim.2017.200

well-distinguished syndrome, it shares several clinical manifestations with previously mentioned syndromes as well as with other entities also caused by mutations in genes within the PI3K-Akt-mTOR pathway. Here we tested the hypothesis that CLAPO could be caused by somatic mutations activating this pathway, and we evaluated the natural history and phenotype of CLAPO and its phenotypic overlap with other PI3K-Akt-mTOR entities.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and samples

The study was performed at the Institute of Medical and Molecular Genetics and the Vascular Anomalies Center at La Paz Hospital, Madrid (Spain). We retrospectively reviewed the clinical characteristics and follow-up of 13 patients diagnosed with CLAPO between February 2007 and March 2017, including the 6 patients reported in the original description of the syndrome.<sup>4</sup> Clinical findings are summarized in **Table 1**.

Blood samples were collected from all patients, saliva samples from four patients and affected tissue samples from nine patients (**Table 1**). Affected tissue was defined as any type of vascular malformation obtained as part of the routine treatment, and in the case of cutaneous biopsies, these were obtained in regions with vascular malformation and/or true overgrowth (differentiating it from an asymmetry as a consequence of a vascular malformation). DNA extraction was performed by standard procedures. All studies in this project were approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario La Paz (PI-1919), with informed consent including consent to publish patient photos.

### High-throughput sequencing

High-throughput sequencing studies were performed using three distinct custom panels previously available and validated for use in our laboratory. The subsequent analyses of the sequencing data were based on the use of virtual panels (i.e., tiers) with an average expected reading depth of 500×. The first panel (Tier1: Mosaic panel) included 20 genes known to cause developmental syndromes in the form of somatic mosaicism. The second panel (Tier2: overgrowth, lymphatic and vascular syndromes (OGLYVAS) panel) was composed of 301 genes associated with lymphatic/vascular malformations and overgrowths of vascular origin, including PI3K-Akt-mTOR pathway genes, as well as 20 genes of the Mosaic panel. The third panel (Tier3: expanded mosaic candidate genes (EMG)) included 1,375 genes, including genes in the OGLYVAS panel. The complete lists of genes can be found in **Supplementary Table 1** online.

The three panels were designed, captured, and analyzed with the same tools, protocols, and instruments. The custom panels were designed by using NimbleDesign software (Roche NimbleGen, WI, USA): hg19 NCBI Build 37.1/GRCh37.p13, targeting > 98% of all exons (RefSeq) for these genes. For each sample, paired-end (2 × 150 bp reads) libraries were created according to the standard protocols KAPA HTP Library

Preparation Kit for Illumina platforms (Roche Sequencing, CA, USA), SeqCap EZ Library SR (Roche NimbleGen, WI, USA) and NEXTflex-96 Pre Capture Combo Kit (Bio Scientific, TX, USA) for indexing. The captured DNA samples were sequenced on a NextSeq 500 instrument (Illumina, CA, USA) using a HIGH v2 300 cycles cartridge, according to the standard operating protocol.

### Bioinformatics analysis pipeline

Data generated by the NextSeq 500 Desktop Sequencer was analyzed using an in-house bioinformatics pipeline for somatic mosaicism detection. BCL files containing base calls were converted into paired FASTQ files using *bcl2fastq-v2.15.0.4* software from Illumina (<https://github.com/brwnj/bcl2fastq>) and preprocessing using *Trimmomatic*<sup>10</sup> for trimming and cropping FASTQ data as well as removing adapters. Subsequently, balanced reads were mapped to hg19/GRCh37 human genome by using *Bowtie2* aligner,<sup>11</sup> and polymerase chain reaction (PCR) duplicate reads were removed using *Picard MarkDuplicates* (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). A subsequent local realignment and recalibration of reads was done to correct misalignments due to the presence of indels by using *Genome Analysis Toolkit RealignerTargetCreator* and *IndelRealigner*, and *BaseRecalibrator* methods, respectively. Once this preprocessing was achieved, the flowchart depicted in **Supplementary Figure 1** was followed.

The specific approach for mosaic detection included the extraction of the base-pair information for each genomic position from the BAM files using *SAMtools mpileup v1.3* (ref. 12), facilitating the subsequent single-nucleotide polymorphism/indel calling. The base quality (q value) and mapping quality scores (Q value) were lowered to 0, to characterize mutated alleles amplified in very low proportion and to avoid losing variants in non-unique genomic sequences, since many genes in the capture design have pseudogenes or share high percent identity with other genomic sites.

Variant calling was performed using *bcftools v1.3*. The low constraints allowed the emergence of many alternate alleles, even though many could be false positives. The strategy of the analysis was to keep all multiallelic sites in the VCF file for later consideration. Some attributes were defined to filter out likely sequencing artifacts or variants with high frequency in samples sequenced in the same run, and others to keep mosaic variants to analyze further on. This was applied in all the samples individually, regardless of the tissue type, generating a corresponding VCF file (see **Supplementary Figure 1a**).

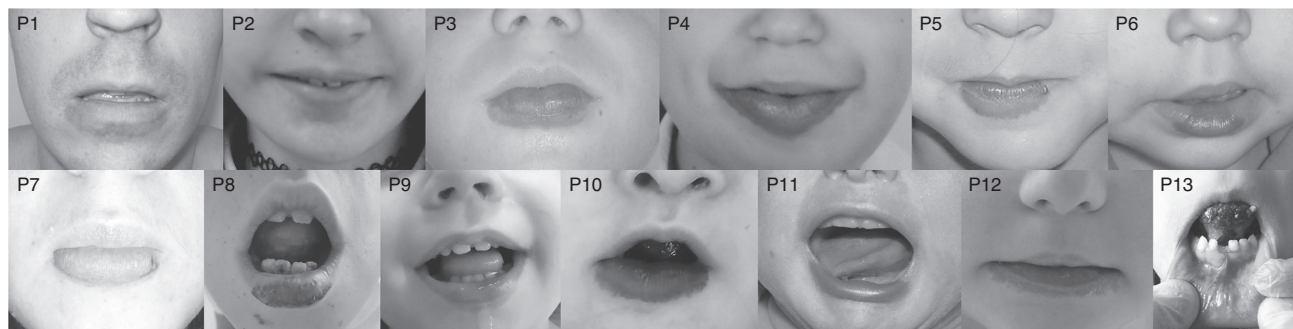
Subsequently, a germ-line versus somatic variant comparison was undertaken by analyzing the tissue and the blood VCF files from the same patient/sample (see **Supplementary Figure 1b**). The contrasting of matched tissue and blood samples was crucial to distinguish somatic from germ-line variants, bringing out low allelic fraction from background noise caused by the high-throughput sequencing error rate.

**Table 1** Phenotypic review of 13 patients with CLAPO

ID	Age <sup>a</sup>	Sex	Years of follow-up	Biological samples	<i>PIK3CA</i> mutation detected	CM lower lip (HPO:0005306)	LM (HPO:0100766)	Overgrowth (HPO:0001548)	VM (HPO:0012721)	Other CM	Other
P1	40	Male	10.2	Blood and affected skin tissue	+	Full lip	Bilateral lymphedema with predominance of foot-knee	Partial overgrowth of the right side of the body (+1.5 cm.)	Multiple varicose veins in the legs	Right area of the body, reddish color	—
P2	17	Female	10.2	Blood and affected skin tissue	+	2 cm	Lower limbs	Left leg and right arm hypertrophy	—	Left inguinal region	—
P3	20	Male	9.4	Blood	N/S	Full lip	Tongue and mandibular region	Generalized	Neck	—	—
P4	20	Female	10.1	Blood and LM tissue	—	Full lip	Tongue and mandibular region	—	Neck	—	Pectus excavatum
P5	16	Female	10.0	Blood	N/S	4 cm	Tongue and mandibular region	—	Neck	—	—
P6	11	Female	10.2	Blood and LM tissue	+	2 cm	Tongue and mandibular region	—	Neck	Neck	—
P7	18	Female	2.6	Blood, CM tissue, and saliva	—	Full lip	Intraoral part of the lip	—	—	—	Multiple small melanocytic nevi in clavicle, back, and lumbar region
P8	12	Male	2.0	Blood and affected mucosa tissue	—	3 cm	Cervicofacial region, tongue, gluteus	—	Neck	Right gluteus	Left facial paralysis and hypotonia
P9	4	Female	1.5	Blood and CM tissue	+	3 cm	—	—	Neck	Multiple, extensive: right lower limb (genital and gluteal), face, neck	Presacral ganglioneuroma.
P10	2	Female	1.5	Blood, CM tissue and saliva	+	Full lip	Cervicofacial region, tongue	Segmental hypoplasia	Neck	Left hand, between the 4th and 5th fingers	Noneffective rapamycin treatment; ocular impairment due to LM; gastrectomy
P11	5	Male	1.1	Blood and saliva	N/S	Full lip	Cervicofacial region	—	Neck	Glabella and neck	—
P12	4	Male	1.1	Blood and saliva	N/S	Full lip	Cervicofacial region, tongue	—	Neck	Tongue and right ankle	—
P13	7	Female	0.8	Blood and LM tissue	+	Gingiva, no lip involvement	Tongue and mandibular region	—	Tongue and possible VM in left hip	Hip	Propranolol not effective

CLAPO, capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation predominant on the face and neck, asymmetry, and partial/generalized overgrowth; CM, capillary malformation; HPO, Human Phenotype Ontology code; LM, lymphatic malformation; N/S: molecular study not performed due to lack of affected tissue; VM, venous malformation.  
<sup>a</sup>Age at end of follow-up.





**Figure 1 Capillary malformation of the lower lip, the hallmark of CLAPO syndrome, in the 13 patients reviewed.** It is constantly a congenital feature, always present in the midline, symmetrical and well defined. There are three patterns: narrow midline capillary malformation (i.e., P6), entire lower lip affected (i.e. P7), and central inner area without external skin involvement (P13).

The final files encoded global information about alignments. Manual filtering was applied to determine the candidate pathogenic variants. The resulting VCF files were manually visualized with the Integrative Genomics Viewer software to verify mutations and correct annotation.

#### Validation of high-throughput deep sequencing variants (Sanger, pyrosequencing, and droplet digital polymerase chain reaction)

Sanger sequencing was used to confirm variants present in more than 15% of the reads in the deep sequencing data. Standard PCR and Sanger sequencing were performed using the 96-capillary ABI 3730xl ADN analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). Long-range PCR and Sanger sequencing were also used to verify chromosomal location in variants found with high identity to another part of the genome. Pyrosequencing primers were designed using PyroMark software, and QIAGEN reagents and the PyroMark Q96 MD instrument (Qiagen, Hilden, Germany) were used according to manufacturer's protocol to confirm mosaic variants in the 5% and 15% read fraction range. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR), able to detect and quantify somatic mosaic variants at frequencies as low as 0.1%,<sup>13</sup> was used to detect/validate and quantify variants found on deep sequencing studies in less than 5% of reads or variants above 5% of reads but whose confirmation by pyrosequencing was not conclusive. We also used ddPCR to screen for the three common mutations described in *PROS* (*PIK3CA*: NM\_006218.2: c.1624G > A, p.Glu542Lys; c.1633G > A, p. Glu545Lys; and c.3140A > G, His1047Arg) in all negative samples by high-throughput sequencing.<sup>14</sup> The QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, CA, USA) was used according to the manufacturer's protocol. Nucleic acid molecules were quantified using a two-color fluorescence detector (FAM channel for mutant allele and VIC channel for wild type) and six assays with well-defined and validated somatic mosaic variants were used as controls to validate the technique.

## RESULTS

### Clinical features

Longitudinal data for 13 patients with CLAPO was gathered for a total of 70.5 person-years (ranging from 0.8 to 10.2). The mean age at diagnosis was 8.0 years (0.6 to 30.4) and the mean age at the end of this study was 10.4 years (2.2 to 40.5). None of the patients had a relevant family history. Except for one patient of Arab descent whose parents were born in Morocco (P6), all patients in the cohort were Caucasian and had parents from the Iberian Peninsula. The cohort included eight females and five males. Among the main features of CLAPO the only common clinical manifestation was the capillary malformation (CM) of the lower lip (13/13; 100%) (Figure 1); all other features were present at birth or became evident postnatally. The CM of the lower lip was always present in the midline, with a symmetrical distribution, ranging from 2 to 11 cm, with well-defined borders in several patients, and often affecting the portion of the skin under the lip or the intra-oral mucosa. We observed three distinct patterns of midline CM on the lower lip: (i) five patients (P2, P5, P6, P8, P9) had a narrow midline CM with reddish color, (ii) seven patients (P1, P3, P4, P7, P10, P11, P12) had a CM that involved the entire lower lip with a predominant brown/purple color, and (iii) one patient (P13) had a CM including the central inner area of the lower lip without external skin involvement under the vermilion. In our experience, untreated isolated capillary malformations (classically called port-wine stains) evolve by a progressive thickening and darkening of the malformation due to a progressive vessel dilation, which can, in turn, produce skin overgrowth. Nonetheless, we did not observe this type of progression in the complete cohort of 13 patients with CLAPO. However, as some of the patients are very young and have been followed up for a short period of time, thickening and darkening of the CM on the lower lip in these patients cannot be ruled out in the future. Remarkably, what we did observe, based on photographs and information provided by patients and relatives, is a decreased intensity in the CM of the lower lip, usually between months 6 and 18 of age, in four (P1–3, P6) of the six patients followed more than 9 years. While midline CMs of the face are frequently

correlated with lesions of the brain in patients with megalencephaly-capillary malformation syndrome (MCAP),<sup>15</sup> no psychomotor delay or intellectual deficit was apparent in CLAPO patients.

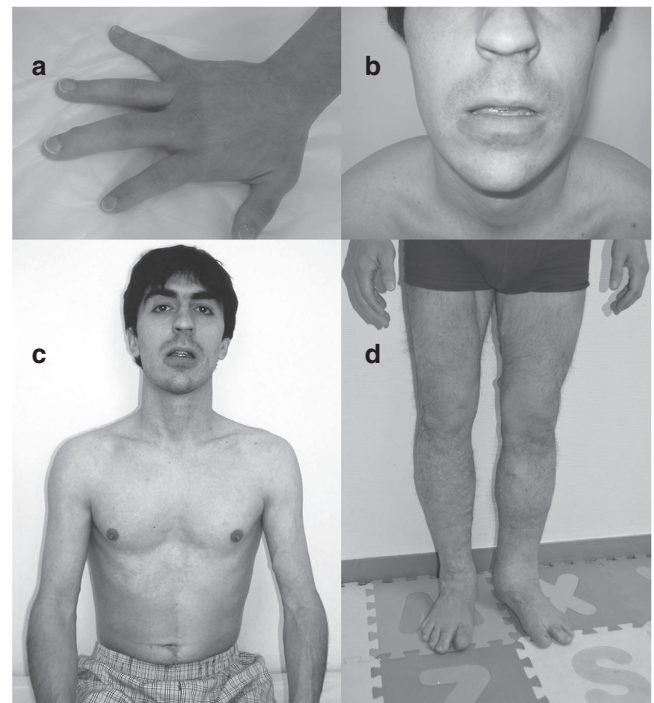
The second major clinical feature was the presence of lymphatic malformations (LMs), observed in 12 of 13 patients (92%). In 10 patients (P3–8, P10–13) the LM involved the lip, oral mucosa, neck, and tongue, seen in 5 of 10 with right sided predominance (P5, P6, P10–12). Another two patients (P1, P2) had unilateral LM on the lower limbs, one of which (P1) was associated with lymphedema. At birth, the tongue had a symmetrical midline combined capillary/lymphatic/venous malformation in 8 of 13 patients (P3–6, P8, P10, P12, P13) with CLAPO, which was mild, well-defined, and affected the tip of the tongue. In 5 of 8 patients (P3–5, P8, P13), the tongue lesions evolved over time, causing growth of the affected area and severe hemorrhagic events with episodes of acute inflammation, triggering and aggravating symptoms. On the other hand, P2 had a left thigh LM that was not noted until 15 years of age, indicating that an apparent absence of congenital LM does not exclude a later onset. Sporadic LMs are rare and arise more often with craniofacial venous malformations.<sup>16</sup> In our cohort LMs of the neck, tongue, and/or limb were also observed in association with venous malformations in 11 patients (all but P2 and P7), which showed progressive increase in size and in no case involution.

In this cohort the asymmetry in 8 of 13 patients (P4–6, P8, P10–13) actually reflected a direct consequence of the presence of a LM on the face/neck, although in three patients (P1–3) there was a true asymmetric overgrowth with the presence of bony hypertrophy. In addition to the facial asymmetry, P10 had asymmetry caused by left limb undergrowth. P1 had macrodactyly and overgrowth of the right side of the body (**Figure 2**), and P2 had a postnatal increase in the length of the left leg. P1 and P2 were initially referred with a diagnosis of Klippel–Trenaunay syndrome.

Recently, P9 suffered a large presacral ganglioneuroma that was successfully resected, and P10 had severe failure to thrive needing gastrostomy. Those findings can eventually expand the phenotype of CLAPO syndrome.

### Molecular results

Our main hypothesis was that somatic mutations were the genetic cause of CLAPO. Accordingly, we screened 20 DNA blood/saliva/tissue samples from 9 patients (P1, P2, P4, P6–10, and P13) with CLAPO using custom high-throughput deep sequencing panels including genes associated with vascular malformations and overgrowth, and a custom bioinformatic pipeline for somatic mosaic detection with a tiered analysis approach. Average read depth for Tier1 was 535×, for Tier2 342×, and for Tier3 404×, after removing duplicates. Variants were excluded as disease candidates by their presence in > 0.01 population frequency (1000 Genomes project (<http://www.internationalgenome.org/>), the National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>), the Exome Aggregation



**Figure 2 Patient 1.** (a) Macroductyly (overgrowth). (b) Capillary malformation of the full lower lip. (c) Partial asymmetry of the right side of the body associated to diffuse capillary malformation. (d) Bilateral lymphedema with predominance of foot-knee, and multiple varicose veins.

Consortium (ExAC; <http://exac.broadinstitute.org>), by pathogenicity predictors, and by using new custom parameters developed here for somatic mosaic detection (AVAF, SampleRun). After filtering, mean variants per sample for Tier1 was 5.2, for Tier2 31.3, and for Tier3 175.6.

Our analysis identified *PIK3CA* variants in six of nine (66%) patients with CLAPO (P1, P2, P6, P9, P10, and P13). All mutations were somatic missense single-nucleotide variations with a range of mosaicism between 1.26% and 16%. We identified a total of five distinct mutations in *PIK3CA* (NM\_006218.2), including one hotspot mutation (c.1624G > A;p.Glu542Lys); two recurrent, strong (gain of function) mutations (c.3140A > T;p.His1047Leu, c.1258T > C;p.Cys420Arg); one previously described mutation in patients with macroductyly (c.344G > C;p.Arg115Pro); and one novel somatic *PIK3CA* mutation (c.248T > C; p.Phe83Ser) not previously described in developmental disorders (**Figure 3**).

All variants detected were confirmed using at least one orthogonal method based on the mosaicism percentage of the alternative allele from the next-generation candidate gene sequencing. None of the mutations detected in the patients were present (by Sanger sequencing) in the blood samples of the patient's parents. Molecular data and variant information were collected in **Table 2**. In the affected tissue samples from patients P4, P7, and P8 no mutation was detected. Mean *PIK3CA* reading depth of 427× (171–603) for P4, 399× (151–573) for P7, and 311× (60–583) for P8 was obtained.



**Figure 3** *PIK3CA* mutations detected in patients with CLAPO. Diagram showing the distribution of the mutations detected along the *PIK3CA* domains.

## DISCUSSION

In the present report we describe for the first time the presence of somatic activating *PIK3CA* mutations in patients with CLAPO, and we report an update of the phenotype and natural history of the syndrome.

Somatic mosaic mutations in *PIK3CA* have been detected in six of nine patients with CLAPO. All mutations were detected in affected tissue, in percentages ranging from 3 to 16%, and in one of the patients (P9) the mutation was also mosaic at a level of 1.26% in a blood sample. All the mutations detected are missense variants, four of which have previously been reported as causing the PROS spectrum<sup>9,14</sup> and detected in different types of cancer (COSMIC database; <http://cancer.sanger.ac.uk/>). We also identified a novel *PIK3CA* mutation (Phe83Ser), not previously described in development disorders, but then again reported in the COSMIC database in three cancer samples.

The family of syndromes caused by activating *PIK3CA* mutations includes well-known and distinct entities such as MCAP, CLOVES (congenital lipomatous overgrowth, vascular malformations, epidermal nevi, and skeletal/spinal abnormalities), isolated LM, isolated adipose fibrodysplasia, and hemimegalencephaly, among others.<sup>9</sup> In addition to the distribution pattern, some of the syndromes included in PROS have overlapping clinical findings with CLAPO, mainly capillary and lymphatic malformations and segmental overgrowth. However, sharing a common mutated gene does not make their formerly differentiated classification obsolete since it has implications for clinical diagnosis, evolution, and follow-up.

Our findings suggest that somatic activating *PIK3CA* mutations can be responsible for the combination of capillary, lymphatic, and venous malformation as well as the overgrowth features characteristic of CLAPO syndrome. Given the overlapping phenotypic features between CLAPO and PROS (mainly with MCAP and CLOVES), and the presence of somatic activating *PIK3CA* mutations, we postulate that CLAPO syndrome might be included into the PROS spectrum.

The multiple or reticulate and diffuse CM present in different parts of the body appear to be similar in both CLAPO and MCAP. However, one of the main clinical manifestations in CLAPO is the CM of the lower lip, a feature that is not considered characteristic of MCAP, in which midline CMs are most frequently described in upper lip, glabella, and philtrum. Anatomically, the differential involvement of the lower lip or the upper lip is distinctive and is relevant as they have distinct embryological origins and

clinical implications. The forehead, the dorsum apex of the nose, and the central part of the upper lip derive from the frontonasal prominence, whereas the chin, lower lip, and lower cheek regions derive from the mandibular prominences. These distinct embryological origins might also explain the co-occurrence of brain alterations and CM of the upper lip in MCAP and the absence of neurological involvement in CLAPO.

The second main feature in CLAPO, the LM, is also frequent in CLOVES and facial infiltrating lipomatosis. While 2 of the 13 patients described here had a LM of the legs, this type of malformation occurs in CLAPO more frequently in the cervicofacial region and tongue, where there is a clear nonrandom association with capillary or venous malformations. Venous malformations were not originally described as a main feature in CLAPO, but we now know that they are a rather frequent feature, and it has recently been described that this type of malformation can arise sporadically as a consequence of somatic activating mutations in *PIK3CA*,<sup>17</sup> which has also been described for isolated LM.<sup>18</sup> Since it is possible that both lymphatic and venous malformations are not apparent congenitally, the presence of CM in the lower lip should make us aware of a possible later appearance of these two types of vascular malformations. This specific and nonrandom combination of vascular malformations highlights the utility of the clinical diagnosis in patients with CLAPO.

Overgrowth is not always evident in CLAPO, as none of the patients had macrocephaly, the involvement was segmental and rarely generalized, and in the case of facial asymmetry it appears to be caused by a vascular component. As with all overgrowth syndromes, it is important to distinguish in CLAPO and PROS what is apparent asymmetry from true overgrowth caused by hyperplasia or hypertrophy. In addition, no patient with CLAPO has lipomatous overgrowth, which is a common feature in the PROS spectrum. In spite of the fact that partial/generalized overgrowth is part of the CLAPO acronym, its low frequency in this cohort of patients suggests that it should not be considered a major clinical criterion for the diagnosis of CLAPO, despite being a frequent (but not mandatory) feature in PROS.

Considering the clinical characteristics and the natural history described in our cohort of patients, CLAPO could be classified as an entity with intermediate severity in the PROS spectrum, sharing characteristics mainly with MCAP and CLOVES, and certainly with isolated forms of lymphatic and venous malformations.

**Table 2** Variants detected in nine patients with CLAPO

Patient ID	Change	Frequency by deep sequencing	Frequency by confirmation technique	COSMIC <sup>a</sup>	Developmental disorders <sup>b</sup> (refs. 14,17,18,21–38)
P1 (CM: skin biopsy in right hemithorax)	PK3CA.NM_006218.2:c.344G>C; p.Arg115Pro	12% (1,290, 171)	7.5% (pyrosequencing), 10.2% (ddPCR)	1	6
P2 (CM: skin biopsy in left inguinal region)	PK3CA.NM_006218.2:c.248T>C; p.Phe83Ser	11% (328, 41)	9.5% (pyrosequencing)	3	0 <sup>c</sup>
P6 (LM: oral mucosa)	PK3CA.NM_006218.2:c.1258T>C; p.Cys420Arg	12% (287, 39)	7.5% (pyrosequencing), 10.3% (ddPCR)	78	15
P9 (CM: skin biopsy on right leg)	PK3CA.NM_006218.2:c.344G>C; p.Arg115Pro	16% (1,019, 195)	13.3% (pyrosequencing), 15.7% (ddPCR)	1	6
P9 (blood)	PK3CA.NM_006218.2:c.344G>C; p.Arg115Pro	0% (217, 0)	1.26% (ddPCR)	1	6
P10 (CM: lower lip)	PK3CA.NM_006218.2:c.1624G>A; p.Glu542Lys	10% (85, 9)	3.04% (ddPCR)	999	44
P13 (LM: tongue)	PK3CA.NM_006218.2:c.3140A>T; p.His1047Leu	16% (87, 16)	10% (pyrosequencing), Sanger sequencing	315	30

The tissue in which the variant was detected is specified in each case. Variant frequency by deep sequencing shows the percentage of mosaicism and the number of reads for each allele (wt, alternate). Frequency by confirmation technique includes which other technique(s) were used to validate the candidate variant and its percentage.

CLAPO, capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation predominant on the face and neck, asymmetry, and partial/generalized overgrowth; CM, capillary malformation; ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; LM, lymphatic malformation.

<sup>a</sup>Cancer samples with identified *PIK3CA* mutations in COSMIC database (<http://cancer.sanger.ac.uk/>; accessed June 2017). <sup>b</sup>Number of patients with vascular/overgrowth disorders previously reported with the specific *PIK3CA* variant. <sup>c</sup>In silico prediction for Phe83Ser: CADD 15.97 (damaging  $\geq 14$ ), gerp2 5.44 (conserved  $> 2.45$ ), VestPred 0.678 (damaging  $\geq 0.65$ ), Fathmm -0.54 (possibly damaging (-1,0.8)), mutation taster 0.9999 (disease-causing), LRT 0.000000999999 (deleterious).

One of the major challenges in somatic mosaicism is the detection of altered alleles in low mosaics in affected tissues. Correspondingly, the molecular diagnosis of CLAPO patients is not trivial. One limitation comes from the requirement to obtain affected tissue. Thus, the lack of success detecting *PIK3CA* mutations in three of nine of the molecularly studied patients with CLAPO does not implicate the absence of mutations in this gene, nor does it exclude the molecular diagnosis of CLAPO.

