

# EL CEREBRO CLÍNICO DEL SÍNDROME COFFIN-SIRIS: ESTUDIO INTEGRAL DE UN TRASTORNO DEL NEURODESARROLLO

## INVESTIGADORES

Dr. Francesc Palau

Dra. Janet Hoenicka

Dr. Jordi Pijuan

Equipo IPER (Dr. Dídac Casas, Dr. Antonio Martínez, Dra. Leticia Pías, Mercè Bolasell)

EQUIPO DEL INSTITUTO PEDIÁTRICO DE ENFERMEDADES RARAS - IPER  
INSTITUT DE RECERCA SANT JOAN DE DÉU (IRSJD)  
**HOSPITAL SANT JOAN DE DÉU**

Barcelona, 18 de diciembre de 2020

## RESUMEN

La discapacidad intelectual es una condición relativamente común donde sin embargo, es necesario investigar acerca del proceso patológico lo que permitirá mejorar el diagnóstico etiológico y el desarrollo de nuevos tratamientos.

En este proyecto proponemos que el mapa conjunto del efecto de genes mutantes y de su relación con la estructura cerebral permite la comprensión fisiopatológica de los trastornos del neurodesarrollo (TND), lo que hemos denominado 'Cerebro Clínico'. De forma específica estudiaremos el cerebro clínico del síndrome de Coffin-Siris (CSS). CSS es un trastorno sistémico del desarrollo que se caracteriza por una diversidad semiológica con discapacidad intelectual y dificultad en el desarrollo del habla. CSS se debe a mutaciones en un conjunto de genes que codifican proteínas del complejo mSWI/SNF que regula el remodelado de la cromatina afectando el funcionamiento de muchos genes. El estudio del cerebro clínico en CSS nos ha de permitir no solo conocer los mecanismos patogénicos de las mutaciones sobre el remodelado de la cromatina y la regulación de la expresión génica, sino también abrir una vía exploratoria del desarrollo cerebral para establecer relaciones fisiopatológicas entre las redes neuronales. Los objetivos son: (i) análisis fenotípico de las características clínicas e historia natural de los pacientes y mapa del conectoma cerebral (HSJD); (ii) estudio experimental de las mutaciones clínicas de los genes mSWI/SNF en modelos celulares (fibroblastos de los pacientes y las neuronas inducidas (iNs) reprogramadas) (IRSJD y Universidad de Wisconsin) y (iii) cribado de fármacos y compuestos en modelos celulares y en el modelo *C. elegans* en colaboración con el Dr. Cerón del Institut d'Investigació de Bellvitge (IDIBELL).

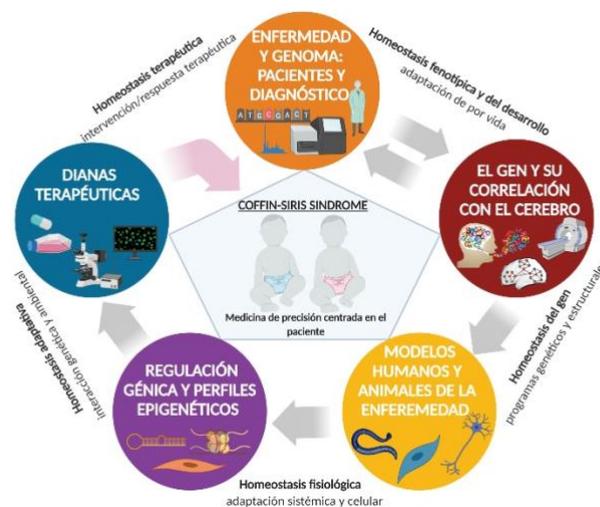


Figura 1. Representación esquemática de los ejes principales del proyecto.

## ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

**EL SÍNDROME DE COFFIN SIRIS (CSS), ASPECTOS CLÍNICOS Y MOLECULARES:** El síndrome de Coffin-Siris (CSS)<sup>1</sup> (MIM #135900 para CSS1, y otros) es un trastorno sistémico del desarrollo se caracteriza clásicamente por discapacidad intelectual (DI) y en el que más del 60% de los pacientes presentan mutaciones en los genes que codifican proteínas del complejo de remodelación de cromatina *Mammalian switch/sucrose non-fermentable* (mSWI/SNF)<sup>2,3</sup>. La discapacidad intelectual está presente en la mayoría y es generalmente de moderada a severa (rango de coeficiente intelectual: 40 a 69); aunque, se ha reportado un coeficiente intelectual tan alto como 97<sup>4</sup>. El lenguaje expresivo se ve más gravemente afectado que el lenguaje receptivo, y un subconjunto significativo de pacientes CSS no hablan. Las anomalías conductuales incluyen hiperactividad (~10%), agresividad (~10%) y, en ocasiones, características autistas<sup>1</sup>.

La herencia de CSS es autosómica dominante, aunque en la mayoría de los casos no hay antecedentes familiares, debido a que la variante patogénica se ha producido por mutación *de novo* espontánea. La posibilidad de que en una familia sin antecedentes haya más de un hijo enfermo se debería a la presencia de mosaicismo germinal en uno de los progenitores. Los genes principales causantes de CSS son *ARID1A*, *ARID1B*, *SMARCA4*, *SMARCB1*, *SMARCE1* y *SOX11*<sup>1,5</sup>, y codifican proteínas del complejo mSWI/SNF (también denominado BAF) que es una de las cuatro familias principales del remodelado de cromatina dependiente de ATP, y que regula la accesibilidad del DNA al nucleosoma y movilizándolo<sup>2,3</sup> (en OMIM se relacionan hasta 10 genes CSS). Este mecanismo permite establecer una estructura abierta de la cromatina, incrementando la accesibilidad al DNA y, por ende, su transcripción, replicación y reparación. Alguno de los miembros del complejo mSWI/SNF está mutado en otros cuadros clínicos como son el síndrome de Nicolaidis-Baraitser o formas de discapacidad intelectual (DI) más leves. Se ha sugerido nombrar este conjunto de síndromes y fenotipos como SSRIDDs (*mSWI/SNF-related intellectual disability disorders*)<sup>5</sup>, extendiendo a 9 el número de mSWI/SNF genes que condicionan síndromes del desarrollo. Son trastornos que entroncan con el papel de la epigenética en la enfermedad humana<sup>6</sup>.

**EL INSTITUTO PEDIÁTRICO DE ENFERMEDADES RARAS (IPER) Y EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LOS TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO (TND):** En el IPER del HSJD<sup>7</sup> se aborda el manejo médico integral y multidisciplinar de niños y niñas afectados por algún trastorno minoritario. Esta aproximación clínica se lleva a cabo en interacción directa y cotidiana con el Servicio de Medicina Genética y Molecular (SMGM), las consultas de genética clínica y asesoramiento genético, y los laboratorios de genética y genómica que dependen de dicho servicio<sup>8</sup>. Una de las áreas que ha merecido nuestra atención desde el inicio del IPER a mediados de 2015 ha sido la de niños aquejados por trastornos del desarrollo (TND) y defectos congénitos con expresión clínica multisistémica, muchos de ellos con afectación intelectual y cognitiva. Para ello, el IPER ha puesto en marcha un Programa de Planes Funcionales a través de los cuales estos pacientes y sus padres reciben atención personalizada y en grupo por varios médicos y profesionales del HSJD, en la que en una misma jornada se revisan los problemas médicos de un modo multidisciplinar y se pone en contacto a las diferentes familias.

La adquisición de las funciones del neurodesarrollo y de las funciones ejecutivas son fundamentales para el desarrollo, crecimiento y adaptación global del niño en el conjunto de las

fases tempranas del ciclo vital humano, desde la vida fetal y neonatal a la adolescencia. Las disfunciones del neurodesarrollo y/o ejecutivas reflejan cualquier interrupción o debilidad en estos procesos, que pueden resultar del mal funcionamiento neuroanatómico o psicofisiológico. Sin embargo, solo 3-4 de cada 10 niños con retraso global del desarrollo, discapacidad intelectual y trastornos neuroconductuales tienen diagnóstico etiológico. Por ello, el IPER ha implementado el Programa de Diagnóstico Traslacional (PDT)<sup>9</sup> basado en el circuito 'fenotipado–genómica clínica–genómica funcional–validación clínica'. El PDT integra parte de la actividad del Grupo de Neurogenética y Medicina Molecular<sup>10</sup> del IRSJD en el contexto asistencial-científico del campus SJD (HSJD – IRSJD), con la finalidad de abordar los problemas de salud de los niños con enfermedades neurogenéticas. En el laboratorio del IPER/Neurogenética se realiza el estudio y validación funcional de los hallazgos genéticos de los pacientes para la mejora del diagnóstico, la definición de biomarcadores y la determinación de dianas moleculares de interés terapéutico.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS

El estudio de las enfermedades que afectan el desarrollo del cerebro permite abordar desde la patología y clínica humanas el conocimiento científico de las funciones del neurodesarrollo. El mapa conjunto del efecto de genes mutantes y su relación con la estructura cerebral abre una oportunidad de estudio y de definición fisiopatológica que hemos denominado '**Cerebro Clínico**'. Esta propuesta sobre los TND requiere la actuación conjunta desde aproximaciones que ofrecen un paisaje abierto y complejo que se compone de **fenotipos clínicos** de **genotipos** de genes específicos y de **respuestas celulares fisiopatológicas**. El estudio del cerebro clínico de TND con causas genéticas conocidas como el CSS nos ha de permitir no solo conocer los mecanismos patogénicos de las mutaciones sobre el remodelado de la cromatina y regulación de la expresión génica, sino también abrir una vía exploratoria del desarrollo cerebral para establecer **relaciones fisiopatológicas entre las redes/circuitos neuronales** (conectoma) y CSS. Este conocimiento ha de dirigir una **línea de investigación terapéutica** con definición de biomarcadores y modelos de análisis preclínico en los que ensayar nuevos fármacos y, a la vez, **conocer el desarrollo del cerebro** en base a la expresión fenotípica, la neuroimagen, los genes y las redes genéticas (**Figura 1**).

### OBJETIVOS

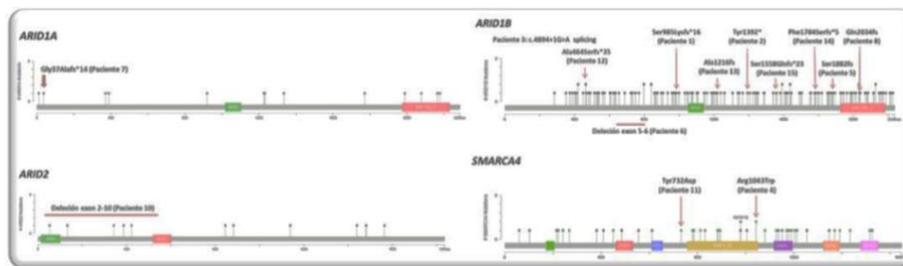
1. Fenotipado clínico de precisión en pacientes CSS
2. Determinar el impacto de las mutaciones clínicas de los pacientes CSS en fibroblastos, Neuronas inducidas (iNs) y *Caenorhabditis elegans* como modelos de enfermedad
3. Detección de fármacos y objetivos terapéuticos en modelos de CSS

## RESULTADOS PRELIMINARES

**ESTUDIOS *IN SILICO*:** La **Tabla 1** muestra el diagnóstico genético de los pacientes con el síndrome de Coffin-Siris que actualmente visitamos en el IPER y para los que hay un Plan Funcional definido. En la **Figura 2** se indica el espectro mutacional para cada gen.

