



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Diagnóstico del Síndrome Cornelia de Lange mediante
la utilización de un panel de secuenciación masiva

Cornelia de Lange syndrome diagnosis by using a
massive sequencing panel

Autora

Julia del Rincón de la Villa

Directores

Juan Pié Juste

Ana Latorre Pellicer

Facultad de Medicina

2019

Resumen

El síndrome Cornelia de Lange (SCdL) es un trastorno genético multisistémico cuya clínica incluye principalmente dismorfia craneofacial, retraso psicomotor y del crecimiento y malformaciones en las extremidades. Su etiología se relaciona principalmente con la afectación del funcionamiento del anillo de las cohesinas, aunque también pueden entrar en juego la afectación de otras estructuras y factores relacionados con el proceso de la transcripción de los genes. La importante variabilidad fenotípica y genética lleva a clasificar sus manifestaciones como un espectro.

El número creciente de genes causales, la existencia de síndromes con fenotipos superpuestos, y la gran heterogeneidad clínica dificulta el diagnóstico genético, siendo en ocasiones insuficientes los métodos tradicionales (secuenciación por Sanger, MLPA...). Sobre dicha base, en este estudio se presenta la primera aplicación de un nuevo panel de genes de secuenciación masiva para el diagnóstico del SCdL, desarrollado en la Unidad Nacional de Referencia, con lo que se ha conseguido el diagnóstico genético de dos pacientes con fenotipo clásico, detectando en ellos mutaciones en dos de los genes clásicos asociados al síndrome (c.6272G>A en el gen *NIPBL* y c.305G>A en *HDAC8*). Este panel de secuenciación masiva permite un profundo estudio de los genes, aportando ventajas (mayor rapidez, cobertura y profundidad de lectura) respecto a otros métodos de diagnóstico genético, siendo de gran utilidad para realizar mejores diagnósticos en el SCdL y abriendo nuevos horizontes en la investigación de los mecanismos subyacentes a esta patología.

Palabras clave: Síndrome Cornelia de Lange, cohesinopatías, transcripción, panel, secuenciación masiva de nueva generación, genotipo, fenotipo.

Abstract

Cornelia de Lange syndrome (CdLS) is a genetic and multisystemic disorder whose clinical symptoms mainly include craniofacial dysmorphism, psychomotor and growth retardation and malformations in extremities. Its etiology is mainly related to abnormalities in the cohesion complex, although other structures and factors related to the transcription process can also be affected. The important phenotypic and genetic variability lead to classify its clinical manifestations as a spectrum.

The increasing number of causal genes, the existence of syndromes with overlapped phenotypes, and the considerable clinical heterogeneity make genetic diagnosis difficult, and traditional methods (as Sanger sequencing, MLPA...) are sometimes insufficient. In that context, this study presents the first application of a new custom next generation sequencing panel for CdLS diagnosis, developed in the National Reference Unit, which obtained the genetic diagnosis of two patients with a typical phenotype by detecting mutations in two of the CdLS associated genes (c.6272G> A in *NIPBL* and c.305G> A in *HDAC8*). This gene panel allows an in-depth study of the genes, providing some advantages (speed, coverage and sequencing depth) compared to other techniques of genetic diagnosis, being useful to achieve better CdLS diagnoses and opening new horizons for investigation in the mechanisms underlying this pathology.

Key words: Cornelia de Lange syndrome, cohesinopathies, transcription, gene panel, new generation sequencing, genotype, phenotype.

Índice

INTRODUCCIÓN	6
Síndrome de Cornelia de Lange.....	6
a) Manifestaciones clínicas	6
b) Bases moleculares	8
1. Genes del complejo de cohesinas	9
2. Otros genes relacionados con el SCdL. Regulación de la transcripción.	11
a) Modificación de histonas y remodelación de la cromatina	11
b) Inicio de la transcripción	12
c) Pausa y elongación de la transcripción	13
d) Looping de promotor y enhancer.....	13
e) Otros genes	13
c) Diagnóstico genético	13
1) Técnicas de diagnóstico genético.....	13
a. Anomalías en la estructura del genoma.....	14
b. Anomalías en la secuencia del genoma	14
I. Secuenciación de primera generación	14
II. Secuenciación de segunda generación (NGS)	15
2) Estrategia de diagnóstico genético en el SCdL.....	15
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
1. Características generales del estudio.....	18
2. Pacientes	18
a. Recogida de muestras (sangre y biopsia de piel).....	18
b. Recogida de información clínica.....	18
3. Muestras.....	19
a. Extracción de ADN de sangre	19
b. Cultivo celular y extracción de ADN de fibroblastos	19
c. Cuantificación de ADN.....	19
4. Análisis por secuenciación masiva	20
a. Diseño del panel.....	20
b. Preparación de librerías y secuenciación de la muestra.....	20
c. Análisis de Resultados	21
Bases de datos de mutaciones reportadas causantes de enfermedad	21

Bases de datos de variación genética	21
Algoritmos para la predicción de patogenicidad	21
5. Validación por secuenciación Sanger y estudios de cosegregación familiar	22
RESULTADOS	23
a) Paciente 1	23
Diagnóstico clínico (criterios de Kline y Gillis).....	23
Diagnóstico genético	24
Datos técnicos	25
Datos Genéticos	25
Interpretación biológica y clínica	26
Conclusión del análisis genético.....	26
b) Paciente 2	27
Diagnóstico clínico (criterios de Kline y Gillis).....	27
Diagnóstico genético	28
Datos técnicos	28
Datos genéticos	28
Interpretación Biológica y Clínica.....	29
Conclusión del análisis genético.....	29
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35

INTRODUCCIÓN

Síndrome de Cornelia de Lange

El Síndrome de Cornelia de Lange (SCdL, OMIM #122470, 30590, 300882, 610759 y 614701) es un síndrome genético multisistémico descrito por primera vez en el año 1932 por la pediatra Cornelia de Lange, y caracterizado clínicamente por dismorfia craneofacial, retraso del desarrollo con retraso psicomotor y mental y alteraciones en las extremidades. Además, los pacientes presentan malformaciones congénitas en distintos sistemas.

La prevalencia estimada del SCdL oscila entre 1/10.000 y 1/30.000 nacimientos, de los cuales, en la mayoría de los casos, está producido por mutaciones de novo. Generalmente se trata de una patología autosómica dominante o ligada al cromosoma X.

El síndrome se ha asociado a anomalías moleculares que afectan a la regulación de la cromatina, concretamente, con mutaciones en alguno de los genes que conforman el complejo de las cohesinas, un sistema con forma de anillo, compuesto por cuatro subunidades proteicas y más de 25 proteínas adicionales relacionadas con su regulación. Así, se engloba dentro de un conjunto de patologías denominadas cohesinopatías, que comparten rasgos fenotípicos: deformidades craneofaciales, defectos en las extremidades y retraso mental (^{1, 2}).

a) Manifestaciones clínicas

Alteraciones craneofaciales

Los rasgos craneofaciales incluyen microcefalia, sinofridia, cejas arqueadas, pestañas largas y finas, nariz pequeña con el puente deprimido y ancho, narinas antevertidas y filtrum alargado y prominente. También presentan paladar elevado, labio superior fino con comisuras orientadas hacia abajo, diastema dentario y micrognatia. Los pabellones auriculares son de implantación baja y están rotados posteriormente. Además, suelen tener el cuello corto, con baja implantación posterior del cabello (^{1, 3}). (Ver figura 1)

Alteraciones del crecimiento y desarrollo

Otro de los hallazgos más habituales en pacientes con SCdL es el retraso psicomotor/mental, cuya intensidad es muy variable. Todas las áreas del desarrollo intelectual suelen estar afectadas, con especial importancia de la del lenguaje (25-30% de los pacientes son incapaces de hablar). Es también muy común el retraso de crecimiento (peso, talla y perímetro cefálico por debajo del percentil 5) (^{1, 3}).

Alteraciones del comportamiento

Asimismo, son frecuentes los problemas de comportamiento. Destacan la hiperactividad y déficit de atención, timidez extrema, agresividad, episodios de autolesiones, comportamiento obsesivo-compulsivo y depresión (^{1, 3}).

Alteraciones de las extremidades

Pueden aparecer alteraciones en las extremidades: manos y pies pequeños, acortamiento del primer metacarpo, sindactilias, braquiclinodactilia del quinto dedo, etc. Un tercio de estos pacientes presentan malformaciones graves de las extremidades superiores, que van desde la oligodactilia hasta la ausencia completa del antebrazo (^{1, 3}). (Ver figura 1)

Alteraciones neurosensoriales y de la piel

Se trata de pacientes en los que también destaca el hirsutismo, sobre todo en la cara, espalda y extremidades, y, en muchos casos, presentan también cutis marmorata (retícula cutánea de color violáceo).

En cuanto a las alteraciones sensoriales, el 60% de los pacientes con SCdL presentan pérdida de audición, neurosensorial o de transmisión. También tienen predisposición a episodios frecuentes de otitis media y sinusitis, por estenosis auditiva externa. A nivel oftalmológico, existen hallazgos comunes como la miopía, la ptosis o la blefaritis (^{1, 3}).

Alteraciones en otros órganos y sistemas

Aparato digestivo: El reflujo gastroesofágico (RGE) es casi constante en estos pacientes (>90%). Comienza en edades muy tempranas y suele ser severo, conllevando complicaciones como el esófago de Barrett o anemias por sangrado. Es importante destacar que el RGE puede ser la causa en estos pacientes de cambios inexplicables en el humor y en el comportamiento, que son debidas al dolor que produce el cuadro.

Sistema circulatorio: El 25% de los pacientes presenta alguna cardiopatía congénita, siendo las más comunes la estenosis de la válvula pulmonar y la comunicación interventricular.

Sistema nervioso: Desde el punto de vista neurológico, se sabe que alrededor del 23% de estos pacientes presentan ataques epilépticos. También suelen presentar hipotonía y alteraciones del sueño.

Alteraciones genitourinarias: Más del 40% de los individuos presentan malformaciones genitourinarias, entre las que se encuentran, por ejemplo, el reflujo vesicoureteral, la displasia renal la criptorquidia, hipospadias, hipoplasia de labios mayores, etc (^{1, 3}).

El fenotipo del SCdL se puede considerar un espectro, en el que se incluyen los casos de fenotipo clásico, cuando cumplen una serie de criterios clínicos, y también algunos de fenotipo no clásico (aquellos cuya alteración molecular se encuentra en los genes del complejo de las cohesinas). Existen, pues, distintos criterios para su diagnóstico clínico, entre los cuales destacan los reunidos en las tablas de Kline y Gillis (^{1, 4, 5}).