Another challenge is the bioinformatic method for the detection of somatic mosaicism. There are several computational approaches to detect somatic variants, but they cannot be applied to this problem since the starting data or the genomic landscape is different. Strelka<sup>19</sup> for single-nucleotide variation discovery or Mutect<sup>20</sup> for indel discovery are two of the most used variant callers for somatic variant detection. However, neither of them was developed to detect variants in mosaic disorders. Thanks to the computational approach applied here, we could rescue reads with low mapping quality score due to high percent identity with other genomic regions, and call variants that were present both in somatic and mosaic state.

In conclusion, this study documents the clinical features and natural history in a well-defined cohort of patients with CLAPO, and detected activating *PIK3CA* mutations in six of nine studied affected tissues. We detected *PIK3CA* activating variants previously described as causing the PROS spectrum, together with a clinical distribution pattern distinctive of somatic mosaicism, and a constellation of nonrandom clinical manifestations that, although in combination are specific to CLAPO, are also frequent in other syndromes within the PROS spectrum. We conclude that CLAPO belongs to the PROS family of somatic syndromes. In clinical terms, the differences between CLAPO and other PROS spectrum phenotypes demonstrate that the presence of a CM in the upper lip should raise suspicion of possible neurological involvement, whereas the CM in the lower lip may be associated with later occurrence of lymphatic/venous malformations. This could reflect their distinct embryological origin but does not imply that a patient with PROS and without upper lip CM should not be monitored for possible neurological compromise. In diagnostic terms, the approach in CLAPO requires the use of appropriate samples and bioinformatic algorithms, allowing the detection of somatic mosaic variants. Because CLAPO is caused by activating mutations in *PIK3CA*, affected patients may benefit from inhibitors of this pathway. Therapeutic trials of this disorder should be undertaken.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/gim>

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the project "Genetics of vascular and lymphatic malformations" financed with funds donated by

Asociación Ultrafondo and Villareal FC, cofinanced by project IP-17 from the funding call “Todos Somos Raros” (Telemaraton TVE promoted by Fundación Isabel Gemio, Federación ASEM, and Federación Española de Enfermedades Raras), cofinanced by the Instituto de Salud Carlos III, FEDER FUNDS FIS PI15/01481, and IIS-Fundación Jiménez Díaz UAM Genome Medicine Chair. We are grateful to the patients and their families. We want to honor the memory of Angel Llopis (affected by a non-CLAPO-related vascular anomaly) and thank his father, Fernando. We also thank Leslie Biesecker of the National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, for his invaluable contribution to critically revising this work.

## DISCLOSURE









The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Del Pozo J, Gómez-Tellado M, López-Gutiérrez JC. Vascular malformations in childhood. *Actas Dermosifiliogr* 2012;103:661–678.
- Duffy K. Genetics and syndromes associated with vascular malformations. *Pediatr Clin North Am* 2010;57:1111–1120.
- Hagen SL, Hook KP. Overgrowth syndromes with vascular malformations. *Semin Cutan Med Surg* 2016;35:161–169.
- López-Gutiérrez JC, Lapunzina P. Capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation of the face and neck, asymmetry and partial/generalized overgrowth (CLAPO): report of six cases of a new syndrome/association. *Am J Med Genet A* 2008;146A:2583–2588.
- Krämer D, Cossio ML, Whittle C. CLAPO syndrome: case report. *Int J Dermatol* 2016;55:1149–1150.
- Flores-Terry MÁ, Zamberk-Majlis P, Cortina-de la Calle MP, García-Arpa M. CLAPO syndrome. *Actas Dermosifiliogr*; e-pub ahead of print 15 May 2017.
- Lindhurst MJ, Sapp JC, Teer JK, et al. A mosaic activating mutation in *AKT1* associated with the Proteus syndrome. *N Engl J Med* 2011;365:611–619.
- Shirley MD, Tang H, Fallione CJ, et al. Sturge-Weber syndrome and port-wine stains caused by somatic mutation in *GNAQ*. *N Engl J Med* 2013;368:1971–1979.
- Keppeler-Noreuil KM, Rios JJ, Parker VE, et al. *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am J Med Genet A* 2015;167A:287–295.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:2114–2120.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012;9:357–359.
- Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 2011;27:2987–2993.
- Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 2011;83:8604–8610.
- Mirzaa G, Timms AE, Conti V, et al. *PIK3CA*-associated developmental disorders exhibit distinct classes of mutations with variable expression and tissue distribution. *JCI Insight* 2016;1:e87623.
- Martínez-Glez V, Romanelli V, Mori MA, et al. Macrocephaly-capillary malformation: analysis of 13 patients and review of the diagnostic criteria. *Am J Med Genet A* 2010;152A:3101–3106.
- Ewing MJ, Zreik RT, Donner LR, Zehr KJ. Large lymphaticovenous malformation resection. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2013;17:205–206.
- Limaye N, Kangas J, Mendola A, et al. Somatic activating *PIK3CA* mutations cause venous malformation. *Am J Hum Genet* 2015;97:914–921.
- Osborn AJ, Dickie P, Neilson DE, et al. Activating *PIK3CA* alleles and lymphangiogenic phenotype of lymphatic endothelial cells isolated from lymphatic malformations. *Hum Mol Genet* 2015;24:926–938.
- Saunders CT, Wong WS, Swamy S, Becq J, Murray LJ, Cheetham RK. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. *Bioinformatics* 2012;28:1811–1817.
- Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol* 2013;31:213–219.
- Yeung KS, Ip JJ, Chow CP, et al. Somatic *PIK3CA* mutations in seven patients with *PIK3CA*-related overgrowth spectrum. *Am J Med Genet A* 2017;173:978–984.
- Kuentz P, St-Onge J, Duffourd Y, et al. Molecular diagnosis of *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS) in 162 patients and recommendations for genetic testing. *Genet Med* 2017;19:989–997.
- Huchtagowder V, Shenoy A, Corliss M, et al. Utility of clinical high-depth next generation sequencing for somatic variant detection in the *PIK3CA*-related overgrowth spectrum. *Clin Genet* 2017;91:79–85.
- Chang F, Liu L, Fang E, et al. Molecular diagnosis of mosaic overgrowth syndromes using a custom-designed next-generation sequencing panel. *J Mol Diagn* 2017;19:613–624.
- Vahidnezhad H, Youssefian L, Baghdadi T, et al. Phenotypic heterogeneity in *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS). *Br J Dermatol* 2016;175:810–814.
- Tripolszki K, Knox R, Parker V, et al. Somatic mosaicism of the *PIK3CA* gene identified in a Hungarian girl with macrodactyly and syndactyly. *Eur J Med Genet* 2016;59:223–226.
- Youssefian L, Vahidnezhad H, Baghdadi T et al. Fibroadipose hyperplasia versus Proteus syndrome: segmental overgrowth with a mosaic mutation in the *PIK3CA* gene. *J Invest Dermatol* 2015;135:1450–1453.
- Luks VL, Kamitaki N, Vivero MP, et al. Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in *PIK3CA*. *J Pediatr* 2015;166:1048–1054.
- Loconte DC, Grossi V, Bozzao C, et al. Molecular and functional characterization of three different postzygotic mutations in *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS) patients: effects on *PI3K/AKT/mTOR* signaling and sensitivity to *PI3K* inhibitors. *PLoS One* 2015;10:e0123092.
- Boscolo E, Coma S, Luks VL, et al. *AKT* hyper-phosphorylation associated with *PI3K* mutations in lymphatic endothelial cells from a patient with lymphatic malformation. *Angiogenesis* 2015;18:151–162.
- Maclellan RA, Luks VL, Vivero MP, et al. *PIK3CA* activating mutations in facial infiltrating lipomatosis. *Plast Reconstr Surg* 2014;133:12e–19e.
- Keppeler-Noreuil KM, Sapp JC, Lindhurst MJ, et al. Clinical delineation and natural history of the *PIK3CA*-related overgrowth spectrum. *Am J Med Genet A* 2014;164A:1713–1733.
- Emrick LT, Murphy L, Shamshirsaz AA, et al. Prenatal diagnosis of CLOVES syndrome confirmed by detection of a mosaic *PIK3CA* mutation in cultured amniocytes. *Am J Med Genet A* 2014;164A:2633–2637.
- Bornstein E, Bacino CA, Maliszewski K, et al. Isolated fetal macrodactyly: phenotypic and genetic disparities in mosaic overgrowth syndrome. *J Ultrasound Med* 2014;33:1305–1307.
- Rios JJ, Paria N, Burns DK, et al. Somatic gain-of-function mutations in *PIK3CA* in patients with macrodactyly. *Hum Mol Genet* 2013;22:444–451.
- Lindhurst MJ, Parker VE, Payne F, et al. Mosaic overgrowth with fibroadipose hyperplasia is caused by somatic activating mutations in *PIK3CA*. *Nat Genet* 2012;44:928–933.
- Kurek KC, Luks VL, Ayturk UM, et al. Somatic mosaic activating mutations in *PIK3CA* cause CLOVES syndrome. *Am J Hum Genet* 2012;90:1108–1115.
- Leiter SM, Parker VE, Welters A, et al. Hypoinsulinaemic, hypoketotic hypoglycaemia due to mosaic genetic activation of *PI3-kinase*. *Eur J Endocrinol* 2017;177:175–186.

ARTICLE

# Somatic activating mutations in *PIK3CA* cause generalized lymphatic anomaly

Lara Rodriguez-Laguna<sup>1</sup> , Noelia Agra<sup>1</sup>, Kristina Ibañez<sup>2</sup> , Gloria Oliva-Molina<sup>1</sup>, Gema Gordo<sup>1</sup> , Noor Khurana<sup>3</sup>, Devon Hominick<sup>3</sup>, María Beato<sup>4</sup>, Isabel Colmenero<sup>5</sup> , Gonzalo Herranz<sup>1</sup>, Juan M. Torres Canizalez<sup>6</sup>, Rebeca Rodríguez Pena<sup>6</sup>, Elena Vallespín<sup>7,8</sup> , Rubén Martín-Arenas<sup>7</sup>, Ángela del Pozo<sup>2</sup> , Cristina Villaverde<sup>8,9</sup>, Ana Bustamante<sup>8,9</sup>, Carmen Ayuso<sup>8,9</sup>, Pablo Lapunzina<sup>8,10</sup>, Juan C. Lopez-Gutierrez<sup>11</sup>, Michael T. Dellinger<sup>3,12</sup> , and Victor Martinez-Glez<sup>1,8,10</sup> 

**Generalized lymphatic anomaly (GLA) is a vascular disorder characterized by diffuse or multifocal lymphatic malformations (LMs). The etiology of GLA is poorly understood. We identified four distinct somatic *PIK3CA* variants (Glu542Lys, Gln546Lys, His1047Arg, and His1047Leu) in tissue samples from five out of nine patients with GLA. These same *PIK3CA* variants occur in *PIK3CA*-related overgrowth spectrum and cause hyperactivation of the PI3K–AKT–mTOR pathway. We found that the mTOR inhibitor, rapamycin, prevented lymphatic hyperplasia and dysfunction in mice that expressed an active form of *PIK3CA* (His1047Arg) in their lymphatics. We also found that rapamycin reduced pain in patients with GLA. In conclusion, we report that somatic activating *PIK3CA* mutations can cause GLA, and we provide preclinical and clinical evidence to support the use of rapamycin for the treatment of this disabling and deadly disease.**

## Introduction

Generalized lymphatic anomaly (GLA), formerly known as lymphangiomatosis, is a sporadic disorder characterized by diffuse or multifocal lymphatic malformations (LMs; [Lala et al., 2013](#)). Because of the low incidence of the disease, the literature on GLA is confined to case reports and several small series. These reports have revealed that GLA typically presents at birth or in children and young adults ([Lala et al., 2013](#); [Ozeki et al., 2016](#)). Patients with GLA frequently display lymphatic abnormalities in their skin, soft tissues, and abdominal and thoracic viscera. These lymphatic abnormalities can cause pericardial, pleural, or peritoneal effusions, which can have lethal consequences ([Lala et al., 2013](#); [Trenor and Chaudry, 2014](#)). Strikingly, patients with GLA can also have lymphatic vessels in their bones ([Lala et al., 2013](#)). The presence of bone lymphatics is associated with the loss of medullary bone, pain, and impaired mobility ([Lala et al., 2013](#)).

Depending on the severity of the disease and the extent of organ involvement, different treatment strategies are used to

treat GLA. Surgery and radiotherapy have been used to reduce pleural effusions and to stabilize affected regions of the skeleton ([Ludwig et al., 2016](#); [Ozeki et al., 2016](#)). Pharmacotherapy has also been used to treat patients with GLA. The most commonly used pharmacotherapies have been zoledronic acid (osteoclast inhibitor), interferon  $\alpha$  2b (angiogenesis inhibitor), and rapamycin (mechanistic target of rapamycin [mTOR] inhibitor; [Laverdière et al., 2000](#); [Ozeki et al., 2007, 2016](#); [Timke et al., 2007](#); [Yeager et al., 2008](#); [Adams et al., 2016](#); [Ellati et al., 2016](#); [Triana et al., 2017](#)). Currently, there is no clear rationale for using specific targeted therapies in GLA.

The clinical characteristics and sporadic presentation of GLA suggest that somatic mutations could cause the disease. Here, we performed targeted high-throughput sequencing with paired blood/tissue samples and isolated lymphatic endothelial cells (LECs) to test the hypothesis that GLA is caused by somatic (postzygotic) mutations.

<sup>1</sup>Vascular Malformations Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, Institute of Medical and Molecular Genetics–Instituto de Investigación PAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Bioinformatics Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, Institute of Medical and Molecular Genetics–Instituto de Investigación PAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Hamon Center for Therapeutic Oncology Research, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX; <sup>4</sup>Department of Pathology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>5</sup>Department of Pathology, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain; <sup>6</sup>Unit of Immunology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>7</sup>Structural and Functional Genomics Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, Institute of Medical and Molecular Genetics–Instituto de Investigación PAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>8</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>9</sup>Department of Genetics, Instituto de Investigación Sanitaria–Fundación Jiménez Díaz Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; <sup>10</sup>Clinical Genetics Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, Institute of Medical and Molecular Genetics–Instituto de Investigación PAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>11</sup>Vascular Anomalies Center, Plastic Surgery, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>12</sup>Division of Surgical Oncology, Department of Surgery, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX.

Correspondence to Michael T. Dellinger: [michael.dellinger@utsouthwestern.edu](mailto:michael.dellinger@utsouthwestern.edu); Victor Martinez-Glez: [vmartineglez@salud.madrid.org](mailto:vmartineglez@salud.madrid.org).

© 2018 Rodriguez-Laguna et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

## Results

Nine patients with a diagnosis of GLA were clinically, radiologically, and molecularly evaluated. Clinical findings for all patients are summarized in [Table 1](#). Radiological features commonly found in our cohort of patients are shown in [Fig. 1](#). The cohort included five females and four males. None of the patients had a relevant family history. LMs were distributed throughout the body and showed mainly a mixed macro/microcystic phenotype. Irregular and variably sized lymphatic channels were observed by histology ([Fig. 2](#)). Five patients had bone loss in the medullary cavity, one with axial involvement and four with both axial and appendicular involvement. Patient GLA002 had both cortical and medullary bone loss. Three patients had chylous effusions. Seven patients had some degree of visceral involvement, three had associated vascular malformations, and three had skin alterations. One patient had hemothorax and another patient had a coagulopathy. None of the patients had dysmorphism or overgrowth. One patient had been previously diagnosed with complete androgen insensitivity syndrome, an X-linked disorder of sex development, and another patient had Steinert disease, the most frequent myotonic dystrophy.

### Somatic mutations in the PIK3CA gene can be detected in LM samples and LM-LECs from patients with GLA

We isolated LECs from fresh tissue samples obtained from two patients with GLA (GLA054 and GLA061). GLA054-LM-LECs were isolated by FACS using a CD31<sup>+</sup>, podoplanin<sup>+</sup>, and CD34<sup>Low</sup> strategy. GLA061-LM-LECs were isolated by magnetic-activated cell sorting with antibodies against CD31 and podoplanin. The final yield of isolated LM-LECs from the total cells obtained after enzymatic digestion of the tissue was 7.4% for GLA054 and <10% for GLA061. Isolated cells showed the characteristic cobblestone morphology of endothelial cells, and the identity of the cells was confirmed by immunofluorescence staining for Lyve-1 and PROX1 ([Fig. 3](#)).

We performed high-throughput sequencing studies with GLA-LM-LECs and with tissue samples from nine patients with a clinical and radiological diagnosis of GLA. As somatic mosaicism was a theoretical possibility in this pathology, paired blood/tissue samples were studied from all patients. Our first approach was to use a hybridization-based capture custom panel of 1,370 candidate genes associated with PI3K signaling, RAS/MAPK signaling, osteoclast differentiation, and other vascular/lymphatic malformations. We refer to this panel as the gene discovery panel. We identified *PIK3CA*, a gene that encodes the p110 $\alpha$  catalytic subunit of PI3K, as our main candidate gene. Subsequently, we designed an amplicon-based, highly targeted, ultra-deep sequencing panel to search for variants in this gene. We refer to this panel as the *PIK3CA* panel. Average read depth for the gene discovery panel was 510 $\times$ . Average read depth for the *PIK3CA* panel was 13,819 $\times$ . After filtering, the mean variant number per sample was 203 for the gene discovery panel and 5 for the *PIK3CA* panel.

We identified four distinct *PIK3CA* (NM\_006218.2) variants (Glu542Lys, Gln546Lys, His1047Arg, and His1047Leu) in five out of nine (55.6%) patients ([Table 2](#)). The variants were detected in LM tissues and also in LECs isolated from LM tissues from two patients (GLA054-LM-LECs and GLA061-LM-LECs; [Table 2](#)). All

mutations were somatic missense single nucleotide variations with a range of mosaicism between 1.1% and 23.0% in LM tissues and 28% and 33% in LM-LECs. The *PIK3CA* variants have been previously described as gain-of-function mutations in cancer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer database; <http://cancer.sanger.ac.uk/>) and *PIK3CA*-related overgrowth syndrome (PROS; [Mirzaa et al., 2016](#); [Kuentz et al., 2017](#)). The Glu542Lys, His1047Arg, and His1047Leu variants have also been reported in isolated LMs ([Luks et al., 2015](#)). All *PIK3CA* variants were confirmed using at least one alternative method based on the alternative allele frequency from the high-throughput sequencing results. *PIK3CA* mutations were not detected in LM tissue samples from patients GLA011, GLA022, GLA038, and GLA053. *PIK3CA* mutations were not present in blood samples from any of the patients.

### Excessive PI3K signaling in LECs causes lymphatic hyperplasia and dysfunction in mice

*Prox1-CreER<sup>T2</sup>* mice have been widely used to excise *floxed* DNA sequences in LECs ([Srinivasan et al., 2007](#); [Sabine et al., 2012](#); [James et al., 2013](#); [Murtomaki et al., 2013](#)). To further characterize Cre-activity in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>* mice, we bred *Prox1-CreER<sup>T2</sup>* mice with *mT/mG* reporter mice and analyzed the expression pattern of GFP in multiple tissues. We found that LECs in the kidney, heart, lung, pancreas, periosteum, and skin expressed GFP ([Fig. S1](#)). These data show that *Prox1-CreER<sup>T2</sup>* mice display Cre activity in LECs in multiple tissues. We also found that cardiomyocytes, hepatocytes, islets, neurons, and pancreatic ducts expressed GFP ([Fig. S1](#)). These findings are in agreement with other reports that cardiomyocytes, hepatocytes, islets, neurons, and pancreatic ducts express *Prox1* ([Wang et al., 2005](#); [Risebro et al., 2009](#); [Choi et al., 2011](#); [Truman et al., 2012](#); [Hong et al., 2016](#)).

To characterize the effect of excessive PI3K signaling in LECs on the structure and function of lymphatics, we used the Cre-loxP system to express an active form of *PIK3CA* in LECs. We bred *Prox1-CreER<sup>T2</sup>* mice with *LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice (Cre-inducible mutant form of *PIK3CA*) to create *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice ([Fig. 4 A](#)). *LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* (control) and *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice were injected with tamoxifen on postnatal days (P) 31, P33, P35, P39, and P42, and tissues were collected from mice on P70 and P98 ([Fig. 4 B](#)). Whole-mount immunofluorescence staining of ear skin revealed that the lymphatic network in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice was hyperplastic ([Fig. 4, C-G](#)). To determine whether LEC proliferation was different between *LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* and *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice, we stained sections of ear skin with antibodies against Lyve-1 and Ki-67. We found that *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice had significantly more Ki-67-positive LECs than *LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice ([Fig. S2](#)). These results show that excessive PI3K signaling in LECs induces LEC proliferation.

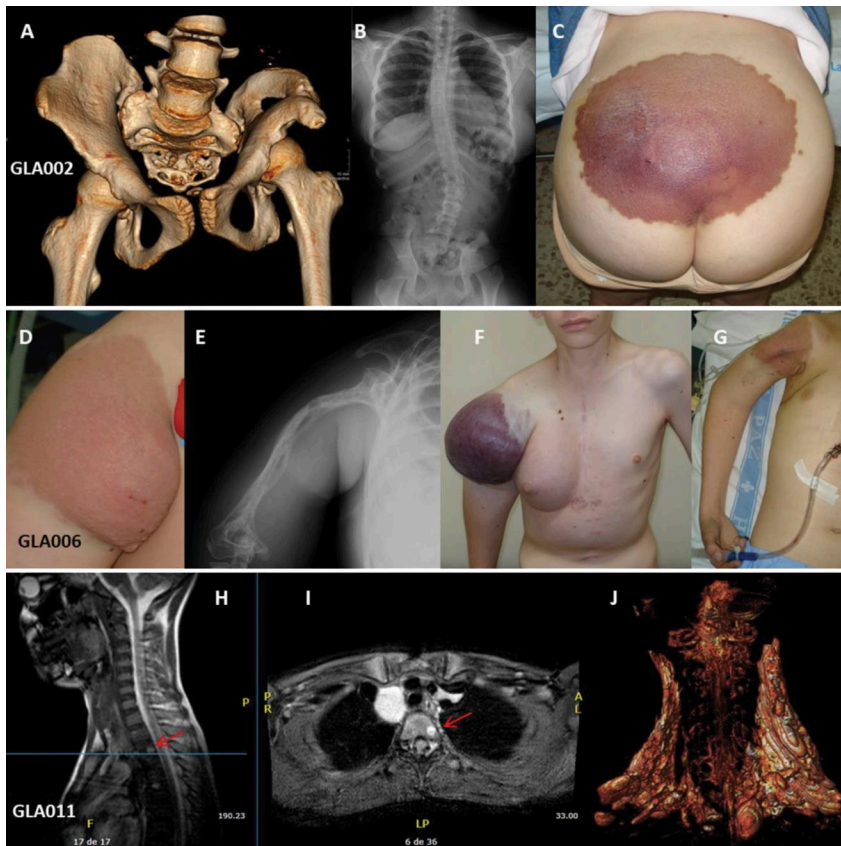
To determine whether excessive PI3K signaling in hepatocytes and pancreatic ducts caused abnormalities, we examined H&E-stained liver and pancreas samples from *LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* and *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice. We did not observe any histological abnormalities in the liver and pancreas samples from *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice ([Fig. S3](#)). To extend

Table 1. Clinical features in nine patients with GLA

Patient	Age (y)	Sex	PIK3CA variant	LM	Effusions	Osteolysis	Visceral involvement	Associated vascular anomalies	Skin alteration	Rapamycin treatment	Rapamycin response	Other
GLA002	17	F	c.3140A>G; p.His1047Arg	Pelvic LM (predominantly microcystic) affecting lumbosacral spine and guttural region	-	Massive (axial and appendicular) osteolysis in iliac bones, sacrococcygeal vertebrae and vertebral body L5, causing paraplegia of lower limbs	Pelvic organs	Atypical epidermoid hemangioma in cranial vault	Sacral patch	+	Pain reduction; improvement in ability to walk	Treatment with radiotherapy and interferon; secondary ovarian dysfunction; idiopathic intracranial hypertension; hyperthyroidism; dysmetria; distal shortening of the ulna; accessory cervical rib; scoliosis; slow growth
GLA006	23	M	c.3140A>T; p.His1047Leu	LM (predominantly macrocystic) in the arm (skin, soft tissues, and humerus), covering the right axilla, shoulder, and right hemithorax (pleura, pericardium, anterior mediastinum, thymus, diaphragm, ribs and vertebrae), and spleen	Chylothorax, hemothorax, chylopericardium	Osteolysis (axial and appendicular) of the humerus, clavicle, and ribs on the right side	Spleen	-	Upper limb	-	NA	Deceased
GLA011	20	M	None	Bilateral cervico-thoracic macrocystic LM with discrete bilateral mediastinal progression (up to aorto-pulmonary window) and around the vertebral arteries in the cranial region	-	Multiple (axial and appendicular) lytic lesions predominantly affecting dorsal and lumbar vertebrae, third left rib, pelvis, both middle thirds of humerus, bilateral supraacetabular region, and proximal portions of femurs	-	-	-	+	Pain reduction; improvement of dysphagia; breathing	Multiple cervical LM infections
GLA022	6	F	None	Right mediastinal thoracic macrocystic LM with supraclavicular and external thoracic extension; two small splenic LMs	-	-	Lung, spleen	Upper cava aneurysm	-	-	NA	Diffuse supra and infratentorial cortico-subcortical atrophy; breathing difficulties; right lung diffuse alveolar damage; squamous metaplasia and tracheobronchial ulcerations; herpes simplex virus type II ulcers in tongue; chronic duodenal peptic ulcer; thymus atrophy by compression; decreased
GLA038	15	F	None	Multiple LMs: retroperitoneal infiltrating the spine, with macrocystic component, the biggest in the left hypochondrium, right flank, and right paravascular; and microcystic, most important in soft tissues of right hemipelvis	-	Multiple (axial and appendicular) bone lesions in vertebral bodies D12, L1, L3, L4, L5, sacrum, and iliac crests	Multiple focal lesions in spleen	-	-	+	Pain reduction	Complete androgen insensitivity syndrome; hypogonadotropic hypogonadism; absence of Mullerian structures and abdominal dysplastic testicle; umbilical hernia; osteopenia
GLA051	35	F	c.1624G>A; p.Glu542Lys	Retroperitoneal and right thigh mixed (macro/microcystic) LMs	Chylous ascites	-	Kidney compression; nephrectomy	-	-	+	Pain reduction	Steiner disease; secondary lymphedema in right leg; severe chronic pain in the outer area of the right knee; epigastric hernia; surgery for polyps in the gallbladder
GLA053	4	M	None	Thoracic LM (predominantly microcystic)	Chylopericardium	Osteolysis (axial) in upper and lower part of left ribs, arches 10 to 12 missing	Left lung	-	Two large hyperchromic lesions in left hemithorax	+	Pain reduction, metabolic improvement, size reduction	Severe respiratory insufficiency; cardiac tamponade; bronchospasm; thrombopenia; failure to thrive; growth delay in size and weight; gastrostomy, and Port-a-Cath
GLA054	38	F	c.1636C>A; p.Gln546Lys	LM in left upper limb and hemithorax present since birth (predominantly microcystic)	Hemothorax	-	-	-	-	+	Pain reduction	-
GLA061	16	M	c.1624G>A; p.Glu542Lys	Cervicofacial and thoracic complex LM (mixed, with slight macrocystic predominance)	-	-	-	Cervical and cranial LVM; intracranial VM	-	+	Pain reduction	-

F, female; LVM, lymphatic venous malformation; M, male; NA, not applicable; VM, venous malformation.





