



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Estudio del Mosaicismo Parental en el Síndrome
Cornelia de Lange

Parental Mosaicism Study in Cornelia de Lange
Syndrome

Autora

Carla Chena Salas

Directores

Marta Gil Salvador

Ana Latorre Pellicer

Facultad de Medicina

2022

INDICE

INDICE	2
RESUMEN	4
ABSTRACT.....	5
1 INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Síndrome Cornelia de Lange	6
1.2 Etiología y bases moleculares del SCdL	6
1.2.1 Complejo de Cohesinas	6
1.2.2 Genes implicados en el SCdL	7
1.3 Manifestaciones clínicas en los diferentes órganos y sistemas.....	10
1.4 Diagnóstico genético del SCdL	12
1.5 Mosaicismo genético en el SCdL.....	13
1.5.1 Introducción al mosaicismo genético.....	13
1.5.2 Características del mosaicismo genético en el SCdL	15
2 OBJETIVOS.....	17
3 MATERIAL Y MÉTODOS	18
3.1 Características generales del estudio	18
3.1.1 Aspectos éticos.....	18
3.1.2 Participantes.....	18
3.2 Evaluación clínica	18
3.3 Toma de muestras de saliva, extracción y cuantificación del ADN	19
3.3.1 Obtención de muestras de saliva	19
3.3.2 Extracción de ADN.....	21
3.3.3 Cuantificación de ADN.....	21
3.4 Secuenciación Sanger	22
3.4.1 Amplificación del ADN por PCR.....	22
3.4.2 Limpieza del producto de PCR.....	23
3.4.3 Secuenciación Sanger	23
3.4.4 Análisis de resultados de la secuenciación Sanger	24
3.5 Secuenciación masiva con paneles de genes	24
3.5.1 Protocolo de secuenciación con el panel de genes del SCdL	24
3.5.2 Interpretación de variantes genéticas	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Estudio de la presencia de mosaicismo parental en el SCdL	26

4.2 Descripción de un caso de mosaicismo parental.....	29
4.2.1 Historia Clínica.....	29
4.2.2 Cálculo del score clínico del SCdL.....	29
4.2.3 Evaluación del fenotipo facial con la herramienta Face2Gene.....	30
4.2.4 Diagnóstico molecular.....	31
5 DISCUSIÓN	32
6 CONCLUSIONES.....	36
7 BIBLIOGRAFIA.....	37

RESUMEN

El Síndrome Cornelia de Lange (SCdL) es un trastorno genético del neurodesarrollo con una gran variabilidad genética. Aunque la amplia mayoría de casos descritos se deben a variantes *de novo* en uno de los ocho genes causales conocidos hasta la fecha (*NIPBL*, *SMC1A*, *HDAC8*, *SMC3*, *RAD21*, *BRD4*, *ANKRD11* y *MAU2*); en los últimos años, se ha revelado una prevalencia especialmente alta de casos de mosaicismo genético en este síndrome, pudiendo llegar a suponer hasta un 13% de los casos diagnosticados. Sin embargo, se desconoce la contribución del mosaicismo parental de baja frecuencia en la transmisión del SCdL. En este trabajo nos planteamos evaluar la relevancia de este fenómeno. Para ello, se han evaluado 11 familias con un niño/a afectado, y aplicado las técnicas de secuenciación Sanger y de nueva generación en una muestra de saliva de los progenitores. La utilización de un panel de genes con alta profundidad de lectura (>900x) ha permitido detectar, en una de las familias estudiadas, la presencia de la variante causal (*SMC1A*, c.2078G>A) en la madre del paciente, con una frecuencia alélica del 9% en la muestra de ADN procedente de saliva. En conclusión, los casos de mosaicismo parental podrían ser más frecuentes de lo estimado hasta el momento en el SCdL, teniendo una repercusión directa en el asesoramiento genético y cálculo de recurrencia familiar. Por ello, proponemos realizar estudios de segregación familiar en este síndrome en muestras de saliva o fibroblastos de los progenitores utilizando técnicas de secuenciación con alta profundidad de lectura.

Palabras clave: Síndrome Cornelia de Lange, mosaicismo genético, asesoramiento genético, secuenciación masiva de nueva generación, gen *SMC1A*.

ABSTRACT

Cornelia de Lange Syndrome (CdLS) is a genetic neurodevelopmental disorder with a high genetic heterogeneity. Although most of the cases described are due to *de novo* variants in one of the eight causal genes known to date (*NIPBL*, *SMC1A*, *HDAC8*, *SMC3*, *RAD21*, *BRD4*, *ANKRD11* and *MAU2*); recently, a particularly high prevalence of genetic mosaicism has been revealed in this syndrome, which may account for up to 13% of diagnosed cases. However, the contribution of low levels of parental mosaicism in the transmission of CdLS is yet unknown. In this study, we intend to evaluate the relevance of this phenomenon. For this purpose, 11 families with an affected child have been tested using Sanger and new generation sequencing techniques, which have been applied to a buccal swab sample from the parents. An NGS panel with very high sequencing depth (>900x) has allowed the detection of a causal variant (*SMC1A*, c.2078G>A) maternally transmitted to an affected child. This variant presents an allele frequency of 9% in the saliva-derived DNA of the mother. In conclusion, parental mosaic cases could be more frequent than currently recognized in CdLS, which could have a great impact on genetic counseling and familial recurrence calculation. For this reason, we propose to carry out family segregation studies in this syndrome in saliva or fibroblasts samples from the parents using highly sensitive sequencing techniques.

Keywords; Cornelia de Lange Syndrome, genetic mosaicism, genetic counseling, massive next-generation sequencing, *SMC1A* gene.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Síndrome Cornelia de Lange

El Síndrome Cornelia de Lange (SCdL, OMIM #122470, #30590, #300882, #610759, #614701) es un desorden genético multisistémico que fue descrito por primera vez en el año 1932 por la pediatra Cornelia de Lange, y se caracteriza clínicamente por deformidades craneofaciales, defectos en las extremidades y discapacidad intelectual. La prevalencia estimada del SCdL oscila entre 1/10.000 y 1/30.000 nacidos vivos, y en la mayoría de los casos, está producido por variantes genéticas *de novo*. Se trata de una patología autosómica dominante o ligada al cromosoma X (1).

1.2 Etiología y bases moleculares del SCdL

El espectro CdL se asocia con variantes genéticas en genes relacionados con el complejo de cohesinas.

1.2.1 Complejo de Cohesinas

El complejo de cohesinas está compuesto por un núcleo central con un anillo y proteínas asociadas que participan en la regulación de su función. Cada gen relacionado con el SCdL codifica un componente diferente del complejo, pudiendo dar lugar a proteínas estructurales, como por ejemplo SMC3 o SMC1A, o reguladoras, como es el caso de NIPBL (Figura 1).

Este complejo tiene diversas funciones. Una de ellas es el establecimiento y mantenimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas, que es esencial en células en división y cobra especial relevancia en la regulación de la división del óvulo fecundado a lo largo del desarrollo del embrión (2). Aunque sería lo esperable, las células derivadas de pacientes con SCdL no presentan defectos obvios en la cohesión de las cromátidas hermanas, sugiriendo que otras funciones del complejo de cohesinas pudieran estar implicadas en los mecanismos patogénicos del síndrome. Se ha descrito que el complejo de cohesinas también participa en la reparación del ADN, mantiene su estabilidad durante la replicación y la división celular, e interviene en la regulación de la transcripción, siendo precisamente la alteración de esta función la que se cree que pudiera ser la responsable del fenotipo observado en el SCdL (3,4).

Dicho desorden y otros síndromes relacionados se han denominado clásicamente como 'cohesinopatías'. Esto se debe a que son causados por alteraciones en genes que producen proteínas del complejo de cohesinas. Sin embargo, algunos autores consideran más adecuado clasificar el SCdL de acuerdo con la función biológica alterada y no a la estructura involucrada.

De este modo, ha sido incluido dentro del grupo de las “transcriptomopatías”, que engloba síndromes causados por una desregulación de la expresión génica, como el síndrome KBG (SKBG, OMIM #148050), el síndrome de Coffin-Siris (SCS, OMIM #135900), el síndrome de RubinsteinTaybi (SRT, OMIM #180849, #613684) o el síndrome de Wiedemann-Steiner (SWDST, OMIM #605130), con los que comparte cierta similitud fenotípica (5).

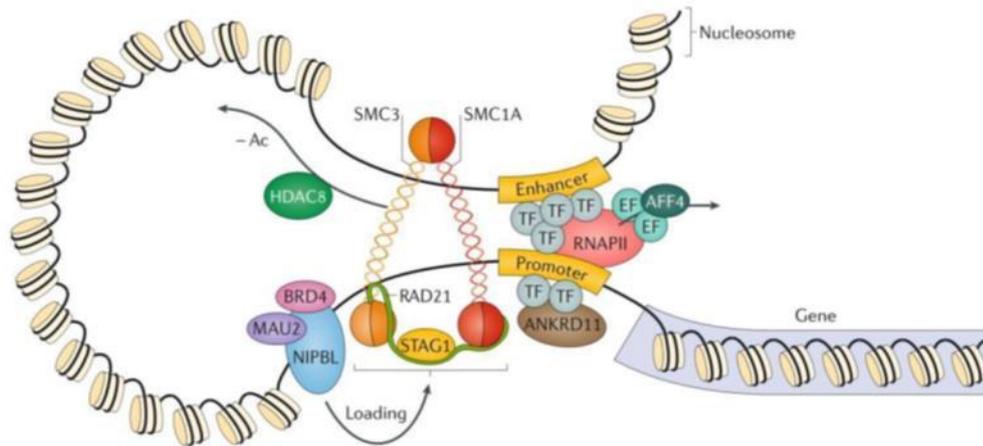


Figura 1. Complejo de cohesinas y genes afectados en el SCdL. EF: Factor de elongación. TF: Factor de transcripción. RNAPII: ARN polimerasa II. Fuente: Kline AD, Moss JF, Selicorni A, Bisgaard M, Deardorff MA, Gillett PM, et al. Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. Nat. Rev. Genet. 2018; 19(10):649-666. (Modificada)

1.2.2 Genes implicados en el SCdL

Hasta la fecha, se han descrito al menos ocho genes causales: *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*, *HDAC8*, *ANKRD11*, *BRD4* y *MAU2*(1).

***NIPBL*:** Es el gen más frecuentemente afectado, responsable de hasta el 70% de los casos de SCdL, generalmente albergando mutaciones sin sentido o de pérdida de función, y resultando de estas últimas unas características clínicas más graves. La afectación del gen *NIPBL* suele conllevar la presencia de un fenotipo clásico. Además de lo explicado anteriormente, en el estudio del gen *NIPBL* también se han apreciado microdeleciones o deleciones intragénicas de exón en el 3% de los casos. Finalmente, se ha probado que un número considerable de personas con SCdL clásico porta variantes de *NIPBL* en mosaico (1,6).

***SMC1A*:** Es el gen que codifica la proteína 1A responsable del mantenimiento estructural de los cromosomas. Es un componente central del complejo de cohesinas, y se han identificado variantes en este gen en aproximadamente el 5% de los individuos con SCdL. El fenotipo asociado a la afectación de este gen corresponde a un fenotipo no clásico con cejas más pobladas, el puente nasal con un acortamiento menos llamativo y una cara más redonda que los individuos con variantes en *NIPBL*. Un subconjunto de individuos con afectación en el gen *SMC1A* puede

presentar un fenotipo completamente distinto al del SCdL, que a menudo se parece al del síndrome de Rett. *SMC1A* es un gen ligado al cromosoma X, y en las pocas familias reportadas hasta la fecha, las mujeres están menos afectadas que los hombres, probablemente debido a la inactivación de dicho cromosoma (1).

HDAC8: En este caso, existen pacientes que presentan afectación en el gen *HDAC8* y cumplen los criterios del SCdL clásico, aunque en términos generales, la afectación de este gen produce una variación fenotípica considerable, que incluye como características distintivas fontanela anterior grande, hipertelorismo orbital y personalidades extrovertidas. El gen *HDAC8* se encuentra en el cromosoma X, y en función de cómo se produce su inactivación, las mujeres portadoras pueden verse afectadas de forma variable o incluso estar completamente sanas (1).