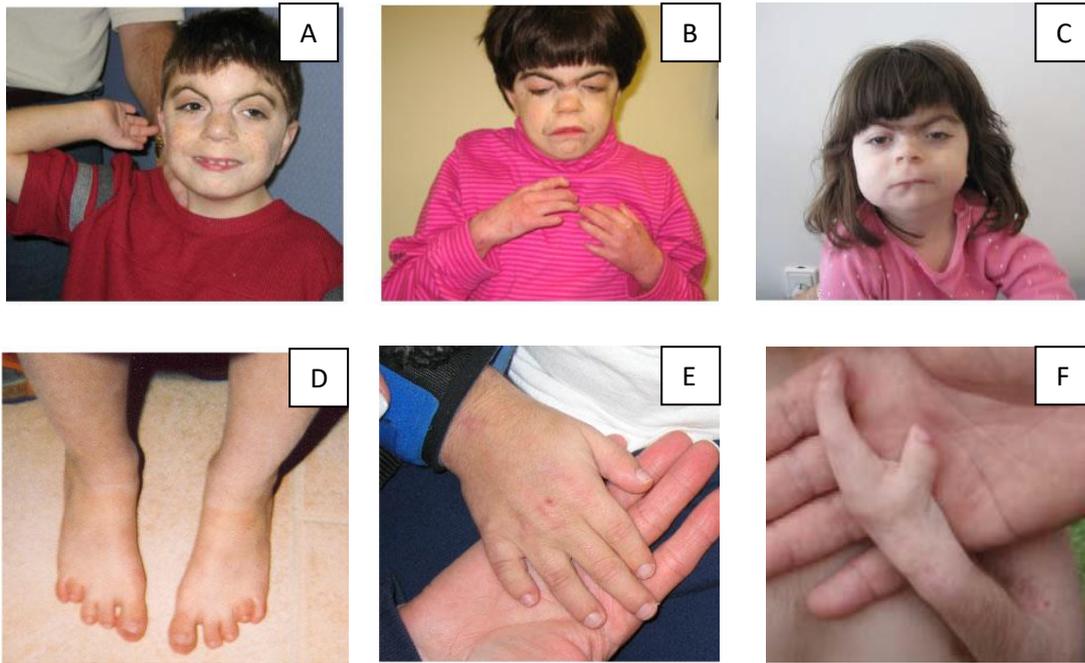


Figura 1. Manifestaciones clínicas en el SCdL. A) Leve sinofridia, cejas arqueadas, puente nasal deprimido y ancho, filtrum alargado, labio superior fino con comisuras orientadas hacia abajo, diastema dentario, pabellones auriculares de implantación baja. B) Sinofridia, cejas arqueadas, puente nasal deprimido y ancho, filtrum alargado, labio superior fino con comisuras orientadas hacia abajo. C) Sinofridia, filtrum alargado, labios finos con comisuras orientadas hacia abajo, nariz pequeña con puente deprimido y narinas antevertidas. D) Pies pequeños, sindactilia parcial de los dedos 2 y 3. E) Braqui-clinodactilia del quinto dedo. F) Oligodactilia. Imágenes obtenidas de Kline et al., 2007 y Boyle et al., 2014.

b) Bases moleculares

El mecanismo molecular más importante en la patogenia del SCdL es la afectación de la función del anillo de las cohesinas. Este anillo es un regulador vital en muchos procesos cromosómicos, como la segregación de los cromosomas en las divisiones celulares, la regulación en la expresión de los genes o el mantenimiento de la estabilidad del genoma y de la estructura de la cromatina. Se ha observado que la función más afectada en el SCdL es la del mantenimiento de la cromatina, relevante sobre todo a la hora de realizarse la transcripción⁽⁶⁾. La aparición de mutaciones en los reguladores de la transcripción da lugar a un grupo de patologías del neurodesarrollo a las que se ha llamado “transcriptomopatías” y que comparten características fenotípicas básicas como discapacidad intelectual, retraso del crecimiento y del desarrollo y dismorfismos faciales. Así, el SCdL se puede englobar esta categoría, más amplia, de las transcriptomopatías, y explica por qué existe solapamiento con otros síndromes en los que el fallo molecular está en otros puntos del proceso de la transcripción, como se comentará posteriormente^(4,7,8).

Desde un punto de vista funcional, podemos clasificar los componentes del anillo de las cohesinas en dos grupos: por un lado los componentes estructurales del anillo (*SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*, *STAG1* y *STAG2*), y por otro los componentes reguladores de su función (*NIPBL*, *HDAC8*, *BRD4*, *ANKRD11*, *MAU2*, *AFF4*, *ESCO2*, *ESCO1*, *WAPL*, *PDS5A* y *PDS5B*)⁽⁹⁾. (Ver figura 2)

Existe, en este síndrome, cierta correlación genotipo-fenotipo. La gravedad de los síntomas se correlaciona, en mayor medida, con el gen afecto, siendo *NIPBL* el responsable del fenotipo más grave y *SMC3* y *SMC1A* los que generan el fenotipo más leve. Sin embargo, se han encontrado diferencias fenotípicas en pacientes con la misma mutación, lo que sugiere la existencia de factores ambientales o de otros factores genéticos no conocidos. Dentro del mismo gen, la severidad del fenotipo también parece correlacionarse con el efecto de la proteína mutada: las mutaciones sin sentido (no sense) y aquellas que cambian el marco de lectura (frameshift) son más severas, y las mutaciones de tipo sentido erróneo (missense), más moderadas. Cabe destacar que, en el caso de algunos de los genes, el reducido número de pacientes conocidos con la alteración dificulta una relación genotipo-fenotipo clara (^{9, 10, 11}).

El mosaicismismo (presencia de dos o más poblaciones celulares, con diferente genotipo, en un solo individuo) es frecuente en el SCdL, y dificulta en algunos casos el diagnóstico, por ejemplo, en el caso de no estar presente la mutación causal en la estirpe celular analizada (generalmente, linfocitos). Se piensa que el mosaicismismo conlleva variaciones en la severidad del fenotipo, relacionándose severidad con el porcentaje de mosaicismismo, aunque este hecho aún no se ha probado (¹).

1. Genes del complejo de cohesinas

El primer gen relacionado con este síndrome fue el *NIPBL*, en el 2004. Desde entonces se han descrito seis genes causales más: *SMC3* (MIM 610759), *SMC1A* (MIM 300590), *RAD21* (MIM 606462), *HDAC8* (MIM 300882), *BRD4* y *ANKRD11*, siendo la relación causal de estos genes con el SCdL ampliamente avalada por la bibliografía (^{1, 11}).

- *NIPBL* (Nipped-B like protein): Localizado en el cromosoma 5 (5p13.2) y compuesto por 47 exones. Sus variantes son autosómicas dominantes, y la mayoría de ellas son de tipo missense. Se expresa en todo el organismo (lo que justifica la afectación multisistémica), especialmente en el corazón y en el músculo esquelético. Las variantes en este gen se relacionan con el cuadro clásico de SCdL (con las manifestaciones fenotípicas comentadas anteriormente), y se ha encontrado como causante de aproximadamente el 70% de los casos de SCdL (^{1, 11}).

La mayoría de las alteraciones descritas en el gen *NIPBL* responden a mutaciones en regiones codificantes del gen, pero también se han descrito mutaciones en zonas exónicas flanqueantes que modifican el patrón splicing, variaciones en el número de copias del gen, e incluso se ha descrito una variante patogénica en la región 5'UTR (^{12, 13}).

- *SMC3* (Structural maintenance of chromosomes 3): Localizado en el cromosoma 10 (10q25.2) y compuesto por 29 exones. Suele causar también un SCdL autosómico dominante. Las mutaciones más comunes son las missense o las inserciones y deleciones in-frame. Se relaciona funcionalmente con *SMC1A*. Sus variantes son poco frecuentes, representando solo el 1-2% de los SCdL, y se identifica en individuos con fenotipo no clásico, y leve en la mayoría de los casos. Típicamente muestran microcefalia pero con un fenotipo facial menos marcado (la sinofridia casi siempre está ausente y la nariz es frecuentemente más ancha y menos deprimida, sin las narinas antevertidas), menor retraso en el crecimiento postnatal (aunque a

veces empeora en la infancia), poca afectación cardíaca y de otros sistemas y ausencia de reducciones de las extremidades (^{14, 15}).

- *SMC1A* (Structural maintenance of chromosomes protein 1A): Localizado en el cromosoma X (Xp11.22), por lo que se transmite ligado al éste, y compuesto por 26 exones. Del mismo modo que *SMC3*, la mayoría de las mutaciones identificadas en él son missense. Se ha identificado como el causante del 5% de los casos de SCdL. Muchos de los afectados presentan un fenotipo no clásico y en general leve, más parecido al de *SMC3* que al de *NIPBL*. Suelen tener menos aplanamiento del puente nasal, unas cejas más pobladas y la cara más redonda que los afectados por el *NIPBL*, y no suelen tener reducción de extremidades ni otras anomalías severas. Algunos de ellos, además, presentan unos percentiles de crecimiento normales e incluso pueden asistir a las clases estándar (^{10, 15}).
- *RAD21* (Double-strand break repair protein RAD21 homologue): Localizado en el cromosoma 8 (8q24.11) y compuesto por 14 exones. Es un importante regulador de la unión y la separación de las cohesinas a la cromatina. Causa un SCdL autosómico dominante. Sus variantes representan un pequeño porcentaje de los casos del SCdL, existiendo hasta la fecha 13 casos reportados de SCdL con afectación de este gen. En comparación con el *NIPBL*, su fenotipo también es más leve, con una discapacidad intelectual menor y menos anomalías físicas. Contrariamente a otros genes, en este caso se han descrito dos mutaciones missense que causan una clínica más severa que diferentes tipos de mutaciones como las nonsense (¹⁶).
- *HDAC8* (Histone deacetylase 8): Localizado en el cromosoma X (Xq13.1, patrón ligado a X) y formado por 8 exones. Es el encargado de desacetilar *SMC3*, permitiendo a este realizar su acción, y de reciclar las cohesinas trasladándolas de una célula a otra. Existen 65 casos de SCdL con afectación de este gen reportados en este momento. Causa un cuadro de SCdL no clásico, con importantes variaciones fenotípicas (hipertelorismo, nariz bulbosa y personalidades alegres, entre otros rasgos), aunque algunos de los individuos sí que cumplen los criterios del síndrome clásico (¹⁷).
- *BRD4* (Bromodomain- containing protein 4): Localizado en el cromosoma 19 (19p13.12) y compuesto por 20 exones. La proteína que condensa se relaciona con *NIPBL* y se une a las histonas, permitiendo la unión a la cromatina. Se han reportado 9 variantes en este gen, la mayoría con un fenotipo no clásico, aunque algunos pacientes cumplen criterios del fenotipo clásico (¹⁸).
- *ANKRD11* (Ankyrin repeat domain-containing protein): Localizado en el cromosoma 16 (16q24.3) y formado por 13 exones. Se relaciona con el promotor de la transcripción, inhibiéndolo. Hasta la fecha, solamente han sido descritas 5 mutaciones en este gen, todas ellas en individuos con fenotipo de SCdL no clásico. (^{1, 11})

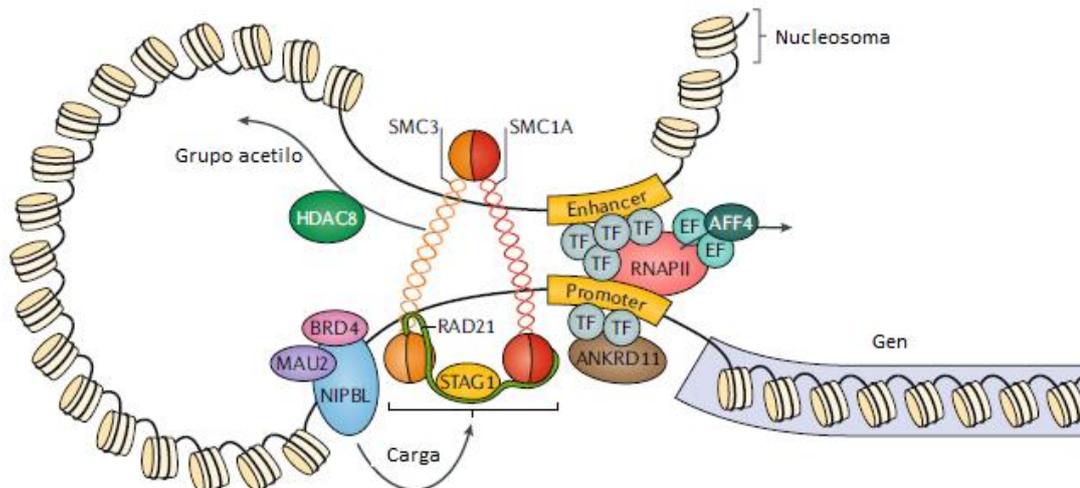


Figura 2. Anillo de las cohesinas. EF: Factor de elongación. TF: Factor de transcripción. RNAPII: ARN polimerasa II. Fuente: Kline AD, Moss JF, Selicorni A, Bisgaard M, Deardorff MA, Gillett PM, et al. Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. Nat. Rev. Genet. 2018; 19(10):649-666. (Modificada)

Además de estos genes, fuertemente relacionados con el SCdL, se encuentran dentro del anillo otros como *STAG1* y *STAG2* (se han descrito pacientes con fenotipo que se solapa con el de SCdL que presentan mutaciones en ellos) ⁽¹⁹⁾, *WAPL* y *PDS5A* (recientemente descritas como causantes de cohesinopatías ⁽²⁰⁾), *MAU2* (que forma un complejo con *NIPBL*) y *ESCO2*, un factor auxiliar que acetila a *SMC3*, relacionado con el Robert síndrome-focomielia (RBS, MIM #268300) y que también está caracterizado por retraso mental, malformaciones craneofaciales y de miembros ^(21, 22).