**Figure 1. Clinical manifestations in patients with GLA. (A–C) GLA002:** Pelvic lymphatic malformation with massive osteolysis (A), secondary scoliosis (B), and skin involvement (C). **(D–G) GLA006:** Cutaneous (D) and humeral involvement (E), with intralesional bleeding (F) and cardiac tamponade in the context of chylopericardium (G). **(H and I) GLA011:** Multiple lytic lesions are present in this patient. Red arrows show an osteolytic lesion adjacent to the superior vertebral plate of T2, 8 × 5 mm, without cortical or disc involvement. **(J)** A bilateral cervical LM that is more prominent on the right side than the left side.

our findings for the pancreas, we also performed an Alcian Blue stain. Alcian Blue staining is performed to identify pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) lesions, which are precursors to pancreatic ductal adenocarcinoma. Importantly, we found that *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice did not have PanIN lesions (Fig. S3).

Intradermally injected Evans blue dye (EBD) binds to albumin, which is absorbed and transported by lymphatic vessels. We performed bipedal EBD lymphangiography to assess lymphatic function in tamoxifen-injected mice. We found that EBD was transported from the hind paws to the iliac lymph nodes in *LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice, but not in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice (Fig. 4, H and I). These results show that excessive PI3K signaling in LECs impairs the function of lymphatic vessels. The functional defect in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice could be due to problems with lymphatic capillaries (e.g., the capillaries are leaky or unable to take up fluid), collecting lymphatics (e.g., valve dysfunction), or both.

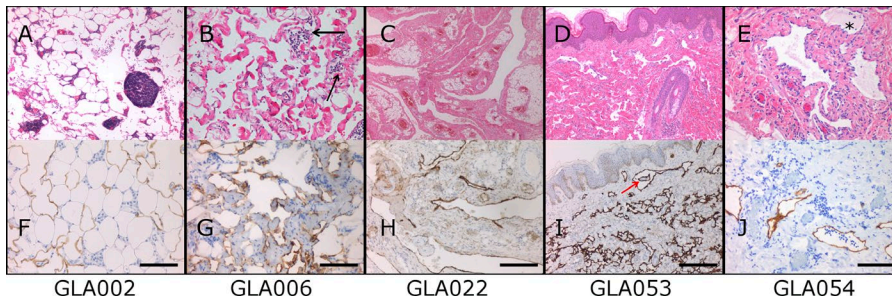
#### Excessive PI3K signaling in LECs induces the formation of lymphatics in bone

Bones in GLA patients can contain lymphatic vessels. To determine whether *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice had bone involvement, we analyzed femurs from P98 mice. No lymphatic vessels were present in femurs from *LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice (Fig. 5 A). In contrast, four out of nine *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice had lymphatic vessels in their bones (Fig. 5 B). Lymphatic vessels were in the marrow cavity and cortical bone. The number of lymphatics ranged from 0 to 10 vessels per

femur. Although a subset of femurs from *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice had lymphatic vessels, the femurs did not display structural abnormalities and were indistinguishable from femurs from *LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice (Fig. 5, C and D). To determine whether the severity of the bone phenotype increased with age, we attempted to collect femurs from older mice. However, we found that almost all of the tamoxifen-injected *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice developed a pleural effusion and died before P98 (Fig. S4). In some *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice, the effusion fluid appeared chylous, whereas in others, it appeared bloody (Fig. S4).

#### Rapamycin prevents lymphatic hyperplasia and dysfunction in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice

Because PI3K signaling stimulates the activation of mTOR, we set out to determine whether rapamycin could prevent lymphatic hyperplasia and dysfunction in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice. *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice were injected with tamoxifen on P31, P33, P35, P39, and P42 and then treated with vehicle or rapamycin from P43 to P70 (Fig. 6 A). We found that rapamycin prevented lymphatic hyperplasia in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice (Fig. 6, B–D). To assess lymphatic function, we injected the hind paws of mice with EBD. EBD was not transported from the hind paws to the iliac lymph nodes in any of the vehicle-treated mice. In contrast, EBD was transported to the iliac lymph nodes in all of the rapamycin-treated mice (Fig. 6, E and F). These results show that rapamycin can prevent lymphatic hyperplasia and preserve lymphatic function in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice.



**Figure 2. Histology of GLA lesions. (A–J)** Biopsies show irregular and variably sized lymphatic channels involving skin (D and I), subcutaneous fat (A and F), and soft tissues (B and G, C and H, and E and J). The endothelial cells lining the vessels show no atypical features. The lumens are empty or filled with proteinaceous fluid, occasionally containing lymphocytes and histiocytes (GLA054, asterisk). Prominent lymphoid aggregates are noted in the stroma in some cases (GLA002). The presence of hemosiderophages indicates past hemorrhage (GLA006, black arrows). In GLA053, irregular vascular channels, more evident in the superficial dermis, show intraluminal pseudopapillae (red arrow). **(F–J)** Immunopositivity for D2-40 (brown) highlights the endothelium of lymphatic channels. Bars, 100  $\mu$ m (F, G, and J); 200  $\mu$ m (H and I).

### Rapamycin partially restores lymphatic function in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice with established disease

Next, we set out to characterize the effect of rapamycin on the phenotype of *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice with established disease. *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice were injected with tamoxifen on P31, P33, P35, P39, and P42 and then treated with vehicle or rapamycin from P70 to P91 (Fig. 7 A). We found that rapamycin attenuated lymphatic hyperplasia in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice (Fig. 7, B–D). To assess lymphatic function, we injected the hind paws of mice with EBD. EBD was not transported from the hind paws to the iliac lymph nodes in any of the vehicle-treated mice. To our surprise, EBD was transported from the hind paws to the iliac lymph nodes in 9 out of 11 of the rapamycin-treated mice (Fig. 7, E and F). These results show that rapamycin can attenuate lymphatic hyperplasia and partially restore lymphatic function in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice with established disease.

### Rapamycin reduces pain in patients with GLA

Seven of the nine patients with GLA were treated with rapamycin at 0.8 mg/m<sup>2</sup> per dose twice daily for an average time of 16 mo. All patients reported a reduction in pain, and one patient showed a subjective (not measured) decrease in the size of their LM. Additionally, three patients showed functional improvement. No improvement of chylothorax or bone regeneration was observed. With respect to side effects, ulcers were observed in the oral mucosa in all patients, and high cholesterol levels were observed in five patients. No related infections were recorded. Antibiotic prophylaxis was not given.

## Discussion

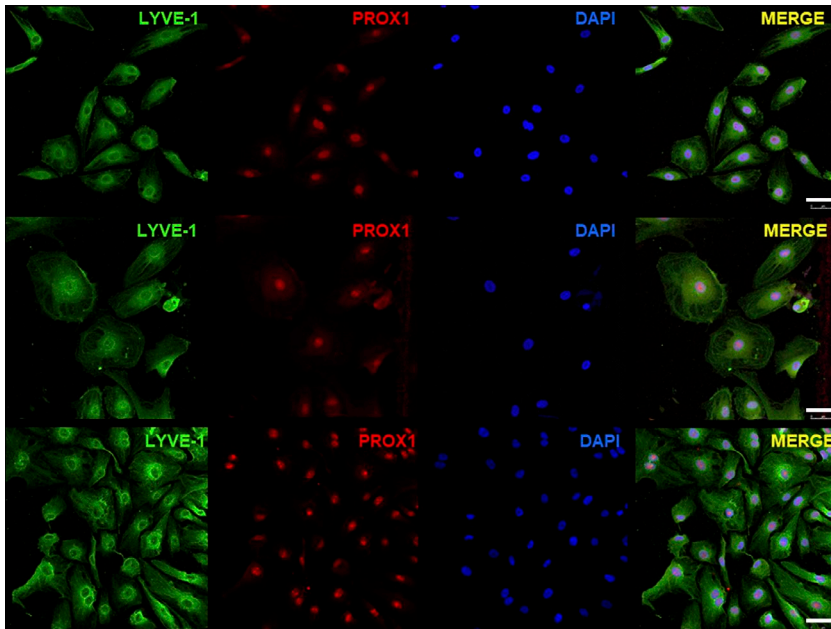
In the present report, we describe the presence of somatic activating *PIK3CA* mutations in patients with GLA. The variants were detected in LM samples from five out of nine (55.6%) patients and in LECs isolated from LM samples from two patients (100%). We show that mice that express an active form of *PIK3CA* in their LECs develop hyperplastic lymphatics and lymphatics in bone. Additionally, we show that rapamycin can prevent lym-

phatic hyperplasia and dysfunction in our mouse model of GLA. Lastly, we show that patients with GLA respond to rapamycin. Together, this work demonstrates that GLA can be caused by somatic activating mutations in *PIK3CA* and suggests that rapamycin could be an effective treatment for GLA.

To conclude that somatic activating mutations in *PIK3CA* can cause GLA, we must be sure of the diagnosis of our cohort of patients and weigh possible differential diagnoses. The mutations in this work were detected in LM samples, and even though mutations in *PIK3CA* have already been described in isolated LMs, it is clear that the patients in our study have multifocal disease, undoubtedly differentiating them from patients with isolated LMs. It is also necessary to rule out other PROS diseases such as congenital lipomatous overgrowth, vascular malformations, epidermal nevis, and spinal/skeletal anomalies/scoliosis (CLOVES). None of the patients in our study exhibited characteristics of CLOVES such as asymmetric growth, epidermal nevi, capillary malformation, macrodactyly, sandal gap, or spinal cord involvement. Importantly, none of the patients had lipomatous overgrowth, one of the main characteristics of CLOVES.

It is more challenging to differentiate GLA from Gorham-Stout disease, which is also characterized by LMs and bone loss. Based on the current literature (Lala et al., 2013) and our own clinical experience, the patients in this cohort were diagnosed with GLA because they had different combinations of (1) multiple cystic lesions, (2) multiple, nonprogressive lytic areas in the medullary cavity with noncontiguous lesions, and (4) a high incidence of visceral and skin involvement, as well as other vascular malformations. This differentiates the patients in our study from patients with Gorham-Stout disease, who typically present with cortical and progressive osteolysis, adjacent soft tissue changes, and mainly axial skeletal involvement (Lala et al., 2013).

It was previously reported that GLA patients tend to have macrocystic LMs (Lala et al., 2013). However, our cohort of GLA patients had a variable combination of mixed micro/macrocytic LMs. Our observation highlights the need for additional studies focused on characterizing the phenotypic spectrum of patients with GLA. A better understanding of the phenotype of patients with GLA will facilitate the diagnosis of GLA, improve the classi-



**Figure 3. Immunofluorescence staining of LECs isolated from patients with GLA.** Representative immunofluorescence images of LECs isolated from patients with GLA (GLA0054 and GLA0061), compared with commercial human dermal LECs, stained with specific markers (LYVE-1 and PROX1) and analyzed by confocal microscopy. Bars, 50  $\mu$ m.

fication of lymphatic anomalies, and help define the pathophysiological aspects of the disease.

The detection of tissue-specific mutations in *PIK3CA* in our cohort of patients confirms somatic mosaicism as a pathogenic mechanism in GLA. Somatic mosaicism, defined as the presence of more than one clone of cells with different genotypes derived from a single cell, causes phenotypic variability depending on

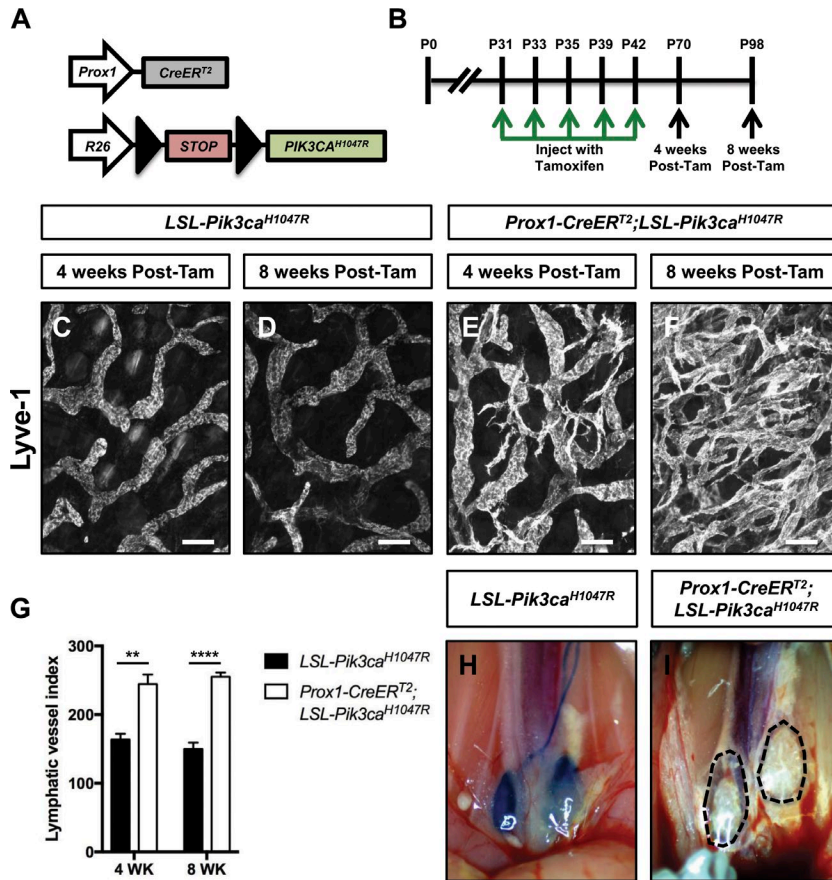
the specific tissue affected. Because of this, *PIK3CA* somatic mutations are present in patients with distinct but partially overlapping clinical features within the PROS family of developmental syndromes (Kurek et al., 2012; Lindhurst et al., 2012; Rivière et al., 2012; Keppler-Noreuil et al., 2014, 2015; Kuentz et al., 2017). This family includes different disorders in which overgrowth and/or LMs are a component feature, such as CLOVES;

**Table 2. Molecular results for *PIK3CA* in nine patients with GLA**

Patient	Age (y)	Sex	Sample	Method	Variant	Alt.var.freq% (wt;alt)
GLA002	17	F	GLA002-Bone1 (iliac crest)	HB	-	0 (186;0)
			GLA002-Bone2 (sacrum)	AB	- <sup>a</sup>	0.01 (38,548;5)
			GLA002-Fascia tissue	AB	- <sup>a</sup>	0.02 (34,032;6)
			GLA002-LM (FFPE)	AB	c.3140A>G; p.His1047Arg	23.0 (22,652;6,761)
GLA006	23	M	GLA006-LM_1	HB	-	0 (277;0)
			GLA006-LM_2 (FFPE)	AB	c.3140A>T; p.His1047Leu	18.48 (12,007;2,722)
GLA011	20	M	GLA011-LM	AB	-	-
GLA022	6	F	GLA022-LM (FFPE)	AB	-	-
GLA038	15	F	GLA038-LM	AB	-	-
GLA051	35	F	GLA051-LM	HB	c.1624G>A; p.Glu542Lys	3.5 (320;11)
			GLA051-LM	AB	c.1624G>A; p.Glu542Lys	1.1 (35,018;385)
GLA053	4	M	GLA053-LM	AB	-	-
GLA054	38	F	GLA054-LM	HB	c.1636C>A; p.Gln546Lys	3.1 (624;20)
			GLA054-LM	AB	c.1636C>A; p.Gln546Lys	3.4 (51,752;1,780)
			GLA054-LM-LECs	HB	c.1636C>A; p.Gln546Lys	27.9 (277;107)
GLA061	16	M	GLA061-LM	AB	c.1624G>A; p.Glu542Lys	1.68 (73,577;1,234)
			GLA061-LM-LECs	AB	c.1624G>A; p.Glu542Lys	33.67 (36,999;12,459)

AB, amplicon-based high-throughput sequencing; Alt.var.freq%, frequency of the alternative variant; F, female; HB, hybridization-based; M, male; wt;alt, number of reads for wild-type and alternative alleles.

<sup>a</sup>Next-generation sequencing reads in the background noise range of the technique and cannot be considered as positive.



**Figure 4. Expression of *Pik3ca*<sup>H1047R</sup> in LECs causes lymphatic hyperplasia and dysfunction.** (A) Schematic of the Cre-loxP system used to induce the expression of *Pik3ca*<sup>H1047R</sup>. (B) Schematic that shows when *Pik3ca*<sup>H1047R</sup> and *Prox1-CreER*<sup>T2</sup>;LSL-*Pik3ca*<sup>H1047R</sup> mice were injected with tamoxifen. Mice were analyzed on P70 (4 wk after the last tamoxifen injection) and P98 (8 wk after the last tamoxifen injection). Tam, tamoxifen. (C–F) Representative images of ear skin whole-mounts stained with an anti-Lyve-1 antibody. The lymphatic network in *Prox1-CreER*<sup>T2</sup>;LSL-*Pik3ca*<sup>H1047R</sup> mice becomes hyperplastic overtime. (G) Lymphatic vessel index values were significantly higher in P70 (244.4 ± 13.898, n = 5) and P98 (255.0 ± 6.364, n = 4) *Prox1-CreER*<sup>T2</sup>;LSL-*Pik3ca*<sup>H1047R</sup> mice than in P70 (163.6 ± 8.477, n = 5) and P98 (149.8 ± 9.202, n = 4) *Pik3ca*<sup>H1047R</sup> mice. (H and I) EBD was transported to the iliac lymph nodes in P70 *Pik3ca*<sup>H1047R</sup> mice (n = 5), but not in P70 *Prox1-CreER*<sup>T2</sup>;LSL-*Pik3ca*<sup>H1047R</sup> mice (n = 5). \*\*, P < 0.01; \*\*\*\*, P < 0.0001; unpaired Student's t test. Bars, 100 μm.

Klippel-Trénaunay syndrome; and capillary malformation of the lower lip, LM of the face and neck, asymmetry, and partial/generalized overgrowth (CLAPO; Kurek et al., 2012; Rivière et al., 2012; Luks et al., 2015; Rodriguez-Laguna et al., 2018). Based on our findings, it seems appropriate to include GLA within the PROS family of disorders (Biesecker, 2018) and will allow the entire spectrum of pathologies included in PROS to benefit from advances that occur in the study and treatment of these diseases.

We did not detect *PIK3CA* mutations in four GLA patients in our study. Therefore, it is possible that GLA is a genetically heterogeneous disease. Indeed, a mutation in *NRAS* was recently found in a patient diagnosed with GLA (Manevitz-Mendelson et al., 2018). However, we did not detect pathogenic variants in *NRAS* in any of the patients in our study. It is also possible that we were unable to identify variants in *PIK3CA* or other genes because the patients were low-level mosaics or because there was a low percentage of mutant cells in the sequenced sample. A mutation in *PIK3CA* was detected in the second sample but not in the first sample from patient GLA006. This is not unusual when studying different samples from patients diagnosed with a pathology associated with somatic mosaicism. The application of improved high-throughput diagnostic technologies and bioinformatics algorithms, capable of detecting low mosaics, will likely expand the identification of *PIK3CA* mutations and facilitate the genetic counseling of affected individuals and families.

Bone loss is one of the most intriguing clinical characteristics of GLA. Our study is the first to report that bone loss is associated

with mutations in *PIK3CA*. It remains to be determined why bone loss occurs in GLA and not in isolated LMs or in PROS syndromes with more pleiotropic clinical features.

Lymphatic vessels are not present in normal bones, but they are present in bones in patients with GLA (Edwards et al., 2008; Lala et al., 2013). We found that *Prox1-CreER*<sup>T2</sup>;LSL-*Pik3ca*<sup>H1047R</sup> mice developed lymphatic vessels in their bones. Although *Prox1-CreER*<sup>T2</sup>;LSL-*Pik3ca*<sup>H1047R</sup> mice had lymphatic vessels in their bones, they did not lose bone. This is likely because the mice died before they had significant bone involvement. In the future, LECs from *Prox1-CreER*<sup>T2</sup>;LSL-*Pik3ca*<sup>H1047R</sup> mice could be isolated and injected into the tibias of wild-type mice. This approach was recently used to show that LECs induce osteoclast-mediated bone resorption in mice (Wang et al., 2017) and could reveal the effect of GLA-LECs on bone structure.

Rapamycin is a US Food and Drug Administration-approved mTOR inhibitor. We show that rapamycin suppresses lymphatic hyperplasia and dysfunction in *Prox1-CreER*<sup>T2</sup>;LSL-*Pik3ca*<sup>H1047R</sup> mice. We also report that rapamycin reduces pain in patients with GLA. Although this work is not a controlled clinical trial, it adds to the growing number of reports that GLA patients respond to rapamycin (Hammill et al., 2011; Adams et al., 2016; Triana et al., 2017). Interestingly, we found that patients in whom we did not detect a mutation in *PIK3CA* responded to rapamycin. This could be due to other types of alterations in *PIK3CA* that we were not able to detect or to alterations in other components in the PI3K/AKT pathway that activate mTOR. Future studies will help distinguish between these two possibilities.

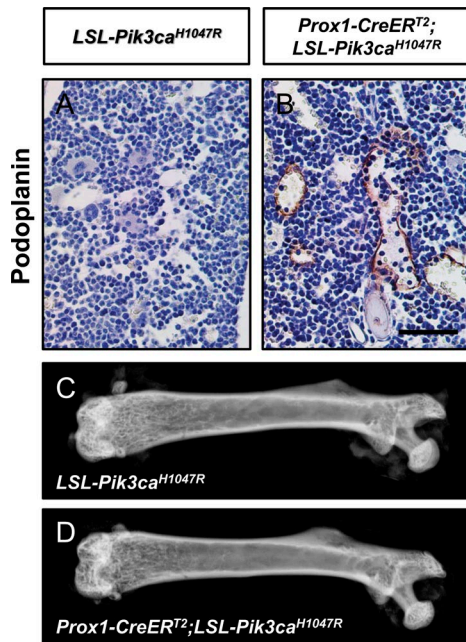


Figure 5. *Prox1-CreER<sup>2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice have lymphatics in their bones. (A and B) Representative images of femurs stained with an anti-podoplanin antibody. Femurs from *Prox1CreER<sup>2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice (four out of nine mice), but not from *LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice, had lymphatics. (C and D) Representative x-ray images of femurs from *LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* and *Prox1-CreER<sup>2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice. Femurs from *LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* and *Prox1-CreER<sup>2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice appear similar to one another. Bar, 50  $\mu$ m.

A significant part of the management of GLA could become nonsurgical in the near future. Less aggressive treatments such as interventional radiology procedures and pharmacological therapies are improving the mortality rates and the quality of life of patients. Rapamycin has become a new therapeutic option for patients with GLAs that are refractory to standard care. However, indications for rapamycin treatment in patients with GLA are not standardized. The most common indication for its use is the presence of severe chronic pain, but it is also used for progressive osteolysis, respiratory failure, and different types of lymphatic leaks. Importantly, it is a safe treatment showing minimal side effects when administered in neonates and young infants for long periods of time (Nadal et al., 2016). Unfortunately, the specific phenotypes that respond to treatment, the optimum dose of rapamycin, and the duration of treatment remain unclear. Customized controlled trials will help answer these questions and lead to the development of specific treatment protocols for GLA.

## Materials and methods

### Patients and samples

Participants were seen at the Vascular Anomalies Center and the Institute of Medical and Molecular Genetics and had a clinical diagnosis of GLA. All studies in this project were approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario La Paz (reference PI-1404). Informed consent was obtained from all patients/parents. GLA was diagnosed based on the presence of a combination of diffuse or multicentric proliferation of dilated lymphatic vessels, progressive osteolysis, and skin/visceral com-

promise (Lala et al., 2013; Trenor and Chaudry, 2014). We retrospectively reviewed the clinical characteristics of nine patients diagnosed with GLA between December 2012 and September 2017. Blood and tissue samples were collected from patients with GLA during surgical procedures scheduled as part of their routine treatment. LECs were also isolated from LM tissues from two patients (GLA054 and GLA061). When available, archived formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples were retrospectively collected from La Paz Hospital Biobank. All samples studied for each patient are described in Table 1. DNA extraction was performed by standard procedures. We first performed high-throughput sequencing studies with a large custom panel for gene discovery. After we identified the candidate gene, we performed targeted, ultra-deep sequencing, and the candidate variants were later validated by Sanger sequencing, pyrosequencing, and/or droplet digital PCR (ddPCR) depending on the degree of mosaicism detected.