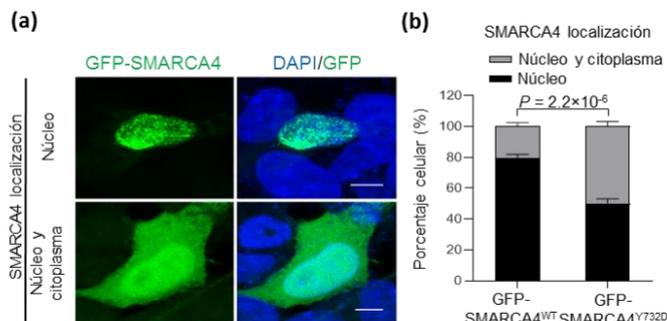
CASO	POSICIÓN	CAMBIO (DNA Y PROTEÍNA)	HGMD*	VAR SOME	M.TASTER <sup>a</sup>	CADD <sup>b</sup>
<b>SMARCA4 [MIM *603254] ; NM_001128849.1</b>						
1	chr19: 11136143	c.3127C>T, p.(Arg1043Trp)	Si	VUS	0.9997 (P)	24.6
2	chr19: 11121127	c.2194T>G, p.(Tyr732Asp)	NR	PP	1 (P)	28.4
<b>ARID1A [MIM *603024] ; NM_006015.4</b>						
3	chr1: 27022999	c.110del, p.(Gly37Alafs*14)	NR	PP	1 (P)	-
<b>ARID1B [MIM *614556] ; NM_001346713.1, NM_020732.3</b>						
4	chr6: 157488287	c.2954_2976del, p.(Ser985Lysfs*16)	NR	PP	-	-
5	chr6: 157521904	c.4176C>A, p.(Tyr1392*)	NR	P	1 (P)	-
6	chr6: 157522623	c.4894+1G>A, Effect: splicing	NR	P	1 (P)	-
7	chr6: 157527916	c.5645_5646delCT, p.(Ser1882fs)	NR	P	1 (P)	-
8	chr6: 157256590-157406049	149460 bp, deletion exons 5 and 6	NR	-	-	-
9	chr6: 157528371	c.6096delC, p.(Gln2034fs)	Si	PP	1 (P)	-
10	chr6: 157100445	c.1382_1391del, p.(Ala464Serfs*35)	NR	VUS	-	-
11	chr6: 157510871	c.3645dupA, p.(Ala1216fs)	NR	P	-	-
12	chr6: 157527626	c.5351_5354del, p.(Phe1784Serfs*5)	NR	P	-	-
13	chr6: 157522387	c.4658_4659insGCCCA, p.(Ser1558Glnfs*23)	NR	PP	-	-
<b>ARID2 [MIM *609539] , NM_152641.3</b>						
14	chr12: 46123610	110 kb deletion exons 2-10	NR	-	-	-

**Tabla 1.** Listado de las variantes genéticas en los pacientes con Coffin-Siris. Abreviaturas: HGMD (Human Gene Mutation Database), NR (No Reportado), P (Patogénico), PP (Probablemente Patogénico), VUS (variante de significado incierto). <sup>a</sup>Mutation Taster – rango de menor a mayor patogénico de 0 a 1. <sup>b</sup>CADD (Combined Annotation Dependent Depletion) Valores  $\geq 20$  son patogénicos.



**Figura 2.** Mapa mutacional de las variantes patogénicas de los pacientes del IPER en las proteínas ARID1A, ARID1B, ARID2, SMARCA4.

**ESTUDIOS *IN VITRO*:** el estudio de la patogénico de las variantes de significado clínico incierto (VUS) lo abordamos mediante clonaje del cDNA silvestre y mutagénesis para introducir la VUS o mediante el estudio directo de los fibroblastos de los pacientes. En la **Figura 3** se muestran los hallazgos que demuestran que la variante VUS p.Tyr732Asp del gen SMARCA4 de CSS4 afecta la localización subcelular.



hallazgos que demuestran que la variante VUS p.Tyr732Asp del gen SMARCA4 de CSS4 afecta la localización subcelular.

**Figura 3.** Validación funcional de la variante VUS p.Tyr732Asp en la proteína SMARCA4. (a) Localización subcelular de GFP-SMARCA4 diferenciando los dos patrones de expresión (b) Porcentaje de los patrones

nucleares y núcleo y citoplasma en SMARCA4<sup>WT</sup> vs SMARCA4<sup>Y732D</sup>; n=5 experimentos independientes. Mann-Whitney test. Escala 5  $\mu$ m.