2. Otros genes relacionados con el SCdL. Regulación de la transcripción.

La transcripción del ADN a ARN es un proceso complejo en el que participan multitud de factores. Se han descrito cómo mutaciones en genes involucrados en las distintas etapas del proceso de transcripción y/o en la modificación epigenética del genoma pueden causar diversos trastornos que comparten muchas características fenotípicas con el SCdL. El proceso general de transcripción consiste en la síntesis de una cadena de ARN por la acción de una ARN polimerasa, cuya función es leer la secuencia de nucleótidos del ADN molde y sintetizar la nueva cadena de ADN utilizando nucleótidos libres. El citado proceso puede dividirse en las siguientes fases ^(8, 23):

a) **Modificación de histonas y remodelación de la cromatina**

Las histonas son unas proteínas octaméricas que juegan un papel clave en el empaquetamiento del ADN. Sin embargo, durante la transcripción, la maquinaria transcripcional necesita tener acceso al ADN, por lo que es necesario que éste se desenrolle de las histonas, para lo cual son necesarios procesos de modificación de histonas y de remodelación de la cromatina. Algunos de los genes y proteínas implicados en estos procesos son:

- *CREBBP* y *EP300*: Codifican proteínas con acción acetiltransferasa de la lisina, fundamental para activar la cromatina. El fenotipo derivado de su alteración (llamado síndrome de Rubinstein-Taybi, MIM #180849, 613684) tiene características fenotípicas como cejas altas y arqueadas, pestañas largas, puente nasal aplanado y trastornos del comportamiento similares a los encontrados en pacientes con SCdL. También se han encontrado mutaciones en *EP300* en pacientes con características de SCdL y, además, *EP300* se relaciona con HDAC8, proteína reguladora del anillo de las cohesinas que ya se ha explicado anteriormente (^{24, 25}).

- *KMT2A*: Metiltransferasa lisina-específica. Su alteración conduce al síndrome de Wiedemann-Steiner (WDSTS, OMIM #605130), que también comparte características fenotípicas con el SCdL (²⁶).

- El complejo SWI/SNF (switch/sucrose non-fermenting), llamado complejo BAF en mamíferos, es un complejo dependiente de ATP que regula la accesibilidad al ADN. El anillo de cohesinas también ayuda a mantener libres las regiones de ADN, por lo que la afectación de ambos complejos tiene efectos parecidos. Las mutaciones en el complejo BAF causan un espectro de síndromes entre los que se incluyen el síndrome de Coffin-Siris (CSS, MIM #135900, #614608, #614607, #614609, #616938, #617808, #618362 Y #618027) y el síndrome de Nicolaides-Baraitser (NCBRS), ambos con fenotipos solapantes entre sí y con el SCdL. Mutaciones en los genes *ARID1A*, *ARID1B*, *SMARCA4*, *SMARCB1*, *SMARCE1* o *SOX11* se relacionan con el síndrome de Coffin-Siris (dismorfismo facial, microcefalia, estatura baja, discapacidad intelectual, etc.). Sin embargo, la alteración en el gen *SMARCA2* se ha relacionado con el síndrome de Nicolaides-Baraitser (MIM #601358), caracterizado por retraso mental, braquidactilia, criptorquidia, baja estatura o epilepsia (^{27, 28}).

- *PHF6*: La proteína PHF6 interactúa directamente con un componente (RBBP4) del complejo de remodelación y desacetilación de histonas, e influye activamente en la represión de la expresión de los genes. El fenotipo derivado de su alteración (llamado síndrome de Borjeson-Forsman-Lehmann, MIM #301900), que incluye rasgos como arcos supraorbitarios prominentes, sinofridia, nariz corta, clinodactilia, uñas hipoplásicas, retraso mental severo, epilepsia o hipogonadismo, por lo que posee un alto grado de parecido con el CSS (²⁹).

b) *Inicio de la transcripción*

El inicio de la transcripción viene determinado por los promotores, unas secuencias que definen la región del gen en la que se une el complejo enzimático responsable de la síntesis. La ARN polimerasa se une a los promotores a través de otro complejo proteico denominado complejo de preiniciación, formado por TFIID (compuesto por las proteínas TAF), TFIIA, TFIIB y TFIIF. Se han encontrado mutaciones del *TAF6* en dos familias diferentes con fenotipo de SCdL (estando uno de los pacientes previamente diagnosticado de SCdL). El fenotipo relacionado con estas mutaciones (síndrome de Alazami-Yuan, MIM #617126) incluye hipotonía, retraso en el desarrollo psicomotor, pobre adquisición del lenguaje, cejas curvadas, puente nasal prominente, sinofridia, hirsutismo y pestañas largas, características que recuerdan al SCdL (^{11, 30}).

c) ***Pausa y elongación de la transcripción***

El proceso de elongación de la cadena de ADN naciente está sujeto a paradas, debido a diversos obstáculos que la polimerasa se puede encontrar al avanzar por el ADN molde (por ejemplo, daños sufridos por el ADN). Por ello, es necesaria la presencia de factores que favorecen la elongación como el SEC (super elongation complex). Dentro de este es importante la proteína AFF4, cuya hiperfunción se ha relacionado con un fenotipo Cornelia-like. Usando secuenciación completa del exoma, se encontró esta mutación en 3 pacientes con fenotipo de SCdL y se le denominó síndrome de CHOPS (MIM #616368). Posteriormente, también se ha demostrado interacción molecular directa entre el complejo de cohesinas, el SEC y la ARN polimerasa (³¹).

d) ***Looping de promotor y enhancer***

Para que la transcripción pueda llevarse a cabo, es necesario que la zona del promotor se acerque otras zonas, llamadas potenciadores (o enhancers), para lo que el ADN forma un looping. Dicho proceso se ve facilitado por la acción del complejo de las cohesinas, comentado previamente, que abraza el looping para mantener las interacciones enhancer-promotor.

e) ***Otros genes***

- *DDX11*: Helicasa que participa en la reparación del ADN y en la cohesión de las cromátidas hermanas, por lo que sus alteraciones también pueden considerarse cohesinopatías (³²).

- *NAA10*: La enzima NAA10 está implicada en la acetilación del terminal amino de las proteínas, entre otras funciones. La base molecular de cómo las variantes en NAA10 llevan a los diversos fenotipos en los seres humanos está aún en investigación, pero mutaciones en ese gen llevan parejo un fenotipo (síndrome de Ogden, MIM #300855) caracterizado por pestañas largas, cejas finas y arqueadas, puente nasal ancho, retraso severo en el desarrollo psicomotor, características dismórficas e hipotonía, rasgos solapantes con el SCdL (³³).

c) **Diagnóstico genético**

El diagnóstico genético del SCdL puede resultar complejo, debido, principalmente, a la heterogeneidad genética. Esta se manifiesta por un lado en el número de genes que pueden estar afectados, pero también en el tipo de anomalías genéticas, que pueden ir desde variaciones estructurales (como variación en el número de copias) a variaciones en la secuencia (variaciones de un solo nucleótido, inserciones o deleciones..., tanto en regiones codificantes como en regiones de splicing).

Esta heterogeneidad obliga en muchas ocasiones a la utilización de varias técnicas de diagnóstico genético, de las cuales destacan las siguientes:

1) **Técnicas de diagnóstico genético**

En función del tipo de anomalías a detectar y la capacidad de la técnica se pueden clasificar las técnicas de diagnóstico genético en:

a. **Anomalías en la estructura del genoma:**

i. **Cariotipo, FISH y MLPA:**

El cariotipo es la representación ordenada de los cromosomas, examinada bajo un microscopio. Pone de manifiesto anomalías numéricas y estructurales, aunque su resolución está limitada a reordenamientos muy grandes (5-8 Mb). A pesar de que los pacientes con SCdL suelen presentar un cariotipo normal, podría recomendarse su realización en etapas prenatales, por ejemplo, para detectar síndromes asociados como el síndrome de Turner ⁽⁴⁾.

Hibridación fluorescente *in situ* (FISH): Es una técnica citogenética de hibridación de los cromosomas con sondas que emiten fluorescencia. Permite la rápida determinación de aneuploidías, reordenamientos, microdeleciones, duplicaciones e inversiones, con una mayor resolución que el cariotipo ⁽⁴⁾.

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification assay): Se trata de una técnica capaz de detectar variaciones en el número de copias de un gen evaluando las copias de cada secuencia de ADN, pudiendo así evidenciar deleciones y duplicaciones que otras técnicas, como la de Sanger, no son capaces de detectar ⁽³⁴⁾. Se estima que aproximadamente un 2-3% de los casos de CdLS son debidos a variaciones en el número de copias (CNV) en el gen *NIPBL* ⁽³⁵⁾.

ii. **Hibridación genómica comparativa en microarrays (acGH):**

Esta técnica es capaz de detectar reordenamientos muy pequeños y pequeñas deleciones o duplicaciones (resolución de 1Mb-<1Kb), a un coste no muy elevado. Se basa en la hibridación de dos tipos de ADN, marcados con fluorocromos distintos (generalmente uno verde y otro rojo) con una fase sólida que contiene miles de sondas de ADN monocatenario (los arrays) inmovilizadas en una superficie, y valorar según la intensidad luminosa de la fluorescencia, cómo de representado está el gen en las muestras ⁽³⁶⁾. Esta técnica ha permitido algunos diagnósticos de SCdL, como es el caso de un paciente con una duplicación en *SMC1A* ⁽³⁷⁾.

b. **Anomalías en la secuencia del genoma:**

I. Secuenciación de primera generación

i. **Secuenciación sanger:**

Tradicionalmente, el diagnóstico molecular en enfermedades monogénicas de origen conocido se realiza mediante la secuenciación de exones y zonas de splicing de una muestra de ADN, normalmente de las células de la sangre, mediante el método Sanger. Desarrollada en el año 1977 por Frederick Sanger, esta técnica se considera la primera técnica de secuenciación, siendo el máximo exponente de la primera generación de la misma, y sus procesos se utilizan también en muchas de las técnicas más modernas. Sin embargo, este procedimiento implica una serie de limitaciones en relación coste-eficiencia cuando se aplica a enfermedades con heterogeneidad genética (en las que no existe un único gen causal, sino un grupo de genes potencialmente candidatos), como es el caso del SCdL ⁽³⁸⁾.

Por último, destacar que la secuenciación Sanger sigue siendo la técnica de elección para la confirmación de las variantes encontradas por secuenciación masiva.

ii. **Pirosecuenciación:**

Fue la primera alternativa al método de Sanger. Se basa en la detección de señales luminosas generadas a partir del pirofosfato tras la polimerización de un nuevo nucleótido durante la síntesis del ADN. Los nucleótidos se van añadiendo de uno en uno y, si se produce la reacción, se libera un pirofosfato que emite luz. Es una técnica más sensible que la secuenciación Sanger, siendo posible diferenciar qué tanto por ciento de alelos están mutados. En el SCdL ha resultado de gran utilidad para detectar casos de mosaicismo genético (³⁶).

II. Secuenciación de segunda generación (NGS):

Las nuevas técnicas de secuenciación masiva inician su actividad comercial en el año 2005. En contraposición a la secuenciación Sanger, las plataformas de NGS permiten obtener millones de fragmentos de ADN en un único proceso.

- i. **Panel de genes:** Se trata de una técnica cada vez más ampliamente extendida. A diferencia de un exoma, en el que se secuenciarían todos los genes del paciente, un panel secuencia un conjunto limitado de genes, por lo que permite un estudio restringido pero profundo. La aplicación de paneles de secuenciación masiva al diagnóstico de enfermedades con heterogeneidad genética requiere de un proceso de diseño biomédico de los genes asociados a la patología, diseño bioinformático del panel y de la validación bioinformática y diagnóstica, que permita evaluar los parámetros de calidad. Además, posteriormente se requerirá la confirmación de las variantes encontradas por secuenciación Sanger (³⁵, ³⁷). Entre sus mayores utilidades destacarían las enfermedades con heterogeneidad genética, fenotipos solapantes, y trastornos con genes asociados cuya estructura o vía molecular es común, características que se cumplen en el SCdL (³⁹).
- ii. **Exoma** (WES: Whole-exome sequencing): Consiste en la secuenciación de todos los exones del genoma. Sus mayores utilidades son aquellas patologías con heterogeneidad genética extrema y gran cantidad de mutaciones de novo, cuando se reúnen dos o más fenotipos no relacionados en un solo paciente, los casos en los que no se encuentran rasgos fenotípicos sugestivos de ninguna patología en el momento de solicitar el test y en fenotipos anodinos pero con sospecha de alteración genética asociada (³⁶, ³⁹).