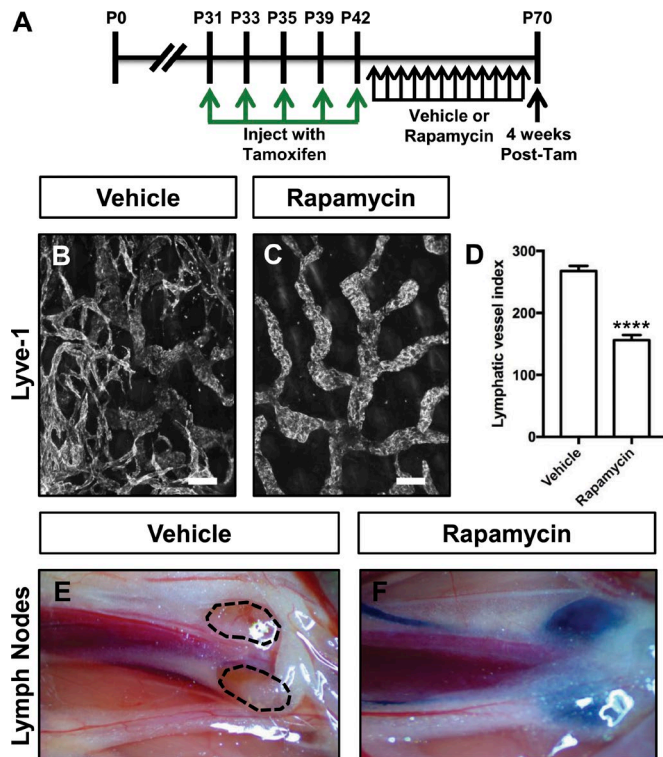
### High-throughput sequencing

High-throughput sequencing studies were performed using two different platforms. In the first platform, we used a hybridization-based capture approach for gene discovery, including 1,370 genes associated with PI3K signaling, RAS/MAPK signaling, osteoclast differentiation, and other related vascular malformations. The custom panel was designed with NimbleDesign (<https://design.nimblegen.com>; Roche NimbleGen): HG19 NCBI Build 37.1/GRCh37, targeting >98% of all exons (RefSeq) for these genes. For each sample, paired-end libraries (2  $\times$  150 bp reads) were created according to the standard deep sequencing protocols KAPA HTP Library Preparation Kit for Illumina platforms, SeqCap EZ Library SR (Roche NimbleGen) and NEXTflex-96 Pre Capture Combo Kit (Bioo Scientific Corp.) for indexing. The captured DNA samples were sequenced on a NextSeq 500 instrument (Illumina) using a HIGH v2 300 cycles cartridge, according to the standard operating protocol.

In the second platform, we used an amplicon-based method for highly targeted, ultra-deep sequencing, including *PIK3CA* and another 19 related genes. For this panel, probes were designed with the DesignStudio Sequenced Assay tool (Illumina), using an amplicon length of 175 bp and a total number of 715 amplicons. The dual-pool design was selected, and amplicon-based library preparation was performed using the TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit according to the manufacturer's protocol (Illumina). The protocol starts from 10 ng of genomic DNA or FFPE DNA samples. To optimize the variant detection and minimize false-positive reads (artifacts), a second pool of oligos with the same samples were synthesized and sequenced in parallel, which is especially helpful in FFPE samples. The captured DNA samples were sequenced on a NextSeq 500 instrument using a Mid Output kit v2 300 cycles cartridge, according to the standard operating protocol.

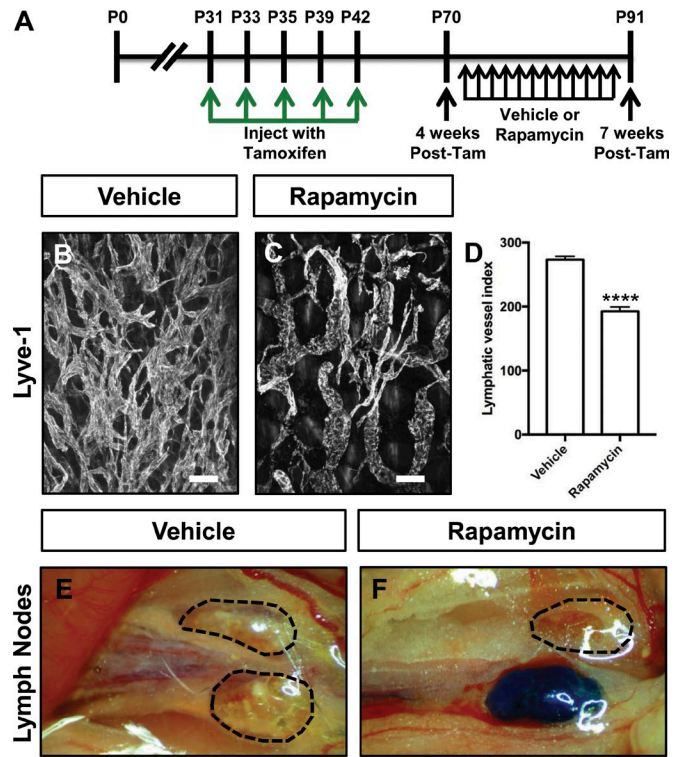
### Bioinformatics analysis

Two different bioinformatic analyses were applied, depending on the high-throughput sequencing platform used. For the hybridization-based capture approach, data generated by the NextSeq 500 Desktop Sequencer was analyzed using an in-house bioin-



**Figure 6. Rapamycin prevents lymphatic hyperplasia and dysfunction in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice.** (A) Schematic that shows when mice were injected with tamoxifen. *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice were treated with vehicle or rapamycin (100  $\mu$ g; 5 $\times$ /wk) from P43 to P70. Tam, tamoxifen. (B and C) Representative images of ear skin whole-mounts stained with an anti-Lyve-1 antibody. The lymphatic network was hyperplastic in vehicle-treated mice but not in rapamycin-treated mice. (D) Lymphatic vessel index values were significantly higher in vehicle-injected mice ( $267.7 \pm 8.293$ ,  $n = 3$ ) than in rapamycin-injected mice ( $156 \pm 8.269$ ,  $n = 7$ ). (E and F) EBD was transported to the iliac lymph nodes in rapamycin-treated mice ( $n = 7$ ), but not in vehicle-treated mice ( $n = 4$ ). \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , unpaired Student's  $t$  test). Bars, 100  $\mu$ m.

formatics pipeline for somatic mosaicism detection. In brief, BCL files containing base calls were converted into paired FASTQ files using bcl2fastq-v2.15.0.4 software from Illumina (<https://github.com/brwnj/bcl2fastq>) and preprocessing using Trimmomatic for trimming and cropping FASTQ data as well as removing adapters. Subsequently, balanced reads were mapped to hg19/GRCh37 human genome by using Bowtie2 aligner, and PCR duplicate reads were removed using Picard MarkDuplicates. A subsequent local realignment and recalibration of reads was done to correct misalignments due to the presence of INDELS by using GATK RealignerTargetCreator and IndelRealigner, and BaseRecalibrator methods, respectively. Mosaic detection included the extraction of the bp information for each genomic position from the BAM files using samtools mpileup v1.3, facilitating the subsequent SNP/INDEL calling. Variant calling was performed using bcftools v1.3. The strategy of the analysis was to keep all multiallelic sites in the VCF file for later consideration. Some attributes were defined to filter out likely sequencing artifacts or variants with high frequency in samples sequenced in the same run, and others to keep mosaic variants to analyze further on. Subsequently, a germline versus somatic variant comparison



**Figure 7. Rapamycin attenuates lymphatic hyperplasia and restores lymphatic function in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice.** (A) Schematic that shows when mice were injected with tamoxifen. *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice were treated with vehicle or rapamycin (100  $\mu$ g; 5 $\times$ /wk) from P70 to P91. Tam, tamoxifen. (B and C) Representative images of ear skin whole-mounts stained with an anti-Lyve-1 antibody. (D) Lymphatic vessel index values were significantly higher in vehicle-injected mice ( $273 \pm 5.404$ ,  $n = 6$ ) than in rapamycin-injected mice ( $192.5 \pm 6.876$ ,  $n = 7$ ). (E and F) EBD was transported to the iliac lymph nodes in most rapamycin-treated mice (9 out of 11 mice). In contrast, EBD was not transported to the iliac lymph nodes in vehicle-treated mice ( $n = 9$ ). \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; unpaired Student's  $t$  test). Bars, 100  $\mu$ m.

was undertaken by analyzing the tissue and the blood VCF files from the same patient/sample. The final files encoded global information about alignments. Manual filtering was applied to determine the candidate pathogenic variants. The resulting VCF files were manually visualized with the Integrative Genomics Viewer software to verify mutations and correct annotation. For the amplicon-based method, a different analysis strategy was followed. BCL files resulting from the NextSeq 500 were converted into paired FASTQ files using bcl2fastq-v2.15.0.4 software from Illumina. After that, three bioinformatic apps from Illumina (Amplicon Ds tool, Variant Calling Assessment tool, and TruSeq Amplicon tool) were used to obtain VCF files. Alignment was performed using the banded Smith-Waterman algorithm in the targeted regions, and the variant calling used the Illumina-developed Somatic Variant Caller and the Ensembl database for the annotation of the variants.

#### Validation of high-throughput deep sequencing variants

Variants present in >15% of the reads in the deep sequencing data were confirmed by Sanger sequencing using the 96-capillary ABI 3730xl ADN analyzer (Applied Biosystems). Mosaics variants in

the 5% and 15% read fraction range were confirmed by pyrosequencing. Primers were designed using PyroMark software, and QIAGEN reagents and the Pyromark Q96 MD instrument (QIAGEN) were used according to the manufacturer's protocol. Variants found in <5% of reads were confirmed by ddPCR. The QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad) was used to generate DNA-oil droplets and posterior variant quantification using a two-color fluorescence detector, according to the manufacturer's protocol. In addition to including a control sample in each experiment, six assays with well-defined and validated somatic mosaic variants were used as controls to previously validate the technique.

### Isolation and characterization of LM-LECs in patients with GLA

Fresh tissues obtained from surgical procedures were immersed in EGM-2MV BulletKit Medium after collection and transported immediately to the laboratory. Tissues were dissected into 1-mm<sup>3</sup> pieces and incubated with PBS containing 0.1% collagenase for 1–2 h at 37°C. The digested cell suspensions were gently squeezed through a 70- $\mu$ m nylon cell strainer, centrifuged at 300 *g* for 10 min, and resuspended in EGM-2MV BulletKit Medium. To reduce fibroblast and other cell type contamination, a Percoll gradient centrifugation was performed. Percoll gradients ranged from 45% to 15% Percoll in 5% steps of 5.0 ml each except 9.0 ml in the 15% step. The endothelial cell-containing section was recovered between the 30% and 35% gradient (adaptation from Gu et al., 2006). Cells were seeded in a Petri dish for 30 min to remove fast-adhering cells for further reduce fibroblast contamination. The unbound cells were removed into a sterile Falcon tube, pelleted, and resuspended in EGM-2MV supplemented with vascular endothelial growth factor-C before being seeded in fibronectin-coated plastic. For the isolation of the GLA054-LM-LECs, a FACS strategy was applied, as described before (Lokmic et al., 2015), using anti-human podoplanin (Sigma-Aldrich)–Alexa Fluor 488 (1:200; Cell Signaling), Brilliant Violet 421 anti-human CD34 antibody (1:200; BioLegend), PE mouse anti-human CD31 (1:50; Becton Dickinson), and 7AAD PerCP (1:20; BioLegend). For the isolation of GLA061-LM-LECs, a CD31-positive, podoplanin-positive selection strategy was employed using antibody-coated magnetic beads (Dynabeads; Invitrogen, Life Technologies) to separate LECs from other cell types (Osborn et al., 2015). The purity and phenotype of the isolated LECs were confirmed by immunofluorescence staining with antibodies against PROX-1 (Abcam) and LYVE-1 (ATGen).

### Rapamycin treatment in patients

Seven of the nine patients with GLA were treated with rapamycin at 0.8 mg/m<sup>2</sup> per dose twice daily for an average time of 16 mo. Blood levels were maintained between 12 and 20 ng/ml. To verify the response to treatment, we evaluated pain reduction, a decrease in size (subjective), functional improvement, bone regeneration, and/or improvement of chylothorax.

### Mice and genotyping

The animal experiments described in this manuscript were performed in accordance with an animal protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of University of

Texas Southwestern Medical Center. Mice were maintained in ventilated microisolator cages and were fed a standard diet ad libitum. Mice were provided nestlets and igloos as enrichment items. *Prox1-CreER<sup>T2</sup>* mice (Srinivasan et al., 2007) were genotyped with the following primers: 5'-GTGGAAAGGAGCGGTACAC TGA-3'; 5'-CACACACACACACGCTTGC-3'; and 5'-GCCAGAGGC CACTTGTGTAG-3'. The wild-type allele was 370 bp, and the Cre allele was 267 bp. *LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice (Adams et al., 2011) were genotyped with the following primers: 5'-GCCAAGAGTTTGTCC TCAACC-3'; 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'; and 5'-GGAGCG GGAGAAATGGATATG-3'. The wild-type allele was ~650 bp, and the mutant allele was 340 bp. *mT/mG* mice (Muzumdar et al., 2007) were genotyped with the following primers: 5'-CTCTGC TGCCTCTGGCTTCT-3'; 5'-CGAGGCGGATCACAAAGCAATA-3'; and 5'-TCAATGGGCGGGGTCGTT-3'. The wild-type allele was 330 bp, and the mutant allele was 250 bp. All mice were maintained on a mixed genetic background (129 and FVB). Littermates were used as controls in all of our animal experiments.

### Preparation of tamoxifen and rapamycin

Tamoxifen (20 mg; T5648; Sigma-Aldrich) was dissolved in a mixture of ethanol (100  $\mu$ l; E7023; Sigma-Aldrich) and sunflower oil (900  $\mu$ l; W530285; Sigma-Aldrich). Mice received 100  $\mu$ l of tamoxifen via an intraperitoneal injection on P31, P33, P35, P39, and P42. Rapamycin (BML-A275-0025; Enzo) was dissolved in ethanol to make a stock solution (50 mg/ml). The stock solution was then diluted to 1 mg/ml in a saline solution that contained polyethylene glycol (5% wt/vol; 88440; Sigma-Aldrich) and Tween 80 (5% wt/vol; P4780; Sigma-Aldrich). Mice received 100  $\mu$ g of rapamycin (~5 mg/kg) five times a wk via an intraperitoneal injection.

### Whole-mount immunofluorescence staining

Ear skin samples were fixed overnight at 4° C with 1% paraformaldehyde, washed with PBS (6  $\times$  15 min), and then blocked overnight with PBS + 0.3% TX-100 + 20% Aquablock. Next, samples were incubated overnight with a goat anti-Lyve-1 antibody (1:1,000; AF2125; R&D Systems). Following the overnight incubation, samples were washed with PBS + 0.3% TX-100 (3  $\times$  40 min), incubated overnight with an FITC-conjugated anti-goat antibody (1:500), and then washed with PBS + 0.3% TX-100 (3  $\times$  40 min). Samples were mounted with ProLong Gold plus DAPI (P36935; Invitrogen).

### Quantification of lymphatic vessel index

To quantify lymphatic vessels, we took representative pictures of the lymphatic network at the periphery of the ear. The pictures were analyzed with ImageJ. A grid (19,000 cm<sup>2</sup>) was placed over the pictures, and the number of times the gridlines intersected on a lymphatic vessel was determined.

### Assessment of LEC proliferation

Ear sections were stained with antibodies against Lyve-1 (1:250; AF2125; R&D Systems) and Ki-67 (1:400; 12202S; Cell Signaling). Four pictures were taken of each sample at  $\times$ 20 magnification. The number of Ki-67-positive and Ki-67-negative LECs in each image was manually counted. The percentage of Ki-67-positive

LECs was determined by dividing the number of Ki-67-positive LECs by the total number of LECs.

### Immunohistochemistry of bone sections

Bones were fixed in 4% paraformaldehyde overnight and then decalcified in 10% EDTA (pH, 7.4) for 2 wk. Bones were embedded in paraffin and sectioned at 5  $\mu$ m. Slides were deparaffinized in xylene and rehydrated through a descending ethanol series. Endogenous peroxidase activity was blocked with a hydrogen peroxide/methanol solution, and nonspecific binding was blocked with Tris-buffered saline and Tween 20 + 20% Aquablock (PP82-T3082; East Coast Biologics). Slides were incubated overnight with a hamster anti-podoplanin antibody (1:1,000; ab11936; Abcam). The following day, slides were washed with Tris-buffered saline and Tween 20 and incubated with an HRP-conjugated secondary antibody. Antibody binding was detected with 3-3'-diaminobenzidine (SK-4105; Vector). Slides were then counterstained with hematoxylin, dehydrated through an ascending ethanol series, and cleared in xylene. Coverslips were mounted with Cytoseal.

### Bipedal EBD lymphangiography

EBD (E2129; Sigma-Aldrich) was dissolved in sterile PBS to create a 1% wt/vol working solution. Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of avertin. Approximately 30  $\mu$ l of EBD was injected intradermally into each hind paw. 3 min later, the iliac lymph nodes were examined under a dissecting microscope.

### Statistical analysis of animal experiments

Data were analyzed using GraphPad Prism statistical analysis software (version 7.0). All results are expressed as means  $\pm$  SEM. Unpaired Student's *t* tests were performed to test means for significance. Data were considered significant at *P* < 0.05.

### Online supplemental material

Fig. S1 shows that Cre-mediated recombination occurs in LECs and other cell types in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>* mice. Fig. S2 shows that LEC proliferation is increased in *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice. Fig. S3 shows that liver and pancreas samples from *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice appear normal. Fig. S4 shows a survival curve for *Prox1-CreER<sup>T2</sup>;LSL-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* mice.

### Acknowledgments

We thank all patients and their families for their participation in this study.

This work was funded by The Lymphatic Malformation Institute (Ref. PI-1404).

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: P. Lapunzina, J.C. Lopez-Gutierrez, and V. Martinez-Glez designed and supervised the study. L. Rodriguez-Laguna, M.T. Dellinger, and V. Martinez-Glez wrote the manuscript. C. Ayuso critically revised the study and the manuscript for intellectual content. N. Agra, G. Oliva-Molina, and G. Herranz performed in vitro cellular studies. J.M. Torres Canizalez and R. Rodríguez Pena designed and supervised flow cytometry experiments. L. Rodriguez-Laguna and N. Agra participated in the draft of the manuscript. P. Lapunzina, J.C. Lopez-Gutierrez, and V. Martinez-Glez evaluated patients and collaborated in the clinical characterization of the patients. M. Beato and I. Colmenero performed histopathological studies. E. Vallespín supervised and R. Martín-Arenas performed the high-throughput sequencing experiments. A. Bustamante supervised and C. Villaverde, G. Gordo, and L. Rodriguez-Laguna performed ddPCR experiments. K. Ibañez, A. del Pozo, and L. Rodriguez-Laguna performed the bioinformatic analysis, and L. Rodriguez-Laguna, G. Gordo, K. Ibañez, and A. del Pozo developed the in-house bioinformatic pipelines for low-mosaics detection. G. Gordo and L. Rodriguez-Laguna performed molecular experiments and analysis other than high-throughput sequencing (Sanger sequencing, pyrosequencing, etc.). N. Khurana, D. Hominick, and M.T. Dellinger performed animal studies. All authors have approved the manuscript for submission.

Submitted: 17 July 2018  
Revised: 10 October 2018  
Accepted: 29 November 2018

### References





- Adams, D.M., C.C. Trenor III, A.M. Hammill, A.A. Vinks, M.N. Patel, G. Chaudry, M.S. Wentzel, P.S. Moberley-Schuman, L.M. Campbell, C. Brookbank, et al. 2016. Efficacy and Safety of Sirolimus in the Treatment of Complicated Vascular Anomalies. *Pediatrics*. 137:e20153257. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-3257>
- Adams, J.R., K. Xu, J.C. Liu, N.M. Agamez, A.J. Loch, R.G. Wong, W. Wang, K.L. Wright, T.F. Lane, E. Zacksenhaus, and S.E. Egan. 2011. Cooperation between *Pik3ca* and *p53* mutations in mouse mammary tumor formation. *Cancer Res*. 71:2706-2717. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0738>
- Biesecker, L.G. 2018. Mosaic disorders and the taxonomy of human disease. *Genet. Med*. 20:800-801. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.213>
- Choi, I., H.K. Chung, S. Ramu, H.N. Lee, K.E. Kim, S. Lee, J. Yoo, D. Choi, Y.S. Lee, B. Aguilar, and Y.K. Hong. 2011. Visualization of lymphatic vessels by *Prox1*-promoter directed GFP reporter in a bacterial artificial chromosome-based transgenic mouse. *Blood*. 117:362-365. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-298562>
- Edwards, J.R., K. Williams, L.G. Kindblom, J.M. Meis-Kindblom, P.C. Hogendoorn, D. Hughes, R.G. Forsyth, D. Jackson, and N.A. Athanasou. 2008. Lymphatics and bone. *Hum. Pathol*. 39:49-55. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.04.022>
- Ellati, R., A. Attili, H. Haddad, M. Al-Hussaini, and A. Shehadeh. 2016. Novel approach of treating Gorham-Stout disease in the humerus--Case report and review of literature. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 20:426-432.
- Gu, B., J.S. Alexander, Y. Gu, Y. Zhang, D.F. Lewis, and Y. Wang. 2006. Expression of lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) in the human placenta. *Lymphat. Res. Biol*. 4:11-17. <https://doi.org/10.1089/lrb.2006.4.11>
- Hammill, A.M., M. Wentzel, A. Gupta, S. Nelson, A. Lucky, R. Elluru, R. Dasgupta, R.G. Azizkhan, and D.M. Adams. 2011. Sirolimus for the treatment of complicated vascular anomalies in children. *Pediatr. Blood Cancer*. 57:1018-1024. <https://doi.org/10.1002/pbc.23124>
- Hong, M., E. Jung, S. Yang, W. Jung, Y.J. Seong, E. Park, A. Bramos, K.E. Kim, S. Lee, G. Daghlian, et al. 2016. Efficient Assessment of Developmental, Surgical and Pathological Lymphangiogenesis Using a Lymphatic Reporter Mouse and Its Embryonic Stem Cells. *PLoS One*. 11:e0157126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157126>
- James, J.M., A. Nalbandian, and Y.S. Mukouyama. 2013. TGF $\beta$  signaling is required for sprouting lymphangiogenesis during lymphatic network development in the skin. *Development*. 140:3903-3914. <https://doi.org/10.1242/dev.095026>
- Keppler-Noreuil, K.M., J.C. Sapp, M.J. Lindhurst, V.E. Parker, C. Blumhorst, T. Darling, L.L. Tosi, S.M. Huson, R.W. Whitehouse, E. Jakkula, et al. 2014.



- Clinical delineation and natural history of the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Am. J. Med. Genet. A.* 164A:1713–1733. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36552>
- Kepler-Noreuil, K.M., J.J. Rios, V.E. Parker, R.K. Semple, M.J. Lindhurst, J.C. Sapp, A. Alomari, M. Ezaki, W. Dobyns, and L.G. Biesecker. 2015. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am. J. Med. Genet. A.* 167A:287–295. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36836>
- Kuentz, P., J. St-Onge, Y. Duffourd, J.B. Courcet, V. Carmignac, T. Jouan, A. Sorlin, C. Abasq-Thomas, J. Albuissou, J. Amiel, et al. 2017. Molecular diagnosis of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) in 162 patients and recommendations for genetic testing. *Genet. Med.* 19:989–997. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.220>
- Kurek, K.C., V.L. Luks, U.M. Ayturk, A.I. Alomari, S.J. Fishman, S.A. Spencer, J.B. Mulliken, M.E. Bowen, G.L. Yamamoto, H.P. Kozakewich, and M.L. Warman. 2012. Somatic mosaic activating mutations in PIK3CA cause CLOVES syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 90:1108–1115. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.05.006>
- Lala, S., J.B. Mulliken, A.I. Alomari, S.J. Fishman, H.P. Kozakewich, and G. Chaudry. 2013. Gorham-Stout disease and generalized lymphatic anomaly—clinical, radiologic, and histologic differentiation. *Skeletal Radiol.* 42:917–924. <https://doi.org/10.1007/s00256-012-1565-4>
- Laverdière, C., M. David, J. Dubois, P. Russo, L. Hershon, and J.G. Lapierre. 2000. Improvement of disseminated lymphangiomatosis with recombinant interferon therapy. *Pediatr. Pulmonol.* 29:321–324. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0496\(200004\)29:4%3C321::AID-PPUL13%3E3.O.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0496(200004)29:4%3C321::AID-PPUL13%3E3.O.CO;2-C)
- Lindhurst, M.J., V.E. Parker, F. Payne, J.C. Sapp, S. Rudge, J. Harris, A.M. Witkowski, Q. Zhang, M.P. Groeneveld, C.E. Scott, et al. 2012. Mosaic overgrowth with fibroadipose hyperplasia is caused by somatic activating mutations in PIK3CA. *Nat. Genet.* 44:928–933. <https://doi.org/10.1038/ng.2332>
- Lokmic, Z., E.S. Ng, M. Burton, E.G. Stanley, A.J. Penington, and A.G. Elefanty. 2015. Isolation of human lymphatic endothelial cells by multi-parameter fluorescence-activated cell sorting. *J. Vis. Exp.* 1:e52691.
- Ludwig, K.F., T. Slone, K.B. Cederberg, A.T. Silva, and M. Dellinger. 2016. A new case and review of chylothorax in generalized lymphatic anomaly and Gorham-Stout disease. *Lymphology.* 49:73–84.
- Luks, V.L., N. Kamitaki, M.P. Vivero, W. Uller, R. Rab, J.V. Bovée, K.L. Rialon, C.J. Guevara, A.I. Alomari, A.K. Greene, et al. 2015. Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. *J. Pediatr.* 166:1048–54.e1: 5. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.12.069>
- Manevitz-Mendelson, E., G.S. Lechner, O. Barel, I. Davidi-Avrahami, L. Ziv-Strasser, E. Eyal, I. Pessach, U. Rimon, A. Barzilai, A. Hirshberg, et al. 2018. Somatic NRAS mutation in patient with generalized lymphatic anomaly. *Angiogenesis.* 21:287–298. <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9595-8>
- Mirzaa, G., A.E. Timms, V. Conti, E.A. Boyle, K.M. Girisha, B. Martin, M. Kircher, C. Olds, J. Juusola, S. Collins, et al. 2016. PIK3CA-associated developmental disorders exhibit distinct classes of mutations with variable expression and tissue distribution. *JCI Insight.* 1:e87623. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.87623>
- Murtoomaki, A., M.K. Uh, Y.K. Choi, C. Kitajewski, V. Borisenko, J. Kitajewski, and C.J. Shawber. 2013. Notch1 functions as a negative regulator of lymphatic endothelial cell differentiation in the venous endothelium. *Development.* 140:2365–2376. <https://doi.org/10.1242/dev.083865>
- Muzumdar, M.D., B. Tasic, K. Miyamichi, L. Li, and L. Luo. 2007. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis.* 45:593–605. <https://doi.org/10.1002/dvg.20335>
- Nadal, M., B. Giraudeau, E. Tavernier, A.P. Jonville-Bera, G. Lorette, and A. Maruani. 2016. Efficacy and Safety of Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors in Vascular Anomalies: A Systematic Review. *Acta Derm. Venereol.* 96:448–452. <https://doi.org/10.2340/00015555-2300>
- Osborn, A.J., P. Dickie, D.E. Neilson, K. Glaser, K.A. Lynch, A. Gupta, and B.H. Dickie. 2015. Activating PIK3CA alleles and lymphangiogenic phenotype of lymphatic endothelial cells isolated from lymphatic malformations. *Hum. Mol. Genet.* 24:926–938. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu505>
- Ozeki, M., M. Funato, K. Kanda, M. Ito, T. Teramoto, H. Kaneko, T. Fukao, and N. Kondo. 2007. Clinical improvement of diffuse lymphangiomatosis with pegylated interferon alfa-2b therapy: case report and review of the literature. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 24:513–524. <https://doi.org/10.1080/08880010701533603>
- Ozeki, M., A. Fujino, K. Matsuoka, S. Nosaka, T. Kuroda, and T. Fukao. 2016. Clinical Features and Prognosis of Generalized Lymphatic Anomaly, Kaposiform Lymphangiomatosis, and Gorham-Stout Disease. *Pediatr. Blood Cancer.* 63:832–838. <https://doi.org/10.1002/psc.25914>
- Risebro, C.A., R.G. Searles, A.A. Melville, E. Ehler, N. Jina, S. Shah, J. Pallas, M. Hubank, M. Dillard, N.L. Harvey, et al. 2009. Prox1 maintains muscle structure and growth in the developing heart. *Development.* 136:495–505. <https://doi.org/10.1242/dev.030007>
- Rivière, J.B., G.M. Mirzaa, B.J. O’Roak, M. Beddaoui, D. Alcantara, R.L. Conway, J. St-Onge, J.A. Schwartzentruber, K.W. Gripp, S.M. Nikkel, et al. Finding of Rare Disease Genes (FORGE) Canada Consortium. 2012. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat. Genet.* 44:934–940. <https://doi.org/10.1038/ng.2331>
- Rodriguez-Laguna, L., K. Ibañez, G. Gordo, S. Garcia-Minaur, F. Santos-Simarro, N. Agra, E. Vallespín, V.E. Fernández-Montaño, R. Martín-Arenas, Á. Del Pozo, et al. 2018. CLAPO syndrome: identification of somatic activating PIK3CA mutations and delineation of the natural history and phenotype. *Genet. Med.* 20:882–889. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.200>
- Sabine, A., Y. Agalarov, H. Maby-El Hajjami, M. Jaquet, R. Hägerling, C. Pollmann, D. Beber, A. Pfenniger, N. Miura, O. Dormond, et al. 2012. Mechanotransduction, PROX1, and FOXC2 cooperate to control connexin37 and calcineurin during lymphatic-valve formation. *Dev. Cell.* 22:430–445. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.020>
- Srinivasan, R.S., M.E. Dillard, O.V. Lagutin, F.J. Lin, S. Tsai, M.J. Tsai, I.M. Samokhvalov, and G. Oliver. 2007. Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. *Genes Dev.* 21:2422–2432. <https://doi.org/10.1101/gad.1588407>
- Timke, C., M.F. Krause, H.C. Oppermann, I. Leuschner, and A. Claviez. 2007. Interferon alpha 2b treatment in an eleven-year-old boy with disseminated lymphangiomatosis. *Pediatr. Blood Cancer.* 48:108–111. <https://doi.org/10.1002/psc.20461>
- Trenor, C.C. III, and G. Chaudry. 2014. Complex lymphatic anomalies. *Semin. Pediatr. Surg.* 23:186–190. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2014.07.006>
- Triana, P., M. Dore, V.N. Cerezo, M. Cervantes, A.V. Sanchez, M.M. Ferrero, M.D. Gonzalez, and J.C. Lopez-Gutierrez. 2017. Sirolimus in the Treatment of Vascular Anomalies. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 27:86–90.
- Truman, L.A., K.L. Bentley, E.C. Smith, S.A. Massaro, D.G. Gonzalez, A.M. Haberman, M. Hill, D. Jones, W. Min, D.S. Krause, and N.H. Ruddle. 2012. Prox1 lymphatic vessel reporter mice reveal Prox1 expression in the adrenal medulla, megakaryocytes, and platelets. *Am. J. Pathol.* 180:1715–1725. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.12.026>
- Wang, J., G. Kilic, M. Aydin, Z. Burke, G. Oliver, and B. Sosa-Pineda. 2005. Prox1 activity controls pancreas morphogenesis and participates in the production of “secondary transition” pancreatic endocrine cells. *Dev. Biol.* 286:182–194. <https://doi.org/10.1016/j.jydbio.2005.07.021>
- Wang, W., H. Wang, X. Zhou, X. Li, W. Sun, M. Dellinger, B.F. Boyce, and L. Xing. 2017. Lymphatic Endothelial Cells Produce M-CSF, Causing Massive Bone Loss in Mice. *J. Bone Miner. Res.* 32:939–950. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3077>
- Yeager, N.D., S. Hammond, J. Mahan, J.T. Davis, and B. Adler. 2008. Unique diagnostic features and successful management of a patient with disseminated lymphangiomatosis and chylothorax. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 30:66–69. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e318159a55a>