SMC3: La afectación del gen *SMC3* es una causa infrecuente de SCdL. Los individuos afectados muestran discapacidad intelectual, talla baja y anomalías congénitas que no cumplen los criterios diagnósticos clínicos del SCdL no clásico. Las variantes identificadas en *SMC3* en personas con SCdL suelen ser cambios sin sentido, sugiriendo que las variantes de pérdida de función no son compatibles con la vida (1,7).

RAD21: Suele conllevar un fenotipo SCdL atenuado en comparación con el causado por variantes en *NIPBL* o *SMC1A* en lo que respecta a morfología facial, anomalías de las extremidades y especialmente la cognición y el comportamiento. En algunos individuos con información clínica limitada, los diagnósticos adicionales incluyen síndrome de Mungan en pacientes con variantes bialélicas y holoprosencefalia, con o sin características de SCdL. Se han descrito varios casos adicionales con fenotipos que incluyen esclerocórnea, en los que la participación de la variante *RAD21* es incierta. Las variantes son con frecuencia familiares, y los análisis de genotipo-fenotipo han demostrado una notable variabilidad interfamiliar e intrafamiliar, (1,8).

BRD4: Este gen se relacionó por primera vez con el SCdL cuando se identificó una deleción *de novo* que incluía *BRD4* en un individuo con un fenotipo atípico de SCdL. Hoy en día, el número de individuos con variantes en *BRD4* es demasiado pequeño para sacar conclusiones sobre el fenotipo asociado más común (1).

ANKRD11: Actualmente, gracias a los avances tecnológicos, ha sido posible la identificación de cinco variantes *de novo* que afectan al gen *ANKRD11* en individuos con un fenotipo no clásico del SCdL. Además, se han identificado variantes adicionales en cohortes clínicas y de investigación, sin embargo, los pacientes que las albergan presentan características

que se superponen con el fenotipo clásico, así como con algunas características menores de SCdL (1,9).

MAU2: El heterodímero NIPBL/MAU2 tiene la función de cargar cohesinas en la cromatina. Recientemente, se ha informado de una variante en *MAU2* causante de la eliminación de siete aminoácidos que afecta a la interacción entre MAU2 y el extremo N-Terminal de NIPBL, provocando un mal funcionamiento del complejo de cohesinas (10).

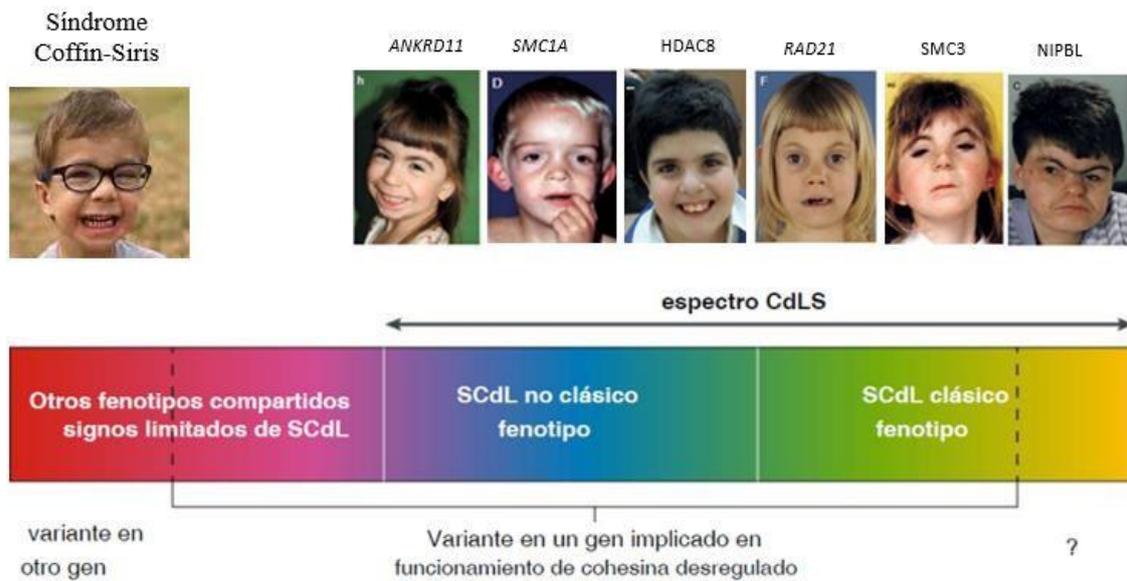


Figura 2. Espectro Cornelia de Lange. Fuente: Kline AD, Moss JF, Selicorni A, Bisgaard M, Deardorff MA, Gillett PM, et al. Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. Nat. Rev. Genet. 2018; 19(10):649-666. (Modificada)

Para finalizar este apartado e introducir el próximo cabe comentar que los fenotipos que comprende el SCdL se pueden definir como un espectro, que incluye individuos con fenotipo clásico de SCdL en los que se ha identificado o no una variante patogénica en un gen implicado en el complejo de las cohesinas. También incluye individuos con un fenotipo de SCdL no clásico que albergan una variante patogénica en un gen relevante para la función de las cohesinas. Sin embargo, hay individuos que pueden ser portadores de una variante causal en un gen relevante para la función de cohesinas, pero por poca o ninguna semejanza con el fenotipo asociado al SCdL no están incluidos dentro del espectro CdL (1) (Figura 2).

Finalmente, se baraja la hipótesis de que haya genes que causen el espectro CdL que no tienen función dentro del complejo de cohesinas. Así pues, debido a la continua necesidad de estudio genético que implica el SCdL, no se debe excluir la existencia de ninguna causa genética, antes debe ser estudiada e investigada.

1.3 Manifestaciones clínicas en los diferentes órganos y sistemas

El SCdL clásico es fácilmente reconocible por facultativos experimentados, sin embargo, no todas las personas con SCdL exhiben el este fenotipo y la presentación del trastorno puede variar ampliamente de leve a grave junto con diferentes grados de afectación facial y de las extremidades. La afectación facial es la más llamativa y posiblemente la más sencilla de reconocer. Consiste principalmente en la presencia de sinofridia, cejas gruesas, y a nivel nasal se suele apreciar una nariz corta, cresta nasal cóncava y punta nasal hacia arriba. Como en muchos síndromes que presentan un fenotipo facial concreto, los pacientes con SCdL tienen el filtrum más largo de lo habitual, el labio superior más delgado y las comisuras de la boca hacia abajo. Estas características faciales junto a oligodactilia de la mano, adactilia y hernia diafragmática congénita se consideran características cardinales del SCdL (1) (Figura 3).

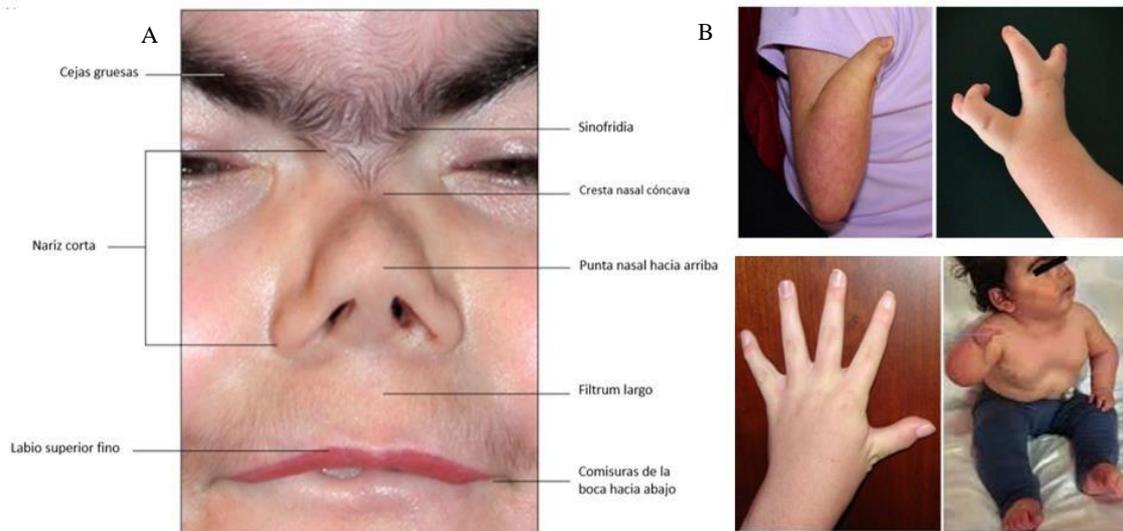


Figura 3. Fenotipo clásico del SCdL. Imagen A. Fenotipo facial clásico; sinofridia, cejas gruesas, cresta nasal cóncava, punta nasal hacia arriba, nariz corta, filtrum alargado, labio superior fino y comisura de la boca hacia abajo. Imagen B. Alteraciones de las extremidades; oligodactilia, sindactilia, braqui-clinodactilia del quinto dedo. 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)

El fenotipo característico del SCdL, ya sea clásico o no, suele incluir defectos en los diferentes sistemas del individuo. Cabe señalar que casi todos los órganos de los sentidos, en mayor o menor medida, presentan alguna característica que merma su funcionalidad. En primer lugar, las manifestaciones oculares debido al fenotipo facial son muy frecuentes, con independencia del gen involucrado. La ptosis bilateral o unilateral que oscurece parte de la pupila, la blefaritis que consiste en la inflamación del párpado y la obstrucción unilateral o bilateral de conducto nasolagrimal son las manifestaciones oculares más típicas, aunque también suelen presentar deficiencias visuales.

En segundo lugar, la afectación de los oídos, nariz y garganta confiere patología más complicada e incapacitante como es la pérdida de audición. Es típicamente bilateral, comenzando en la infancia, varía de leve a grave (40-50%) y es neurosensorial en el 25% de los casos y conductivo en el 75%. A nivel general, la pérdida de audición afecta a un 85-90% de las personas con SCdL. En cuanto a las anomalías nasales, tienden a producir infecciones recurrentes de los senos paranasales (1).

Junto a todo lo mencionado, las personas con SCdL habitualmente presentan malformaciones en las extremidades. Esto implica la necesidad de tratamiento rehabilitador y ortopedia durante toda la vida del individuo.

Además, el desarrollo de estos individuos presenta patologías enfocadas en diferentes áreas. Concretamente, se ven afectados el crecimiento físico y desarrollo motor, para cuya evaluación hay disponibles tablas de crecimiento específicas. Este se encuentra influenciado por la naturaleza de la variante y el gen causante, acostumbrando a estar menos comprometido en individuos con variantes en *SMC1A* que en aquellos que tienen afectado *NIPBL*. El desarrollo motor se retrasa invariablemente, aunque en este caso no se dispone de datos confiables para una gran serie de individuos con diagnósticos confirmados molecularmente. En una pequeña serie, los niños con variantes en *SMC1A* alcanzaron varios hitos como sentarse, caminar y pronunciar las primeras palabras a una edad más temprana que los niños con variantes en *NIPBL*. En este último grupo, a los 5 años, el 99% se sentaba, el 63% caminaba de forma independiente y el 38% había comenzado a hablar (1).

En cuanto al desarrollo cognitivo e intelectual de las personas con SCdL, estas muestran una discapacidad intelectual que puede variar de profunda a leve, sin embargo, en la mayoría de los casos, tiene lugar una discapacidad intelectual de severa a moderada. De nuevo, los individuos con variantes en *SMC1A* tienden a un grado de capacidad cognitiva más alto que aquellos con variantes en *NIPBL*.

A nivel conductual y de comportamiento, en individuos con SCdL se aprecian frecuentemente perfiles de comportamiento repetitivo y adaptativo deteriorado. Las habilidades de comportamiento adaptativo en el SCdL pueden disminuir o variar con los años. Así pues, puede haber un mayor dominio con la edad de habilidades específicas de autoayuda como lavarse y alimentarse, pero haber al mismo tiempo una disminución del dominio de otras habilidades como pedir ayuda o moverse de forma independiente. Los comportamientos repetitivos pueden asumir manifestaciones discretas que suelen consistir en movimientos motores estereotipados, insistencia en la uniformidad y comportamientos rituales, siendo característicos hacer fila y ordenar. Además, la conducta autolesiva es frecuente en individuos

con SCdL, y el comportamiento autoagresivo puede interpretarse como un signo o una respuesta al dolor. Las descripciones de problemas comunes de salud mental en personas con SCdL incluyen el trastorno del espectro autista (TEA), ansiedad social y trastornos del estado de ánimo, que no parecen estar asociados con el sitio o la naturaleza de la variante genética involucrada. La ansiedad es común en individuos con SCdL, y tiende a manifestarse como ansiedad generalizada, ansiedad por separación, mutismo selectivo o como factor exacerbante de conductas repetitivas, síntomas relacionados con el estado de ánimo o conductas disruptivas, agresivas y autolesivas. Las personas con SCdL tienen una mayor preferencia por la igualdad y tienen dificultades para responder a los cambios en la rutina, lo que puede hacer que los periodos de transición sean más desafiantes y provoquen ansiedad. Medir la psicopatología en el SCdL es difícil porque la mayoría de las personas afectadas no pueden informar adecuadamente de su propia incomodidad (1).