## **METODOLOGÍA**

Los sujetos de estudio son pacientes con diagnóstico CSS controlados y atendidos en el IPER. También se considera futuros pacientes y colaboración con grupos clínicos de otros hospitales. El proyecto incluye 3 bloques:

### **BLOQUE 1: FENOTIPADO CLÍNICO DE PRECISIÓN EN PACIENTES CSS.**

- i) **Clínica CSS específica**, monitorización continuada de la historia natural, definición de términos de HPO de síntomas y signos, diagnóstico genético.
- ii) **Caracterización del conectoma del cerebro mediante RMN** y correlación del gen/mutación/arquitectura cerebral: segmentación de las imágenes adquiridas con RMN de T3 ponderadas en T2, de la sustancia blanca, la sustancia gris cortical, el líquido cefalorraquídeo en el espacio extraaxial (LCR) y el volumen de estructuras como núcleos grises centrales y cerebelo. En base a estas segmentaciones, descriptores corticales para todo el cerebro, así como para los lóbulos frontal, temporal, parietal y occipital, y cerebelo por separado.
- iii) **Estudio estructural del cerebro con RMN**, mediante la secuencia de difusión (DWI) particularmente con la imagen del tensor de difusión (DTI) con distribución y orientación de los tractos de fibras y su integridad. Mediante tractografía determinista manual se diseccionarán los tractos de interés, lo que permitirá dibujar ROI específicos adaptados a cada niño, así se tendrá en cuenta la neuroanatomía de cada paciente. Se intentará mapear la anatomía de conexión incluidas las correlaciones espaciales entre vías y particularmente el 'dorsal stream and ventral stream' del lenguaje.
- iv) **Tarea de lenguaje con RMN funcional (fMRI)**. Se reconstruirá el *resting state* estándar de las redes de fMRI Datos de estado de reposo preprocesado de todos los pacientes que se procesarán utilizando el Group ICA de fMRI Toolbox (GIFT v4.0b; <http://mialab.mrn.org/software/gift/>). Los datos se concatenarán y reducirán a 10 componentes independientes utilizando un análisis de componentes principales de dos pasos y el algoritmo Infomax. Todos los datos serán comparados con datos normativos adecuados a la edad de los pacientes y disponibles en repositorio *NIH Pediatric MRI Data Repository*.

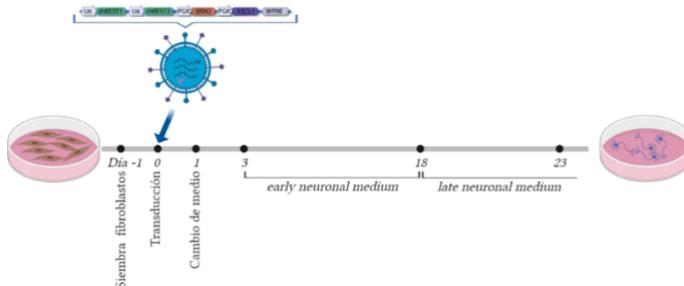
### **BLOQUE 2: ESTUDIO BIOQUÍMICO DEL IMPACTO DE LAS MUTACIONES CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CSS EN MODELOS DE ENFERMEDAD Y DEFINICIÓN DE FIRMAS MOLECULARES.**

**Análisis bioinformáticos de variantes genéticas clínicas CSS:** utilizaremos diferentes bases de datos y programas para clasificar las variantes CSS de acuerdo a su frecuencia [ejemplo (ej) *Genome Aggregation Database* (GnomAD)], patogenicidad [ej. *Mutation Database* (HGMD), *Varsome*], efecto de la variante sobre la función de la proteína mutada [ej. *Polymorphism Phenotyping version 2* (PolyPhen-2)] y efecto de la variante sobre la estructura de la proteína mutada [ej. I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement)]

### **Generación de fibroblastos y de Neuronas inducidas (iNs) de pacientes CSS**

**OBTENCIÓN Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES:** se obtendrán de una biopsia de piel en el SMGM, se almacenarán en el Biobanco HSJD, se cultivarán (medio DMEM suplementado con 10% de FBS, 1% de L-Glutamina, 1% de combinación de antibiótico penicilina/estreptomina) y se incubarán en el laboratorio de investigación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El mantenimiento y la siembra de fibroblastos se realizarán siguiendo los protocolos internos del laboratorio.