## ORIGINAL ARTICLE

# *mTOR* mutations in Smith-Kingsmore syndrome: Four additional patients and a review

G. Gordo<sup>1,2,3</sup> | J. Tenorio<sup>1,2</sup>  | P. Arias<sup>1,2</sup> | F. Santos-Simarro<sup>1,4</sup> | S. García-Miñaur<sup>1,4</sup> | J.C. Moreno<sup>1,2</sup> | J. Nevado<sup>1,5</sup> | E. Vallespin<sup>1,5</sup> | L. Rodriguez-Laguna<sup>1,3</sup> | R. de Mena<sup>1,5</sup> | I. Dapia<sup>1,2</sup> | M. Palomares-Bralo<sup>1,5</sup>  | Á. del Pozo<sup>1,6</sup> | K. Ibañez<sup>1,6</sup> | J.C. Silla<sup>1,6</sup> | E. Barroso<sup>1,2</sup> | V.L. Ruiz-Pérez<sup>1,7</sup> | V. Martínez-Glez<sup>1,3,4</sup>  | P. Lapunzina<sup>1,2,4</sup> 

<sup>1</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Molecular Endocrinology Section, Overgrowth Syndromes Laboratory, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), IdiPAZ, Hospital Universitario la Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

<sup>3</sup>Vascular Malformations Section, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), IdiPAZ, Hospital Universitario la Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

<sup>4</sup>Clinical Genetics Section, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), IdiPAZ, Hospital Universitario la Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

<sup>5</sup>Structural and Functional Genomics Section, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), IdiPAZ, Hospital Universitario la Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

<sup>6</sup>Bioinformatics Section, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), IdiPAZ, Hospital Universitario la Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

<sup>7</sup>IIB, Instituto de Investigación "Alberto Sols", Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

**Correspondence**

Pablo Lapunzina, MD, PhD, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Universidad Autónoma de Madrid, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Paseo de la Castellana 261-28046, Madrid, Spain. Email: pablo.lapunzina@salud.madrid.org; plapunzina@ciberer.es

Víctor Martínez-Glez, MD, PhD, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Universidad Autónoma de Madrid, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Paseo de la Castellana 261-28046, Madrid, Spain. Email: vmartinezglz@salud.madrid.org

Smith-Kingsmore syndrome (SKS) OMIM #616638, also known as MINDS syndrome (ORPHA 457485), is a rare autosomal dominant disorder reported so far in 23 patients. SKS is characterized by intellectual disability, macrocephaly/hemi/megalencephaly, and seizures. It is also associated with a pattern of facial dysmorphism and other non-neurological features. Germline or mosaic mutations of the *mTOR* gene have been detected in all patients. The *mTOR* gene is a key regulator of cell growth, cell proliferation, protein synthesis and synaptic plasticity, and the *mTOR* pathway (PI3K-AKT-*mTOR*) is highly regulated and critical for cell survival and apoptosis. Mutations in different genes in this pathway result in known rare diseases implicated in hemi/megalencephaly with epilepsy, as the tuberous sclerosis complex caused by mutations in *TSC1* and *TSC2*, or the *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS). We here present 4 new cases of SKS, review all clinical and molecular aspects of this disorder, as well as some characteristics of the patients with only brain *mTOR* somatic mutations.

**KEYWORDS**

constitutive mosaicism, germline mosaicism, gonadal mosaicism, macrocephaly, megalencephaly, MINDS syndrome, *mTOR*, Smith-Kingsmore syndrome, somatic mosaicism

The first authors Gema Gordo and Jair Tenorio contributed equally to this study.

The senior authors Víctor Martínez-Glez and Pablo Lapunzina contributed equally to this study.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2017 The Authors. Clinical Genetics published by John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

**Funding information**

Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award number: FEDER FUNDS FIS PI15/01481; "Todos Somos Raros" (Telemaratón TVE promoted by Fundación Isabel Gemio, Federación ASEM, and Federación Española de Enfermedades Raras), Grant/Award number: IP-17

**1 | INTRODUCTION**

Smith-Kingsmore syndrome (SKS) (MIM 616638), also known as MINDS (ORPHA 457485), is a rare syndrome, first described by Smith et al<sup>1</sup> and caused by mutations in the mammalian target of rapamycin (*mTOR*, MIM 601231) gene. The most consistent findings in SKS are intellectual disability (ID), developmental delay, megalencephaly and seizures (Table 1). There is moderate clinical variability, ranging from patients with macrocephaly, mild ID, and no convulsions, to severe forms in patients with intractable epilepsy, megalencephaly, severe ID, and autistic spectrum disorder (ASD). Other non-neurological features include facial dysmorphisms and small thorax.

SKS belongs to the group of "mTORopathies," a term introduced to describe neurological disorders characterized by altered cortical architecture, abnormal neuronal morphology and intractable epilepsy as a consequence of mTOR signalling hyperactivation, providing probably a histopathological substrate for epileptogenesis.<sup>2,3</sup> These mTORopathies-related epilepsies include: SKS, isolated hemimegalencephaly, ganglioglioma, focal cortical dysplasia (FCD), and tuberous sclerosis complex (TSC).<sup>2,4</sup>

Macrocephaly and hemi/megalencephaly—with or without normal cortex—is a rather prevalent clinical feature among different types of vascular and/or overgrowth syndromes caused by germline or post-zygotic mutations in different genes in the PI3K-AKT-mTOR pathway: megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus syndrome (AKT3 and *PIK3R2*),<sup>5,6</sup> megalencephaly-capillary malformation (MCAP; *PIK3CA*),<sup>7</sup> Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome (*PTEN*),<sup>8</sup> Tenorio syndrome (*RNF125*),<sup>9</sup> isolated hemimegalencephaly (*PIK3CA* and *AKT3*),<sup>10</sup> and with syndromes with epilepsy, hemimegalencephaly and/or FCD due to mutations in *DEPDC5*, *NPRL2* and *NPRL3* genes, involved in mTORC1 regulation.<sup>11</sup> Axial skeletal overgrowth is not affected by mutations in *mTOR*, but megalencephaly is clearly a finding.<sup>12</sup> The main differences between the syndromes involved in this pathway are based on: (1) its germinal or somatic origin, causing generalized or segmental distribution patterns as in hemi or megalencephaly, (2) the degree of mosaicism, and (3) the presence of distinctive extra-cerebral manifestations, mostly the vascular malformations, nevi, and adipose overgrowth frequently found in the *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS).<sup>10,13–15</sup>

The *mTOR* gene is a key regulator of cell growth, cell proliferation, protein synthesis and synaptic plasticity. The mTOR pathway is highly regulated and critical for cell survival and apoptosis. It is known that *mTOR* negatively regulates autophagy in response to growth factors, nutritional status and stress responses. Thus, it would appear that impaired autophagy in neurons is directly related to unregulated expression of *mTOR* and that this plays some role in epilepsy.<sup>12</sup> mTORC1 inhibitors, including drugs currently approved for a variety of conditions, are clinically available inducers of autophagy.

The prevalence of SKS, with 23 patients reported so far, is still unknown. We here report on 4 new SKS patients with *mTOR* mutations and review all the clinical characteristics and molecular aspects of this disorder. We also discuss some characteristics of patients with brain somatic mutations in *mTOR* who show some similarities with individuals with SKS.

**TABLE 1** Clinical findings in Smith-Kingsmore syndrome (SKS)

Very common (observed in more than 75% of patients)		
Intellectual disability	24/26	92.3%
Macrocephaly/megalencephaly	24/27	88.9%
Seizures	17/23	73.9%
Frequent (observed in 25%-75% of patients)		
CNS anomalies (other than hemimegalencephaly)	16/24	66.7%
Curly/wavy hair	8/13	61.5%
Ventriculomegaly	13/24	54.2%
Macrosomia at birth/large for gestational age	12/27	44.4%
Speech anomaly	9/27	33.3%
Dysmorphic facial features	9/27	33.3%
Autistic spectrum disorder	8/27	29.6%
Rare (observed in less than 25% of patients)		
Hypotonia	5/27	18.5%
Diastasis recti/herniae	4/27	14.8%
Capillary malformation of the skin	4/27	14.8%
Hypomelanosis/patchy hypopigmentation of skin	4/27	14.8%
Strabismus	4/27	14.8%
Abnormal corpus callosum	4/27	14.8%
Small thorax	4/27	14.8%
Hyperactivity	3/27	11.1%
Café-au-lait spots	3/27	11.1%
Pes planus/talipes	3/27	11.1%
Abnormal gait	3/27	11.1%
Polymicrogyria	2/27	7.4%
Prominent abdomen	2/27	7.4%
Hemangiomas	2/27	7.4%
Iris colobomata	2/27	7.4%
Criptorchidism	2/27	7.4%
Asthma	2/27	7.4%
Lactose intolerance	2/27	7.4%
Hypospadias	1/27	3.7%
Neonatal hypoglycaemia	1/27	3.7%
IgA deficiency	1/27	3.7%
Persistent food allergies	1/27	3.7%
Intestinal polyps	1/27	3.7%

## 2 | PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Patients

All studies in this project were approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario La Paz (reference PI-1919), with informed consent. We retrospectively reviewed the patients enrolled in the Spanish Overgrowth Registry (RESSC),<sup>16</sup> selecting those with macrocephaly. Four patients from 3 families were finally enrolled. Patient 1 had macrocephaly and ID, and the other 3 patients were referred with clinical diagnosis of macrocephaly-capillary malformation.

To update the phenotype in SKS, we performed a retrospective review of the clinical characteristics including the 4 patients described herein, and the 23 patients previously reported to date (Table 2). These patients were ascertained from a series of patients with focal epilepsy, ID, brain anomalies and megalencephaly or hemimegalencephaly.<sup>1,12,17–22</sup> Reported patients with only brain somatic mutations of *mTOR* were also reviewed.<sup>10,17,23–25</sup>

### 2.2 | NGS studies

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes from all patients. DNA was also extracted from saliva, hyperpigmented skin and hypopigmented skin samples from Patient 2.

A deep Next Generation Sequencing (NGS) panel, with an average expected reading depth of  $\times 500$ , was designed to study 20 genes known to cause developmental syndromes characterized by overgrowth and/or vascular anomalies in the form of somatic mosaicism: *mTOR*, *NRAS*, *AKT3*, *PIK3CA*, *FGFR3*, *RASA1*, *TSC1*, *GNAQ*, *PTEN*, *HRAS*, *PTPN11*, *KRAS*, *CCND2*, *AKT1*, *DICER1*, *TSC2*, *NF1*, *MAP3K3*, *PIK3R2*, and *AKT2*. NGS custom panel was designed with NimbleDesign software (Roche NimbleGen, Inc., Pleasanton, CA): hg19 NCBI Build 37.1/GRCh37, targeting >98% of all exons (RefSeq) for these genes. For each sample, paired-end libraries were created according to the standard NGS protocols KAPA HTP Library Preparation Kit for Illumina platforms, SeqCap EZ Library SR and NEXTflex-96 Pre Capture Combo Kit for indexing. The captured DNA samples were sequenced on a NextSeq 500 instrument (Illumina, Inc., San Diego, CA) according to the standard operating protocol.

The analysis of the sequenced reads was performed with 2 different in-house bioinformatic pipelines: germline and mosaic. In the germline pipeline, the reads were filtered and low-quality nucleotides were removed. Bowtie2<sup>26</sup> was used for mapping and local realignment/recalibration was performed around indels to improve possible mapping-related misalignment. The variant discovery was carried out by a combination of GATK Haplotype Caller<sup>27</sup> and LACONV (in preparation) tools.

In the mosaic pipeline, variants were analyzed with independent tools under very low constraints of quality and depth. Variants were identified with samtools mpileup<sup>28</sup> followed by variant calling using bcftools v1.3.<sup>29</sup> The quality per alignment and nucleotide were set to 0.7. Then, this first raw vcf file was annotated with their alternative variant allele fraction (AVAF) and the maximum of alternative variant allele fraction (MAVAF) in those sites with more than 1 alternative allele identified. The variants with AVAF below the threshold were

filtered. In addition, the vcf file was reformatted by splitting the multiallelic sites into these primitives and the variant positions were normalized. Finally, the vcf were enriched with information of the overlapping of each variant in a sample with the remaining samples of the run.

### 2.3 | Sanger sequencing and pyrosequencing

Non-mosaic heterozygous variants and variants present in more than 15% of the reads in the deep-sequencing data were validated by Sanger sequencing in DNA blood samples from patients, parents, and in sperm sample from the father of Patients 3 and 4 (siblings). Primers were previously designed using Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) and SNPs Check3 (<https://secure.ngl.org.uk/SNPCheck/>) tools. Sequencing was performed using polymerase chain reaction standard methods and a 96-capillary ABI 3730xl ADN analyser (Applied Biosystem, Foster, California). Mosaic variants between the 5% and 15% read fraction range were confirmed by pyrosequencing. Primers were designed with the PyroMark software, and pyrosequencing was performed with the PyroMark Q96 MD instrument (Qiagen, Hilden, Germany), according to manufacturer's protocol.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Clinical features in SKS

Clinical features in our 4 new patients with SKS and the review of the 23 patients previously described in the literature up to date, including clinical, radiological and genomic findings, are summarized in Table 2. Facial features in our patients are shown in Figure 1.

Macrocephaly and hemi/megalencephaly—mostly with central nervous system (CNS) magnetic resonance imaging (MRI) findings—were found in 88.9% of individuals with SKS. Mean values of macrocephaly in all reported patients is  $+3.83 (\pm 0.98)$  SD, in the moderate to severe range. Hydrocephalus, ASD, seizures (see below) and attention deficit hyperactivity disorder (any of them) are usually present (Table 1). Generalized hypotonia may be present in small children with SKS. In some cases, only non-specific MRI abnormalities, including thin corpus callosum and/or ventricular dilatation, can be found. FCD seems to be more frequent in patients with brain mosaic mutations in *mTOR* than in patients with SKS.

Convulsions and associated symptoms are constant findings (73.9%). Electroencephalogram (EEG) anomalies includes: right occipitoparietal spikes and slow activity, theta activity intermixed with normal background activity, polyspike waves and slow waves activity, slow and sharp waves during sleep (both diffuse and focal), persistent diffuse sharp and slow wave activity, mild slow background, diffuse and centro-temporal epileptiform discharges, irregular slowing of background rhythms and frequent bursts of generalized slow wave convulsions.

ID is common in SKS, and may be severe, moderate or mild. It could appear alone or in combination with delay or absent speech, as well as distorted articulation.

**TABLE 2** Clinical, radiological and genomic findings in 27 Smith-Kingsmore syndrome (SKS) patients with germline or constitutive mosaic mutations in *mTOR*

	Epi4k Consortium et al <sup>22</sup>				Baynam et al <sup>21</sup>		Mroske et al <sup>19</sup>	
	Smith et al <sup>1</sup>	2013	2015	2015	2015	2015	2015	2015
Year	2013	2013	2015	2015	2015	2015	2015	2015
Origin		Australian aborigine	Australian aborigine	Australian aborigine	Australian aborigine			
Intellectual disability (ID)		Patient 1	Patient 2	Patient 3		Proband		Brother
Age (y)	1.5	1.5	7	3	2	5		23
Gender	F	M	F	M	M	M		M
Weight/height postnatal	N	N	N	N	N	N		N
Megalencephaly/macrocephaly	+	+	+	+	+	+		+
OFC	>+3 SD	>+3 SD	>+3 SD	>+3 SD	>+3 SD	+5 SD		+5 SD
Large for gestational age	-	-	-	+	+	+		+
Autism								
Hyperactivity			+			+		+
Intellectual disability	+		Severe	Severe	Severe	Moderate		+
Speech						Delay		Delay
Seizures	Intractable	+	+	+	+	-		-
Diastasis recti or umbilical herniae	+	+	+	+	+			
Other	Face: NSLF, large anterior fontanelle, frontal bossing, midface hypoplasia, small chin. Hypertelorism, downslanting palpebral fissures, depressed nasal bridge. Full and widely spaced brows. Thick eyelashes. Other: hypotonia. Hypoglycemia and thrombocytopenia, sacral cleft, umbilical hernia, hands had a trident appearance with short proximal phalanges.	Seizures: infantile spasms and myoclonic epilepsy.	Face NSLF8. Abdominal region: prominent. Hepatomegaly at 20 wk gestation. Renal asymmetry. Skin: CLS. Other: Rocker-bottom heels, pes planus, broad feet, an ossifying anterior fontanel, large ear lobes. Aortic sinus to right atrial fistula.	Face NSLF8. Chest: small in infancy. Abdominal region: prominent. Skin: CLS. Deep palmar and plantar creases. Other: IgA deficiency.	Face NSLF8. Chest: small in infancy. Abdominal region: prominent. Skin: CLS. Deep palmar and plantar creases.	Eyes: 3, genitalia: 5, other: 6	Eyes: 4, genitalia: 5, Other: 7	
CNS image	Callosal dysgenesis and mild dilatation of the posterior horns of the lateral ventricles.	Mild prominence of the ventricular system, hypogenesis of the body and the splenium of the corpus callosum, generalized white	Megalencephaly, perisylvian polymicrogyria, mild prominence of the lateral ventricles, moderate hypogenesis	Megalencephaly	Megalencephaly			Mild ventricular prominence, hypoplastic CC, small medulla

TABLE 2 (Continued)

	Smith et al <sup>1</sup>	Epi4k Consortium et al <sup>22</sup>	Baynam et al <sup>21</sup>	Baynam et al <sup>21</sup>	Baynam et al <sup>21</sup>	Mroske et al <sup>19</sup>	Mroske et al <sup>19</sup>
Genomic change	c.4448G>T	c.4785G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A
Protein change	p.Cys1483Phe	p.Met1595Ile	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys
Type of mutation	Probably GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF
Type of inheritance	de novo	de novo	Maternal gonadal mosaicism	Maternal gonadal mosaicism	Maternal gonadal mosaicism	Gonadal mosaicism	Gonadal mosaicism
Year	2016	2016	2016	2016	2015	2015	2016
Origin							Danish
ID	LR12-379a1	LR12-379a2	LR14-012	LR15-065	Case 1	Case 2	Patient 7
Age (y)	17	17	3				8
Gender	M	M	F	M			F
Weight/height postnatal	N	N	N	N			
Megalencephaly/macrocephaly	+	+	+	+	+	+	+
OFC							+3.31 SD
Large for gestational age					+	+	
Autism	+	+	+	+	+	+	
Hyperactivity							
Intellectual disability	+	+	+	Mild	+	+	
Speech	Absent	Absent					
Seizures	+	+			+	+	+
Diastasis recti or umbilical herniae					-	-	
Other		Skin: 1	Abdominal region: 2	Face: dysmorphic facial features. Skin: hypomelanosis of Ito.	Face: dysmorphic facial features. Skin: hypomelanosis of Ito.	Face: dysmorphic facial features. Skin: hypomelanosis of Ito.	
CNS image	Megalencephaly	Megalencephaly	Mild dysmyelination mild ventriculomegaly	Subtle undersulcation, mild dysmyelination, moderate ventriculomegaly	Hemimegalencephaly	Hemimegalencephaly	
Genomic change	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.4448G>A	c.5494G>A
Protein change	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Cys1483Tyr	p.Ala1832Thr



TABLE 2 (Continued)

Type of inheritance	Moller et al <sup>17</sup>		Moller et al <sup>17</sup>		Moller et al <sup>17</sup>		Moller et al <sup>17</sup>		Moller et al <sup>17</sup>	
	Germline maternal	Transmitted to daughter	Germline de novo	Germline de novo (twin pair)	Germline de novo (twin pair)	Germline de novo (twin pair)	Germline de novo (twin pair)	Germline de novo (twin pair)	Germline de novo	Germline de novo
	Moosa et al <sup>12</sup>		P1	P2	P3	P3	P3	P3	P4	P4
Year	2017	2017	2016	2016	2016	2016	2016	2016	2016	2016
Origin	Germany	Germany	Spain	Spain	Spain	Spain	Spain	Spain	Spain	Spain
ID	Index	Younger brother	OGS771	OGS1464	OGS1092	OGS1092	OGS1092	OGS1092	OGS1093	OGS1093
Age (years)	7	2.5	16	8	9	9	9	9	10.5	10.5
Gender	F	M	M	M	F	F	F	F	M	M
Weight/height postnatal			Tall	N	N	N	N	N	N	N
Megalencephaly/macrocephaly	+	+	+	+	Progressive	Progressive	Progressive	Progressive	Progressive	Progressive
OFC	+4.9 SD	+4 SD	>+4 SD	+4 SD	>+3 SD	>+3 SD	>+3 SD	>+3 SD	>+6.5 SD	>+6.5 SD
Large for gestational age	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Autism			+		-	-	-	-	-	-
Hyperactivity			+		-	-	-	-	-	-
Intellectual disability	+	+	Mild-moderate	+	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe
Speech			Delay		Delay	Delay	Delay	Delay	Delay	Delay
Seizures			-	+	-	-	-	-	-	-
Diastasis recti or umbilical herniae			-	-	-	-	-	-	-	-
Other	Abdominal region: multiple polyps in the ileum, cecum, and colon. Bilateral cystic kidneys (inherited from his father).		Face: deep set eyes. Triangular, small chin. Other: large hands, camptodactyly.	Face: hypertelorism, open mouth appearance and smooth philtrum. Skin: hyperpigmentation following Blaschko lines in arms and legs. Other: Strabismus. Hypotonia, neonatal hypoglycaemia. Hypospadias.	Face: facial capillary malformation, smooth philtrum. Skin: capillary malformation in shoulders, and areas of hypopigmentation and hyperpigmentation. Other: Strabismus. Delayed bone age, hypotonia.	Face: smooth philtrum, posteriorly rotated ears. Skin: reticular capillary malformation, peri-axillary capillary malformation. Other: Bilateral talipes equinovarus, hypotonia, decreased subcutaneous fat, delayed bone age.	Face: smooth philtrum, posteriorly rotated ears. Skin: reticular capillary malformation, peri-axillary capillary malformation. Other: Bilateral talipes equinovarus, hypotonia, decreased subcutaneous fat, delayed bone age.	Face: smooth philtrum, posteriorly rotated ears. Skin: reticular capillary malformation, peri-axillary capillary malformation. Other: Bilateral talipes equinovarus, hypotonia, decreased subcutaneous fat, delayed bone age.	Face: smooth philtrum, posteriorly rotated ears. Skin: reticular capillary malformation, peri-axillary capillary malformation. Other: Bilateral talipes equinovarus, hypotonia, decreased subcutaneous fat, delayed bone age.	Face: smooth philtrum, posteriorly rotated ears. Skin: reticular capillary malformation, peri-axillary capillary malformation. Other: Bilateral talipes equinovarus, hypotonia, decreased subcutaneous fat, delayed bone age.
CNS image	Mildly dilated ventricles		Megalencephaly	Ventriculomegaly, gliosis, cavum vergae, periventricular venous malformation	N	N	N	N	Ventriculomegaly, hydrocephaly	Ventriculomegaly, hydrocephaly
Genomic change	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.4448G>A	c.6605T>G	c.6605T>G	c.6605T>G	c.6605T>G	c.6605T>G	c.6605T>G
Protein change	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Cys1483Tyr	p.Phe2202Cys	p.Phe2202Cys	p.Phe2202Cys	p.Phe2202Cys	p.Phe2202Cys	p.Phe2202Cys
Type of mutation	GOF	GOF	GOF	GOF	Probably GOF	Probably GOF	Probably GOF	Probably GOF	Probably GOF	Probably GOF
Type of inheritance	Gonadal mosaicism	Gonadal mosaicism	Germline de novo	Mosaic in all studied tissues (blood, saliva, skin)	Gonadal mosaicism (probably maternal)	Gonadal mosaicism (probably maternal)	Gonadal mosaicism (probably maternal)	Gonadal mosaicism (probably maternal)	Gonadal mosaicism (probably maternal)	Gonadal mosaicism (probably maternal)

Abbreviations: GOF, gain-of-function. OFC, occipitofrontal circumference. NSLF, Noonan syndrome-like face. CLS, Cafe-au-lait lesion(s). CNS, central nervous system. CC, corpus callosum.