Además, es interesante comentar que las personas con SCdL presentan grandes dificultades de comunicación, particularmente a la hora de expresarse, aunque puede haber un habla y lenguaje bien desarrollados. La fonación, el habla y la masticación se ven comprometidas debido a un tono muscular anormal general. El habla también puede verse afectado debido a la pérdida de audición o anomalías morfológicas en el paladar, la mandíbula y la articulación temporomandibular. A la vez, la visión también cobra importancia en la comunicación, y, por ende, el deterioro cognitivo complica aún más la comunicación y la comprensión de esta.

Para finalizar, a nivel sistémico destacamos el reflujo gastroesofágico como el problema gastrointestinal más prevalente y grave. Se puede presentar en la infancia en forma de eventos distónicos clínicamente significativos similares a los del síndrome de Sandifer. En un estudio de cuestionario, la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) fue más común en individuos con variantes en *NIPBL* (71%) que en aquellos con variantes en *SMC1A* (60%), siendo en ambos casos una patología bastante frecuente(11). A nivel del sistema nervioso, las convulsiones, concretamente por epilepsia parcial, están presentes en un 45% de individuos con variantes en *SMC1A*, en un 15% de individuos con variantes en *NIPBL* y en un 20–26% de individuos sin diagnóstico molecular. Las otras dos manifestaciones neurológicas destacables consisten en anormalidades cerebrales estructurales, especialmente en individuos con variantes en *NIPBL* y problemas relacionados con el sueño tanto en individuos con variantes en *NIPBL* como en *SMC1A* (1).

1.4 Diagnóstico genético del SCdL

El método más efectivo para detectar variantes causales en los genes relacionados con el SCdL es la secuenciación masiva mediante un panel de genes específico que incluya al menos los

ocho genes conocidos causantes del síndrome. La mayoría de los laboratorios de diagnóstico incluyen varios genes adicionales que pueden causar un fenotipo similar al del SCdL, como *CREBBP* y *EP300*. En caso de que la técnica mencionada no estuviera disponible, la secuenciación Sanger de *NIPBL* es el método de elección en individuos con fenotipo clásico. Sin embargo, para aquellos con fenotipo no clásico, la evaluación del mismo por facultativos con experiencia puede orientar las pruebas moleculares (1) (Figura 4).

Cabe la posibilidad de que los métodos anteriormente mencionados no revelen variantes causales. En ese caso, considerando la posibilidad de mosaicismo, se debe hacer un estudio más profundo y/o de tejidos adicionales. Para ello, se prefiere el uso de fibroblastos no cultivados, aunque también se pueden usar células bucales o células epiteliales de la vejiga. Si este estudio también resultara negativo, se procedería a analizar la presencia de deleciones o duplicaciones en *NIPBL* a través de la amplificación de sonda dependiente de ligadura multiplex (MLPA)(1).

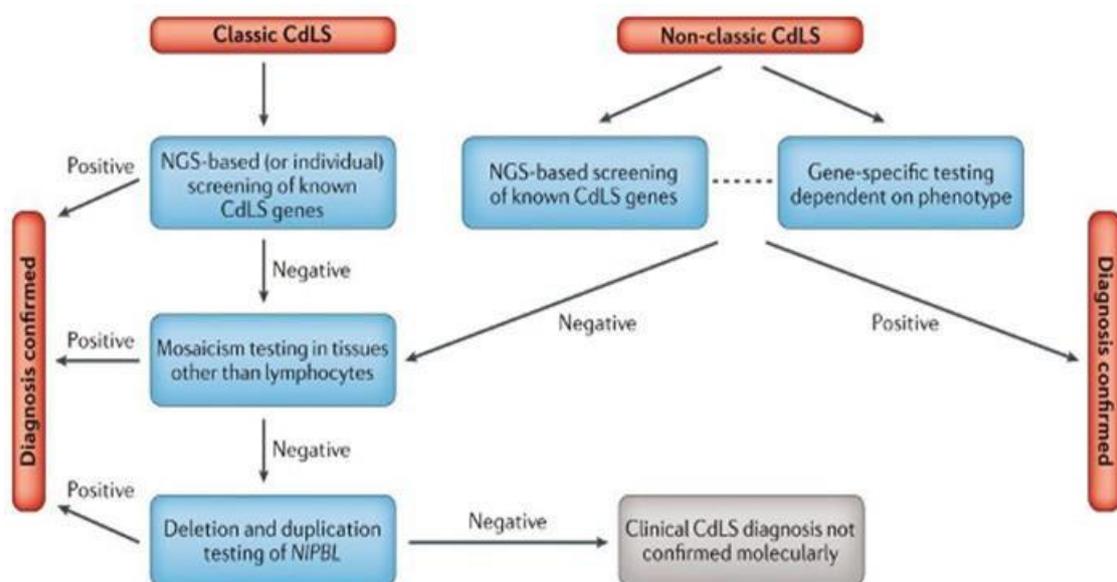


Figura 4. Diagnóstico genético en el SCdL. Fuente: Kline AD, Moss JF, Selicorni A, Bisgaard M, Deardorff MA, Gillett PM, et al. Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. Nat. Rev. Genet. 2018; 19(10):649-666. (Modificada)

1.5 Mosaicismo genético en el SCdL

1.5.1 Introducción al mosaicismo genético

Gracias a los recientes avances en tecnologías genómicas, incluida la secuenciación de nueva generación, ha sido posible la evaluación de las diferentes condiciones genéticas presentes en el genoma humano. Una de las muchas variantes existentes es el mosaicismo, objeto de estudio y reflexión en este trabajo. El concepto de mosaico corresponde al individuo que se ha desarrollado a partir de un solo óvulo fertilizado y tiene dos o más poblaciones de

células con distintos genotipos. La generación de células genéticamente distintas a partir de un solo cigoto requiere eventos mutacionales postcigóticos, que pueden dar lugar a una enfermedad esporádica (12).

Dentro del escenario del mosaicismo se encuentran descritos tipos más específicos del mismo, que se clasifican en función de los tejidos que albergan las células con variantes y el potencial de transmisión a la descendencia. De este modo, podemos encontrar el mosaicismo de línea germinal o gonadal, el mosaicismo somático y el mosaicismo gonadosomático, que es la combinación de los dos anteriores. En el mosaicismo germinal, los precursores de células germinales en la gónada son heterogéneos, es decir, algunos tienen una variante genética y otros no, al igual que ocurre en el mosaicismo somático, que hace referencia a las células no germinales presentando también estas un patrón heterogéneo (12,13). Los trastornos que cursan con mosaicismo y son clínicamente evidentes se clasifican en distintas categorías. En todas ellas, es probable que la variante postcigótica *de novo* subyacente ocurra al azar y, por lo tanto, generalmente se manifiesta clínicamente como una enfermedad esporádica en individuos con padres no afectados. Sin embargo, el momento del desarrollo en el que tiene lugar el evento mutacional y el linaje celular afectado, combinados con las consecuencias fenotípicas de la variante en cuestión, determinan en última instancia la distribución tisular del mosaicismo, y también los patrones de recurrencia de la enfermedad dentro de las familias (12).

Actualmente, los avances tecnológicos recientes han permitido detectar eventos de mosaicismo en muchos trastornos y en diversos tipos de tejidos, eliminando la idea de que el mosaicismo es un fenómeno limitado a trastornos que tienen atributos clínicos observables o a aquellos que tienen una etiología molecular conocida. Además, todas estas herramientas permiten su estudio a una resolución cada vez mayor y más precisa detectando variantes en frecuencias alélicas muy bajas (12).

El mosaicismo, en ocasiones, puede ser específico de un tejido, por lo que su detección puede requerir el análisis de múltiples tejidos dentro de un individuo. En algunos casos, la elección del tejido se sugiere por el reconocimiento de un síndrome o fenotipo sospechoso. En ausencia de indicios fenotípicos que desencadenen la búsqueda de mosaicismo, su detección se basa en el uso de técnicas sensibles de genotipado, como microarrays de SNPs o secuenciación de nueva generación (NGS), capaces de detectar variantes genéticas presentes en frecuencias alélicas muy bajas (1,12).

Desde 2005, las técnicas basadas en microarrays comenzaron a reemplazar las pruebas citogenéticas debido a las múltiples ventajas que presentan, puesto que es posible analizar muchas células simultáneamente o analizar diferentes tipos de células incluso en las distintas

fases del ciclo celular. Además, las muestras no requieren cultivo, lo cual algunas veces puede provocar que se originen nuevas mutaciones (12). En relación con las técnicas de secuenciación de ADN cabe destacar el método Sanger y la secuenciación masiva o de nueva generación (NGS). Ambas son de gran utilidad, pero a la hora de estudiar casos de mosaicismo, el uso de paneles NGS presenta una serie de ventajas en comparación con el método Sanger.

Por un lado, la secuenciación Sanger se basa en la síntesis de una hebra de ADN complementaria a una hebra molde generando fragmentos de ADN bicatenario de diferente tamaño por la adición secuencial de los cuatro dideoxinucleótidos carentes del grupo -OH en 3' y marcados con un fluoróforo. De este modo, si se incorporan a la cadena de ADN la reacción se detiene y al correr los fragmentos resultantes en un gel de electroforesis es posible conocer su tamaño (14). Aunque el método de Sanger ha sido ampliamente utilizado y supuso un hito histórico para el diagnóstico molecular, presenta un rendimiento limitado y no es cuantitativo, por lo que está siendo cada vez más desplazado por las nuevas técnicas de secuenciación masiva, que facilitan especialmente el estudio de las enfermedades multigénicas y más heterogéneas, como es el caso del SCdL (15).

La secuenciación masiva hace referencia a las técnicas de alto rendimiento que permiten secuenciar millones de secuencias de ADN en paralelo y muy rápidamente. Existen diferentes posibilidades como la elaboración de paneles de genes, la secuenciación de exomas o la secuenciación de genomas completos (16). Si bien es cierto que las técnicas NGS han supuesto un gran avance confiriendo rapidez y agilidad a los estudios genéticos, tienen ciertas limitaciones a la hora de cubrir regiones problemáticas como exones con baja o nula cobertura, regiones homólogas con pseudogenes, con alto contenido en GC o muy repetitivas. Además, aunque suponen una minoría, la presencia de falsos positivos, sobre todo a la hora de detectar deleciones e inserciones, hace necesaria la confirmación de las variantes detectadas mediante secuenciación Sanger para alcanzar un diagnóstico genético fiable y validado (15).

1.5.2 Características del mosaicismo genético en el SCdL

Recientemente, se ha estimado que el mosaicismo ocurre en aproximadamente el 10-15% de los individuos con SCdL con fenotipo clásico que albergan una variante en el gen *NIPBL*, lo cual supone una prevalencia inusualmente alta. Además, llama la atención que, en la mayoría de los casos, dicha variable se encuentra en muy baja frecuencia alélica o es indetectable en sangre. Respecto a otros genes causales, hasta el momento, hay muy pocos casos conocidos de individuos con SCdL que alberguen variantes mosaico en *SMC3*, *RAD21* o *SMC1A* (17).

Otra característica que llama la atención es que, en la mayoría de los desórdenes genéticos, el mosaicismo conduce a una variación en la gravedad del fenotipo clínico presentándose de forma más leve. Sin embargo, de acuerdo con los datos actuales, esto no parece cumplirse en el SCdL (18).