2) Estrategia de diagnóstico genético en el SCdL

En 2018 se realizó un consenso sobre el manejo del SCdL, en el cual se incluye un algoritmo que explica cómo se debería realizar idealmente el proceso diagnóstico. (Ver figura 3)

En resumen, en pacientes que presenten el fenotipo clásico del SCdL, se recomienda que la aproximación diagnóstica inicial se realice por medio del análisis de al menos los siete genes conocidos del síndrome por NGS, o, en su defecto, por secuenciación Sanger. Si mediante estas técnicas no se detecta la variante causal, se debe considerar un estudio de mosaicismo y, si resulta negativo, buscar deleciones y duplicaciones, sobre todo en el gen *NIPBL*, con MLPA o arrays CGH.

Por otro lado, en los pacientes con el fenotipo no clásico, sería de elección, de nuevo, las técnicas de secuenciación masiva o, en el caso de un fenotipo que oriente hacia un gen determinado, realizar los estudios dirigidos a detectar una alteración en dicho gen. En el caso de que estas técnicas no encontrasen la causa, se podría realizar un estudio de duplicaciones y deleciones, debido a su rapidez. Por último, si los resultados fuesen negativos, se recurriría al estudio de mosaicismos, como en el supuesto anterior ⁽¹⁾.

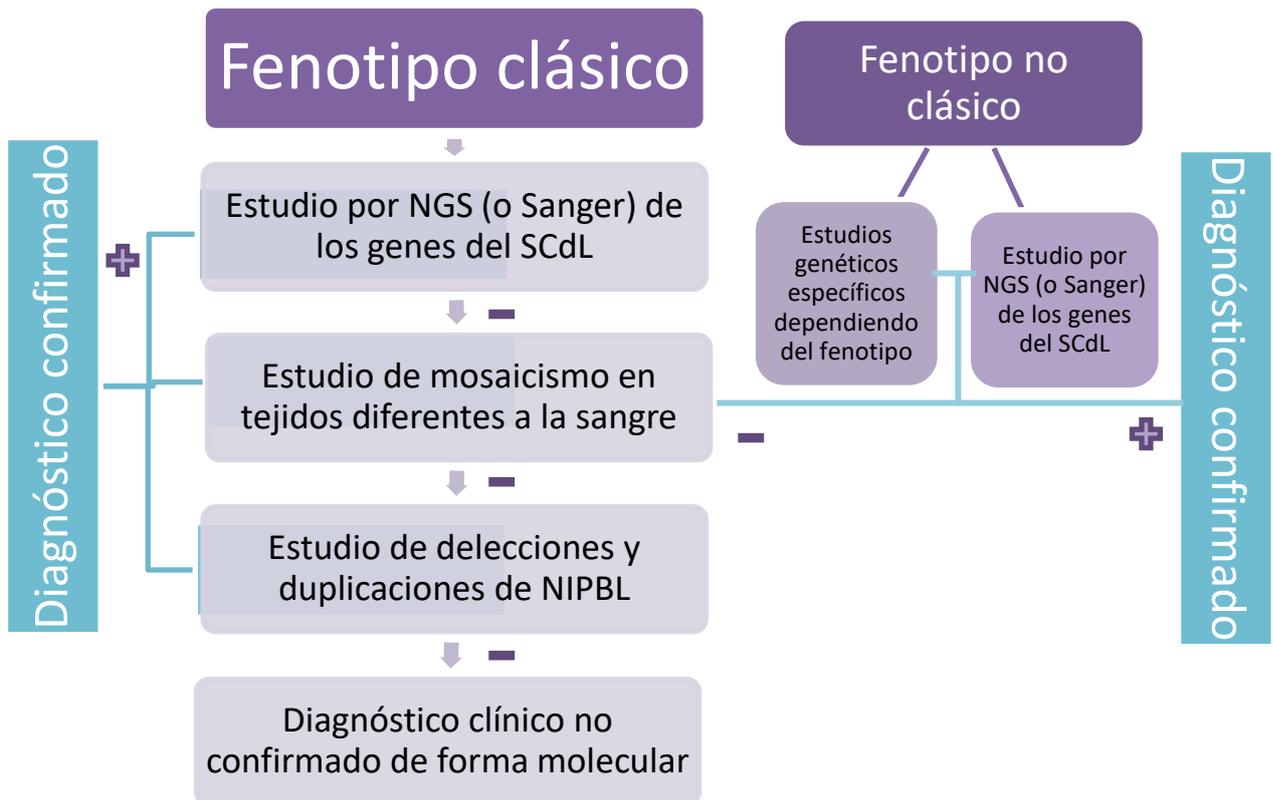


Figura 3. Algoritmo diagnóstico del SCdL. Tomada de Kline AD, Krantz ID, Sommer A, Kliever M, Jackson LG, Fitzpatrick DR, et al. Cornelia de Lange Syndrome : Clinical Review, Diagnostic and Scoring Systems, and Anticipatory Guidance. 2007;1296:1287–96. Adaptada.

OBJETIVOS

Objetivo general

Se plantea como objetivo general de este trabajo la aplicación de un nuevo método diagnóstico para el SCdL, basado en un panel de genes por secuenciación masiva.

Objetivos específicos

Para llevar a cabo este objetivo, en este trabajo se pretende:

1. Conocer y aplicar los criterios de clasificación clínica del SCdL a dos pacientes pediátricos con sospecha de SCdL para guiar el diagnóstico genético.
2. Comprender los diferentes métodos de diagnóstico genético en enfermedades raras con el fin de seleccionar el más adecuado en cada caso.
3. Estudiar las vías moleculares y los genes implicados en el SCdL para el diseño de un panel de genes de secuenciación masiva específico para el diagnóstico de este síndrome.
4. Aplicar el panel de genes diseñado para el diagnóstico genético del SCdL a dos pacientes sin diagnóstico genético conocido.
5. Interpretar y valorar los resultados obtenidos en los análisis de secuenciación del panel.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Características generales del estudio

La realización de este trabajo se ha llevado a cabo con la colaboración de los investigadores del Grupo de Genética Clínica y Genómica Funcional del Instituto de Investigación Sanitaria (ISS) Aragón, GII062. La recogida de la información clínica se ha realizado en el servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa", y los análisis de laboratorio en las instalaciones del grupo en la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza.

Las muestras biológicas e información clínica están recogidas en la colección de muestras inscrita con el código C.0002316 en el registro nacional del ISCIII para la línea de investigación en el Síndrome de Cornelia de Lange, cuyo responsable es el Dr. Feliciano Ramos Fuentes. Los objetivos de este trabajo están incluidos en el proyecto con título "Síndrome Cornelia de Lange: desarrollo de paneles diagnósticos, patrones de expresión genética y evaluación de ejes endocrinos en pacientes afectados" aprobado por el CEICA. El proyecto de investigación ha sido financiado con fondos del Proyecto de Investigación PI15-00707 de la convocatoria de Proyectos de Investigación en Salud (PI), AES 2015.

2. Pacientes

Para la realización de este proyecto se seleccionaron dos pacientes con fenotipo compatible con el SCdL en los que aún no se había encontrado la alteración genética causante de su cuadro.

a. **Recogida de muestras (sangre y biopsia de piel):**

La recogida de muestras se llevó a cabo en el Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa", por especialistas perteneciente al Grupo de Genética Clínica y Genómica Funcional, durante el XIII Congreso Nacional Científico-Familiar del Síndrome Cornelia de Lange, que se celebró en Zaragoza del 25 al 28 de Octubre de 2018.

Se extrajeron 4 ml de sangre periférica en un tubo con EDTA, y fueron conservados a 4°C hasta su envío y extracción de ADN.

Para las biopsias de piel se empleó la técnica de sacabocados o *punch*, que se realizó utilizando un bisturí de forma de cilindro unido a un mango de plástico. Previamente, se infiltró anestesia local (lidocaína al 1%) en la zona. Mediante la aplicación de presión sobre el instrumento, este se rotó sobre la piel, penetrando en todas las capas de la misma (epidermis, dermis y parte de la hipodermis) y obteniendo una muestra tisular cilíndrica. Una vez cortado este fragmento de piel, se extrajo con unas pinzas y se cortó su base con un bisturí para separarlo completamente. Posteriormente, se procedió a cerrar la piel con dos puntos de sutura. Por último, la biopsia se introdujo en un recipiente estéril con medio de cultivo y se envió inmediatamente al laboratorio donde fue procesado para el cultivo de fibroblastos y extracción de ADN.

b. **Recogida de información clínica:**

La información clínica de los pacientes fue obtenida de la Historia Clínica y de las consultas realizadas por distintos especialistas, siempre supervisada por un clínico de referencia, durante la realización del XIII Congreso, que

permitió recoger información actual de diferentes disciplinas. Posteriormente, se utilizaron los criterios diagnósticos de Kline y Gillis para clasificar a los pacientes según su fenotipo y la gravedad del mismo.

3. Muestras

Las muestras se enviaron a los laboratorios del grupo de investigación de Genética Clínica y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza, situado en la Facultad de Medicina. Las biopsias de piel fueron procesadas y sembradas en el mismo día, mientras que las muestras de sangre fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento (menos de 4 días).

a. **Extracción de ADN de sangre:** La extracción de ADN se realizó por métodos manuales convencionales. Para ello se mezclaron 4 ml de sangre con 40 ml de una solución de Tritón Sucrosa y se centrifugó durante 10 min a 2000 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 6 ml de tampón SE que contiene SDS, NaCl y EDTA que permite la solubilización de las membranas celulares. Se añadió también 120 µl de Proteinasa K (10 mg/mL), para digerir las proteínas. Esta mezcla se incubó toda la noche a 37°C. A continuación, se añadieron 2 mL de NaCl 6M y 8 mL de cloroformo y se centrifugó 15 min a 2500 rpm a 4°C. Para la precipitación de ADN se añadió 1 volumen de isopropanol, y se realizó un lavado con etanol al 70%. Tras centrifugar durante 5 min a 1200 rpm, el pellet de ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en buffer TE.

b. **Cultivo celular y extracción de ADN de fibroblastos:** Tras la recepción de la biopsia, y para conseguir un cultivo celular primario, se procedió a sembrar el material de la misma en placas de cultivo bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar. Las células se crecieron en un incubador a 37°C a una atmósfera de CO₂ al 5%. Los reactivos se calentaron en un baño a 37°C antes de ser añadidos al cultivo.

Cada biopsia fue diseccionada individualmente en una placa de Petri con PBS 1X y cortada en trocitos muy pequeños. Estos trocitos se sembraron en una Placa de Petri con medio de cultivo DMEM que contenía 10% SFB, 1% de Penicilina-estreptomicina, 5µg/ml de Plasmocin y 1% de Fungizona. A la semana se cambió el medio, y una vez que el cultivo llegó a un 90% de confluencia, se congeló un vial indicando "pasaje 1", y se sembraron 2 placas para su expansión.

Una vez que se tuvieron células suficientes se recogió un pellet celular para la extracción de ADN. La extracción de ADN de fibroblastos se realizó con el kit PureLink™ de Invitrogen (Thermo Fisher), siguiendo el protocolo del fabricante.

c. **Cuantificación de ADN**

Para la posterior realización de los estudios genéticos, las muestras de ADN extraídas de sangre y fibroblastos fueron cuantificadas por espectrofotometría y por fluorometría:

i. *Cuantificación de ADN por fluorometría:* La cuantificación precisa de ADN de doble cadena se realizó con el Fluorómetro Qubit 3.0 de Thermo Fisher y el kit Qubit dsDNA BR Assay, con un rango de detección de 2 a 1000 ng, siguiendo las instrucciones del fabricante.

ii. *Cuantificación de ADN por espectrofotometría:* Se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 y de acuerdo al protocolo NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer

User Manual (Thermo Fisher Scientific). El ADN genómico extraído se cuantificó a 260 nm. Además, esta técnica permite evaluar la pureza de ADN por medio de la relación de absorbancia a 260/280 y 260/230.