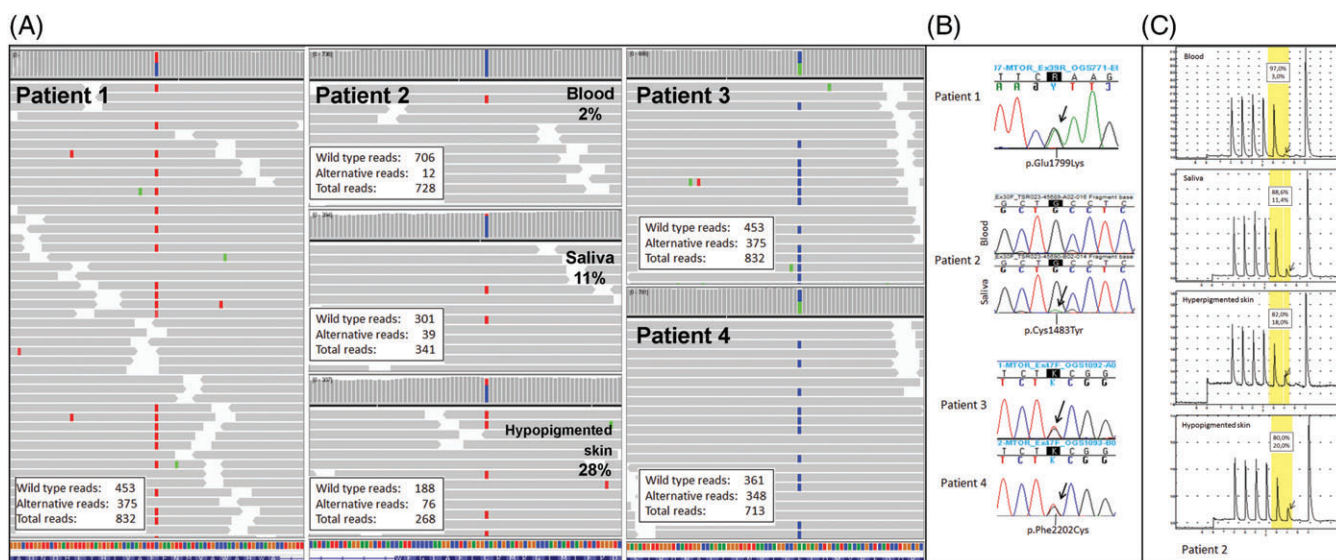




**FIGURE 1** Facial features of patients with Smith-Kingsmore syndrome. Patients 1, 2, 3 and 4 show mixed characteristics of the 2 different phenotypes or *gestalts* described so far: macrocephaly (P1, P2, P3, P4), large forehead (P2, P3, P4), bitemporal narrowing (P1, P3, P4), hypertelorism (P2, P3, P4), downslanting palpebral fissures (P4), an open mouth appearance (P1, P2, P4), long philtrum (P3, P4), and triangular face with pointed chin (P1, P3, P4). Uncommon clinical features included facial capillary malformation (slightly appreciable in P3), deep set eyes (P1), strabismus (P3), smooth philtrum (P2, P3, P4) and posteriorly rotated ears (P4)

Some patients exhibit, when reported, a pattern of facial dysmorphology. At least 2 different phenotypes or *gestalts* have been described. One group of patients present a Noonan syndrome-like aspect, including curly hair, frontal bossing, tall forehead, downslanting palpebral fissures, bitemporal narrowing, an open mouth appearance, a prominent and long philtrum, flat nasal bridge,

macrostomia, an open mouth posture, hypertelorism, and a short nose with a depressed nasal bridge. Other individuals show only large forehead, macrocephaly and triangular face, with pointed chin, or a face without a constant pattern or typical gestalt (Figure 1). The neck may be short or normal. Only a few patients have a webbed neck.



**FIGURE 2** Next-generation sequencing results and variants validation by Sanger sequencing or pyrosequencing. (A) *de novo* *mTOR* heterozygous variant c.5395G>A (p.Glu1799Lys) in Patient 1, constitutive mosaic variant c.4448G>A (p.Cys1483Tyr) in Patient 2 with different mosaicism levels in blood, saliva and hypopigmented skin, and the heterozygous variant c.6605T>G (p.Phe2202Cys) in Patients 3 and 4. (B) Sanger sequencing showing variants from Patients 1 to 4. For Patient 2, Sanger from saliva sample shows a very low peak of A (panel B: Patient 2, black arrow) representing the low mosaicism. (C) Pyrosequencing results from different sample types in Patient 2. Black arrows show different mosaicism levels in each tissue (blood 3%, saliva 11.4%, hyperpigmented skin 18% and hypopigmented skin 20%)



TABLE 3 (Continued)

Type of mutation	Lim and Lee <sup>23</sup>	Nakashima et al <sup>24</sup>	Nakashima et al <sup>24</sup>	Nakashima et al <sup>24</sup>	Nakashima et al <sup>24</sup>	Nakashima et al <sup>24</sup>	Nakashima et al <sup>24</sup>	Nakashima et al <sup>24</sup>	Moller et al <sup>17</sup>	Moller et al <sup>17</sup>	Moller et al <sup>17</sup>	Moller et al <sup>17</sup>	Moller et al <sup>17</sup>	Moller et al <sup>17</sup>
Type of inheritance	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF
	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic

Abbreviations: ACS, abnormal cerebral sulcation; AGWM, abnormality of the gray-white matter; ASz, atonic seizures; BC, balloon cells; BCL, balloon cells-like; CD, cortical dyslamination; CEM, clonic eye movements; CN, cytomegalic neuron; CPS, complex partial seizure; Csz, clonic seizure; DCD, diffuse cortical dysplasia; DN, dysmorphic neurons; ED, eye deviation; EN, ectopic neurons; F, female; FCD, focal cortical dysplasia; FDS, focal dyscognitive seizures; GE, gestural automatism; GOF, gain-of-function; IED, interictal epileptiform discharges; LFPF, left fronto-parietal focus; LHD, left head deviation; LOC, loss of consciousness; M, male; NA, not applicable; NSz, nocturnal seizures; RHD, right hand dystonia; sGTCS, secondarily generalized tonic-clonic seizure; sz, seizure; TSz, tonic seizures; VDLCH, volume decreased of the left cerebral hemisphere.

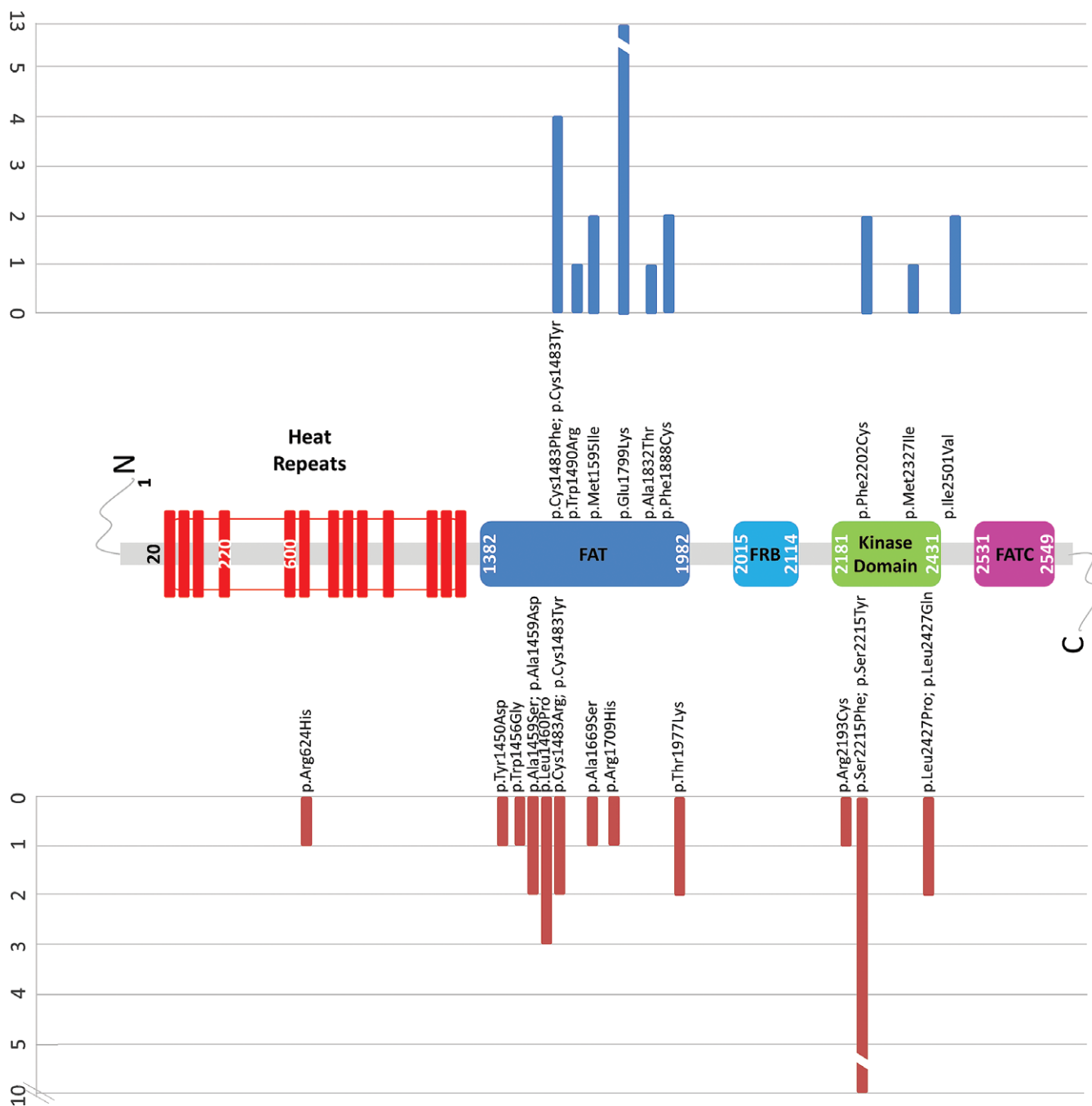
Some patients had capillary malformations—similar to those observed in MCAP—hemangiomas, hepatic vascular malformations, and a small thorax with protruding abdomen. Unlike some overgrowth syndromes, visceromegaly is not common. Cryptorchidism has been observed only in 2 siblings, and one patient also had hypospadias. Multiple intestinal polyps described by Moosa et al in a 7-year-old brother<sup>12</sup> should be taken into account in SKS as reported patients may not have been evaluated for this or may not be old enough to have developed polyps yet.

### 3.2 | Molecular results

There is no clear genotype-phenotype correlation in either the 27 patients with SKS or in the 27 cases described with somatic brain alteration. The variants described are located along all exons of *mTOR*. However, there are some hotspots: the c.5395G>A;p.Glu1799Lys gain-of-function (GOF) variant affecting the FRAP-ATM-TTRAP (FAT) domain of the protein has been detected in 48.1% (13/27) of SKS patients (Figure 2, Table 2), and in cases with brain somatic *mTOR* variants the most frequently affected amino acid is the serine at position 2215 (p.Ser2215Phe and p.Ser2215Tyr), found in 37% (10/27) of the patients (Table 3). The remaining patients with SKS or somatic alterations had different less or not recurrent mutations, mostly affecting the FAT (22/31, 71.0%) and kinase (6/31, 19.4%) domains of the protein (Figure 3). No mutations have been described in the FKBP12-rapamycin-binding (FRB) or C-terminal FAT (FATC) domains, neither in SKS nor in somatic cases. The penetrance in SKS seems to be 100% as all patients with a germline or mosaic *mTOR* mutation have had clinical findings; however, this may change in the future due to current ascertainment bias.

Germline *mTOR* mutations have been found in 92.6% (25/27) of the patients with SKS. One of the patients reported by Ghahramani, as well as Patient 2 (P2) described in this study, had constitutive, mosaic *mTOR* mutations, because the mutated allele was detected in low percentages in all tissues studied, including blood. Case 2 from Ghahramani showed increased abundance of the mutant allele in the affected skin (36%) vs blood (1%).<sup>20</sup> In our study, Patient 2 showed by NGS the mutant allele in 2% (12/720) of the reads in blood sample, 11% (39/341) in saliva, 18% (only by pyrosequencing) in hyperpigmented skin, and 28% (76/268) in hypopigmented skin, all confirmed by pyrosequencing (Figure 2).

In 9 out of 27 SKS patients (33.3%) gonadal mosaicism has been suspected. In the case of the family studied by Baynam et al, the mutation p.Glu1799Lys was transmitted in the mother's germline, as all 3 children had different fathers.<sup>21</sup> In the family reported by Mroske et al, the mutation p.Glu1799Lys found in 2 siblings (of 6 and 23 years) was not detected in blood sample of either parent.<sup>19</sup> In the family reported by Moosa et al, high-depth sequencing of parental blood samples did not detect the presence of mosaicism for the mutation p.Glu1799Lys, which could be localized in the chromosome of paternal origin.<sup>12</sup> In the family described herein the mutation p.Phe2202Cys was detected in blood samples from the 2 siblings, and was not present in blood samples from either parent or sperm sample from the father, thus maternal gonadal mosaicism is suspected.



**FIGURE 3** Germline mutations described in *mTOR* in patients with Smith-Kingsmore syndrome (upper panel, blue bars) and somatic mutations in patients with only brain involvement (lower panel, red bars). Data represent the localization and the frequency for each *mTOR* mutation. N: N terminus; C: C terminus. Note that the vast majority of germline mutations (blue bars) clustered in the FAT and kinase domains

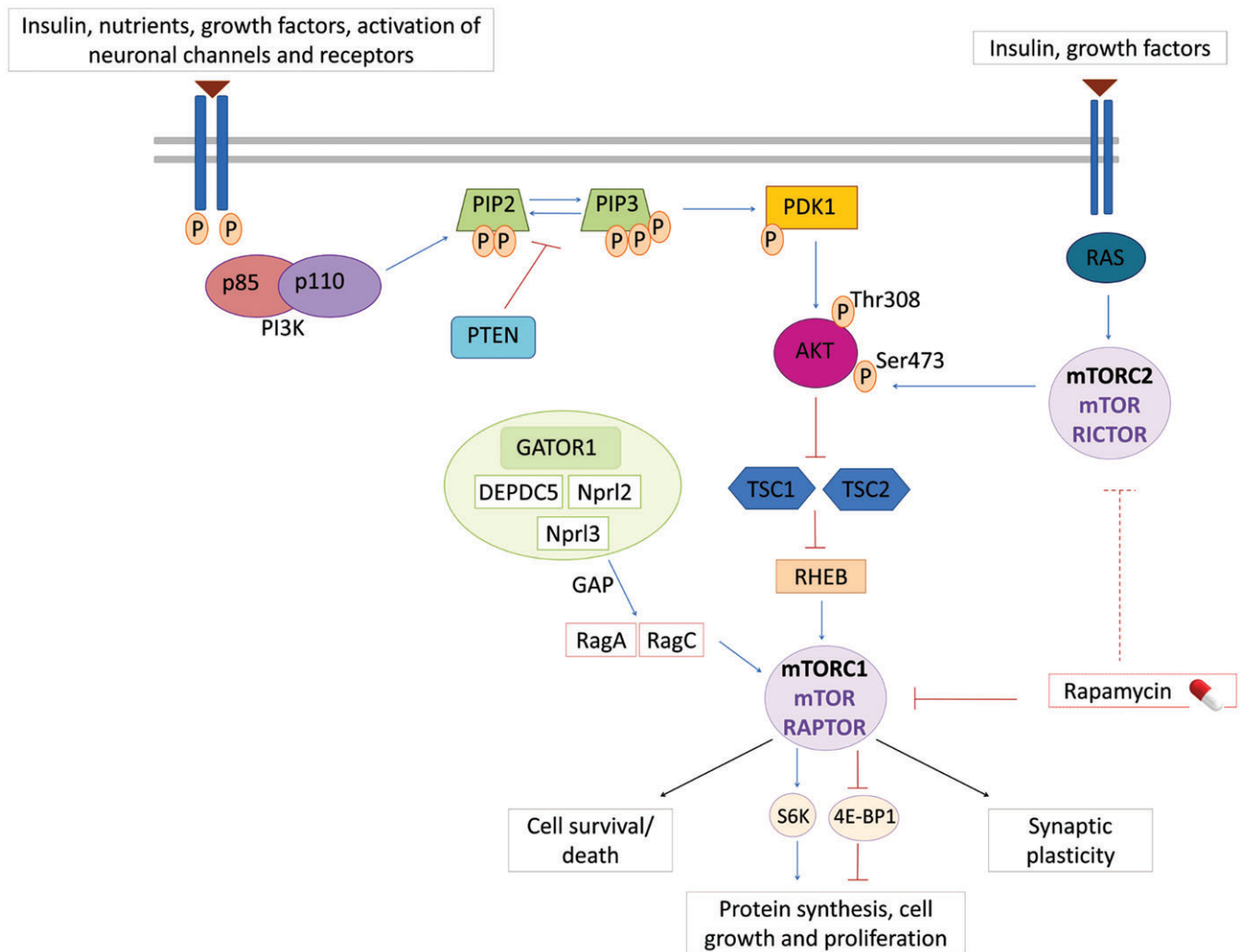
## 4 | DISCUSSION

SKS is a rare, recently described disorder of the mTOR pathway. We report 4 new patients, review the literature for previously published cases of SKS, and compare them with reported cases of brain somatic *mTOR* variants.

SKS belongs to the group of “mTORopathies,” which also includes patients with *mTOR* somatic mutations—as tissue mosaicism—including neoplastic tissues (Table 3), and patients with mutations in other mTOR regulatory genes (eg, *TSC1*, *TSC2*, *AKT3*,

*DEPDC5*) (Figure 4). We have decided to maintain the eponym SKS only for patients with *mTOR* mutations present in all tissues, either germinal or as a constitutive mutation present in mosaic form, therefore present in all cell types but not in 100% of the cells, to which hereafter we will call “constitutive mosaicism.”

Analysing the 4 patients described here and the 23 cases of SKS previously reported in the literature, we have seen that the major diagnostic features of SKS are ID (92.3%), macrocephaly/megalencephaly or hemimegalencephaly (88.9%) and seizures (73.9%). Non-neurological symptoms are also common, and a facial gestalt is



**FIGURE 4** The PI3K/PTEN-mTOR pathway regulating cell growth and proliferation. mTOR is activated by signalling through the PI3K-Akt pathway. PTEN, TSC1, and TSC2 act as negative regulators of the mTOR pathway, and removal or loss-of-function mutations lead to hyperactivation of mTOR. mTOR complex 1 (mTORC1) signalling requires activation of the adaptor protein Raptor, and mTOR complex 2 (mTORC2), which is largely insensitive to acute rapamycin treatment, requires activation of the Rictor protein. GATOR1: GAP activity toward Rags (GATOR) complex is composed by Depdc5, Npr12 and Npr13. DEPDC5 along with TSC1 and TSC2, acts as a negative regulator of mTORC1. Both TSC1 and TSC2 provide critical regulation of mTORC1 through the GTPase-activating protein (GAP) activity of the TSC on the Rag GTPases. Similarly, the GATOR1 complex provides critical regulation of mTORC1 through its GAP activity on the Rag GTPases. Loss of either of these protein complexes through loss of any one of their critical protein components leads to high-level activation of mTORC1, and downstream effects on anabolic processes, including synthesis of all components needed for organelle synthesis, protein translation, and an increase in cell size

variably present and can include some Noonan-like facial features and an open mouth appearance. Nevertheless, because the 23 patients previously described were ascertained from a series of patients with focal epilepsy, ID, brain anomalies and megalencephaly or hemimegalencephaly, there could be a bias toward neurological phenotypes, giving less importance, or not reporting, other clinical manifestations more frequently described in (germline or somatic) syndromes of the PI3K-AKT-mTOR pathway. Remarkably, 3 of the 4 patients described here were referred with an initial diagnosis of MCAP, showing common features in patients with somatic *PIK3CA* mutations (nevus, skin hyperpigmentation, etc.). Thus, *mTOR* mutations should be considered in those patients with phenotypic overlap with the *PIK3CA* spectrum or other syndromes within this pathway. A list of relatively common findings can be found in Table 1.

The variants in *mTOR* in patients with SKS are distributed all over the gene, and there is great phenotypic variability within patients showing the same mutation, even among those with germline mutations. As with most vascular and/or overgrowth syndromes within the differential diagnosis, all *mTOR* mutations reported in patients with SKS cause GOF in the pathway. However, there are no clear genotype-phenotype correlations. Mutations in the FAT domain are frequent, especially the recurrent variant p.Glu1799Lys, detected in 48.1% of the patients with SKS. It has been functionally showed that some mutations in the FAT domain, especially the variant Cys1483Phe, detected in 3/27 patients with SKS and 2/27 patients with only brain *mTOR* somatic mutations, may decrease the binding of the mTOR endogenous inhibitor Deptor. This suggests that mutations in the FAT protein domain could increase mTOR activity by a decrease in its inhibition; still, it cannot be ruled out

that these mutations, as well as mutations outside the FAT domain, generate an increase of mTOR kinase activity.<sup>30</sup>

Gonadal mosaicism, both of maternal and paternal origin, seems to be highly common in SKS (33.3%), which has implications for genetic counselling. Specifically, a relatively high recurrence risk, compared to de novo mutations, should be considered, although precise recurrence risks cannot currently be provided. A recent hypothesis proposed that the *mTOR* GOF mutation p.Glu1799Lys—present in the 3 families with gonadal mosaicism described then—represents a mutational hotspot in somatic cells (eg, germline and colorectal tissues)<sup>12</sup>. However, these figures may change in the future due to current ascertainment bias.

Germinal mutations, either de novo, inherited from affected parents or due to gonadal mosaicism, were present in 92.6% of the patients with SKS. However, 2 of the 27 patients with SKS have mosaic *mTOR* mutations in all tissues studied, which has important implications for accurate molecular diagnosis (traditional techniques do not detect low mosaicism) and for genetic counselling (ie, recurrence risk and follow-up). It has been suggested that the percentage of mosaicism in somatic mutations could be correlated with the extent of the cerebral malformation,<sup>18</sup> but this is not the case in all patients. Some patients with germinal mutations only present neurological symptoms and some do not show cerebral malformations, in contrast to reported individuals with somatic (Table 3) mutations.<sup>17</sup>

These differences could be explained if germline mutations were less activating than somatic mutations, or by the undetected presence of other affected genes, either with germinal or somatic involvement.<sup>17</sup> Perhaps a combination of these two lies behind the lack of correlation between genotype and phenotype. Different *mTOR* mutations could have different effects on the pathway, especially if it is already differentially modulated by other variant/s in other gene/s. In addition, clarifying these aspects could be of great importance for the use of mTOR inhibitors such as rapamycin, as it efficiently inhibits mTORC1 but not mTORC2, two complexes with different downstream functions (Figure 4). A recent study in renal cell carcinomas reported that although mutations in the FAT domain of *mTOR* led to an increase in both mTORC1 and mTORC2 activities, several of these mutations showed residual mTOR kinase activity after treatment with rapamycin at clinically relevant doses.<sup>31</sup> More studies on the effects of different *mTOR* mutations, as well as on other types of small molecules able to modulate the PI3K/AKT/mTOR pathway, are needed.

Diagnosis in SKS is suspected on the clinical findings and is molecularly confirmed with the detection of germline or constitutive mosaic mutations in *mTOR*. Due to the wide differential diagnosis, as well as to the possibility of mosaicism—with variable alternative allele fractions depending on the studied tissue—we recommend an approach based on the use of deep coverage NGS, testing all genes in the differential diagnosis. Consistent with the gain of function mutations observed in SKS, microdeletions of the gene have not been reported. No biochemical or serologic pathognomonic markers have been documented in patients with SKS. Management in SKS includes treatment of epilepsy and multidisciplinary support. Possible future treatments with rapamycin, or other mTOR inhibitors, may be promising for the prevention of neurocognitive manifestations, including epilepsy, but still needs to be tested.<sup>32</sup>

In conclusion, SKS, caused by germline or mosaic mutations in the *mTOR* gene, is a recently described and clinically discernible disorder characterized mainly by ID, macrocephaly/hemi/megalencephaly, and seizures. Facial dysmorphism and other non-neurological manifestations, may also provide diagnostic clues in some individuals. However, there is a high phenotypic overlap with other syndromes associated with the PI3K-AKTmTOR pathway (ie, MCAP). Since the best tool to make a clinical diagnosis is to think about a specific diagnostic possibility, this paper presents for the first time an in-depth review of this rare disease, which may help not only in the improvement of the clinical diagnosis but also in the diagnostic approach. We have also confirmed mosaic *mTOR* mutations present in all studied tissues (including blood) as a cause in SKS, which have consequences in terms of phenotype and diagnosis. Similarly, the review of all available aspects to date may also be of interest for further clinical management, follow-up, and therapeutic approaches (ie, mTOR inhibitors) on this group of patients.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the project IP-17 from the call “Todos Somos Raros” (Telemaraton TVE promoted by Fundación Isabel Gemio, Federación ASEM, and Federación Española de Enfermedades Raras), and co-financed by ISCIII, FEDER FUNDS FIS PI15/01481.