Además, la identificación de nuevos casos de mosaicismo genético podría influir en el riesgo de recurrencia familiar que presenta el SCdL, aunque hasta el momento no existen estudios a gran escala que lo estimen. Tradicionalmente, el SCdL segrega de manera autosómica dominante, pero ya son varios los genes ligados al cromosoma X que se han identificado como causales de este espectro y siguen las reglas generales de herencia ligada al X. En los últimos años, se han informado familias en las que el mosaicismo de la línea germinal conduce a hermanos afectados nacidos de padres no afectados. En este sentido, la experiencia en una muestra de 560 familias que incluían un individuo con una variante causal en *NIPBL*, sugirió que el riesgo de recurrencia familiar debido al mosaicismo gonadal es del 0,89%. En cuanto al riesgo de recurrencia para las variantes en *SMC1A* y *HDAC8*, ante la necesidad de un primer asesoramiento genético, el riesgo empírico de recurrencia es del 1,5%. Este asesoramiento genético puede ser especialmente difícil para las familias en las que se han detectado variantes en *SMC1A*, *HDAC8* y *RAD21* debido a la notable variabilidad del fenotipo, incluso dentro de la misma familia (13,17,18).

2 OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es evaluar la relevancia clínica del mosaicismo parental en el Síndrome Cornelia de Lange (SCdL), y valorar su repercusión en el asesoramiento genético a las familias.

Objetivos específicos

Para llevar a cabo este objetivo se pretende:

1. Optimizar la detección de mosaicismo de baja frecuencia alélica en el SCdL mediante la combinación del análisis de distintas muestras biológicas junto con la aplicación de técnicas de secuenciación altamente sensibles.
2. Estimar la prevalencia de mosaicismo parental en una cohorte de 11 familias con un hijo o hija genéticamente diagnosticado con SCdL.
3. Caracterizar clínica y molecularmente un caso de SCdL heredado por vía materna a causa de mosaicismo gonadosomático en la madre del paciente afectado.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Características generales del estudio

3.1.1 Aspectos éticos

Este estudio se ha llevado a cabo en el Grupo de Genética Clínica y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza e Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (GIIS062). Las muestras biológicas e información clínica están recogidas en la colección de muestras inscrita en el Registro Nacional de Biobancos del Instituto Sanitario Carlos III para la línea de investigación en el Síndrome Cornelia de Lange (C.0005514), cuyo responsable es el Dr. Feliciano J. 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 génica y evaluación de ejes endocrinos en pacientes afectados” aprobado por el CEICA (PI16/225).

3.1.2 Participantes

La recogida de muestras e información clínica se realizó durante el Congreso Nacional Científico-Familiar del Síndrome Cornelia de Lange que tuvo lugar en Madrid en noviembre del 2021. En total en este estudio se han incluido 11 familias afectadas con el SCdL.

3.2 Evaluación clínica

La información clínica de los pacientes fue obtenida durante el transcurso de una consulta realizada y supervisada por el clínico genetista de referencia del Grupo Genética Clínica y Genómica Funcional. Para ello se utilizó una hoja de recogida de datos diseñada específicamente para el estudio del SCdL por medio de códigos HPO, y se calculó el score clínico del SCdL siguiendo con las indicaciones recogidas por Kline et al. (1) (Ver Tabla 1). Además, se realizó un exhaustivo cuestionario y evaluación de antecedentes familiares.

La aplicación de Face2Gene (<https://face2gene.com>) se usó como método complementario de evaluación clínica para analizar los rasgos faciales de la paciente en estudio. La tecnología DeepGestalt y su aplicación Face2Gene realiza una evaluación facial que detecta rasgos dismórficos y patrones reconocibles de las malformaciones faciales a partir de fotografías faciales en 2D. Su aplicación permite discriminar entre los diferentes síndromes de neurodesarrollo, y ha demostrado tener una alta sensibilidad para la detección del SCdL (19,20).

Tabla 1: Cálculo del Score clínico del SCdL. Tabla de elaboración propia.

Características cardinales (2 puntos cada una si está presente)
Sinofridia y/o cejas gruesas
Nariz corta, cresta nasal cóncava y/o punta nasal hacia arriba
Filtrum largo y/o liso
Bermellón del labio superior fino y/o comisuras de la boca hacia abajo
Oligodactilia de la mano y/o adactilia
Hernia diafragmática congénita
Rasgos sugerentes (1 punto cada uno si está presente)
Retraso global del desarrollo y/o discapacidad intelectual
Retraso del crecimiento prenatal (<2sD)
Retraso del crecimiento postnatal (<2sD)
Microcefalia (prenatal y/o posnatal)
Manos pequeñas y/o pies
Quinto dedo corto
Hirsutismo
Puntuación Clínica
<4 puntos: insuficiente para indicar pruebas moleculares para Cornelia de Lange.
4 a 8 puntos (de los cuales al menos 1 es cardinal): pruebas moleculares indicadas.
9 o 10 puntos (de los cuales al menos 2 cardinales): Cornelia de Lange no clásicas.
≥11 puntos, de los cuales al menos 3 son cardinales: Cornelia de Lange clásicos

3.3 Toma de muestras de saliva, extracción y cuantificación del ADN

3.3.1 Obtención de muestras de saliva

Las muestras de saliva fueron recogidas mediante el uso del *Kit Orange referencia og-575* y *og-675*. El uso de este tipo de kit es simple y sencillo (Ver Figura 5). De hecho, está preparado para que cada paciente, si está capacitado, pueda recoger la saliva sin necesidad de un profesional sanitario lo haga por él. En el caso de este estudio la recogida de saliva sí que fue realizada y supervisada por profesionales que ayudaron a los pacientes y progenitores.

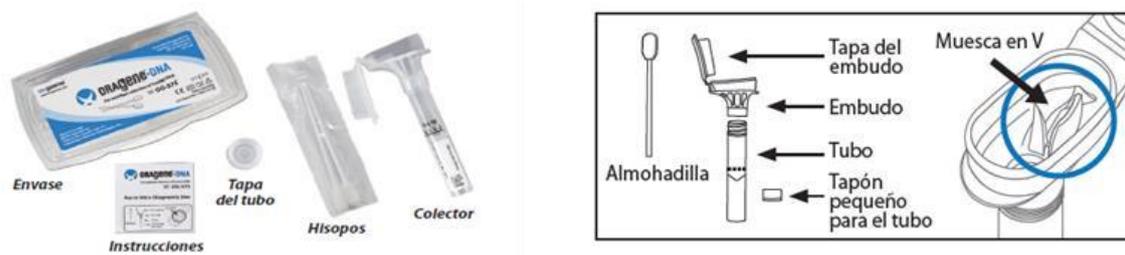


Figura 5: Componentes del *Kit Orange referencia og-575* y *og-675* para la obtención de muestras de saliva de pacientes y progenitores.

Antes de comenzar a recoger la saliva con este tipo de Kit, hay que tener en cuenta las siguientes precauciones;

- No retirar la película de plástico de la tapa del embudo

- Comprobar que la almohadilla no está dañada cada vez que vaya a introducirla en la boca del individuo. Usando una segunda almohadilla si la primera presenta signos de desgaste.
- No es recomendable reemplazar la almohadilla por otro tipo de almohadillas o bastoncillos.

En cuanto al procedimiento de recogida, el individuo no debe haber comido, bebido, fumado o mascado chicle durante los 30 minutos previos a la obtención de la muestra de saliva, además debe adoptar una posición adecuada en vertical. No es un procedimiento muy largo, pero si puede durar 15 min aproximadamente, siendo influenciado por la colaboración del paciente.

Consta de los siguientes cuatro pasos, (protocolo *Kit Orange*) (Ver Figura 6):

1. Se coloca la almohadilla en la cara interna de la mejilla. A continuación, se pasa suavemente la almohadilla por las encías y la cara interna de las mejillas durante 30 segundos para recoger la máxima cantidad de saliva posible.
2. Una vez la almohadilla se haya empapado en saliva, se introduce la muesca en V del embudo. Se escurre la saliva de la almohadilla con un movimiento de torsión y presión contra la pared interna de la muesca en V. La saliva entrará en el tubo
3. Se repiten estos pasos una o dos veces utilizando la misma almohadilla hasta que el fluido de la saliva, sin burbujas, alcance la línea de llenado. Se debe comprobar que la almohadilla no está dañada cada vez que se vaya a introducir en la boca del individuo. Se debe utilizar una segunda almohadilla si la primera presenta signos de desgaste. Es aconsejable golpear suavemente la parte inferior del tubo sobre una superficie dura para reducir el número de burbujas.
4. Se debe mantener el tubo en posición vertical con una mano y la otra mano se debe usar para cerrar la tapa, presionándola firmemente hasta que se escuche un "clic". El líquido de la tapa se liberará y pasará al tubo, donde se mezclará con la saliva. Hay que asegurar que la tapa este bien cerrada.
5. Una vez realizado el paso anterior, es posible desenroscar el embudo del tubo, siempre manteniendo el tubo en posición vertical.
6. Esta vez se tapa el tubo con el tapón pequeño.

- Finalmente se agita el tubo cerrado durante 5 segundos. Se debe desechar el tubo y las almohadillas.



Figura 6: Procedimiento para la obtención de muestras de saliva con el Kit Orange OG-575.

3.3.2 Extracción de ADN

Una vez adquiridas las muestras biológicas, el paso siguiente es extraer el ADN de la saliva mediante el protocolo de precipitación con etanol y reactivo *Prepit•L2P* para purificarlo posteriormente según las indicaciones del fabricante (Tabla 2)

Tabla 2: Procedimiento de extracción de ADN a partir de una muestra de saliva.

1	Mezclar la muestra en el kit DNA Genotek por inversión y agitación suave durante unos segundos
2	Incubar la muestra a 50°C en una incubadora de agua durante un mínimo de 1 hora o en una incubadora de aire durante un mínimo de 2 horas
3	Transfiera 500 µL de la muestra mezclada a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL
4	Para 500 µL de muestra, agregue 20 µL (1/25 del volumen) de PTL2P al tubo de microcentrífuga y mezcle con vórtex durante unos segundos
5	Incubar en hielo durante 10 minutos
6	Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos a 15 000 × g
7	Transferir con cuidado la mayor parte del sobrenadante claro con una pipeta a un tubo de microcentrífuga nuevo. Es posible desechar el pellet.
8	A 500 µL de sobrenadante, agregue 600 µL de etanol al 95 % o al 100 % a temperatura ambiente. Mezclar suavemente por inversión 10 veces.
9	Reposar la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir que el ADN precipite por completo.
10	Colocar el tubo en la microcentrífuga en una orientación conocida. Centrifugar a temperatura ambiente durante 2 minutos a 15.000 × g
11	Retirar con cuidado el sobrenadante con la punta de una pipeta y deséchelo. Ser cuidadosos para no perturbar el sedimento de ADN
12	Lavado con etanol: Añadir con cuidado 250 µL de etanol al 70%. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Retire completamente el etanol sin perturbar el sedimento.
13	Agregue 100 µL de solución TE para disolver el sedimento de ADN. Vórtice durante al menos 5 segundos.
14	Para asegurar la rehidratación completa del ADN (pellet y frotis) incubar a temperatura ambiente durante la noche seguido de agitación vorticial a 50 °C durante 1 hora con agitación vorticial ocasional.
15	Opciones para el almacenamiento del ADN completamente rehidratado: a) Recomendado en TE, en alícuotas a -20°C para almacenamiento a largo plazo, o b) En TE a 4°C hasta por 2 meses

3.3.3 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN fue realizada usando un *NanoDrop 2000*, es un espectrofotómetro de UV visible de espectro completo que permite evaluar y cuantificar la pureza de ADN. Con este tipo de espectrofotómetro es posible medir volúmenes de muestras muy pequeños, de alrededor de 0,5 µl. Su sistema de retención permite el pipeteo directo de

muestras sobre la superficie de medición óptica y una vez terminada la medición, basta con limpiar las superficies con un paño de laboratorio sin pelusa (Figura 7).

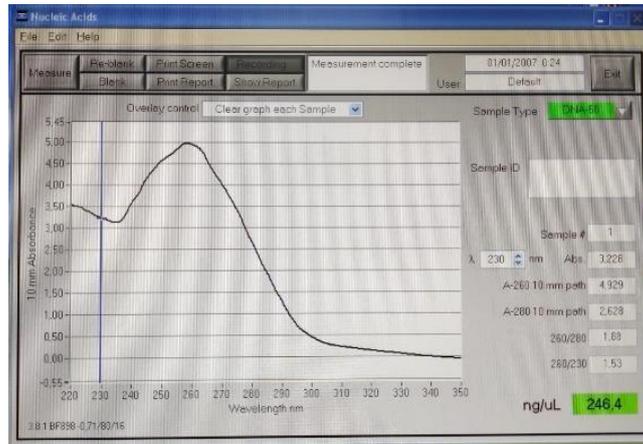


Figura 7: Ejemplo de cuantificación de ADN usando un NanoDrop 2000. Imagen obtenida durante el procedimiento de cuantificación de ADN en los laboratorios del Departamento de Fisiología de la Universidad de Zaragoza.