REPROGRAMACIÓN DIRECTA DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES A NEURONAS FUNCIONALES: La reprogramación directa de fibroblastos ofrece un enfoque único para generar linajes neuronales maduros para su estudio. Este protocolo se basa en la tranfección con un lentivirus de los fibroblastos lo que nos permitirá obtener “induced-Neurons” (iNs) reprogramadas en un plazo aproximado de 25 días<sup>12</sup>.



**Figura 3:** Diagrama temporal de la reprogramación de fibroblastos de pacientes a iNs.

### Estudios morfológicos y Funcionales en fibroblastos e iNs de pacientes y controles:

-TINCIONES ESPECÍFICAS: para medir niveles de proteína nuclear silvestre vs mutación clínica CSS utilizaremos anticuerpos específicos y sondas de inmunofluorescencia. Se utilizará un procedimiento estándar para la incubación, fijación, tinción y preparación de muestras para la microscopía confocal. Se cuantificará y comparará niveles de expresión y localización subcelular.

-ADQUISICIÓN DE IMÁGENES Y ANÁLISIS DE IMÁGENES COMPUTACIONALES: Se obtendrán imágenes de súper resolución utilizando el software Leica LAS X (versión 3.1.5) con objetivo 100x (Plan HCX APO CS, 1.4 NA). La deconvolución de la imagen se realizará con el software Huygens Essential v4.4 (SVI, Leiden, Holanda). Se desarrollará un sistema de análisis de imagen personalizado para la segmentación y caracterización. La implementación utilizará el software computacional MATLAB R\_2018a (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

-ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL COMPLEJO mSWI/SNF: Para estudios de expresión de proteínas, se obtendrán extractos proteicos nucleares con el kit de extracción nuclear y citoplasmática NE-PER (Thermo Scientific) y se determinará niveles de expresión mediante Western blot e interacciones en el complejo mediante Co-inmunoprecipitación.

-ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE IN SITU PROXIMITY LIGATION ASSAY (PLA): se estudiará la incorporación a los complejos mSWI/SNF de la proteína silvestre vs mutación clínica CSS mediante el estudio de interacción con el kit de ensayo de PLA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Duolink® In Situ Detection Red Starter Kit (Mouse/Rabbit), Sigma-Aldrich). Las muestras se visualizarán con el microscopio confocal y el número de interacciones será cuantificado mediante el software ImageJ.

-ESTUDIOS DE CICLO CELULAR Y DE LA VÍA DE WNT CANÓNICA: se estudiará y comparará el efecto sobre las fases del ciclo celular por citometría de flujo, y sobre la vía de Wnt canónica por análisis de interacción y moléculas marcadoras, por su implicación directa en la regulación de los complejos mSWI/SNF.

-ANÁLISIS ESTADÍSTICOS: Se realizarán al menos 5 experimentos independientes y los resultados se expresarán como media  $\pm$  desviación estándar. En cada caso, se realizará una prueba de normalidad estadística (prueba de Kolmogorov-Smirnov) seguida de la prueba paramétrica o no paramétrica correspondiente utilizando el software RStudio (versión 1.1.447, RStudio, Inc.)

### BLOQUE 3: DETECCIÓN DE FÁRMACOS Y OBJETIVOS TERAPÉUTICOS EN MODELOS DE CSS

- CRIBADOS GENÉTICOS Y DE FÁRMACOS EN AVATARS DE *C. ELEGANS*: En colaboración con el Dr. Cerón.
- VALIDACIÓN DE FÁRMACOS EN FIBROBLASTOS E IN DE CSS: seleccionaremos fenotipos celulares de los fibroblastos e iNs de pacientes de CSS que faciliten el cribado de los fármacos candidatos. Mediremos el rescate del fenotipo silvestre para cada fármaco para identificar los compuestos o combinaciones de compuestos que pudieran tener potencial terapéutico.

## RESULTADOS ESPERADOS DEL PROYECTO

El proyecto desarrolla un programa innovador de análisis de las funciones del neurodesarrollo en relación con los defectos genéticos en niños con enfermedades del neurodesarrollo, que se concreta en el CSS en el marco del Programa de Diagnóstico Traslacional (PDT) del Instituto Pediátrico de Enfermedades Raras (IPER). El proyecto representa un **avance conceptual e innovador en la adquisición de conocimiento del desarrollo cerebral** desde el estudio y la investigación en niños afectados por estos trastornos del neurodesarrollo. En el caso del CSS con un interés claro en el desarrollo de diversas funciones cognitivas y ejecutivas, como es el desarrollo del habla. El proyecto 'Cerebro Clínico' pone en el foco científico y clínico en la conjunción del mapa estructural y genético del cerebro en desarrollo.