## Conflict of interest

Nothing to declare.

## ORCID

J. Tenorio  <http://orcid.org/0000-0002-5308-2316>

M. Palomares-Bralo  <http://orcid.org/0000-0002-2727-7654>

V. Martinez-Glez  <http://orcid.org/0000-0002-4680-881X>

P. Lapunzina  <http://orcid.org/0000-0002-6324-4825>

## REFERENCES

1. Smith LD, Saunders CJ, Dinwiddie DL, et al. Exome sequencing reveals de novo germline mutation of mammalian target of rapamycin (MTOR) in a patient with megalencephaly and intractable seizures. *J Genomes Exomes*. 2013;2:10.
2. Citraro R, Leo A, Constanti A, et al. mTOR pathway inhibition as a new therapeutic strategy in epilepsy and epileptogenesis. *Pharmacol Res*. 2016;107:333–343.
3. Curatolo P, Moavero R. mTOR inhibitors as a new therapeutic option for epilepsy. *Expert Rev Neurother*. 2013;13:627–638.
4. Crino PB. mTOR: a pathogenic signaling pathway in developmental brain malformations. *Trends Mol Med*. 2011;17:734–742.
5. Mirzaa G, Timms AE, Conti V, et al. PIK3CA-associated developmental disorders exhibit distinct classes of mutations with variable expression and tissue distribution. *JCI Insight*. 2016;1(9):e87623.
6. Mirzaa GM, Conway RL, Gripp KW, et al. Megalencephaly-capillary malformation (MCAP) and megalencephaly-polydactyly-polymicrogyria-hydrocephalus (MPPH) syndromes: two closely related disorders of brain overgrowth and abnormal brain and body morphogenesis. *Am J Med Genet A*. 2012;158A:269–291.
7. Keppler-Noreuil KM, Rios JJ, Parker VE, et al. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria,

- differential diagnosis, and evaluation. *Am J Med Genet A*. 2015;167A:287–295.
8. Eng C. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome. 2001 Nov 29 [Updated 2016 Jun 2]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*<sup>®</sup>[Internet]. Seattle, WA: University of Washington, Seattle; 1993-2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1488/>.
  9. Tenorio J, Mansilla A, Valencia M, et al. A new overgrowth syndrome is due to mutations in RNF125. *Hum Mutat*. 2014;35:1436–1441.
  10. Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, et al. De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat Genet*. 2012;44:941–945.
  11. Baldassari S, Licchetta L, Tinuper P, et al. GATOR1 complex: the common genetic actor in focal epilepsies. *J Med Genet*. 2016;53:503–510.
  12. Moosa S, Bohrer-Rabel H, Altmuller J, et al. Smith-Kingsmore syndrome: a third family with the MTOR mutation c.5395G>A p. (Glu1799Lys) and evidence for paternal gonadal mosaicism. *Am J Med Genet A*. 2017;173:264–267.
  13. Parrini E, Conti V, Dobyns WB, et al. Genetic basis of brain malformations. *Mol Syndromol*. 2016;7:220–233.
  14. Riviere JB, Mirzaa GM, O'Roak BJ, et al. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet*. 2012;44:934–940.
  15. Poduri A, Evrony GD, Cai X, et al. Somatic activation of AKT3 causes hemispheric developmental brain malformations. *Neuron*. 2012;74:41–48.
  16. Lopez-Gutierrez JC, Lapunzina P. Capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation of the face and neck, asymmetry and partial/generalized overgrowth (CLAPO): report of six cases of a new syndrome/association. *Am J Med Genet A*. 2008;146A:2583–2588.
  17. Moller RS, Weckhuysen S, Chipaux M, et al. Germline and somatic mutations in the MTOR gene in focal cortical dysplasia and epilepsy. *Neurol Genet*. 2016;2:e118.
  18. Mirzaa GM, Campbell CD, Solovieff N, et al. Association of MTOR mutations with developmental brain disorders, including megalencephaly, focal cortical dysplasia, and pigmentary mosaicism. *JAMA Neurol*. 2016;73:836–845.
  19. Mroske C, Rasmussen K, Shinde DN, et al. Germline activating MTOR mutation arising through gonadal mosaicism in two brothers with megalencephaly and neurodevelopmental abnormalities. *BMC Med Genet*. 2015;16:102.
  20. Ghahramani NK, Ghahremani S, Lee H, Strom S, Deignan J, Grody W, Nelson S, Vilain E, Martinez-Agosto J. Activating mutations in mTOR cause human overgrowth associated with macrocephaly, intellectual disability, and distinct dysmorphic features. ACMG Annual Clinical Genetics Meeting, Salt Lake City, Utah, 2015.
  21. Baynam G, Overkov A, Davis M, et al. A germline MTOR mutation in Aboriginal Australian siblings with intellectual disability, dysmorphism, macrocephaly, and small thoraces. *Am J Med Genet A*. 2015;167:1659–1667.
  22. Epi4K Consortium, Epilepsy phenome/genome project, Allen AS, et al. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*. 2013;501:217–221.
  23. Lim JS, Lee JH. Brain somatic mutations in MTOR leading to focal cortical dysplasia. *BMB Rep*. 2016;49:71–72.
  24. Nakashima M, Saitsu H, Takei N, et al. Somatic mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. *Ann Neurol*. 2015;78:375–386.
  25. Leventer RJ, Scerri T, Marsh AP, et al. Hemispheric cortical dysplasia secondary to a mosaic somatic mutation in MTOR. *Neurology*. 2015;84:2029–2032.
  26. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9:357–359.
  27. Pirooznia M, Kramer M, Parla J, et al. Validation and assessment of variant calling pipelines for next-generation sequencing. *Hum Genomics*. 2014;8:14.
  28. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*. 2011;27:2987–2993.
  29. J LHHBDPMSM. bcftools—utilities for variant calling and manipulating VCFs and BCFs. The MIT License. Genome Research Ltd.
  30. Grabiner BC, Nardi V, Birsoy K, et al. A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discov*. 2014;4:554–563.
  31. Ghosh AP, Marshall CB, Coric T, et al. Point mutations of the mTOR-RHEB pathway in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6:17895–17910.
  32. Clossen BL, Reddy DS. Novel therapeutic approaches for disease-modification of epileptogenesis for curing epilepsy. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1863:1519–1538.
  33. D'Gama AM, Geng Y, Couto JA, et al. Mammalian target of rapamycin pathway mutations cause hemimegalencephaly and focal cortical dysplasia. *Ann Neurol*. 2015;77:720–725.

**How to cite this article:** Gordo G, Tenorio J, Arias P, et al. mTOR mutations in Smith-Kingsmore syndrome: Four additional patients and a review. *Clin Genet*. 2018;93:762–775. <https://doi.org/10.1111/cge.13135>

## SHORT REPORT

# Constitutional mosaicism in *RASA1*-related capillary malformation-arteriovenous malformation

Gema Gordo<sup>1</sup> | Lara Rodriguez-Laguna<sup>1</sup> | Noelia Agra<sup>1</sup> | Pilar Mendez<sup>2</sup> | Marta Feito<sup>3</sup> | Pablo Lapunzina<sup>4,5</sup>  | Juan C. Lopez-Gutierrez<sup>6</sup> | Victor Martinez-Glez<sup>1,4,5</sup> 

<sup>1</sup>Vascular Malformations Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, INGEMM-IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Unidad de Genética, Servicio de Inmunología y Genética, Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz, Badajoz, Spain

<sup>3</sup>Department of Dermatology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Clinical Genetics Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, INGEMM-IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain

<sup>6</sup>Vascular Anomalies Center-Plastic Surgery, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

## Correspondence

Victor Martinez-Glez, INGEMM-Hospital Universitario La Paz., Paseo La Castellana 261, Edificio Bloque Quirúrgico Planta -1, 28046 Madrid, Spain.  
Email: vmartineglez@salud.madrid.org

## Funding information

Instituto de Salud Carlos III, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Grant/Award Number: PI17/00519

Capillary malformation-arteriovenous malformation (CM-AVM) is caused by germline *RASA1* and *EPHB4* alterations. *RASA1* intralesional second hits have also been reported. Here we report *RASA1* constitutional mosaicism, defined here as the presence of a mosaic variant in all cell types of an individual, in two patients with CM-AVM. High-throughput sequencing was used to search for *RASA1* pathogenic variants in blood samples from two unrelated patients with CM-AVM. An affected tissue sample from one of the patients was also analyzed. Both patients showed different nonsense *RASA1* variants in mosaic, ranging from 7% to 21.5%, in blood samples and in the corresponding affected tissue sample from one of the patients. In conclusion, we report for the first time the presence of *RASA1* constitutional mosaicism in CM-AVM. Constitutional mosaicism has implications for accurate molecular diagnosis and recurrence risk and helps to explain the great phenotypic variability in CM-AVM.

## KEYWORDS

capillary malformation-arteriovenous malformation, constitutional mosaicism, *RASA1*

## 1 | INTRODUCTION

Capillary malformation-arteriovenous malformation (CM-AVM; MIM#608354) is characterized by multiple, small, round-to-oval capillary malformations (CMs) with a reddish-brown to pink appearance often showing white surrounding halos. One-third of the patients also have fast-flow arteriovenous malformations (AVMs) and arteriovenous fistulas (AVFs) in soft tissue, bone, muscle, spine, and brain.<sup>1-3</sup> When multiple or single large CMs with multiple underlying subcutaneous and intramuscular AVFs are associated with overgrowth of a single affected extremity, the condition is known as Parkes Weber syndrome (MIM#608355).

Germline-inactivating variants in the *RASA1* gene have been identified as causing the pathology,<sup>3</sup> and are detected in about 50%-85% of the patients, reaching over 90% in familial cases. There are variable inter- and intrafamilial expressivity and penetrance is 90% to 99%.<sup>1,3</sup> Recently, mutations in *EPHB4* have been described as causing a second type of CM-AVM (CM-AVM2) that mimics *RASA1*-mutated CM-AVM but also hereditary hemorrhagic telangiectasia due to the presence of telangiectasias.<sup>4</sup>

The intrafamilial variability and the multifocal lesions in CM-AVM suggested the need for a somatic "second-hit," as confirmed in a patient showing a *RASA1* germinal mutation and a second somatic mosaic chromosome 5 deletion encompassing *RASA1*,<sup>1</sup> in a patient



with a germinal variant and a second somatic variant in the *RASA1* gene,<sup>5</sup> and in a patient showing a germline *RASA1* mutation and a somatic *RASA1* mutation in the opposite allele (trans) present only within endothelial cells of a CM.<sup>6</sup> No cases of somatic second hit for *EPHB4* have been described so far.

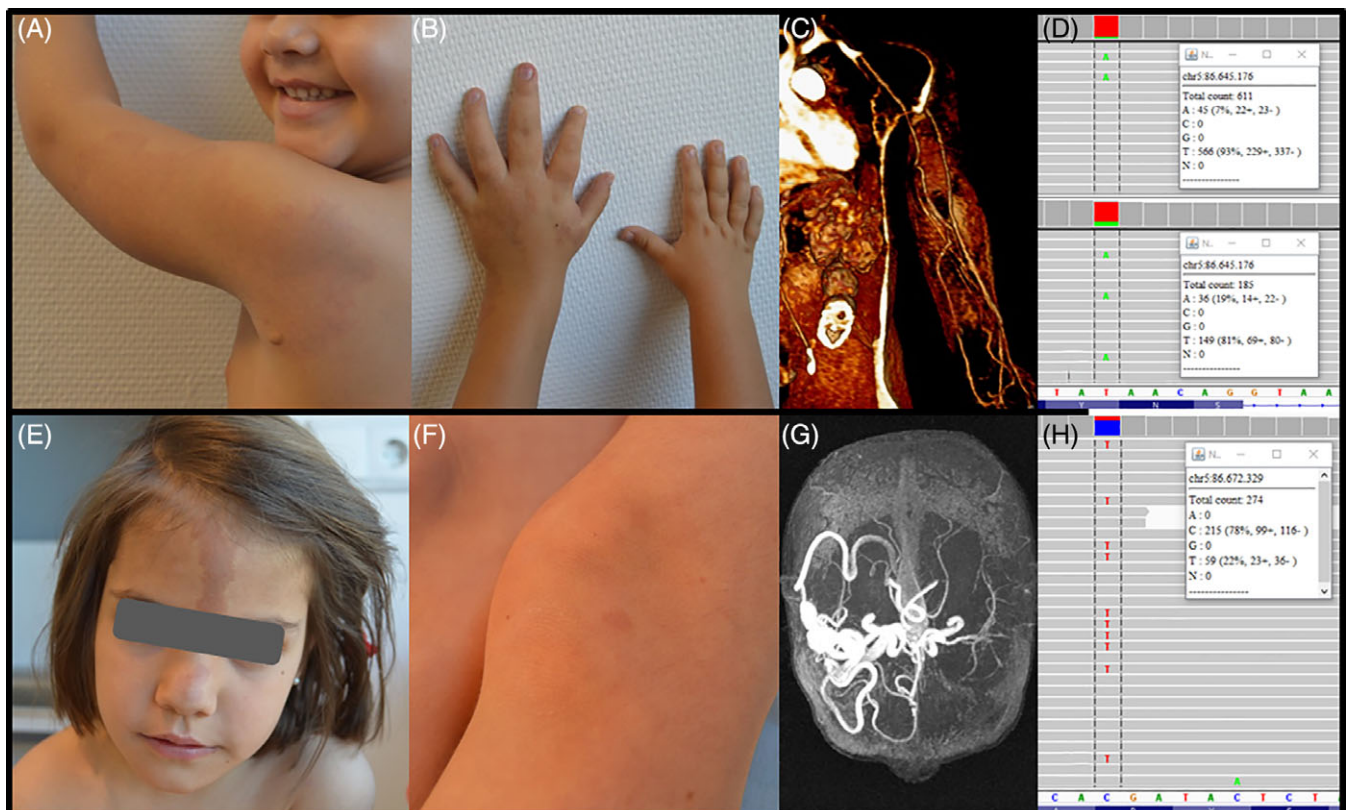
The presence of a first germline mutation followed by a somatic second hit is a known pathogenic mechanism associated with multifocal lesions as in the cerebral cavernous malformations<sup>7</sup> or in the neurofibromatosis type 1 (NF1).<sup>8</sup> The presence of somatic mutations, without previous germline mutations, has also been described in conditions such as the unifocal venous malformations,<sup>9</sup> the *PIK3CA*-related overgrowth spectrum<sup>10</sup> or in several Rasopathies, including NF1.<sup>8,11</sup> However, constitutional mosaicism, which is a pathogenic variant present constitutionally but at the same time in mosaic, therefore in mosaic in all cell types, seems to be an under-recognized and rarely described mechanism.<sup>12</sup> Here, we report constitutional mosaic pathogenic variants in the *RASA1* gene in two unrelated patients with CM-AVM.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

The study was performed in the Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM) at La Paz Hospital, Madrid, Spain, according to the Hospital Ethics Committee, with written informed consent. Patient 1 is a 16-month-old girl with multiple CMs in glabella, axilla,

abdominal region and right thigh, as well as in the left hand and forearm where the CMs are associated with AVM and overgrowth (Figure 1). Patient 2 is a 6-year-old girl with an intracranial AVM and multiple CMs with white halo all over the body and a large midline CM encompassing the forehead, glabella and nose (Figure 1).

Deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted from blood and affected tissue by standard procedures. High-throughput sequencing (next-generation sequencing [NGS]) was performed using a 20 genes custom panel designed with NimbleDesign software (Roche NimbleGen, Inc., Madison, WI): hg19 NCBI Build 37.1/GRCh37.p13, targeting >98% of all exons (RefSeq). Paired-end (2 × 150 bp reads) libraries were created according to the standard protocols KAPA HTP Library Preparation Kit for Illumina platforms, SeqCapEZ Library SR (Roche NimbleGen, Inc., Madison, WI) and NEXTflex-96 Pre-Capture Combo Kit (Bioo Scientific, Austin, TX) for indexing. The captured DNA samples were sequenced on a NextSeq 500 instrument (Illumina, Inc., San Diego, CA) using a HIGH\_v2 300 cycles cartridge, according to the standard operating protocol. Data generated were analyzed using a previously described in-house bioinformatics pipeline for somatic mosaicism detection.<sup>13</sup> To confirm the presence of the mosaic variants, a second NGS experiment and/or pyrosequencing with the Pyromark Q96 MD instrument (QIAGEN, Hilden, Alemania) were performed. Standard polymerase chain reaction and Sanger sequencing were performed using the 96-capillary ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA) to search for variants in *EPHB4* gene.



**FIGURE 1** Patient 1 shows capillary malformations (CMs) and overgrowth (A, B and C) and patient 2 shows large and small CMs (E and F) and an intracranial arteriovenous malformation (G). Integrative genomics viewer (IGV) visualization of mosaic *RASA1* pathogenic variants detected by high-throughput sequencing in blood (7%) and affected tissue (19%) in patient 1 (D) and in blood sample (21.5%) in patient 2 (H) [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

### 3 | RESULTS

Patient 1 showed the variant NM\_002890.2 (RASA1):c.1248T>A;p.Tyr416Ter in DNA obtained from blood in mosaic of 7% [566/45], as well as in DNA extracted from CM tissue biopsy of the region with overgrowth in a mosaic of 19% [149/36] (Figure 1). The variant was not present by NGS in the blood samples of the patient's parents. Patient 2 showed the variant NM\_002890.2 (RASA1):c.2131C>T;p.Arg711Ter in mosaic of 21.5% [215/59] in DNA obtained from blood (Figure 1). The parents of patient 2 were not studied, and no tissue sample was available. Both variants have already been described,<sup>5,14</sup> none of them were present in the Genome Aggregation Database<sup>15</sup> and according to the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology clinical variant interpretation guidelines<sup>16</sup> both variants are classified as pathogenic. No variants were found in *EPHB4* gene by Sanger sequencing.

### 4 | DISCUSSION

We describe for the first time two constitutional *RASA1* pathogenic variants causing CM-AVM, detected in mosaic in blood samples from two unrelated patients and in the affected tissue sample in one of the patients. The clinical manifestations of the two patients are undistinguishable from other patients with germline *RASA1* mutations causing CM-AVM.

We cannot discard the presence of a second hit in these patients either as a low mosaic in *RASA1* or in another related gene. Additionally, it has not been proven if these mutations produce a nonsense-mediated mRNA decay (NMD) phenomenon or if they cause a dominant negative effect, as observed in the Phosphatase and tensin homolog.<sup>17</sup> The second case would be more likely in patient 1 because the stop codon is located near the end of exon 8 and does not comply with the precept of being located more than 50 nucleotides upstream of the exon-exon junction to trigger the NMD.<sup>18</sup> However, the dominant negative interaction cannot explain on its own the presence of multiple localized lesions.

On the other hand, the temporal window in which a somatic mutation appears during embryonic development can be determinant more than the percentage of affected cells in an individual. Mutations occurring earlier do not necessarily have to produce larger pathogenic consequences. Normal growth and patterning of tissues in embryos are guided by temporal windows involving long-range and dose-dependent responses, short-range signaling activation and dynamics, and transcriptional feedback, thus translating temporal information into spatial information.<sup>19</sup> Therefore, localized and time-specific *RASA1* alterations could be causing deregulations that would not occur the same way in the context of germinal alterations or even in somatic alterations arising before or after the temporal window.

Somatic mosaicism is defined as the presence of more than one clone of cells with different genotypes, all which are derived from a single cell. Conversely, constitutional mosaicism can be defined as the presence of a mosaic variant in all cell types of an individual. This in clinical practice would mean the presence of a mosaic variant in multiple tested samples from one individual or the presence of a mosaic variant in blood sample in a disorder whose phenotypic consequences

are known to be caused by mutations in other cell/tissue types. The percentage of mosaicism present among the cell types may be different. Constitutional mosaicism could be the consequence of a spontaneous and partial reversion of a pathogenic germline variant resulting from a reverse point mutation, mitotic recombination or a gene conversion restoring the aminoacid sequence, a rare mechanism known as revertant mosaicism.<sup>20</sup> Even if there are no affected relatives, it is still possible that the germline mutation undergoing the reversion can be acquired from a gonadal mosaicism, which would require the coexistence of two rare mechanisms. More likely, constitutional mosaicism could also be caused by an early somatic mosaicism, which in turn could be conditioned by a selective advantage of wild-type cells in the embryo. The presence of mosaicism in different cell types with different embryological origins has already been described in other pathologies such as macrocephaly-capillary malformation (MCAP), caused by somatic mutations in *PIK3CA*. In MCAP, it is not uncommon to detect different percentages of the pathogenic variant in blood lymphocytes (endoderm), skin with overgrowth (epidermis is ectodermal and cultured skin biopsy fibroblasts are mesodermal) or vascular malformations (endothelium is mesodermal), among others.

Although it is a rare phenomenon, in our center, we have detected constitutional mosaicism in 2 of 11 *RASA1* confirmed mutations. In CM-AVM, it would be advisable to use deep high-throughput sequencing studies (>500x) in blood samples to detect a possible constitutional mosaicism with a low frequency of the pathogenic variant. Only if the result is negative could be considered the possibility of obtaining biopsies of affected tissue to search for somatic alterations.

For genetic counseling, three scenarios must be considered: (a) a revertant mosaicism in a variant inherited from an affected parent, with a recurrence risk of 50%; (b) a revertant mosaicism in a variant inherited by gonadal mosaicism from healthy parents; with an overall theoretical recurrence risk of 1%-2%; and (c) an early embryonic mutation, with no increased recurrence risk for the parents. However, in the three scenarios, the risk for the children of the patient depends on the percentage of mosaicism in the germline.

In conclusion, this report documents for the first time the presence of constitutional mosaicism in *RASA1* as cause of CM-AVM. The phenomenon of constitutional mosaicism is under-recognized, although it has implications for accurate molecular diagnosis and recurrence risk, and helps to explain the great phenotypic variability in CM-AVM. As knowledge and technology advances, constitutional mosaicism could help us to better understand both normal embryological development and the pathogenic mechanism underlying several diseases.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Genomics and Bioinformatics staff of the INGEMM for their collaboration. This research was supported by the project "Clinically and molecularly redefining complex vascular malformations" financed by ISCIII, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) FUNDS, FIS PI17/00519.

### CONFLICTS OF INTEREST

All authors declare no competing interests.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Pablo Lapunzina  <https://orcid.org/0000-0002-6324-4825>

Victor Martinez-Glez  <https://orcid.org/0000-0002-4680-881X>

## REFERENCES

1. Revencu N, Boon LM, Mendola A, et al. RASA1 mutations and associated phenotypes in 68 families with capillary malformation-arteriovenous malformation. *Hum Mutat.* 2013;34:1632-1641. <https://doi.org/10.1002/humu.22431>.
2. Boon LM, Mulliken JB, Viskula M. RASA1: variable phenotype with capillary and arteriovenous malformations. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15:265-269. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.03.004>.
3. Eerola I, Boon LM, Mulliken JB, et al. Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations. *Am J Hum Genet.* 2003;73:1240-1249. <https://doi.org/10.1086/379793>.
4. Amyere M, Revencu N, Helaers R, et al. Germline loss-of-function mutations in EPHB4 cause a second form of capillary malformation-arteriovenous malformation (CM-AVM2) deregulating RAS-MAPK signaling. *Circulation.* 2017;136:1037-1048. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026886>.
5. Macmurdo CF, Wooderchak-Donahue W, Bayrak-Toydemir P, et al. RASA1 somatic mutation and variable expressivity in capillary malformation/arteriovenous malformation (CM/AVM) syndrome. *Am J Med Genet.* 2016;170:1450-1454. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37613>.
6. Lapinski PE, Doosti A, Salato V, North P, Burrows PE, King PD. Somatic second hit mutation of RASA1 in vascular endothelial cells in capillary malformation-arteriovenous malformation. *Eur J Med Genet.* 2018;61:11-16. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.004>.
7. Gault J, Shenkar R, Recksiek P, Awad IA. Biallelic somatic and germline CCM1 truncating mutations in a cerebral cavernous malformation lesion. *Stroke.* 2005;36:872-874. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000157586.20479.f0>.
8. John AM, Ruggieri M, Ferner R, Upadhyaya M. A search for evidence of somatic mutations in the NF1 gene. *J Med Genet.* 2000;37:44-49.
9. Soblet J, Limaye N, Uebelhoer M, Boon LM, Viskula M. Variable somatic TIE2 mutations in half of sporadic venous malformations. *Mol Syndromol.* 2013;4:179-183. <https://doi.org/10.1159/000348327>.
10. Keppler-Noreuil KM, Rios JJ, Parker VE, et al. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am J Med Genet.* 2015;167A: 287-295. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36836>.
11. Hafner C, Groesser L. Mosaic RASopathies. *Cell Cycle.* 2013;12:43-50. <https://doi.org/10.4161/cc.23108>.
12. Gordo G, Tenorio J, Arias P, et al. mTOR mutations in Smith-Kingsmore syndrome: four additional patients and a review. *Clin Genet.* 2018;93:762-775. <https://doi.org/10.1111/cge.13135>.
13. Rodriguez-Laguna L, Ibanez K, Gordo G, et al. CLAPO syndrome: identification of somatic activating PIK3CA mutations and delineation of the natural history and phenotype. *Genet Med.* 2018;20(8):882-889. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.200>.
14. Wooderchak-Donahue WL, Johnson P, McDonald J, et al. Expanding the clinical and molecular findings in RASA1 capillary malformation-arteriovenous malformation. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(10):1521-1536. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0196-1>.
15. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536:285-291. <https://doi.org/10.1038/nature19057>.
16. Richards S, Aziz N, Bale S, 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;17:405-424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
17. Papa A, Wan L, Bonora M, et al. Cancer-associated PTEN mutants act in a dominant-negative manner to suppress PTEN protein function. *Cell.* 2014;157:595-610. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.027>.
18. Gehring NH, Lamprinaki S, Hentze MW, Kulozik AE. The hierarchy of exon-junction complex assembly by the spliceosome explains key features of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* 2009;7:e1000120. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000120>.
19. van Boxtel AL, Chesebro JE, Heliot C, Ramel MC, Stone RK, Hill CS. A temporal window for signal activation dictates the dimensions of a nodal signaling domain. *Dev Cell.* 2015;35:175-185. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.09.014>.
20. Kiritzi D, He Y, Pasmooij AM, et al. Revertant mosaicism in a human skin fragility disorder results from slipped mispairing and mitotic recombination. *J Clin Invest.* 2012;122:1742-1746. <https://doi.org/10.1172/JCI61976>.