3.4 Secuenciación Sanger

El análisis de variantes genéticas mediante secuenciación Sanger consta de cuatro pasos principales:

1. Amplificación de la región de interés por PCR
2. Limpieza del producto de PCR
3. Secuenciación Sanger
4. Análisis de resultados

3.4.1 Amplificación del ADN por PCR

En primer lugar, se realiza una PCR de las muestras de ADN de saliva de cada uno de los individuos del estudio. La PCR o reacción de la cadena de polimerasa consiste en una amplificación mediante copias repetidas de una pequeña región del ADN. Para llevar a cabo esta amplificación, se utilizó el kit DreamTaq PCR Master Mix (2X) de Thermo Scientific™ que contiene la Taq Polimerasa y los nucleótidos necesarios para que tenga lugar la reacción. Además, también se añadieron los oligonucleótidos, específicos para cada región que se quiere estudiar (diseñados en el laboratorio).

Las PCR se hicieron en un volumen total de 10 μ l:

- DreamTaq PCR MasterMix (2X): 10 μ l
- Oligonucleótido *Forward* (10mM): 0.5 μ l
- Oligonucleótido *Reverse* (10mM): 0.5 μ l
- Agua: 8.5 μ l

- ADN (100ng/μl): 0.5 μl

Una vez finalizada la PCR se lleva a cabo un revelado mediante electroforesis. En este estudio, se aplica corriente eléctrica sobre un soporte de gel de agarosa (1%) y usando una pipeta se introduce el ADN amplificado en la PCR en uno de los pocillos (Ver Figura 8A). Debido a la carga negativa de la molécula de ADN, está migrará hacia el electrodo positivo. Al poner la mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, estas se moverán y deberán ir pasando por la malla de gel que es una red tridimensional de fibras cruzadas. Las pequeñas se moverán mejor y más rápido por lo que avanzarán mientras que las más grandes quedarán cerca del lugar de partida. Además, en la preparación del gel se incluyó la sonda fluorescente Gel Red, la que permitió revelar el mismo mediante un transiluminador UV convencional (Ver Figura 8B).

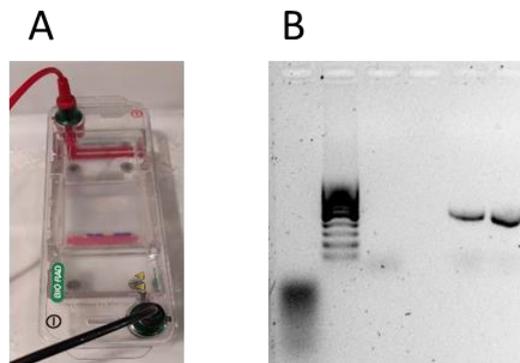


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa de ADN. (A) Imagen de la cubeta de electroforesis (B) imagen representativa de un gel de agarosa revelado mediante un transiluminador UV. Imagen obtenida durante el procedimiento de amplificación de ADN en los laboratorios del Departamento de fisiología de la Universidad de Zaragoza.

3.4.2 Limpieza del producto de PCR

Una vez obtenidos los productos de PCR, antes de realizar la secuenciación de las muestras se debe eliminar todo el material genético adicional mediante la adición de un reactivo enzimático. Concretamente, este método de limpieza de PCR elimina el exceso de cebadores y dNTP usados en la amplificación sin interferir con las aplicaciones posteriores. Cabe señalar que en este estudio se ha usado ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup de Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific) *Exo-SAP*. Tras la inactivación de las enzimas ExoSAP por calor, el producto de PCR ya se encuentra en condiciones óptimas para ser secuenciado.

3.4.3 Secuenciación Sanger

Una vez obtenidos los productos de PCR purificados, se prepararon para ser enviados al servicio externo de secuenciación de Sistemas Genómicos en Valencia con el secuenciador ABI3730xl de Applied Biosystems.

3.4.4 Análisis de resultados de la secuenciación Sanger

En este estudio ha sido necesario usar el software informático SnapGene Viewer para la consecución de los cromatogramas, además del buscador de genomas Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). En la Figura 9 se muestra un ejemplo analizado en el transcurso de este trabajo.

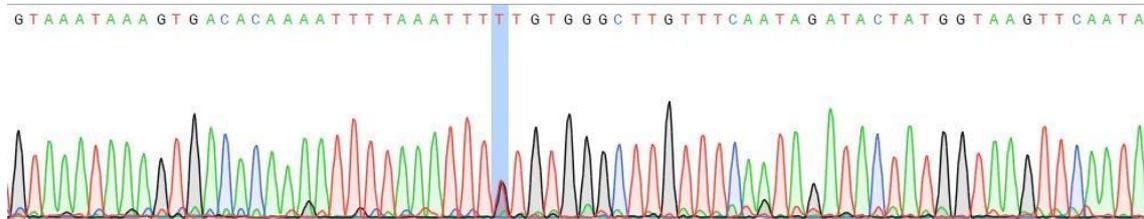


Figura 9: Cromatograma que muestra la presencia de la variante c. 6316G>T en el gen *NIPBL*

3.5 Secuenciación masiva con paneles de genes

El método de secuenciación sanger y la secuenciación de nueva generación tienen características profundamente distintas. La secuenciación Sanger corresponde a un método cualitativo y específico mientras que la secuenciación de nueva generación es de carácter cuantitativo lo que conlleva que sea un método de alta sensibilidad. Dicha sensibilidad está directamente relacionada con profundidad y cobertura de lectura de la muestra. Por ello, para evaluar la presencia de mosaicismos parentales, se realizó una secuenciación masiva con un panel de genes que incluye todos los genes del SCdL descritos hasta la fecha, con alta profundidad de lectura. Esta prueba se realizó en todos aquellos casos que presentaron dudas tras la secuenciación Sanger.

3.5.1 Protocolo de secuenciación con el panel de genes del SCdL

La muestra de ADN fue secuenciada mediante el uso de un panel de genes dirigido diseñado específicamente para el SCdL en el laboratorio de la Unidad de Genética Clínica y Genómica Funcional. Este panel analiza las regiones codificantes e intrónicas flanqueadas (+/-20 pb) de 35 genes relacionados con el SCdL, entre los que se encuentran *NIPBL* (NM_133433.3), *SMC1A* (NM_006306.3), *SMC3* (NM_058243.2), *RAD21* (NM_006265.2), *HDAC8* (NM_018486.2), *BRD4* (NM_058243.2) y *ANKRD11* (NM_001256183.1). Por lo que resultó de gran utilidad para estudiar todas las variantes de nuestro estudio. El panel ha sido diseñado con la tecnología de AmpliSeq y la cobertura *in silico* es del 99.15%. La secuenciación se realizó en los servicios centrales de Secuenciación y Genómica Funcional del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS). Para ello se ha empleado la tecnología de Ion Torrent™. La librería se generó con el sistema automático de Ion Chef y se secuenció en un Ion Chip 530 en la plataforma Ion S5XL con una longitud de lectura establecida en 200bp. Los resultados de secuenciación fueron analizados

por los especialistas del grupo de investigación utilizando los softwares de Ion Torrent Suite™, Ion Reporter™ e IGV (Broad Institute).

3.5.2 Interpretación de variantes genéticas

Las variantes fueron clasificadas de acuerdo con las recomendaciones de la American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), para lo cual se utilizaron las siguientes bases de datos:

Bases de datos de variación genética:

- **GnomAD (Genome Aggregation Database):** <https://gnomad.broadinstitute.org>. Reúne y armoniza datos de secuenciación de exomas y genomas de una variedad de proyectos de secuenciación a gran escala.
- **dbSNP:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>. Base de datos que contiene descripciones de polimorfismos de nucleótido único y sus variantes junto a todas las publicaciones hasta la actualidad.

Bases de datos de mutaciones reportadas causantes de enfermedad:

- **ClinVar:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Constituye un archivo público de acceso gratuito a informes sobre la concordancia entre variaciones y fenotipos humanos, que incluye variantes de línea germinal y somáticas de cualquier tamaño, tipo o ubicación genómica (21).
- **LOVD:** <https://www.lovd.nl/>. Diseñada para recopilar y mostrar variantes en la secuencia de ADN. Base de datos diseñada para recopilar y mostrar variantes en la secuencia de ADN (22)

Algoritmos para la predicción de patogenicidad:

- **Mutation Taster:** <https://www.mutationtaster>. Evalúa las variantes secuenciadas de ADN para determinar su potencial de causar enfermedades.
- **PolyPhen2:** <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>. Predice el posible impacto de una sustitución de aminoácidos en la estructura y función de una proteína humana (23).
- **SIFT:** <http://sift.jcvi.org/>. Predice si la sustitución de un aminoácido afecta a la función de la proteína según la homología de secuencia y las propiedades físicas de los aminoácidos

Aplicaciones integradoras:

- **Varsome:** <https://varsome.com>. Permite investigar las variantes en su contexto genómico, recopilando múltiples bases de datos.

4 RESULTADOS

4.1 Estudio de la presencia de mosaicismo parental en el SCdL

Actualmente, los estudios de cosegregación familiar llevados a cabo en la práctica clínica rutinaria se basan en el estudio del ADN procedente de sangre de los padres de pacientes utilizando métodos de primera generación. Con el fin de detectar si se están pasando por alto casos de mosaicismo parental en este síndrome, se tomaron muestras de raspado bucal de padres asintomáticos con hijos con SCdL y se sometieron a diagnóstico genético para comprobar si alguno de ellos pudiera albergar la variante causal de su hijo en forma de mosaico. Todas las muestras fueron analizadas por secuenciación Sanger, y en caso de sospecha se llevó a cabo un estudio más exhaustivo utilizando un panel de genes de alta profundidad específicamente diseñado en el laboratorio para el diagnóstico del SCdL.

Se analizaron un total de 11 familias: seis de ellas con un niño con una variante causal en el gen *NIPBL*, tres en el gen *HDAC8* y dos en el gen *SMC1A*. En la figura 10 se muestran los cromatogramas resultantes de la secuenciación de las familias estudiadas:

- Familia 1: Se trata de una niña con una variante genética en el gen *NIPBL*, que presenta delección de dos nucleótidos en la posición c.2479_2480, la cual ya ha sido reportada en ClinVar y clasificada como patogénica. No se observa dicha variante en el ADN de saliva de ninguno de los progenitores.
- Familia 2: Se trata de una niña con una variante genética en el gen *NIPBL* que presenta una traslocación en la posición c.6316G>T. Ha sido reportada en ClinVar y clasificada como patogénica. No se observa dicha variante en el ADN de saliva de ninguno de los progenitores.
- Familia 3: Se trata de una niña con una variante genética en el gen *NIPBL* que presenta una traslocación en la posición c.3745 A>G. Ha sido reportada en ClinVar y clasificada como patogénica. No se observa dicha variante en el ADN de saliva de ninguno de los progenitores.
- Familia 4: Se trata de un niño con una variante genética en el gen *NIPBL* que presenta una traslocación en la posición c.4422 G>T. Ha sido reportada en ClinVar y clasificada como patogénica. No se observa dicha variante en el ADN de saliva de ninguno de los progenitores.
- Familia 5: Se trata de una niña con una variante genética en el gen *NIPBL* que presenta una traslocación en la posición c.5482 C>T. Ha sido reportada en ClinVar y clasificada como patogénica. No se observa dicha variante en el ADN de saliva de ninguno de los progenitores.