4. Análisis por secuenciación masiva

El diagnóstico genético se realizó por medio de un panel de secuenciación masiva diseñado específicamente para el diagnóstico del Síndrome de Cornelia de Lange. Este panel ha sido diseñado y puesto a punto en el laboratorio de Genética Clínica y Genómica Funcional. Las características técnicas del panel se han presentado en el Trabajo de Fin de Grado realizado por la alumna Pilar Corral en el Grado de Biotecnología durante el curso académico 2018/2019 con título “Desarrollo y validación técnica de un panel de secuenciación masiva para el estudio genético del Síndrome de Cornelia de Lange”.

a. Diseño del panel

- i. **Selección de genes:** Para la selección de genes a incluir en el panel de secuenciación se consultó la bibliografía disponible sobre los genes del SCdL y otras cohesinopatías y transcriptonopatías utilizando bases de datos como Pubmed, ClinVar, OMIM y GeneReviews. Se incluyeron 7 genes clásicos causales del SCdL (*NIPBL*, *HDAC8*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*, *ANKRD11* y *BRD4*) y otros 27 genes cuya afectación causa fenotipos atípicos de SCdL o fenotipos solapantes, o genes funcionalmente relacionados con los procesos moleculares que llevan al SCdL. Los genes incluidos en el panel se encuentran disponibles a petición del Tribunal.
- ii. **Diseño del panel:** Como estrategia de diseño para la preparación de librerías se utilizaron los paneles de amplicones que se basan en la amplificación de las regiones de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa. El diseño se realizó con el software *Ampliseq Designer*, sobre las regiones exónicas, incluyendo regiones flanqueantes al exón de hasta 25 nucleótidos, y con un tamaño de amplicón en el rango de 125-275 bp. El tamaño del panel fue de 249.25 Kb, la cobertura in silico del 99.16% y uniformidad superior al 95%.
Al realizar el diseño de los amplicones, los objetivos fueron maximizar la cobertura de los genes a estudio con el menor número posible de amplicones obteniendo una uniformidad óptima, elegir una temperatura de melting óptima para todos los primers, e intentar colocar los primers en regiones estables, poco variables, específicas y no homopoliméricas.
- iii. **Limitaciones técnicas:** Las mayores limitaciones técnicas del panel fueron: (i) Grandes reordenamientos (deleciones/duplicaciones). (ii) Cambios en regiones homopoliméricas, repetitivas o con altos contenidos de GC. (iii) Inserciones o deleciones de más de 10pb. (iv) Mutaciones en regiones con alta homología de secuencia con genes homólogos o pseudogenes (v) Alteraciones epigenéticas.

- b. **Preparación de librerías y secuenciación de la muestra:** Para la secuenciación de la muestra de ADN se empleó la tecnología Ion Torrent™. Las librerías se generaron con el sistema automático Ion Chef y se secuenciaron en el Ion Chip 530 en la plataforma Ion S5XL en los Servicios Centrales del IACS (Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud), de

Secuenciación y Genómica Funcional, situados en el CIBA (Centro de Investigación Biomédica de Aragón).

- c. **Análisis de Resultados:** El control de calidad básico y alineamiento del genoma de referencia se realizó con el paquete de software Torrent Suite Software. La integración, anotación e interpretación de variantes se realizó con el Software Ion Reporter. Para la anotación e interpretación de resultados se consultaron diversas bases de datos, entre las que destacan:

a. **Bases de datos de mutaciones reportadas causantes de enfermedad:**

- i. ClinVar: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Base de datos del NCBI, clasifica las variantes en benignas, probablemente benignas, patogénicas, de significado incierto...
- ii. Leiden Open Variation Database (LOVD): <https://www.lovd.nl/>
- iii. Human Gene Mutation Database (HGMD): www.hgmd.org
- iv. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man): <http://www.omim.org/>. Recoge genes humanos y defectos descritos en ellos.

b. **Bases de datos de variación genética:**

- i. dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>. Base de datos del NCBI que contiene descripciones de polimorfismos de de nucleótido único, microsatélites y pequeñas inserciones y deleciones junto con las publicaciones que se han realizado sobre ellas, frecuencias poblacionales, secuencia molecular, etc.
- ii. gnomAD: <https://gnomad.broadinstitute.org/>
- iii. 1000 Genomes Project: <http://www.internationalgenome.org/>

c. **Algoritmos para la predicción de patogenicidad:**

- i. PolyPhen2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- ii. SIFT: <http://sift.jcvi.org/>
- iii. Mutation Taster: <http://www.mutationtaster.org/>

Cuando una variante conlleva cambio de aminoácido, es posible estimar el impacto que puede tener esta sustitución para la función global de la proteína, para lo cual se dispone de cuatro algoritmos que evalúan esto, basándose, entre otras cosas, en las propiedades físicas de los aminoácidos. Estiman, pues la probabilidad de que la variante sea patogénica debido a ese cambio de función. Los más importantes son SIFT (más probabilidades de que sea patogénica cuanto más cercano a 0 sea su valor), Polyphen (más probabilidades cuanto más cerca de 1) y Grantham (mejor cuanto más elevado sea su valor, debe ser por lo menos 100). Por su parte, Mutation Taster, que incluye también frecuencias poblacionales para sus estimaciones, debería ser cercano a 1.

A continuación se aplicaron una serie de filtros para seleccionar variantes probablemente patogénicas. De este modo se excluyeron del análisis (i) las variantes en regiones no codificantes (se excluye de los filtros sitios de splicing flanqueantes al exón hasta +/- 20 nucleótidos), (ii) variantes sinónimas (se excluyen de los filtros variantes en los 4 primeros o últimos nucleótidos del exón), (iii) variantes con elevada frecuencia tanto en la población general (MAF>0.02) como en la base de datos propia de la Unidad de Genética Clínica y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza, (iv) Variantes encontradas en población

sana y descritos como benignas en la literatura, por considerarse cambios polimórficos (SNPs) sin relevancia clínica.

Las variantes obtenidas tras aplicar estos filtros fueron visualizadas en el software Integrative Genomics Viewer (IGV).

5. Validación por secuenciación Sanger y estudios de cosegregación familiar

Por último, las variantes encontradas fueron validadas por secuenciación Sanger por electroforesis capilar, y, si fue posible, se realizaron estudios de cosegregación familiar mediante la secuenciación sanger de dichas variantes en los progenitores (individuos sanos). Se basa en la síntesis de cadenas de ADN mediante una reacción de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para llevar a cabo el proceso bioquímico se requiere el ADN a estudio, un cebador o primer, una ADN polimerasa con buena procesividad y fidelidad (que no introduzca errores en la cadena nueva), desoxinucleótidos estándar y didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs), ambos marcados con fluorescencia. Estos ddNTPs terminan la elongación de la cadena al no tener grupo 3'-OH, produciendo varios fragmentos de ADN de longitud variable.

Los pasos a seguir para realizar la secuenciación por Sanger son:

- a. **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 μ L con el kit Taq DNA Polymerase Master Mix (Canvax) en un termociclador Veriti de Applied Biosystem. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar la región de la variante de interés. A continuación, se comprobó el producto de PCR por medio de una electroforesis de ADN en gel horizontal de agarosa al 1% y Gel Red.
- b. **Purificación del producto de PCR:** Antes de enviar a secuenciar es necesario eliminar los dNTPs y los oligonucleótidos residuales. Para ello se utilizó el reactivo ExoSAP-IT PCR Product Cleanup de Applied BiosystemsTM, siguiendo las instrucciones del fabricante.
- c. **Secuenciación:** La secuenciación Sanger se realizó en el instrumento ABI3730xl de Applied BiosystemsTM en los laboratorios de *Sistemas Genómicos*.
- d. **Análisis de resultados:** Las secuencias fueron analizadas con el software "Analysis Module Variant Analysis Software" de Applied BiosystemsTM.

RESULTADOS

Para este proyecto se seleccionaron dos pacientes con sospecha de SCdL. En ellos, se llevó a cabo una valoración clínica, incluyendo antecedentes personales y familiares, información sobre embarazo y parto, rasgos fenotípicos y datos sobre el crecimiento y desarrollo. Posteriormente, se aplicó en ambos pacientes el panel de secuenciación masiva "Síndrome Cornelia de Lange" (ver Material y Métodos).

Paciente 1:

❖ Diagnóstico clínico:

Paciente de sexo femenino, 11 años y 5 meses, caucásica, nacionalidad española. Diagnóstico sindrómico de SCdL al nacimiento.

Antecedentes personales:

Embarazo: Normal, controlado. Madre otitis en tercer trimestre de gestación (tratamiento con amoxicilina-ácido clavulánico).

Parto: Vaginal, eutócico, a las 38 semanas. Apgar 9-10. Peso: 2550 g, longitud: 46 cm, perímetro cefálico: 31 cm (microcefalia).

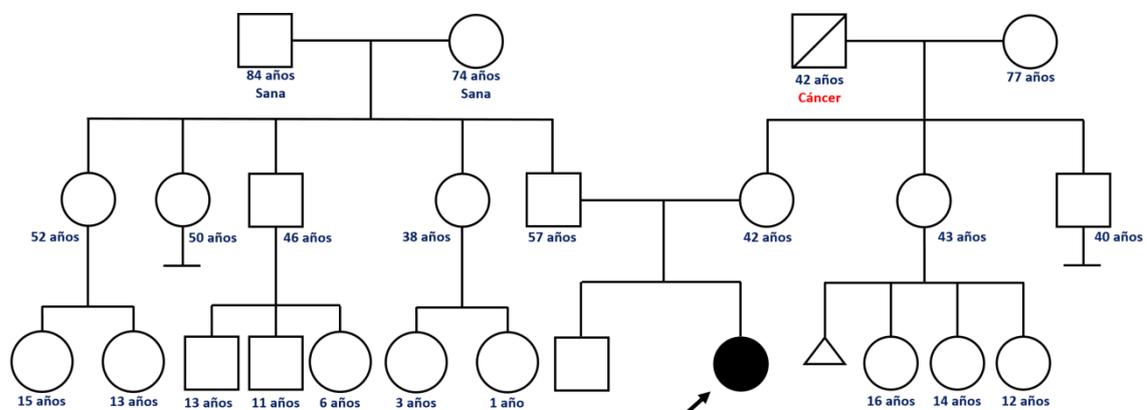
Periodo neonatal: Ingresada por cuadro malformativo (se traslada al HCU desde otro centro). Poquísimos incrementos ponderales en los primeros meses. Hipertonía, llanto débil. Succión escasísima y poca deglución.

Desarrollo psicomotor:

Sostén cefálico: 2 meses, sedestación: 18 meses, bipedestación: 2 años, deambulación autónoma: 2 años (con ayuda), lenguaje: no, comprensión: conservada, control de esfínteres: 10 años.

Antecedentes familiares: Padres y hermano sanos. No otros antecedentes de interés.

Árbol genealógico:



Criterios de Kline

Se trata de unos criterios diagnósticos publicados por Kline et al. en 2007, mediante los cuales se establece el diagnóstico clínico del SCdL. (Ver anexo 1). Tienen gran relevancia debido a la gran diversidad fenotípica que pueden presentar estos pacientes y a la gran cantidad de síndromes con fenotipos solapantes.

Es posible cumplir estos criterios de dos formas. En ambas es requerido el criterio craneofacial (sinofridia más al menos tres de los criterios secundarios de esa categoría), más:

- **Primera opción:** cumplir criterios de al menos dos de las categorías siguientes: crecimiento, desarrollo o comportamiento.
- **Segunda opción:** cumplir criterios de al menos 3 del resto de categorías, siendo necesario que se cumplan los criterios de al menos una de las anteriores (crecimiento, desarrollo o comportamiento).

Según esta tabla, se puede concluir que esta paciente presenta un fenotipo clásico, puesto que cumple las dos opciones de los criterios del SCdL. (Ver Anexo 2 y Anexo 4)

A continuación se destacan los rasgos más destacados de su clínica y fenotipo:

- ❖ Reducción de extremidades: Mano derecha con hipo/agenesia de 5º metacarpiano, que se refleja en implantación proximal de 5º dedo, a nivel de región hipotenar.
- ❖ Estenosis congénita del píloro (intervenida), reflujo gastroesofágico desde los dos meses de vida.
- ❖ Tabique interauricular hiperlaxo, foramen oval permeable. Dilatación leve de aorta ascendente. Hipertensión pulmonar moderada.
- ❖ Cumple todos los criterios craneofaciales (facies muy típica)
- ❖ Cumple criterios de todos los grupos, excepto del grupo de comportamiento (por falta de datos).

Criterios de Gillis

En 2004, Gillis et al. editaron una tabla con el objetivo de clasificar el cuadro de los pacientes en leve, moderado o grave.

La paciente presenta reducción parcial de las extremidades, retraso en el desarrollo de habilidades cognitivas moderado y una media de percentiles entre P25-75, lo que permite clasificarla como fenotipo moderado (Ver Anexo 3 y Anexo 4) ⁽⁴⁰⁾.