La incorporación de los estudios genómicos, especialmente el análisis de paneles génicos y de exomas clínicos dirigidos, está siendo una realidad y progresivamente se va implementando el análisis del genoma en la práctica de la medicina clínica. Es la base de la medicina de precisión y del manejo personalizado de la información biológica de cada individuo, no sólo para enfermedades comunes sino también para las enfermedades raras. Sin embargo, esta es una información que no nos dice todo acerca de la penetrancia génica y de la expresión fenotípica. La complejidad de la fisiopatología de las enfermedades, incluidas las enfermedades raras monogénicas, requiere aproximaciones multidisciplinares. Estas han de tener un fundamento científico y experimental. Este es el sentido, la orientación y la innovación del proyecto, con el que se pretende acercar el conocimiento genómico y genético generado cotidianamente en las actividades clínicas y de laboratorio del IPER/Medicina Genética con la **investigación del efecto de las mutaciones en los procesos celulares neuronales y generar modelos celulares y en *C. elegans* para investigar el efecto de fármacos sobre estos procesos alterados**. La aproximación englobada bajo el concepto de Cerebro Clínico aúna dos grupos de investigación del IRSJD centrado en la neurogenética y el cerebro neonatal, ambos partícipes de la atención médica en el marco del IPER. El proyecto también permite la colaboración con otros grupos de investigación en el campo de la modelización de enfermedades y de la neuroimagen y análisis de mapas de funciones cerebrales.

El Fin Último es generar desde aproximaciones científicas soluciones a los problemas médicos de estos pacientes y de sus familias que abarquen el diagnóstico etiológico y nuevas aproximaciones terapéuticas. También en la divulgación social, especialmente entre los pacientes con CSS y otros trastornos del desarrollo y las asociaciones de pacientes que los representan. Se pretende trabajar junto con los niños y sus padres como piedra angular de una medicina y una ciencia centrada en el paciente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Schrier Vergano S et al. Coffin-Siris syndrome. 2013 Apr 4 [updated 2018 Feb 8]. In: Adam MP et al. eds. *GeneReviews*. University of Washington; 1993-2019
2. Gabriele M et al. The chromatin basis of neurodevelopmental disorders: rethinking dysfunction along molecular and temporal axes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2018; 84: 306-327
3. Mathur R, Roberts CWM. SWI/SNF (BAF) complexes: guardians of the epigenome. *Annu Rev Cancer Biol* 2018; 2: 413-427
4. Santen GW, Clayton-Smith J, Consortium ABC. The ARID1B phenotype: what we have learned so far. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2014; 166C: 276-289
5. Bögershausen N, Wollnik B. Mutational landscape and phenotypic spectrum of SWI/SNF-related intellectual disability disorders. *Front Mol Neurosci* 2018; 11:252
6. Zoghbi HY, Beaudet AL. Epigenetics and human disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016; 8: a019497
7. IPER, <https://www.sjdhospitalbarcelona.org/es/ninos/enfermedades-raras>
8. Servei de Medicina Genètica, <https://www.sjdhospitalbarcelona.org/es/ninos/genetica>
9. Pijuan J et al. Translational Diagnostics: An In-House Pipeline to Validate Genetic Variants in Children with Undiagnosed and Rare Diseases. *Journal of Molecular Diagnostics* 2020
10. Grupo de Neurogenética y Medicina Molecular, IRSJD, [http://www.fsjd.org/grupos-de-investigacion\\_117198/117437](http://www.fsjd.org/grupos-de-investigacion_117198/117437)
11. Palau F. Pediatric Genomics and Precision Medicine in Childhood. In: *Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers*, Faintuch J and Faintuch S eds., Elsevier, pp. 143-152, 2020.
12. Shrigley S. Simple Generation of a High Yield Culture of Induced Neurons from Human Adult Skin Fibroblasts. *Jove* 2018