- Familia 6: Se trata de una niña con una variante genética en el gen *NIPBL* que presenta una traslocación en la posición c.6869 T>C. Ha sido reportada en ClinVar y clasificada como patogénica. No se observa dicha variante en el ADN de saliva de ninguno de los progenitores.
- Familia 7: Se trata de una niña con una variante genética en el gen *HDAC8* que presenta una traslocación en la posición c.9386 G>A. Ha sido reportada en ClinVar y clasificada como patogénica. No se observa dicha variante en el ADN de saliva de ninguno de los progenitores.
- Familia 8: Se trata de una niña con una variante genética en el gen *HDAC8* que presenta una traslocación en la posición c.1081C>T. Ha sido reportada en ClinVar y clasificada como patogénica. No se observa dicha variante en el ADN de saliva de ninguno de los progenitores.
- Familia 9: Se trata de una niña con una variante genética en el gen *HDAC8* que presenta una traslocación en la posición c.6860 T>C. Ha sido reportada en ClinVar y clasificada como patogénica. No se observa dicha variante en el ADN de saliva de ninguno de los progenitores.
- Familia 10: Se trata de una niña con una variante genética en el gen *SMC1A* que presenta una traslocación en la posición c.2906 G>A. Ha sido reportada en ClinVar y clasificada como patogénica. No se observa dicha variante en el ADN de saliva de ninguno de los progenitores.
- Familia 11: Se trata de un niño portador de una variante causal en el gen *SMC1A* (c.2078G>A). El cromatograma correspondiente a la madre de la familia 11 resultó poco concluyente y sugirió la posibilidad de un evento de mosaicismo parental. Por ello se procedió al análisis de esta muestra con una técnica de secuenciación más sensible.

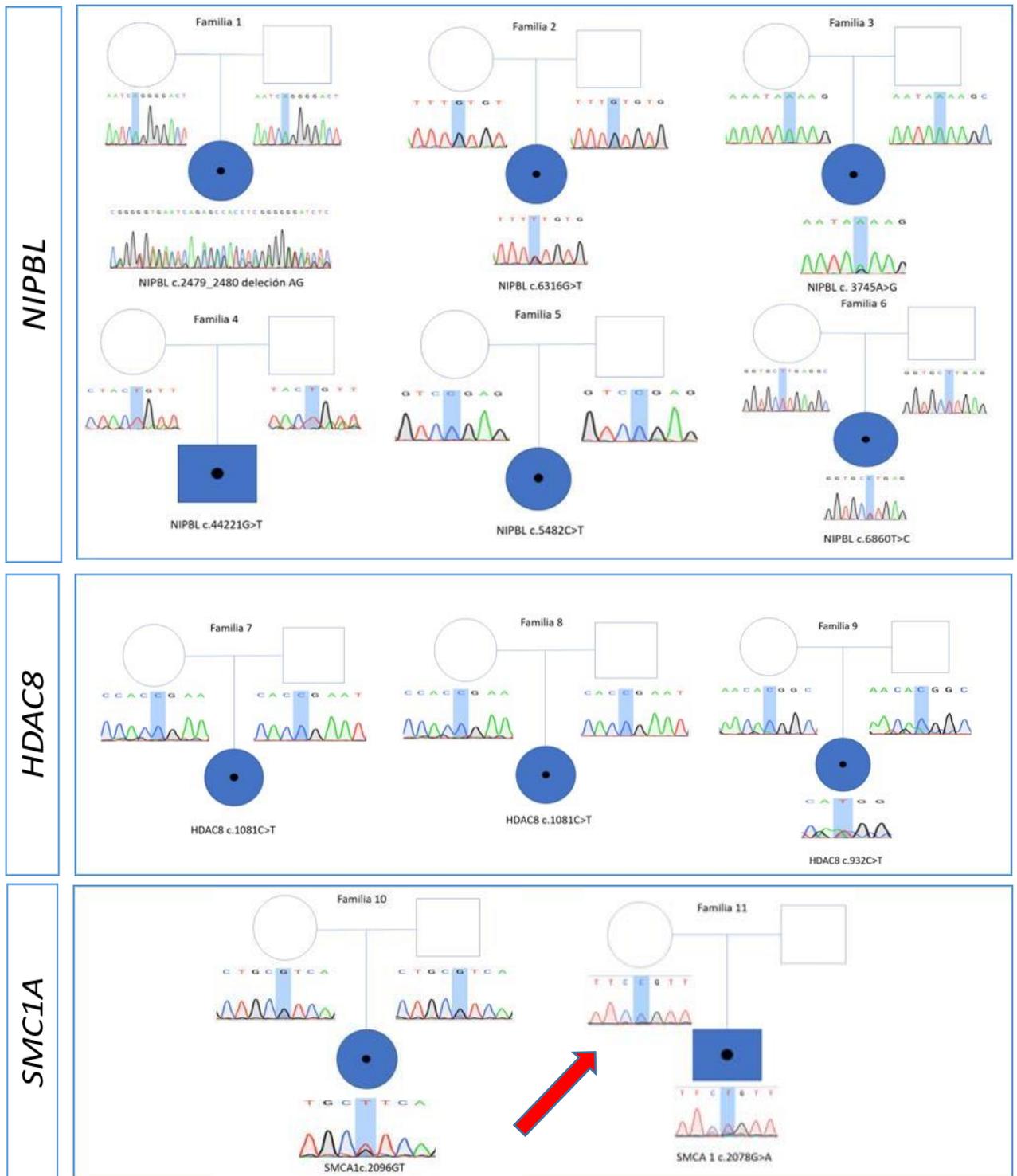


Figura 10: Análisis de mosaicismo parental en 11 familias afectadas con el SCdL. Se muestran los cromatogramas obtenidos tras la secuenciación Sanger de una muestra de ADN de raspado bucal de los padres de pacientes con SCdL. Debajo de cada árbol genealógico se indica la variante genética presente en el paciente. La flecha roja señala la posible presencia de mosaicismo en la muestra de la madre de la familia 11.

4.2 Descripción de un caso de mosaicismo parental

4.2.1 Historia Clínica

Nuestro caso describe a un paciente masculino de 13 meses de edad, primer hijo de una pareja sana no consanguínea, nacido a las 38 semanas y cinco días de edad gestacional sin complicaciones durante el embarazo. Su longitud al nacer (47,5 cm, -1,4 SD), peso corporal (2,505 kg, -1,89 SD) y circunferencia de la cabeza (32 cm, -1,57 SD) estaban dentro de los rangos normales.

A la edad de tres meses el paciente fue trasladado a la unidad de Neuropediatría por la observación de rasgos faciales dismórficos e hipertonía. El examen clínico reveló microcefalia, sinofridia, pestañas largas, orejas de implantación baja, raíz nasal deprimida, labio superior delgado, frente hundida, nacimiento del cabello posterior bajo y sindactilia bilateral parcial en el segundo y tercer dedo del pie. Todos estos hallazgos clínicos apoyaron la sospecha de SCdL en el paciente. Tras el análisis neurológico se detectaron anomalías estructurales como hipoplasia de cerebelo y cuerpo calloso, megacisterna magna y un posible retraso en la mielinización cerebral.

4.2.2 Cálculo del score clínico del SCdL

A la edad de 13 meses se realizó una reevaluación exhaustiva del paciente de edad para calcular el puntaje clínico del SCdL de acuerdo a la guía publicada (1). Si bien las medidas de altura, peso corporal y perímetro cefálico permanecían normales, el examen reveló braquicefalia, micrognatia, cejas y paladar ligeramente arqueados, y diastema leve. El paciente presentaba otras características típicas del SCdL, como manos pequeñas, hirsutismo leve, criptorquidia, discapacidad intelectual, reflujo gastroesofágico y dificultades a la hora de alimentarse. Todos estos hallazgos clínicos confirmaron el diagnóstico clínico de SCdL en el paciente, con una puntuación clínica de 12 (Tabla 3).

Tabla 3. Cálculo del puntaje clínico del Síndrome Cornelia de Lange del paciente 11.

Características cardinales (2 puntos cada una si está presente)
<i>Sinofridia y/o cejas gruesas</i>
<i>Nariz corta, cresta nasal cóncava y/o punta nasal hacia arriba</i>
<i>Filtrum largo y/o liso</i>
<i>Labio superior fino y/o comisuras de la boca hacia abajo</i>
Oligodactilia de la mano y/o adactilia
Hernia diafragmática congénita
Rasgos sugerentes (1 punto cada uno si está presente)
<i>Retraso global del desarrollo y/o discapacidad intelectual</i>
Retraso del crecimiento prenatal (<2sD)
Retraso del crecimiento postnatal (<2sD)
<i>Microcefalia (prenatal y/o posnatal)</i>
<i>Manos pequeñas y/o pies</i>
Quinto dedo corto
<i>Hirsutismo</i>
Puntuación Clínica
<4 puntos: insuficiente para indicar pruebas moleculares para Cornelia de Lange.
4 a 8 puntos (de los cuales al menos 1 es cardinal): pruebas moleculares indicadas.
9 o 10 puntos (de los cuales al menos 2 cardinales): Cornelia de Lange no clásicas
≥11 puntos, de los cuales al menos 3 son cardinales: Cornelia de Lange clásicas

En magenta se resaltan los fenotipos presentes en el paciente 11

4.2.3 Evaluación del fenotipo facial con la herramienta Face2Gene

Con el fin de complementar el diagnóstico clínico realizado, una fotografía de la cara del paciente se sometió a un análisis adicional con la aplicación Face2Gene, resultando el SCdL como el primer síndrome sugerido con un nivel *gestalt* alto (Figura 11). Ambos padres también fueron evaluados clínicamente y utilizando la tecnología Face2Gene y no mostraron ningún signo ni síntoma de SCdL o cualquier otro desorden relacionado.

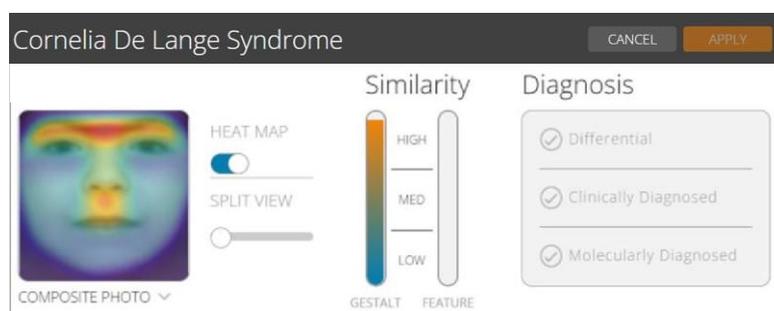


Figura 11. Resultado facial mediante el uso de la aplicación Face2gene. Figura de elaboración propia.

4.2.4 Diagnóstico molecular

4.2.4.1 Clasificación de la variante causal en SMC1A

Ante la sospecha de un trastorno del desarrollo, cuando el paciente tenía cinco meses de edad se realizó un análisis de secuenciación del exoma filtrado para los genes relacionados con el SCdL. Como resultado, se identificó una posible variante causante de enfermedad en heterocigosis en el gen *SMC1A* [*SMC1A*: NM_006306.3: c.2078G>A: p.(Arg693Gln)], detectada con una frecuencia alélica del 50%.

Esta variante no está registrada en las bases de datos poblacionales gnomAD ni ExAC, y se clasificó como patogénica según los criterios AMP/ACMG para la clasificación de variantes y de acuerdo con todos los algoritmos predictivos *in silico* aplicados (SIFT: 0.0, Polyphen-2: 1.0). Además, dicha variante había sido reportada previamente en la literatura en un paciente con SCdL, y también otra que afecta la misma posición aminoacídica (p.Arg693Gly), ambas descritas como deletéreas.

4.2.4.2 Secuenciación Sanger del ADN de saliva y sangre de la madre del paciente

Para investigar el supuesto origen *de novo* de la variante, se realizaron estudios de cosegregación familiar. Tras la secuenciación Sanger del ADN extraído de sangre periférica y de saliva de la madre del paciente, los cromatogramas obtenidos no resultaron concluyentes (Figura 12). Dado que la secuenciación Sanger no es un método cuantitativo que permita confirmar la presencia de mosaicismo genético, se decidió analizar la muestra de ADN procedente de raspado bucal a través de técnicas de secuenciación más profundas.

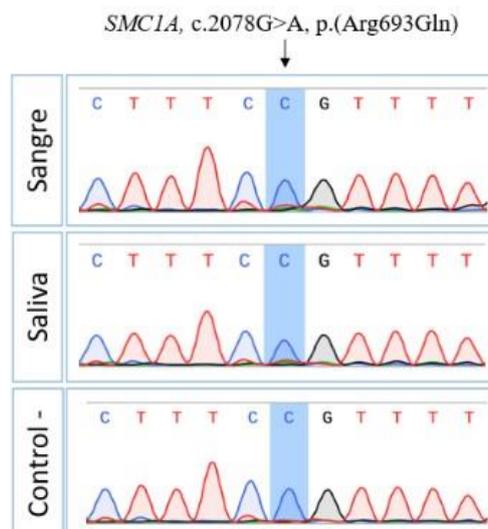


Figura 12. Secuenciación Sanger de las muestras de ADN de saliva y sangre de la madre del paciente. Se muestran los cromatogramas obtenidos tras la secuenciación de las muestras de ADN procedentes de tejido materno en comparación con el cromatograma resultante de la secuenciación Sanger de ADN de un control negativo que no presenta la variante de estudio.