❖ **Diagnóstico genético:**

Ante la sospecha clínica de Síndrome de Cornelia de Lange, se realizó un estudio genético a partir de una muestra de ADN genómico aislado de leucocitos de sangre periférica del paciente. El estudio se llevó a cabo con el panel de secuenciación masiva “Síndrome de Cornelia de Lange”.

Datos técnicos:

Lecturas on target	97.98%
Profundidad media de lecturas por base	1,221
Uniformidad	95.51%
Profundidad de cobertura a 20X	98.62%
Profundidad de cobertura a 100x	97.48%
Profundidad de cobertura a 500x	89.24%
Tanto por ciento de lecturas de principio a fin	88.36%

Tabla 1: Datos técnicos del Paciente 1.

En primer lugar, se revisaron los datos técnicos de la secuenciación de la muestra procesada, prestando especial atención a los datos de profundidad de lectura, es decir el número de veces que se ha leído cada nucleótido en la región de interés (Ver Tabla 1). Como regla general, cuanto mayor sea la profundidad, mayor será la sensibilidad y la confianza de identificación de una variante.

Para la detección de variantes germinales se considera aceptable una profundidad de lectura del 50X. Pero en el caso del SCdL, donde más del 20% de los pacientes presentan condiciones de mosaicismo genético, es necesario aumentar la profundidad para poder detectar variantes con una frecuencia alélica baja. Se estima que, para alcanzar una sensibilidad del 5% (frecuencia del alelo alternativo del 5%), sería necesario una profundidad de 1000 lecturas por muestra (1000X).

En este caso, la profundidad media de lecturas fue de 1221X, con una uniformidad del 95,51% (indica cuánto se alejan los valores de cobertura de esa media). El 97.48% de las bases fueron leídas más de 100 veces y el 89, 24%, más de 500.

Datos Genéticos:

Trás aplicar los filtros descritos en Material y Métodos se detectó en heterocigosis la variante c.6272G>A (p.Cys2091Tyr) en el exón 36 del gen *NIPBL*. (Ver Tabla 2) (Ver Figura 3)

Gen	Exon	Cambio de Nucleótido	Cambio de proteína	Tipo de Variante	Transcrito RefSeq ID	Posición Genómica (GRCh37)	VAF (%)	Cobertura
<i>NIPBL</i>	36	c.6272G>A	p.Cys2091Tyr	Missense	NM_133433.3	Chr5:37044760	50,17	885

Tabla 2: Descripción de las variantes encontradas en el Paciente 1

Esta variante corresponde a transición de guanina (G) por una adenina (A) en la posición c.6272 (NM_133433.3). Se trata de una mutación de tipo “sentido erróneo” (missense), en la que se cambia un único nucleótido, pero esto lleva a un cambio en el aminoácido que se codifica en esa posición. Así, en la posición 2091 de la proteína de esta paciente se encontrará una tirosina en el lugar de una cisteína.

Con una cobertura de 885X, la frecuencia del alelo alternativo (VAF) es de 50,17 %, indicando que es una variante que se encuentra en heterocigosis. Se considera que las mutaciones se encuentran en heterocigosis si su frecuencia es aproximadamente de un 50% (la mitad de los alelos son de un tipo y la otra mitad de otro), en homocigosis si es aproximadamente del 100% (todos los alelos detectados son iguales) y, en el caso de encontrarse en un porcentaje considerablemente más pequeño, nos encontraríamos frente a una mutación somática, lo que puede orientarnos a que se trata de un mosaicismo.



Figura 3: Visualización de la variante c.6272G>A en el gen *NIPBL* en el software IGV.

Por último, la variante c.6272G>A en el gen *NIPBL* ha sido confirmada por secuenciación Sanger (Ver figura 4)

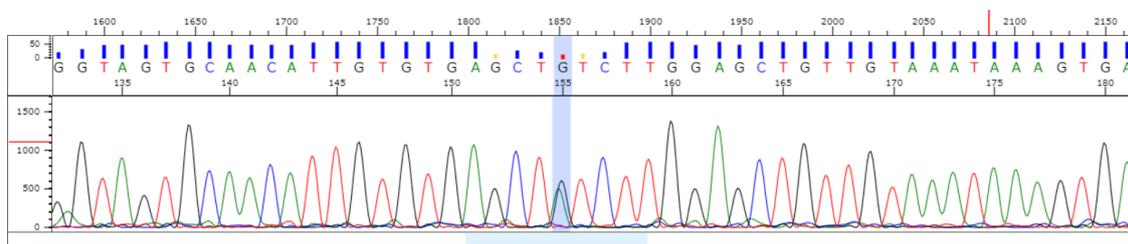


Figura 4: Cromatograma de secuenciación capilar que confirma la variante c.6272G>A en el gen *NIPBL*

Interpretación biológica y clínica:

En primer lugar, se valoró la frecuencia alélica poblacional (MAF: minor allele frequency). Esta variante no está descrita en las bases de datos poblacionales consultadas: ExAC, 1000 Genomes Project, dbSNP, gnomAD, por lo que se entiende que no se detectó la variante en ninguno de los sujetos estudiados en estas bases de datos. Por lo tanto, no podemos considerar esta variante como un polimorfismo (SNP).

A continuación, se comprobó si la variante había sido previamente descrita en alguna base de datos que incluyen asociaciones de variaciones genéticas y fenotipos (ClinVAR, LOVD y HGMD). A pesar de no estar registrada en ninguna de ellas, la variante sí que está previamente descrita como mutación causal del SCdL (Mei et al., 2015) ⁽⁴¹⁾.

Al existir un cambio de aminoácido, es posible estimar el impacto que puede tener esta sustitución para la función global de la proteína. Las herramientas in silico de predicción de efecto funcional, Mutation Taster (= 1.0), SIFT (= 0.0), y Polyphen2 (= 1.0), sugieren que es un cambio patogénico. Además, existe una diferencia fisicoquímica grande entre aminoácidos (Grantham dist.: 194 [0-215]).

Conclusión del análisis genético:

Teniendo en cuenta el resultado del estudio genético, la variante c.6272G>A en el gen *NIPBL* es probablemente patogénica y podría confirmar un diagnóstico clínico de Síndrome Cornelia de

Lange. Aproximadamente el 70% de los casos de Síndrome de Cornelia de Lange se explican por alteraciones en el gen *NIPBL* (1).

Para completar este estudio sería necesario realizar un análisis de cosegregación familiar.

Paciente 2:

❖ Diagnóstico clínico:

Paciente de sexo masculino, de 33 meses de edad. Caucásico, nacionalidad española.

Antecedentes personales:

Embarazo: Controlado, normal.

Parto: Cesárea, a las 39+5 semanas de gestación. Peso: 2880 g, longitud: 46 cm.

Periodo neonatal: Ingresado en neonatología por distrés respiratorio.

Antecedentes familiares: Padres sanos. Tía materna con hipotiroidismo. No otros antecedentes de interés.

Criterios de Kline

Según la tabla de criterios de Kline, se puede afirmar que este paciente presenta un fenotipo clásico, puesto que cumple no solo una, sino las dos opciones de los criterios del SCdL. (Ver Anexo 2 y Anexo 4)

A continuación se destacan los rasgos más destacados de su clínica y fenotipo:

- ❖ Retraso psicomotor y cognitivo grave
- ❖ Hipoacusia grave
- ❖ Miopía mayor de 4 dioptrías
- ❖ Anomalías cardíacas: comunicación interauricular o interventricular
- ❖ Anomalías genitourinarias: estenosis ureteral, hipospadias, criptorquidia.
- ❖ Comportamiento autolesivo (tirones de pelo), rasgos del espectro autista, movimientos repetitivos.
- ❖ Cumple los criterios de todos los grupos

Criterios de Gillis

El paciente no presenta reducción de extremidades, pero sí muestra un retraso grave en el desarrollo de habilidades cognitivas. Por otro lado, sus percentiles medios estaban entre P25 y P75. Todas estas características permiten clasificar al paciente como fenotipo moderado. (Ver Anexo 3 y Anexo 4)

❖ Diagnóstico genético:

De forma análoga a la paciente anterior, se realizó un estudio genético a partir de una muestra de ADN genómico aislado de leucocitos de sangre periférica del paciente. El estudio se llevo a cabo con el panel de secuenciación masiva “Síndrome de Cornelia de Lange”.

Datos técnicos:

Lecturas on target	97.58%
Profundidad media de lecturas por base	1,289
Uniformidad	95.58%
Profundidad de cobertura a 20x	98.69%
Profundidad de cobertura a 100x	97.70%
Profundidad de cobertura a 500x	88.40%
Tanto por ciento de lecturas de principio a fin	87.73%

Tabla 3: Datos técnicos del Paciente 2

La profundidad de cobertura media fue muy buena, de 1289X, con una uniformidad del 95,58%. Se aprecia que prácticamente toda la secuencia (97.70%) fue leída más de 100 veces, y hasta un 89.40%, más de 500 veces.

Datos genéticos:

Tras aplicar los filtros descritos en Material y Métodos se detectó la variante c.305G>A (p.Cys102Tyr) en el exón 4 del gen *HDAC8*. (Ver Tabla 4) (Ver Figura 5)

Gen	Exon	Cambio de Nucleótido	Cambio de proteína	Tipo de Variante	Transcrito RefSeq ID	Posición Genómica (GRCh37)	VAF (%)	Cobertura
<i>HDAC8</i>	4	c.305G>A	p.Cys102Tyr	Missense	NM_018486.2	chrX:71787871	100	298

Tabla 4: Descripción de las variantes encontradas en el Paciente 2.

La variante corresponde a una transición de una G por una A en la posición c.305 (NM_018486.2). Se trata de una mutación missense con cambio de aminoácido: tirosina por cisteína en la posición p.102 de la proteína.

Siendo la cobertura de 298X, encontramos que la frecuencia del alelo alternativo es del 100%, lo que, en este caso, al tratarse de un gen localizado en el cromosoma X, nos indicaría una hemicigosis (el paciente es un varón, por lo que solo tiene una copia del cromosoma X, pudiéndose detectar únicamente un alelo, en este caso, el alternativo).



Figura 5: Visualización de la variante c.305G>A en el gen *HDAC8* en el software IGV

Por último, la variante c.305G>A en el gen *HDAC8* se encuentra en proceso de validación por secuenciación Sanger.

Interpretación Biológica y Clínica:

Esta variante está descrita en dbSNP con el rs782380942, y ha sido identificada en 1 de los 84667 alelos analizados en la base de datos de ExAC. No ha sido reportado en las bases de datos 1000 Genomes Project ni gnomAD. Por lo tanto, teniendo en cuenta los datos poblacionales, no podemos considerar esta variante como un cambio polimórfico.

A continuación, se comprobó si la variante había sido previamente descrita en alguna de las bases de datos mencionadas (ClinVAR, LOVD y HGMD), no encontrándose registrada en ninguna de ellas.

Por último, debido a que en este caso también se existiría un cambio de aminoácido, también se pueden utilizar las herramientas in silico de predicción de efecto funcional en las proteínas: Mutation Taster (= 1.0), SIFT (= 0.0), y Polyphen2 (= 1.0), que sugieren que se trata de un cambio patogénico. Además, también existe una gran diferencia fisicoquímica entre aminoácidos (Grantham dist.: 194 [0-215]).

Conclusión del análisis genético:

Teniendo en cuenta estos resultados, la variante c.305G>A en el gen *HDAC8* es probablemente patogénica, por lo que se podría confirmar el diagnóstico de Síndrome Cornelia de Lange. Sin embargo, de igual manera que en el caso anterior, para completar este estudio sería necesario realizar un análisis de cosegregación familiar.

DISCUSIÓN

El desarrollo, en la última década, de las nuevas técnicas de secuenciación genómica, el descenso de los costes económicos y el avance en los análisis bioinformáticos están suponiendo un cambio en el manejo y diagnóstico de pacientes con enfermedades de base genética. Esta irrupción del diagnóstico genético por secuenciación masiva en la práctica clínica habitual está suponiendo un desafío para los clínicos, que deben conocer y elegir las pruebas genómicas más adecuadas para cada paciente, además de ser capaces de interpretar, valorar e informar sobre los resultados de las mismas.