**How to cite this article:** Gordo G, Rodriguez-Laguna L, Agra N, et al. Constitutional mosaicism in RASA1-related capillary malformation-arteriovenous malformation. *Clin Genet.* 2019;1-4. <https://doi.org/10.1111/cge.13499>

## Title page

**Manuscript title:** Familial hypercholesterolemia: a single-nucleotide variant (SNV) in mosaic at the Low density lipoprotein receptor (*LDLR*).

**Running title:** mosaicism at the *LDLR*

**Authors:** Sonia Rodríguez-Nóvoa<sup>1</sup>, Concepción Alonso<sup>2</sup>, Carmen Rodríguez-Jiménez<sup>1</sup>, Lara Rodríguez-Laguna<sup>3</sup>, Gema Gordo<sup>3</sup>, Victor Martínez-Glez<sup>3</sup> and Iluminada García Polo<sup>4</sup>.

**Keywords:** *LDLR*, hypercholesterolemia, mosaicism

### Authors affiliation:

<sup>1</sup>Department of Genetics of Metabolic Diseases and <sup>3</sup>Vascular Malformations Section, Institute of Medical & Molecular Genetics (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER, U753); <sup>2</sup> Department of Genetics, Hospital de La Princesa, Madrid, Spain; <sup>4</sup> Department of Internal Medicine, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain.

### Corresponding author:

Sonia Rodríguez-Nóvoa  
Department of Genetics of Metabolic Diseases-INGEMM  
Hospital Universitario La Paz  
Paseo de la Castellana 261, 28046  
Madrid, Spain  
Tel: +34 91 727 72 17 ext. 249  
e-mail: [soniamaria.rodriguez@salud.madrid.org](mailto:soniamaria.rodriguez@salud.madrid.org)

**Conflicts of interest:** all authors declare no conflicts of interest.

**Financial support:** the study was supported by grant FIS15/00122, FEDER, ISCIII-Instituto de Salud Carlos III, Spain

## Abstract

**Introduction:** Familial hypercholesterolemia (FH) is most frequently caused by genetic variants in the *LDLR* gene. Most of *LDLR* pathogenic variants are missense, followed by splicing and deletion/insertions variants. Mosaicism is a genetic condition in which an individual shows more than one clone of cells with different genotypes.

**Objective:** Molecular characterization of a patient with hypercholesterolemia.

**Methods:** Genetic analysis of DNA from peripheral blood and saliva was performed by NGS, sanger sequencing and pyrosequencing technologies.

**Results:** NGS analysis detected the pathogenic variant *LDLR:c.1951G>T:p.(Asp651Tyr)* in 9%-12% of reads. The presence of the variant was confirmed by pyrosequencing analysis.

**Conclusion:** Herein, we report the first case of a mosaic single nucleotide variant affecting the *LDLR* gene in a patient with familial hypercholesterolemia. As has been described for other pathologies, mosaicism could be underestimated in FH and its detection will improve with the introduction of NGS technologies in the diagnostic routine.

## Introduction

Different types of pathogenic variants in genes can cause genetic diseases. Most of them are missense variants that affect the coding region of genes. This type of variants consists in a change of aminoacid that alters or impairs the normal function of the resultant protein, therefore causing the disease phenotype. Until recently it was considered that pathogenic variants were always present in all the cells of an individual. However, it is increasingly evident that all individuals are actually complex mosaics composed of multiple genotypes acquired post-zygotically, and that in many cases this can produce a pathogenic effect. In the later cases, the variant must be present in the appropriate cell types and achieve a threshold in the number of cells affected so that the disease can be clinically detected. As a general rule, the earlier during embryonic development the mutation occurs, the greater the number of affected cells, and the greater the possibility of developing the disease. In diagnostic terms, not detecting variants in low mosaics, rather common with classical diagnostic methods, can lead to erroneous conclusions about the results of molecular tests, and therefore in the treatment and follow-up of patients <sup>1</sup>.

Familial hypercholesterolemia (FH, MIM: 143890) is a genetic disorder characterized by an elevation in total cholesterol (TC) and low-density lipoproteins-cholesterol (LDL-C) leading to premature cardiovascular disease <sup>2</sup>. The worldwide prevalence of FH has been estimated in 1/200-300 <sup>3,4</sup> and the main cause is the presence of pathogenic variants in the low density lipoprotein receptor gene (*LDLR*, MIM: 606945) which is involved in the LDL uptake. Up to date, more than 1700 variants have been reported in the *LDLR* gene and around 81% were classified as pathogenic or likely pathogenic <sup>5</sup>. Almost all types of variants have been described in *LDLR* being the missense the most frequent ones. Splicing variants, small and gross deletions and insertions have been described as well.

The increase in the number of reported variants in *LDLR* is due to the implementation of screening strategies to early detection of patients with FH and to the development of new molecular strategies. Conventional method for molecular diagnosis of FH is Sanger sequencing but due to its cost and time consuming, other methodologies have been developed such as the arrays-based methods<sup>6</sup>. The arrays methods are tailored to the most frequent mutations but this is a limitation because the less frequent or new variants are not detected which is an important methodology limitation. With the introduction of new technologies such as next generation sequencing (NGS), the success of the molecular diagnosis rate has increased. Despite this fact, a great number of patients remain without genetic confirmation. Traditionally, most of these patients are further classified as probably having a polygenic hypercholesterolemia.

Herein, we report a case of mosaicism in the *LDLR* gene in a patient with familial hypercholesterolemia.

## **Patients and Methods**

The proband is a man 57 years old referred to our reference laboratory for genetic testing in 2016 because of a clinical suspicion of familial hypercholesterolemia. He has a personal history of hypercholesterolemia detected when he was 40, with the highest levels of cholesterol documented in 2008, CT: 282 mg/dL, LDL: 195 mg/dl. There is no history of tobacco or alcohol consumption. The patient had hypertension, currently under treatment. Different pathologies such as hypothyroidism, kidney disease, diabetes, or the consumption of drugs (progestogens, anabolic steroids) were discarded. At the age of 52, he suffered acute myocardial infarction, needing percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA),

and implantation of a drug-eluting stent. At the age of 56, a coronary angiography showed severe stenosis in the first marginal obtuse.

As a family history, his father died at age of 77, probably due to cardiac insufficiency, the cholesterol levels are not known; his 93 years old mother is still alive, and she is not affected from dyslipidemia; and proband's sister shows normal levels of cholesterol. The patient has four children (33, 31, 30 and 27 years old). Both younger children had hypercholesterolemia detected at the age of 5, and both were treated with resins.

Physical examination showed a height of 1.69 m, weight 74 kg, body-mass index (BMI) of 25.91; he had no arcus cornealis or xanthomas or xanthelasmas.

The patient was clinically classified as having a probably familial hypercholesterolemia according to Dutch Lipid Clinic Network Criteria (DLCNC), so the genetic study of familial hypercholesterolemia was performed.

Genetic analysis was performed by NGS using a customized panel of 198 genes. Preparation and exome enrichment steps were performed according to manufacturer's workflow (Roche Nimblegen) and it was sequenced using MiSeq system. A subset of genes was chosen for analysis of hypercholesterolemia: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, and *LDLRAP1*. Bioinformatic analysis was performed using algorithms developed by our bioinformatics unit. The *in silico* predictors of pathogenicity used were CADD (Combined Annotation Dependent Depletion), Polyphen (Polymorphism Phenotyping), MutAssesor, Fasthmm, and Vest. Scores of conservation used were Gerp2, PhasCons, PhyloP. The splicing predictors used were MaxEntScan, NNSplice, GeneSplicer and Human Splicing Finder. Variants with minor allele frequency >1% were excluded from further analysis. The files were uploaded in BAM format for analysis using Alamut software.



Multiplex ligation-dependent probe amplification (MRC-Holland) was used for detection of large insertions/deletions in *LDLR* gene.

Sanger sequencing was used to confirm variants present in more than 15% of the reads in the deep sequencing data: Standard PCR and Sanger sequencing were performed using the 96-capillary ABI 3730xl ADN analyzer (Applied Biosystem, Foster, USA). The validation of variants detected in mosaics over 5% of the readings in the NGS was performed by the pyrosequencing technique: primers were designed using PyroMark software, and QIAGEN reagents and the Pyromark Q96 MD instrument (QIAGEN, USA) were used according to manufacturer's protocol.

## Results

NGS data from the proband's DNA blood sample was suitable for analysis after passing the quality parameters established in our laboratory: number of reads more than 30x in the 99% of the target bases. The results of the bioinformatics analysis of data from NGS showed the *c.1951G>T:p.(Asp651Tyr)* variant in 12% of the reads, located in exon 13 of the *LDLR* gene. This is a known pathogenic variant associated with FH <sup>7</sup>. Sanger sequencing was negative for this variant. The presence of large deletions or insertions in the whole gene was discarded by MLPA.

When we performed a visual analysis of the bam file using Alamut software we observed three types of reads within exon 13. Close to our pathogenic variant of interest (*c.1951G>T*) we found the synonymous polymorphism *c.1959T> C* (rs5925), with a MAF / MinorAlleleCount for C = 0.336 / 1682 according to dbSNP. This allowed us the visualization of three different compound genotypes: the first one included the pathogenic variant *c.1951G>T* plus the wild type allele for position *c.1959T* in approximately 12% of

the reads. The second one carries the wild type allele for position c.1951G and the polymorphism c.1959T>C in 48% of the reads; and the third one carries the wild type allele for position c.1951G and the c.1959T in 40% of the reads (**Figure 1**).

A new blood sample from the proband was requested in order to confirm the results. After DNA extraction and NGS analysis of the new sample, the pathogenic variant *c.1951G>T* was observed in 9% of reads, confirming the previous results.

The variant *c.1951G>T:p.(Asp651Tyr)* has been previously described and associated with familial hypercholesterolemia <sup>7</sup>. It affects a highly conserved nucleotide (phyloP: 5.69 [-14.1;6.4]) and a highly conserved amino acid (considering 11 species). There is also a large physicochemical difference between Asp and Tyr (Grantham dist.: 160 [0-215]). We use the *in silico* predictors of pathogenicity CADD, VEST, Sift, and Mutation taster and all of them classified the variant as deleterious. This variant is located at the protein domain LDLR class B repeat. Align GVGD: C15 (GV: 85.08 - GD: 92.25). According to AMCG criteria for genetic variant classification, this variant was classified as pathogenic.

We extended the family study by NGS to the proband's two children with hypercholesterolemia. Both of them were heterozygous for the variant *c.1951G>T:p.(Asp651Tyr)*. These results were confirmed by Sanger sequencing. The proband's wife and the other two children with normal levels of cholesterol showed the common allele at the position *c.1951* by Sanger sequencing. Family pedigree is shown in **Figure 2**.

In order to confirm the mosaicism at position *c.1951* of the *LDLR* by an orthogonal method, we performed **pyrosequencing** analysis in the DNA extracted from peripheral blood from the proband, using as a positive control the older daughter, who was heterozygous for the variant *c.1951G>T* by NGS. The results showed that the proband is a mosaic with the

pathogenic variant found in 20% of the reads in peripheral blood DNA. Heterozygous state was confirmed in the daughter. Since mosaicism can affect different tissues in a different proportion, we also decide to analyze a **saliva** sample from the proband, using the same three technologies. NGS sequencing and pyrosequencing analysis showed a mosaic of 8% and 18% of the pathogenic variant respectively, whereas Sanger sequencing hardly showed the variant. **Figure 3** summarizes the results of blood and saliva at the position *c.1951* at the exon 13 of the *LDLR* using the different types of technologies.

## Discussion

In this study we report the first case of a mosaic single-nucleotide variant (SNV) affecting the most relevant gene involved in familial hypercholesterolemia, the *LDLR* gene. This phenomenon occurs when a *de novo* genetic variant appears post-zygotically causing a mosaicism in the embryo. The timing and location in which the variant occurs plays a key role in the distribution of the variant among tissues (that is, somatic, germline or gonosomal) and therefore, determine the final phenotype in the affected patient as well as the patterns of disease reoccurrence within families. Several biological specimens can be tested to detect mosaicism. In this study, we have analyzed two types of specimens, blood and saliva. Although the liver is the target tissue for molecular diagnosis of hypercholesterolemia, since it is the main organ responsible for lipid homeostasis, it is not justified to obtain such a type of sample for genetic analyses due to the invasive nature of sampling. In any case, we assert that the proband's liver is affected to such an extent grade conferring the patient with hypercholesterolemia phenotype. The proband's germline tissue is also affected since two of his children are carriers of the pathogenic variant in a heterozygous form.

The presence of mutations in the form of somatic mosaicism is well known in pathologies that, in a classical way, are caused by constitutionally dominant mutations, and therefore compatible with life. As an example, the neurofibromatosis type I due to mutations in one of the most extensive genes in humans, the *NF1* gene. However, mutations in this gene can also occur in the form of somatic mosaicism giving rise to what is known as segmental NF1, since the clinical manifestations are limited to a part of the body <sup>8</sup>. Other examples of dominant diseases that may occur as mosaic include Duchenne myotonic dystrophy and the hereditary haemorrhagic telangiectasia.

Other pathologies present only in the form of mosaicism and are not heritable, probably because they are incompatible with life in germinal form. As an example we have the *PIK3CA* related overgrowth spectrum (PROS) <sup>9</sup> or the McCune-Albright syndrome. A third form of mosaicism is the one causing germline mosaic disorders, in which dominant pathologies occur in several children of phenotypically healthy parents, due to the presence of a mutation in the germline tissue of one of the parents. The most reported pathology with this type of mechanism is osteogenesis imperfecta type II <sup>8</sup>.

The mosaic variant in the *LDLR* gene presented in this work belongs to the group of mosaicism in dominant genes. However, in addition to the somatic mosaicism, the patient transmitted the variant to two of his children, so his germ cells must be affected. This combination between somatic mosaicism and germinal mosaicism is known as gonosomal mosaicism.

The case described here confirms and highlights the fact that mosaicism does not always occur in clinically easily identifiable disorders. Therefore, we consider that in the FH the molecular confirmation of a mosaic pathogenic variant is especially useful in those patients with LDL-c borderline, and allows cascade screening in the family to further establish

lifestyle changes or medication for early cardiovascular prevention. Although heterozygous FH frequency is around 1/200-250, a minor fraction of them is identified<sup>10</sup>, for this reason improving the molecular detection is of great interest. The use of new technologies such as the high-throughput deep sequencing allows the detection of mosaics. As we describe in our study it is possible that mosaicism can explain some of the cases of patients without molecular confirmation. This phenomenon can be suspected specially in those molecular unconfirmed cases with strong familial segregation, even more when less sensitive methods for analysis were previously used. Even if NGS was used for molecular diagnosis of FH, the bioinformatic treatment of the data should consider the possibility of a mosaicism so that these types of variants are not filtered prior to the variant calling. For example, in routine laboratories, a common variant call ratio used for filtering variants leaves out those that not reach the 20% of the reads. Therefore, the bioinformatics algorithms used for routine analysis need to improve in order to better detect mosaicism. Recent publications have addressed this topic<sup>11</sup>. On the other hand, another aspect to take into account is the reading depth usually used. Improving the deep coverage up to 1000x will increase the ability to detect low-level mosaicism. However, at present a relatively high cost of the test may be a major limitation for large-scale application of this approach in diagnostic laboratory. Something that will probably be solved soon with the technological advances in the NGS platforms.

Sanger sequencing has been the gold standard technology used in most laboratories but it fails to identify cases of mosaicism. It is difficult to detect when the grade of mosaicism is low. Sanger sequencing possess less sensitivity compared with massive sequencing in detecting mosaicism. Recent publications state that the use of sanger sequencing is not adequate to validate NGS findings specially when the last one shows good quality parameters such as a good coverage of reads and quality<sup>12-14</sup>. The authors state that the use

of sanger validation should be restricted for those cases in which the result of NGS has a serious implication for the probands and their families <sup>12</sup>.

With the extensive use of massive sequencing techniques more genes are screened routinely providing ever more information. With adequate tools to process the information, it is possible to explore not only the main genes responsible for FH but other candidate genes. In our experience, certain patients remitted to our laboratory because suspicious of FH have genetic variants in other genes involved in cholesterol metabolism. It is possible that these candidate genes could explain the lipid disturbances in these patients, and mosaicism could also be present in them.

Nowadays, there is no doubt that next generation sequencing provides us with the better results, improving not only the detection of new mutations, but also allowing the identification of new genes and mosaicism. Further analysis is warranted to know the extent of the phenomenon of mosaicism not only in familial hypercholesterolemia but in other dyslipemias.

**Financial support:** the study was supported by grant FIS15/00122, ISCIII-Instituto de Salud Carlos III, Spain

**Conflicts of interest:** The authors have not conflicts of interest

**Author contributions:** SRN, analyzed the NGS data, design the study and write the manuscript; CA and IGP contributed to clinical management, and follow-up of the patient and review the manuscript; CRJ performed sanger analysis and figures; LRL and GG performed pyrosequencing analysis and figures; VM-G contributed to review the data and the manuscript. All authors have approved the final article.

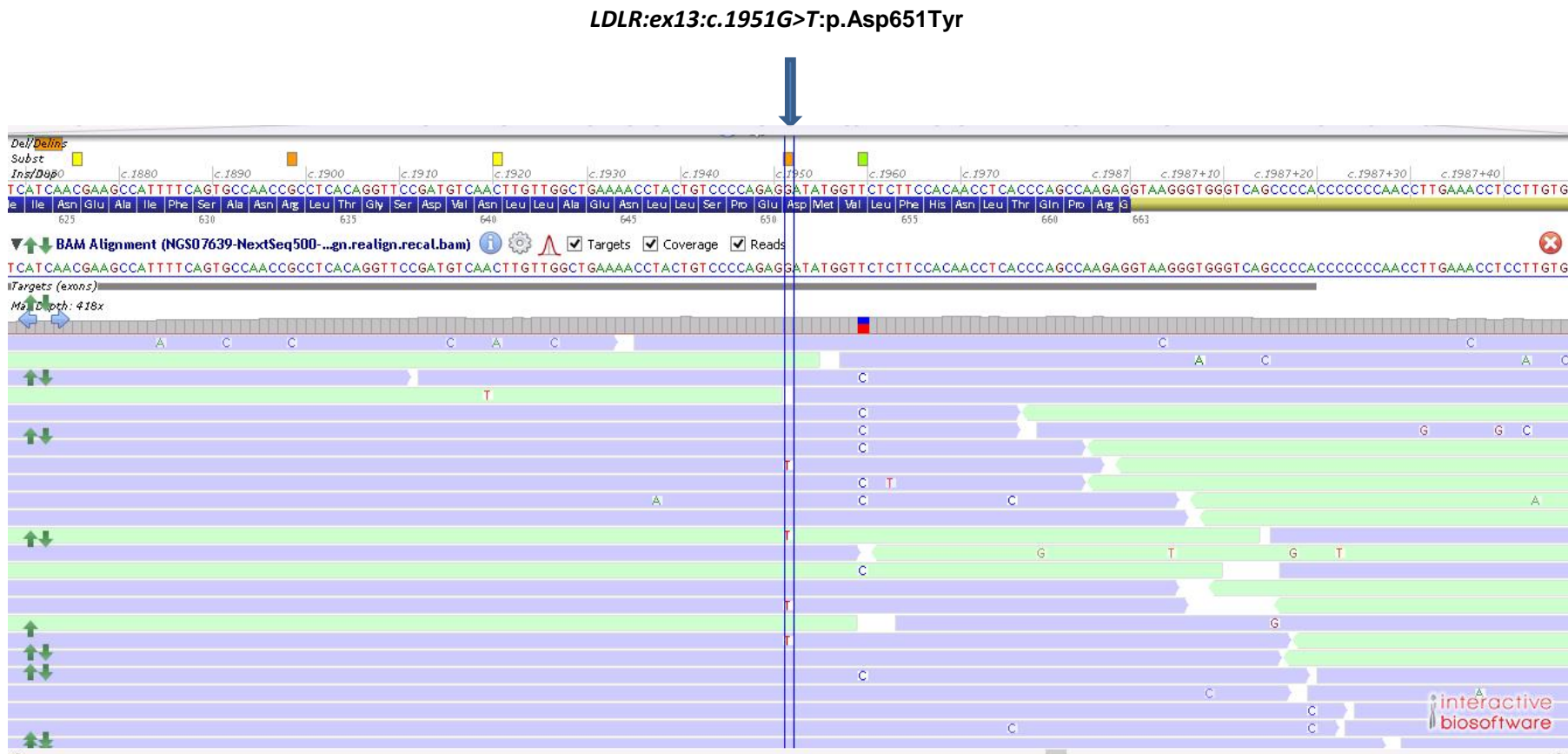
## REFERENCES

1. Forsberg LA, Gisselsson D, Dumanski JP. Mosaicism in health and disease - clones picking up speed. *Nat Rev Genet.* 2017;18(2):128-142.
2. Goldstein JL HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* New York, NY: McGraw-Hill, 2001:2863–913. 2001.
3. Ferranti SD de, Rodday AM, Mendelson MM, Wong JB, Leslie LK, Sheldrick RC. Prevalence of Familial Hypercholesterolemia in the 1999 to 2012 United States National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES). *Circulation.* 2016;133(11):1067-1072.
4. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, Wiklund O, Hegele RA, Raal FJ, Defesche JC, Wiegman A, Santos RD, Watts GF, Parhofer KG, Hovingh GK, Kovanen PT, Boileau C, Aversa M, Borén J, Bruckert E, Catapano AL, Kuivenhoven JA, Pajukanta P, Ray K, Stalenhoef AFH, Stroes E, Taskinen M-R, Tybjærg-Hansen A. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J.* 2013;34(45):3478-90a.
5. Leigh S, Futema M, Whittall R, Taylor-Beadling A, Williams M, den Dunnen JT, Humphries SE. The UCL low-density lipoprotein receptor gene variant database: pathogenicity update. *J Med Genet.* 2017;54(4):217-223.
6. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jiménez E, López M, Tejedor MT, Artieda M, Alonso R, Mata P, Simón L, Martínez A, Pocoví M. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem.* 2005;51(7):1137-1144.
7. Humphries SE, Cranston T, Allen M, Middleton-Price H, Fernandez MC, Senior V, Hawe E, Iversen A, Wray R, Crook MA, Wierzbicki AS. Mutational analysis in UK patients with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolaemia: relationship with plasma lipid traits, heart disease risk and utility in relative tracing. *J Mol Med.* 2006;84(3):203-214.
8. Biesecker LG, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat Rev Genet.* 2013;14(5):307-320.
9. Keppler-Noreuil KM, Rios JJ, Parker VER, Semple RK, Lindhurst MJ, Sapp JC, Alomari A, Ezaki M, Dobyns W, Biesecker LG. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): Diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am J Med Genet A.* 2015;167A(2):287-295.
10. Catapano AL, Graham I, Backer G de, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, Hoes AW, Jennings CS, Landmesser U, Pedersen TR, Reiner Ž, Riccardi G, Taskinen M-R, Tokgozoglul, Verschuren WMM, Vlachopoulos C, Wood DA, Zamorano JL. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J.* 2016;37(39):2999-3058.
11. Huang AY, Zhang Z, Ye AY, Dou Y, Yan L, Yang X, Zhang Y, Wei L. MosaicHunter: Accurate detection of postzygotic single-nucleotide mosaicism through next-generation sequencing of unpaired, trio, and paired samples. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(10):e76.
12. Beck TF, Mullikin JC, Biesecker LG. Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants. *Clin Chem.* 2016;62(4):647-654.

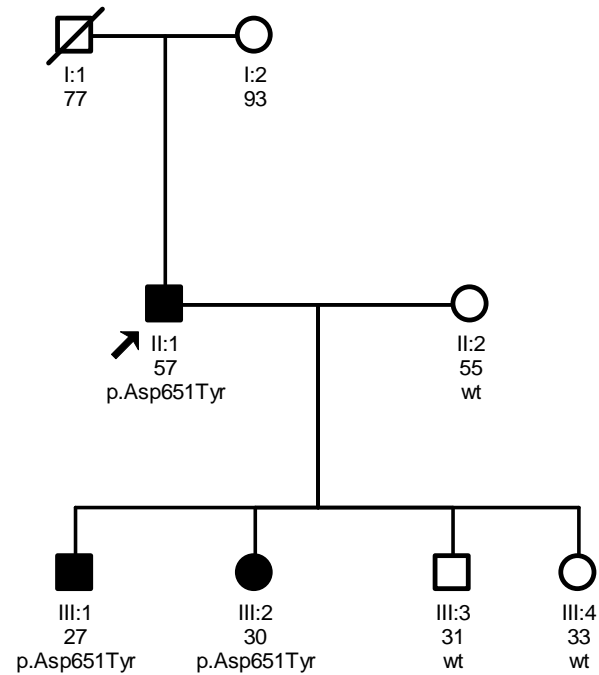
13. Strom SP, Lee H, Das K, Vilain E, Nelson SF, Grody WW, Deignan JL. Assessing the necessity of confirmatory testing for exome-sequencing results in a clinical molecular diagnostic laboratory. *Genet Med*. 2014;16(7):510-515.
14. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, Boer EN de, Almomani R, Boven LG, van den Berg MP, van Spaendonck-Zwarts KY, van Tintelen JP, Sijmons RH, Jongbloed JDH, Sinke RJ. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat*. 2013;34(7):1035-1042.



**Figure 1.** NGS analysis of proband's blood. Visualization of BAM file using Alamut software focus on the exon 13 of *LDLR*. The arrow indicates the position of the genetic variant *LDLR:ex13:c.1951G>T:p.(Asp651Tyr)*.



**Figure 2.** Pedigree of the family showing the segregation of the variant *LDLR:ex13:c.1951G>T:p.(Asp651Tyr)*. The arrow indicates the proband individual; circle and square symbols represent women and men respectively; shadow filled symbols indicate the affected members with hypercholesterolemia. Line 1 below symbols correspond to the individual identification, line two indicates the age; line 3 indicates the LDLR genotype: p.(Asp651Tyr) or normal genotype at this position (wt).



**Figure 3.** The figure shows the results of NGS, Sanger sequencing and pyrosequencing analysis performed in blood and saliva samples. **NGS** analysis of blood samples show the reads with the pathogenic variant in the proband and his daughter. Alamut software was used to visualize BAM file. **Sanger** sequencing corresponding to exon 13 of the *LDLR* shows that the variant is hardly detected in the proband whereas it is clearly detected in his daughter. **Pyrosequencing** analysis of proband and daughter blood shows approximately 20% and 50% of pathogenic variant, respectively. **Saliva** sample from the proband was analyzed using the same three technologies. NGS sequencing and pyrosequencing analysis showed a mosaic of 8% and 18% of the pathogenic variant respectively, whereas Sanger sequencing hardly shows the variant.