4.2.4.3 Secuenciación masiva del ADN de saliva de la madre del paciente

El ADN procedente de mucosa bucal de la madre del paciente se analizó utilizando un panel NGS específicamente diseñado en el laboratorio para el diagnóstico del SCdL que incluía el gen *SMC1A* con alta profundidad de lectura. Este confirmó la presencia de la variante causal del SCdL que albergaba el paciente en una frecuencia alélica muy baja (AAF 9,34%). La posición genómica de interés fue secuenciada con una cobertura de 942 lecturas, lo que permitió la detección de la variante en un nivel tan bajo de mosaicismo. Estos datos se contrastaron con los resultados de secuenciación Sanger de una muestra de raspado bucal de una mujer control que no presentaba la variante de estudio, comprobando que la detección de la variante de estudio en una AAF tan baja era precisa y no se debía a errores intrínsecos del panel. Finalmente, los hallazgos anteriores indicaron que la variante se había transmitido al paciente con SCdL por vía materna.

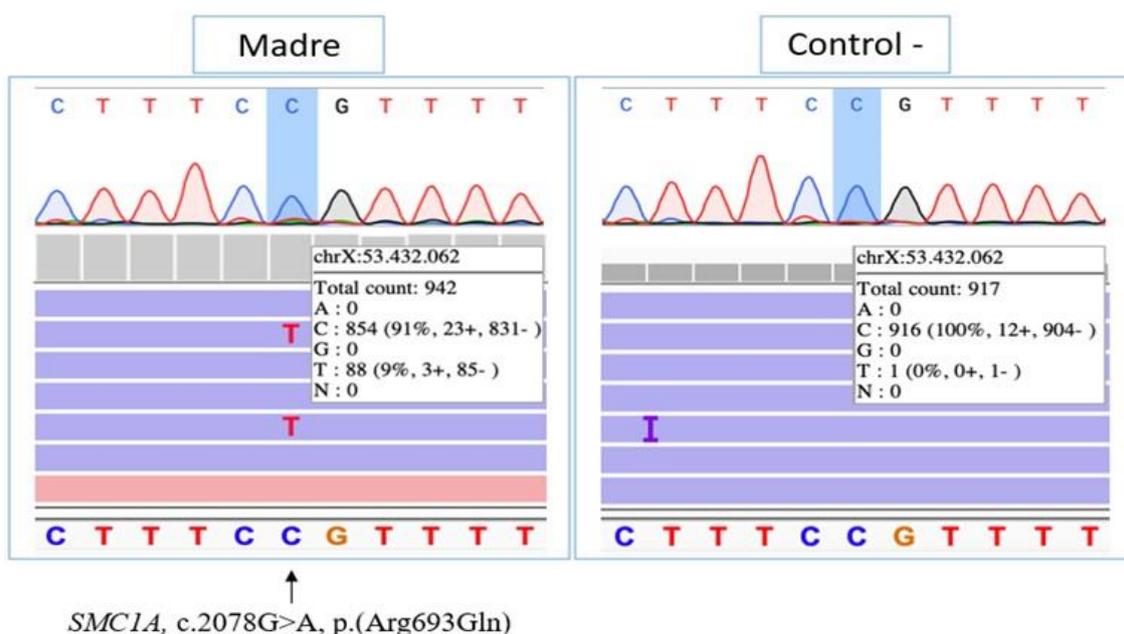


Figura 12. Visualización en el software IGV de la variante c.2078G>A en el gen *SMC1A* detectada en la muestra de ADN de saliva de la madre del paciente por secuenciación masiva.

5 DISCUSIÓN

El Síndrome Cornelia de Lange (SCdL) es un trastorno genético del neurodesarrollo con una gran variabilidad genética. Una amplia mayoría de casos se deben a variantes *de novo* en uno de los genes causales (*NIPBL*, *SMC1A*, *ANKRD11*, *SMC3*, *RAD21*, *BRD4*, *ANKRD11* y *MAU2*)(17). Sin embargo, en los últimos años se ha revelado una prevalencia especialmente alta de casos de mosaicismo genético en este síndrome, pudiendo llegar a suponer hasta un 13% de los casos diagnosticados (17). Esto ha sido posible gracias a la incorporación en el diagnóstico

genético de técnicas de secuenciación genómica más sensibles, junto con el análisis de distintas muestras biológicas de los pacientes.

En el enfoque del diagnóstico genético del SCdL establecido en la guía de manejo clínico del SCdL publicada en 2018 en *Nature Genetics*, ya se refleja la importancia del mosaicismo en este síndrome, y se recomienda explorar esta posibilidad en el caso de no encontrar una variante constitutiva tras la secuenciación de los genes relacionados con el SCdL. Sin embargo, en una muestra de ADN de sangre del paciente es muy difícil detectar un caso de mosaicismo, ya que en el SCdL se ha descrito una eliminación de las células con la variante patogénica específicamente en este tejido (17). Por ello, ante la sospecha clínica de SCdL en un individuo, se recomienda analizar también ADN procedente de muestras de fibroblastos o células bucales.

Pese a estas peculiaridades, los estudios de segregación familiar en el SCdL se siguen realizando de manera rutinaria con el análisis de una muestra de ADN procedente de sangre de los progenitores del paciente con técnicas de secuenciación de primera generación, pudiéndose así pasar por alto casos de mosaicismo parental, que, aunque no cursen con clínica, puedan tener una repercusión directa en el asesoramiento genético y riesgo de recurrencia familiar.

En 2012, Slavin et al. describieron 12 familias con más de un niño afectado confirmado molecularmente nacido de padres no afectados, lo cual parecía revelar una frecuencia inusualmente alta de mosaicismo germinal parental en el SCdL, llegando a suponer hasta un 5.4% de los casos (24). Sin embargo, estos resultados fueron cuestionados por otros autores, por representar una muestra muy sesgada (25).

En este trabajo nos planteamos estudiar molecularmente la prevalencia de mosaicismo parental en una cohorte de 11 familias, y para ello, se obtuvo ADN procedente de frotis bucal de ambos progenitores y se realizó la secuenciación Sanger de la región en la que se encontraba la variante patogénica en su hijo/a. La posterior aplicación de técnicas de secuenciación masiva con un panel de genes relacionados con el SCdL nos permitió confirmar un caso de mosaicismo parental. Siendo así la prevalencia de mosaicismo parental en nuestra cohorte del 9.1% (1/11).

El caso que nos atañe corresponde a un niño afectado que presenta un fenotipo de SCdL clásico y portador de la variante en el gen *SMC1A* c.2078G>A. En el estudio de segregación familiar, la secuenciación Sanger de la muestra de ADN tanto de saliva como de sangre de la madre del paciente resultaron no concluyentes. Gracias a una posterior secuenciación con alta profundidad de lectura (>900x), se pudo concluir la presencia de la variante en el ADN procedente de raspado bucal de la madre con una frecuencia alélica del 9%. Sin embargo, la madre del paciente no presentaba clínica sugestiva del SCdL.

El gen *SMC1A* tiene una herencia ligada al cromosoma X y representa aproximadamente el 5% de los individuos con SCdL diagnosticados clínicamente (26). En el presente caso, la variabilidad fenotípica observada entre madre e hijo podría justificarse por la inactivación aleatoria del cromosoma X, que hace que las mujeres portadoras de variantes patogénicas en *SMC1A* expresen tanto el alelo mutante como el salvaje, mientras que los varones portadores expresan solo el alelo mutante por poseer un solo cromosoma X. Además, se ha informado que *SMC1A* escapa parcialmente a la inactivación del cromosoma X y, como consecuencia, las mujeres expresan el doble de ARNm de *SMC1A* que los varones en proporciones alélicas bastante variables según el individuo (27). Si bien este tema queda por analizar, parece factible que el género, con respecto a las variantes causales en *SMC1A*, pudiera tener un efecto en la expresividad del SCdL. La baja frecuencia alélica encontrada en la madre también podría favorecer la ausencia de manifestaciones clínicas. Sin embargo, esto podría no ser tan obvio en el SCdL, considerando que los pacientes con variantes mosaico suelen presentar características clínicas tan graves como aquellos con variantes patogénicas constitutivas (17). Sea como fuere, la dificultad de interpretar la presentación clínica de las mujeres portadoras de variantes en *SMC1A* ha sido ampliamente reconocida, así como las diferencias entre sexos observadas en la expresividad de SCdL cuando *SMC1A* es el gen afectado.

Hasta la fecha sólo se han descrito dos casos en el SCdL de variantes causales en *SMC1A* transmitidas debido a mosaicismo parental. Sorprendentemente, la única variante descrita [*SMC1A*: NM_006306.3: c.1487G>A; p(Arg496His)] en dos hermanas con SCdL se detectó en forma de mosaicismo gonadosomático en su padre, carente de presentación clínica, reforzando la complejidad en el patrón de herencia y expresividad de las variantes en *SMC1A* anteriormente mencionada (. La misma variante se encontró en otro caso familiar no relacionado y, a pesar de que nunca se pudo confirmar su presencia en los padres, su identificación en ambas hijas resultó compatible con un caso de mosaicismo de la línea germinal (16). Indudablemente, son necesarios más estudios sistemáticos a nivel de población para evaluar la contribución del mosaicismo a la transmisión del SCdL a la descendencia.

Todos estos hallazgos podrían indicar la posibilidad de que los casos de SCdL transmitidos como resultado de mosaicismo gonadosomático en algún progenitor pudieran ser más frecuentes de lo que actualmente se reconoce, así como que el análisis de muestras adicionales además de la sangre con tecnologías altamente sensibles podría revelar varios casos de mosaicismo no detectados hasta el momento en pruebas genéticas estándar. Así pues, cabe señalar que la secuenciación profunda del ADN derivado de células bucales o fibroblastos sería

una forma confiable de investigar el mosaicismo somático en pacientes y padres y, posteriormente, estimar el riesgo de recurrencia.

En este contexto, el riesgo de recurrencia de futuros embarazos podría dividirse en cuatro grupos según el tipo de variantes patogénicas encontradas en los pacientes y sus padres: alto (variante constitutiva de los padres), moderado (variante gonadosomático y/o mosaico germinal de los padres), bajo (Variante *de novo* en línea germinal parental) y mínimo (variante postcigótica en el paciente). Así pues, al planificar el diagnóstico molecular del paciente y los estudios de cosegregación familiar, es necesario tener en cuenta la alta prevalencia de mosaicismo en el SCdL, así como la probable selección purificadora frente a variantes causantes de enfermedades en la sangre.

Para finalizar, la alta prevalencia de mosaicismo en el SCdL, así como la disparidad en la distribución de los tejidos, brindan una orientación novedosa para el manejo clínico y el asesoramiento genético de las familias. Igualmente, el caso que aquí se presenta, junto con los hallazgos recientes sobre el mosaicismo genético en SCdL, manifiestan la necesidad de realizar más investigaciones y estudios a gran escala que permitan conocer mejor la contribución de esta condición genética.