Tradicionalmente, el diagnóstico genético del SCdL se ha realizado por medio de la secuenciación Sanger. En primer lugar, se analizaba el gen *NIPBL*, ya que alteraciones en este gen explican el 70% de los casos del SCdL. Teniendo en cuenta que se trata de un gen de 47 exones, su secuenciación por la metodología Sanger es larga y tediosa. En el caso de no encontrarse mutaciones en *NIPBL*, se analizaban sucesivamente los genes *HDAC8*, *SMC1A*, *SMC3* y *RAD21*. Esta aproximación diagnóstica suponía una media de más de 5 años hasta llegar a un diagnóstico genético y además, más del 30 % de los pacientes quedaban sin diagnóstico. Ello supone, para el clínico, y sobre todo para el paciente y sus familiares cercanos, un largo proceso de incertidumbre, consultas y pruebas diagnósticas hasta recibir, en el mejor de los casos, el diagnóstico correcto.

Los paneles de genes por secuenciación masiva se han convertido en la estrategia más atractiva para abordar el diagnóstico del SCdL. Esto es así, en primer lugar, porque reducen el tiempo necesario hasta llegar al diagnóstico respecto a la secuenciación de cada gen por separado mediante la técnica de Sanger. Además, simplifican la toma de decisiones del clínico, puesto que no es necesario que decida qué genes es necesario secuenciar y en qué orden debe realizarse⁽²⁷⁾. Otra de sus ventajas es el procesamiento en paralelo de varios pacientes en un solo análisis, lo que permite reducir costes y tiempo. Por otro lado, los paneles necesitan menor cantidad de ADN (en algunas técnicas, es suficiente con 20 ng), mientras que para la secuenciación por Sanger se necesitan unos 10ng por exón. Esto cobra especial importancia en los casos en los que el ADN es escaso, como en muestras de frotis bucales o en biopsias, cuya utilización es frecuente en el diagnóstico del SCdL. Además, si la profundidad de lectura es alta, son capaces de detectar los mosaicismos de forma más sensible y fiable que la secuenciación por Sanger⁽⁴²⁾.

Sin embargo, una de las limitaciones de la utilización de los paneles en los laboratorios clínicos es la necesidad de una importante inversión previa, puesto que requieren de un diseño específico con un gasto previo sólo amortizable si se analizan un gran número de muestras.⁽²⁷⁾ En el caso de enfermedades raras, como el SCdL, donde el número de muestras a analizar es reducido, es de gran importancia trabajar en la creación de centros nacionales de referencia, con el objetivo de centralizar los pacientes conocidos y poder obtener más experiencia en el manejo de los mismos. Así, estos contarán con clínicos y facultativos cualificados, expertos en la enfermedad, mejorando así el diagnóstico, tratamiento integral y seguimiento. Los centros de referencia permiten, pues, que el diagnóstico genético pueda ser guiado y realizado por especialistas en una época en la que proliferan las empresas de diagnóstico genético, que al no estar especializadas en la patología, no pueden orientar la

aproximación diagnóstica de la forma más óptima. En este caso, el desarrollo y aplicación, en la Unidad Nacional de Referencia en la que se engloba el grupo de investigación, del panel de secuenciación masiva ha permitido el diagnóstico de los dos pacientes a los que se les aplicó en primer lugar, y permitirá, asimismo, continuar con la línea de investigación sobre las bases moleculares del SCdL.

No obstante, teniendo en cuenta que los paneles de genes solo analizan un número limitado de genes y no permiten la detección de mutaciones en nuevos genes que no hayan sido previamente asociados a la patología, una cuestión que podría surgir en la práctica clínica sería: ¿Por qué no simplemente elegir una técnica de NSG más amplia, el exoma, dado que estudia todas las regiones codificantes? ¿Por qué no incluso el genoma? Sin embargo, la aplicación de estos métodos presenta ciertas limitaciones y desventajas, que se desarrollarán a continuación.

En el caso del SCdL, bien descrita genéticamente y con un conocimiento profundo de los genes implicados, parece indicado la utilización de paneles. En primer lugar, el diseño de paneles de genes garantiza la secuenciación exclusiva de las regiones de interés, lo que facilita mucho el posterior análisis de datos. Un problema importante en técnicas como el exoma o el genoma es el gran número de variantes que se detectan en la secuenciación. Dependiendo del tipo de exoma, el número de variantes detectadas oscila entre 20,000 y 50,000 en cada estudio. Incluso después de la aplicación de los análisis y filtros bioinformáticos, se obtienen unas 100-500 variantes potenciales en un exoma. La interpretación de todas estas variantes en relación con el fenotipo de los pacientes es una costosa tarea por lo que se aumenta el tiempo de espera de los resultados⁽³⁹⁾. En nuestro caso, tras aplicar un panel de genes y realizar los filtros específicos, sólo se ha obtenido una variante potencialmente patogénica en cada uno de los pacientes, lo cual facilita muchísimo la validación de resultados.

Otra problemática de la realización de un exoma y/o genoma es la detección de hallazgos incidentales. Se define hallazgo incidental como aquella variante claramente patogénica, pero no relacionada con la enfermedad que se sospechaba o se estaba estudiando. Estos hallazgos, que pueden suponer de un 1 a un 8.8% del total, podrían tener repercusión en el manejo clínico del paciente. Muchos de ellos no son directamente causales de un trastorno, sino que indican un aumento de riesgo de padecer alguna condición a lo largo de la vida. Así, estos resultados pueden causar aún más incertidumbre y ansiedad en las familias y requerir costosos test para descartar o confirmar las condiciones, por lo que, en muchas ocasiones, comunicar estos hallazgos causa más perjuicio que beneficio, poniéndose así en conflicto el principio ético de no maleficencia con el de autonomía^(39, 43, 44).

Pero, probablemente, la ventaja más destacable de los paneles de genes está en relación con los datos de cobertura. Aunque la técnica de secuenciación del exoma fue diseñada para cubrir el exoma al completo, no ofrece cobertura para todos los exones de todos los genes (los kits comerciales estudian aproximadamente un 92% del exoma), y además no incluyen regiones intrónicas ni reguladoras. El diseño del panel de genes de SCdL ha permitido cubrir el 99% de las regiones exónicas de los genes incluidos, además de añadir regiones splicing y regiones UTR, pudiendo hacer así un análisis más profundo de los genes de interés.

Otro dato de especial relevancia es la gran profundidad de lectura obtenida con el panel (>1000X) y la buena uniformidad (>95%), lo que permite la detección de variantes con baja frecuencia. La principal desventaja de la secuenciación de exoma es que su cobertura no es

uniforme. Esto es importante porque la cobertura no se distribuye uniformemente por toda la secuencia objetivo, sino que, dependiendo de la composición de cada región, algunas serán leídas más frecuentemente que otras. Por ello, si la profundidad de lectura no es suficiente (por ejemplo <10X), puede ocurrir que, en una mutación en heterocigosis, se secuencie únicamente el alelo salvaje de forma casual, lo que lleva a un aumento de los falsos negativos, es decir, una mayor probabilidad de pasar por alto variantes causales (^{38, 39}). Así, el exoma tiene menor sensibilidad clínica que los paneles de genes. Además, en el caso del SCdL, en el que es frecuente el mosaicismo, se requerirá mayor profundidad de lectura, que permita detectar variantes somáticas que puedan estar presentes en porcentajes inferiores al 10%, para lo que sería necesario tener una profundidad de lectura superior a 1000X. Actualmente, debido a las limitaciones de las técnicas, no existe ninguna plataforma que ofrezca una cobertura completa del genoma o del exoma con esa profundidad media de lectura.

Por último, una de las grandes dificultades en el diagnóstico genético es establecer la causalidad en las variantes encontradas. Es frecuente que las variantes detectadas no hayan sido descritas con anterioridad, y en estos casos resultan muy útiles los predictores bioinformáticos de patogenicidad (Mutation Taster, SIFT, Polyphen2, etc.), ya que realizar estudios experimentales sobre los efectos moleculares de cada mutación es demasiado laborioso y costoso como para poder realizarlos de rutina. Estos métodos de predicción se basan principalmente en patrones evolutivos y en la estructura de las proteínas, pero difieren en los algoritmos utilizados. A pesar de sus similitudes, existen en ocasiones claras discordancias entre unos y otros, hecho que se explica en parte por diferencias en sus umbrales de patogenicidad (^{45, 46}). En nuestro caso, la concordancia entre los predictores analizados y el alto valor de patogenicidad estimado conduce a reportar las variantes encontradas en *NIPBL* y *HDAC8* respectivamente como probablemente patogénicas.

A pesar de los grandes avances técnicos desarrollados en la secuenciación del genoma y en su interpretación, el diagnóstico genético del SCdL es aún complejo, debido, sobre todo, a la gran heterogeneidad genética y clínica que presenta. Una buena exploración clínica y de los rasgos físicos, realizada por un profesional experto en el síndrome, es fundamental para poder guiar el diagnóstico genético y encontrar la causa. No todos los pacientes con SCdL presentan el fenotipo típico, por lo que se considera el fenotipo del SCdL como un espectro en el que se engloba tanto el cuadro clínico clásico como cuadros con fenotipo no clásico pero causado por variantes patogénicas en genes relacionados con las cohesinas. Sin embargo, existe también un grupo de entidades relacionadas con las cohesinas, pero que, al mostrar solo un leve solapamiento con el fenotipo clásico del SCdL, como el síndrome de Roberts o el de Nicolaides–Baraitser, no se consideran parte de este espectro. Todas las causas conocidas de SCdL son cohesinopatías, pero no todas las cohesinopatías son, pues, un SCdL. Además, se han descrito variantes patogénicas en genes clásicamente causales del SCdL (como el *SMC1A*) en pacientes que cumplen criterios de otros síndromes, ligeramente similares al SCdL, pero que constituyen una entidad clínica diferente, con bases moleculares no relacionadas con las cohesinas (como es el caso del síndrome de Rett) (^{2, 8, 47}).

Gracias a los resultados obtenidos, puede inferirse cierta relación genotipo-fenotipo. En este proyecto, los dos pacientes estudiados presentaban un fenotipo clásico, y, aunque presentaban la misma gravedad (moderada), el gen afectado era diferente (*NIPBL* en uno de

los pacientes y *HDAC8* en el otro). Se aprecia, pues, que un fenotipo similar puede deberse a diferentes mutaciones en diferentes genes.

Al contrario que las mutaciones en el *NIPBL*, gen causal más típico del SCdL, relacionado en la mayoría de las ocasiones con un fenotipo clásico, en el caso *HDAC8* se suelen encontrar fenotipos no clásicos y diferencias fenotípicas llamativas como la nariz bulbosa o la personalidad alegre. Sin embargo, en este paciente se ha visto que esto no siempre se cumple, puesto que sí que presenta un fenotipo clásico. También suelen tener filtrum menos alargado y labio superior normal, el crecimiento suele estar menos afectado y presentan menor proporción de afectación del grado de movilidad de los codos (características que se pueden apreciar en el paciente afectado por la mutación en *HDAC8*).

Los dos genes encontrados son los únicos que pueden producir defectos de reducción de las extremidades, sin embargo, estos no son constantes, ni tampoco lo es su gravedad: se pudo encontrar que solo uno de los pacientes (en el que se detectó una mutación en el *NIPBL*) presenta alteración en este sentido, y se trata de una alteración leve (^{11, 17}).

La utilización, por primera vez, del panel de genes de secuenciación masiva de este proyecto ha permitido realizar el diagnóstico genético de los dos pacientes seleccionados en menor tiempo y con un coste menor que mediante la técnica de secuenciación Sanger previamente utilizada. Hay que destacar que la primera paciente ya había sido sometida anteriormente en otros centros a diferentes test para hallar la mutación causal de su cuadro, y a pesar de presentar un fenotipo típico, de haber sido diagnosticada sindrónicamente desde el nacimiento, y de que la mutación causal estaba, como se descubrió, en el principal gen del SCdL, permanecía aún sin diagnóstico genético a la edad de 11 años. Llegar a un diagnóstico genético es de gran importancia para las familias, no solo desde el punto de vista psicológico, al tener la certeza de qué es lo que está causando el cuadro clínico, sino también desde el punto de vista de investigaciones futuras, que podrían traer tratamientos dirigidos o mejoras en la calidad de vida de estos pacientes.

En este proyecto, se ha concluido que el panel diseñado, por primera vez en nuestra Unidad de Referencia del Síndrome Cornelia de Lange, ha resultado de gran utilidad en el diagnóstico del cuadro. Así, el potencial de la NGS, y en concreto de los paneles de secuenciación, en este síndrome, es muy grande. Se prevee que en el futuro, con el avance de las técnicas, estas plataformas basadas en la NGS no necesitarán otros tests de confirmación y se convertirán en la herramienta más utilizada. Además, la introducción de las técnicas de tercera generación, con capacidad para realizar lecturas más largas y de detectar expansiones de tripletes, ampliará aún más sus aplicaciones, por lo que es de vital importancia un proceso continuo de actualización por parte de clínicos e investigadores (³⁹).