6 CONCLUSIONES

1. La aplicación de técnicas de secuenciación masiva en los estudios de segregación familiar ha permitido la detección de un caso de Síndrome de Cornelia de Lange heredado por vía materna debido a mosaicismo gonadosomático.
2. Es la primera vez que se describe y se confirma molecularmente en el Síndrome Cornelia de Lange un caso de mosaicismo parental en el gen *SMC1A*.
3. El hallazgo de un caso de mosaicismo parental entre las 11 familias estudiadas en este trabajo revela que este fenómeno podría ser más frecuente de lo estimado hasta el momento en el Síndrome Cornelia de Lange.
4. La secuenciación Sanger y el análisis de una sola muestra biológica en los estudios de segregación familiar podrían no detectar casos de mosaicismo gonadosomático parental de baja frecuencia. Se propone realizar los estudios de segregación familiar en el Síndrome Cornelia de Lange utilizando muestras de saliva o fibroblastos de los progenitores y técnicas de secuenciación con alta profundidad de lectura.
5. La identificación de nuevos casos de mosaicismo parental en el Síndrome Cornelia de Lange tiene importantes implicaciones en el asesoramiento genético y cálculo de riesgo de recurrencia familiar.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Kline AD, Moss JF, Selicorni A, Bisgaard AM, Deardorff MA, Gillett PM, Ishman SL, Kerr LM, Levin AV, Mulder PA, Ramos FJ, Wierzba J, Ajmone PF, Axtell D, Blagowidow N, Cereda A, Costantino A, Cormier-Daire V, FitzPatrick D, Grados M, Groves L, Guthrie W, Huisman S, Kaiser FJ, Koekkoek G, Levis M, Mariani M, McCleery JP, Menke LA, Metrena A, O'Connor J, Oliver C, Pie J, Piening S, Potter CJ, Quaglio AL, Redeker E, Richman D, Rigamonti C, Shi A, Tümer Z, Van Balkom IDC, Hennekam RC. Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Genet.* 2018 Oct;19(10):649-666. doi: 10.1038/s41576-018-0031-0. PMID: 29995837; PMCID: PMC7136165.
2. Wang D, Eberhart MS, Sheridan MV, Hu K, Sherman BD, Nayak A, Wang Y, Marquard SL, Dares CJ, Meyer TJ. Stabilized photoanodes for water oxidation by integration of organic dyes, water oxidation catalysts, and electron-transfer mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Aug 21;115(34):8523-8528. doi: 10.1073/pnas.1802903115. Epub 2018 Aug 6. PMID: 30082396; PMCID: PMC6112685.
3. Panarotto M, Davidson IF, Litos G, Schleiffer A, Peters JM. Cornelia de Lange syndrome mutations in NIPBL can impair cohesin-mediated DNA loop extrusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022 May 3;119(18):e2201029119. doi: 10.1073/pnas.2201029119. Epub 2022 Apr 27. PMID: 35476527.
4. Garcia P, Fernandez-Hernandez R, Cuadrado A, Coca I, Gomez A, Maqueda M, LatorrePellicer A, Puisac B, Ramos FJ, Sandoval J, Esteller M, Mosquera JL, Rodriguez J, Pié J, Losada A, Queralt E. Disruption of NIPBL/Sccl in Cornelia de Lange Syndrome provokes cohesin genome-wide redistribution with an impact in the transcriptome. *Nat Commun.* 2021 Jul 27;12(1):4551. doi: 10.1038/s41467-021-24808-z. PMID: 34315879; PMCID: PMC8316422.
5. Parenti I, Kaiser FJ. Cornelia de Lange Syndrome as Paradigm of Chromatinopathies. *Front Neurosci.* 2021 Nov 5;15:774950. doi: 10.3389/fnins.2021.774950. PMID: 34803598; PMCID: PMC8603810.
6. Krantz ID, McCallum J, DeScipio C, Kaur M, Gillis LA, Yaeger D, Jukofsky L, Wasserman N, Bottani A, Morris CA, Nowaczyk MJ, Toriello H, Bamshad MJ, Carey JC, Rappaport E, Kawachi S, Lander AD, Calof AL, Li HH, Devoto M, Jackson LG. El síndrome de Cornelia de Lange está causado por mutaciones en NIPBL, el homólogo humano de *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nat Genet.* 2004 junio; 36 (6): 631-5. doi: 10.1038/ng1364. Epub 2004 16 de mayo. PMID: 15146186; IDPM: PMC4902017.
7. Liu J, ID de Krantz. Cohesina y enfermedad humana. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:303-20. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164211. PMID: 18767966; IDPM: PMC4894839.
8. Krab LC, Marcos-Alcalde I, Assaf M, Balasubramanian M, Andersen JB, Bisgaard AM, Fitzpatrick DR, Gudmundsson S, Huisman SA, Kalayci T, Maas SM, Martinez F, McKee S, Menke LA, Mulder PA, Murch OD, Parker M, Pie J, Ramos FJ, Rieubland C, Rosenfeld Mokry JA, Scarano E, Shinawi M, Gómez-Puertas P, Tümer Z, Hennekam RC. Delineation of phenotypes and genotypes related to cohesin structural protein RAD21. *Hum Genet.* 2020 May;139(5):575-592. doi: 10.1007/s00439-020-02138-2. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32193685; PMCID: PMC7170815.
9. Latorre-Pellicer A, Ascaso Á, Lucia-Campos C, Gil-Salvador M, Arnedo M, Antoñanzas R, Ayerza-Casas A, Marcos-Alcalde I, Gómez-Puertas P, Ramos FJ, Pié J, Puisac B.

Things are not always what they seem: From Cornelia de Lange to KBG phenotype in a girl with genetic variants in NIPBL and ANKRD11. *Mol Genet Genomic Med.* 2021 Nov;9(11):e1826. doi: 10.1002/mgg3.1826. Epub 2021 Oct 7. PMID: 34617417; PMCID: PMC8606202.

10. Parenti I, Diab F, Gil SR, Mulugeta E, Casa V, Berutti R, Brouwer RWW, Dupé V, Eckhold J, Graf E, Puisac B, Ramos F, Schwarzmayer T, Gines MM, van Staveren T, van IJcken WFJ, Strom TM, Pié J, Watrin E, Kaiser FJ, Wendt KS. MAU2 and NIPBL Variants Impair the Heterodimerization of the Cohesin Loader Subunits and Cause Cornelia de Lange Syndrome. *Cell Rep.* 2020 May 19;31(7):107647. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107647. PMID: 32433956.
11. Huisman S, Mulder PA, Redeker E, Bader I, Bisgaard AM, Brooks A, Cereda A, Cinca C, Clark D, Cormier-Daire V, Deardorff MA, Diderich K, Elting M, van Essen A, FitzPatrick D, Gervasini C, Gillessen-Kaesbach G, Girisha KM, Hilhorst-Hofstee Y, Hopman S, Horn D, Isrie M, Jansen S, Jespersgaard C, Kaiser FJ, Kaur M, Kleefstra T, Krantz ID, Lakeman P, Landlust A, Lessel D, Michot C, Moss J, Noon SE, Oliver C, Parenti I, Pie J, Ramos FJ, Rieubland C, Russo S, Selicorni A, Tümer Z, Vorstenbosch R, Wenger TL, van Balkom I, Piening S, Wierzba J, Hennekam RC. Fenotipos y genotipos en individuos con variantes de SMC1A. *Am J Med Genet A.* 2017 agosto; 173 (8): 2108-2125. doi: 10.1002/ajmg.a.38279. Epub 2017 26 de mayo. PMID: 28548707.
12. Biesecker LG, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat Rev Genet.* 2013 May;14(5):307-20. doi: 10.1038/nrg3424. PMID: 23594909.
13. Wright CF, Prigmore E, Rajan D, Handsaker J, McRae J, Kaplanis J, Fitzgerald TW, FitzPatrick DR, Firth HV, Hurles ME. Clinically-relevant postzygotic mosaicism in parents and children with developmental disorders in trio exome sequencing data. *Nat Commun.* 2019 Jul 5;10(1):2985. doi: 10.1038/s41467-019-11059-2. PMID: 31278258; PMCID: PMC6611863.
14. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, Waterston RH. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature.* 2017 Oct 19;550(7676):345353. doi: 10.1038/nature24286. Epub 2017 Oct 11. Erratum in: *Nature.* 2019 Apr;568(7752):E11. PMID: 29019985.
15. 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 Jun;17(6):444-51. doi: 10.1038/gim.2014.122. Epub 2014 Sep 18. PMID: 25232854.
16. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016 May 17;17(6):333-51. doi: 10.1038/nrg.2016.49. PMID: 27184599.
17. Latorre-Pellicer A, Gil-Salvador M, Parenti I, Lucia-Campos C, Trujillano L, MarcosAlcalde I, Arnedo M, Ascaso Á, Ayerza-Casas A, Antoñanzas-Pérez R, Gervasini C, Piccione M, Mariani M, Weber A, Kanber D, Kuechler A, Munteanu M, Khuller K, Bueno-Lozano G, Puisac B, Gómez-Puertas P, Selicorni A, Kaiser FJ, Ramos FJ, Pié J. Clinical relevance of postzygotic mosaicism in Cornelia de Lange syndrome and purifying selection of NIPBL variants in blood. *Sci Rep.* 2021 Jul 29;11(1):15459. doi: 10.1038/s41598-021-94958-z. PMID: 34326454; PMCID: PMC8322329.
18. Huisman SA, Redeker EJ, Maas SM, Mannens MM, Hennekam RC. High rate of mosaicism in individuals with Cornelia de Lange syndrome. *J Med Genet.* 2013

- May;50(5):339-44. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101477. Epub 2013 Mar 15. PMID: 23505322.
19. Latorre-Pellicer A, Ascaso Á, Trujillano L, Gil-Salvador M, Arnedo M, Lucia-Campos C, Antoñanzas-Pérez R, Marcos-Alcalde I, Parenti I, Bueno-Lozano G, Musio A, Puisac B, Kaiser FJ, Ramos FJ, Gómez-Puertas P, Pié J. Evaluating Face2Gene as a Tool to Identify Cornelia de Lange Syndrome by Facial Phenotypes. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 4;21(3):1042. doi: 10.3390/ijms21031042. PMID: 32033219; PMCID: PMC7038094.
 20. Gurovich Y, Hanani Y, Bar O, Nadav G, Fleischer N, Gelbman D, Basel-Salmon L, Krawitz PM, Kamphausen SB, Zenker M, Bird LM, Gripp KW. Identifying facial phenotypes of genetic disorders using deep learning. *Nat Med.* 2019 Jan;25(1):60-64. doi: 10.1038/s41591-018-0279-0. Epub 2019 Jan 7. PMID: 30617323.
 21. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, Maglott DR. ClinVar: archivo público de relaciones entre variación de secuencia y fenotipo humano. *Ácidos Nucleicos Res.* 42 de enero de 2014 (edición de la base de datos): D980-5. doi: 10.1093/nar/gkt1113. Epub 2013 14 de noviembre. PMID: 24234437; IDPM: PMC3965032.
 22. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: la próxima generación en bases de datos de variantes genéticas. *Hum Mutat.* 2011 mayo;32(5):557-63. doi: 10.1002/humu.21438. Epub 2011 22 de febrero. PMID: 21520333.
 23. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. Un método y un servidor para predecir mutaciones sin sentido dañinas. *Métodos Nat.* 2010 abril; 7 (4): 248-9. doi: 10.1038/nmeth0410-248. PMID: 20354512; IDPM: PMC2855889.
 24. Slavin TP, Lazebnik N, Clark DM, Vengoechea J, Cohen L, Kaur M, Konczal L, Crowe CA, Corteville JE, Nowaczyk MJ, Byrne JL, Jackson LG, Krantz ID. Germline mosaicism in Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet A.* 2012 Jun;158A(6):1481-5. doi: 10.1002/ajmg.a.35381. Epub 2012 May 11. PMID: 22581668; PMCID: PMC3356507.
 25. Mariani M, Bettini LR, Cereda A, Maitz S, Gervasini C, Russo S, Masciadri M, Biondi A, Larizza L, Selicorni A. Germline mosaicism in Cornelia de Lange syndrome: dilemmas and risk figures. *Am J Med Genet A.* 2013 Jul;161A(7):1825-6. doi: 10.1002/ajmg.a.35988. Epub 2013 May 21. PMID: 23696053.
 26. Deardorff MA, Kaur M, Yaeger D, Rampuria A, Korolev S, Pie J, Gil-Rodríguez C, Arnedo M, Loeys B, Kline AD, Wilson M, Lillquist K, Siu V, Ramos FJ, Musio A, Jackson LS, Dorsett D, Krantz ID. Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2007 Mar;80(3):485-94. doi: 10.1086/511888. Epub 2007 Jan 17. PMID: 17273969; PMCID: PMC1821101.
 27. Miller AP, Gustashaw K, Wolff DJ, Rider SH, Monaco AP, Eble B, Schlessinger D, Gorski JL, van Ommen GJ, Weissenbach J, et al. Three genes that escape X chromosome inactivation are clustered within a 6 Mb YAC contig and STS map in Xp11.21-p11.22. *Hum Mol Genet.* 1995 Apr;4(4):731-9. doi: 10.1093/hmg/4.4.731. PMID: 7633424.