CONCLUSIONES

1. La aplicación del nuevo panel de secuenciación “Síndrome Cornelia de Lange” en la Unidad Nacional de Referencia ha permitido, por primera vez, el diagnóstico genético de dos pacientes por este método.
2. La elección y aplicación de un panel de genes en el diagnóstico del SCdL ha reducido considerablemente los tiempos y los costes respecto a la secuenciación Sanger.
3. La experiencia del grupo de investigación en el SCdL ha permitido el desarrollo de un panel que incorpora una amplia y cuidada selección de genes con potencial tanto para el diagnóstico como para la investigación del síndrome.
4. Los filtros aplicados para la selección de las variantes obtenidas tras la secuenciación han demostrado ser útiles acotando el número de variantes potenciales y con ello facilitando la interpretación final de los datos.
5. La aplicación del panel de secuenciación “Síndrome Cornelia de Lange” en este proyecto ha permitido detectar las mutaciones c.6272G>A en el gen *NIPBL* y c.305G>A en *HDAC8*, respectivamente, en los dos pacientes, reportándose por primera vez la variante c.305G>A en el gen *HDAC8* como causante del SCdL.
6. Los dos pacientes presentaron un fenotipo clásico de severidad moderada tras la aplicación de los criterios de Kline y Gillis. A pesar de tener un fenotipo similar, las mutaciones encontradas se localizan en genes diferentes (*NIPBL* y *HDAC8*).

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Kline AD, Moss JF, Selicorni A, Bisgaard M, Deardorff MA, Gillett PM, et al. Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. *Nat. Rev. Genet.* 2018; 19(10):649-666.
- ² Banerji R, Skibbens RV, Iovine MK. How many roads lead to cohesinopathies? *Dev Dyn.* 2017;246(11):881-888.
- ³ Gil MC, Ribate MP, Ramos FJ. Síndrome de Cornelia de Lange. *Protoc diagn ter pediatr.* 2010;(1):1–12.
- ⁴ Kline AD, Krantz ID, Sommer A, Kliewer M, Jackson LG, Fitzpatrick DR, et al. Cornelia de Lange Syndrome : Clinical Review , Diagnostic and Scoring Systems , and Anticipatory Guidance. 2007;1296:1287–96.
- ⁵ Gillis LA, McCallum J, Kaur M, DeScipio C, Yaeger D, Mariani A, et al. NIPBL Mutational Analysis in 120 Individuals with Cornelia de Lange Syndrome and Evaluation of Genotype-Phenotype Correlations. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2004;75(4):610-23. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707627128>
- ⁶ Yuan B, Pehlivan D, Karaca E, Patel N, Charng WL, Gambin T, et al. Global transcriptional disturbances underlie Cornelia de Lange syndrome and related phenotypes. *J Clin Invest.* 2015;125(2):636-51.
- ⁷ Parenti I, Teresa-Rodrigo ME, Pozojevic J, Ruiz Gil S, Bader I, Braunholz D, et al. Mutations in chromatin regulators functionally link Cornelia de Lange syndrome and clinically overlapping phenotypes. *Hum Genet.* 2017 Mar;136(3):307-320.
- ⁸ Izumi K. Disorders of Transcriptional Regulation: An Emerging Category of Multiple Malformation Syndromes. *Mol Syndromol.* 2016;7(5):262-273.
- ⁹ Kaiser F. New genes and analytical techniques. En: XII Congreso Científico Familiar Síndrome Cornelia de Lange. Zaragoza; 2018.
- ¹⁰ Pié J, Gil-rodríguez MC, Ciero M, López-viñas E, Ribate MP, Arnedo M, et al. Mutations and Variants in the Cohesion factor genes NIPBL, SMC1A and SMC3 in a cohort of 30 unrelated patients with Cornelia de Lange Syndrome. *Am J Med Genet.* 2011;(4):924–9.
- ¹¹ Boyle MI, Jespersgaard C, Brøndum-Nielsen K, Bisgaard AM, Tümer Z. Cornelia de Lange Syndrome. *Clin Genet.* 2015;88(1):1-12.
- ¹² ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>)
- ¹³ Borck G, Zarhrate M, Cluzeau C, Bal E, Bonnefont JP, Munnich A, Cormier-Daire V, et al. Father-to-daughter transmission of Cornelia de Lange syndrome caused by a mutation in the 5' untranslated region of the NIPBL Gene. *Hum Mutat.* 2006;27(8):731-5.
- ¹⁴ Gil-Rodríguez MC, Deardorff MA, Ansari M, Tan CA, Parenti I, Baquero-Montoya C, et al. De novo heterozygous mutations in SMC3 cause a range of Cornelia de Lange syndrome-overlapping phenotypes. *Hum Mutat.* 2015;36(4):454-62.
- ¹⁵ Deardorff MA, Kaur M, Yaeger D, Rampuria A, Korolev S, Pie J, et al. Mutations in Cohesin Complex Members SMC3 and SMC1A Cause a Mild Variant of Cornelia de Lange Syndrome with Predominant Mental Retardation. *Am J Med Genet.* 2007;80(3):485-94.

- ¹⁶ Dorval S, Masciadri M, Mathot M, Russo S, Revencu N, Larizza L. A novel RAD21 mutation in a boy with mild Cornelia de Lange presentation: Further delineation of the phenotype. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.01.010>.
- ¹⁷ Kaiser FJ, Ansari M, Braunholz D, Decroos C, Wilde JJ, Fincher CT, et al. Loss-of-function HDAC8 mutations cause a phenotypic spectrum of Cornelia de Lange syndrome-like features , ocular hypertelorism , large fontanelle and X-linked inheritance. *Hum Mol Gen*. 2014;23(11):2888–900.
- ¹⁸ Olley G, Ansari M, Bengani H, Grimes GR, Rhodes J, Von Kriegsheim A, et al. BRD4 interacts with NIPBL and BRD4 is mutated in a Cornelia de Lange-like syndrome. *Nat Genet*. 2018;50(3):329–32.
- ¹⁹ Rubio ED, Reiss DJ, Welcsh PL, Disteché CM, Filippova GN, Baliga NS, et al. CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(24):8309-14.
- ²⁰ Yuan B, Neira J, Pehlivan D, Santiago-Sim T, Song X, Rosenfeld J. Clinical exome sequencing reveals locus heterogeneity and phenotypic variability of cohesinopathies. *Genet Med*. 2018.
- ²¹ Liu J, Krantz ID. Cohesin and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:303-20.
- ²² Banerji R, Skibbens RV, Iovine MK. Cohesin mediates Esco2-dependent transcriptional regulation in a zebrafish regenerating fin model of Roberts Syndrome. *Biol Open*. 2017;6(12):1802-1813.
- ²³ FJ Novo. *Genética Humana. Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la Genética en el campo de la Biomedicina*. Madrid: Pearson educación; 2007.
- ²⁴ Roelfsema JH, White SJ, Ariyu Y, Bartholdi D, Niedrist D, Papadia F, et al. Genetic Heterogeneity in Rubinstein-Taybi Syndrome : Mutations in Both the CBP and EP300 Genes Cause Disease. 2005;572–80.
- ²⁵ Woods SA, Robinson HB, Kohler LJ, Agamanolis D, Sterbenz G, Khalifa M. Exome sequencing identifies a novel EP300 frame shift mutation in a patient with features that overlap Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(1):251-8.
- ²⁶ Jones WD, Dafou D, Mcentagart M, Woollard WJ, Elmslie F V, Holder-epinasse M, et al. De Novo Mutations in MLL Cause Wiedemann-Steiner Syndrome. 2012;358–64.
- ²⁷ Bögershausen N, Wollnik B. Mutational Landscapes and Phenotypic Spectrum of SWI / SNF-Related Intellectual Disability Disorders. *Front Neurosci*. 2018;11:1–18.
- ²⁸ Lopez-Serra L, Kelly G, Patel H, Stewart A, Uhlmann F. The Scc2-Scc4 complex acts in sister chromatid cohesion and transcriptional regulation by maintaining nucleosome-free regions. *Nat Genet*. 2014;46(10):1147-51.
- ²⁹ Liu Z1, Li F, Ruan K, Zhang J, Mei Y, Wu J, et al. Structural and functional insights into the human Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome-associated protein PHF6. *J Biol Chem*. 2014;289(14):10069-83.
- ³⁰ Rope AF, Au PYB, Parboosingh JS, Rawe JAO, Wu Y, Do MJ, et al. TAF1 Variants Are Associated with Dysmorphic Features, Intellectual Disability, and Neurological Manifestations. *Am J Hum Genet*. 2015;922–32.
- ³¹ Izumi K, Nakato R, Zhang Z, Edmondson AC, Noon S, Dulik MC, Rajagopalan R, Venditti CP, et al. Germline gain-of-function mutations in AFF4 cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin. *Nat Genet*. 2015;47(4):338-44.

- ³² Lelij P Van Der, Chrzanowska KH, Godthelp BC, Rooimans MA, Oostra AB, Stumm M, et al. Warsaw Breakage Syndrome, a Cohesinopathy Associated with Mutations in the XPD Helicase Family Member DDX11 / ChIR1. *Am J Hum Genet.* 2010;262–6.
- ³³ Wu Y, Lyon GJ. NAA10-related syndrome. *Exp Mol Med.* 2018;50(7):85.
- ³⁴ Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 3245–76.
- ³⁵ Cheng YW, Tan CA, Minor A, Arndt K, Wysinger L, Grange DK. Copy number analysis of NIPBL in a cohort of 510 patients reveals rare copy number variants and a mosaic deletion. *Mol Genet Genomic Med.* 2014;2(2):115-23.
- ³⁶ Goodwin S, Mcpherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next- generation sequencing technologies. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2016;17(6):333–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- ³⁷ Pié J, Puisac B, Hernández-Marcos M, Teresa-rodrigo ME, Gil-Rodríguez M, Baquero-Montoya C, et al. Special Cases in Cornelia de Lange Syndrome : The Spanish Experience. 2016;172(2):198-205.
- ³⁸ Santillán-Garzón S, Diego-Álvarez D, Buades C, Romera-López A, Pérez-Cabornero L, Valero-Hervás D, et al. Diagnóstico molecular de enfermedades genéticas: del diagnóstico genético al diagnóstico genómico con la secuenciación masiva. *Rev. Med. Clin. Condes.* 2015;26(4):458–69.
- ³⁹ Xue Y, Ankala A, Wilcox WR, Hegde MR. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genet Med.* 2015;17(6).
- ⁴⁰ Kline AD, Barr M, Jackson LG. Growth Manifestations in the Brachmann-de Lange Syndrome. *Am J Med Genet.* 1993;1049:1042–9.
- ⁴¹ Mei L, Liang D, Huang Y, Pan Q, Wu L. Two novel NIPBL gene mutations in Chinese patients with Cornelia de Lange syndrome. *Gene.* 2015 Jan 25;555(2):476-80.
- ⁴² Lohmann K, Klein C. Next Generation Sequencing and the Future of Genetic Diagnosis. *Neurotherapeutics.* 2014; 11(4):699-707.
- ⁴³ Rigter T, Henneman L, Kristoffersson U, Hall A, Yntema HG, Borry P, et al. Reflecting on earlier experiences with unsolicited findings: Points to consider for next-generation sequencing and informed consent in diagnostics. *Hum Mutat.* 2013;34(10):1322–8.
- ⁴⁴ Green RC, Berg JS, Grody WW, Nussbaum RL, Daniel JMO, Kelly E. ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing. *Genet Med.* 2014;15(7):565–74.
- ⁴⁵ Thompson BA, Greenblatt MS, Vallee MP, Herkert JC, Tessereau C, Young EL, et al. Calibration of Multiple In Silico Tools for Predicting Pathogenicity of Mismatch Repair Gene Missense Substitutions. *Hum Mutat.* 2015;34(1):255–65.
- ⁴⁶ Sunyaev SR. Inferring causality and functional significance of human coding DNA variants. *Hum Mol Gen.* 2012;21(1):10–7.
- ⁴⁷ Huisman S, Mulder PA, Redeker E, Bader I, Bisgaard AM, Brooks A, et al. Phenotypes and genotypes in individuals with SMC1A variants. *Am J Med Genet Part A.* 2017;173(8):2108–25.