

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat Autònoma de Barcelona

**ENFERMEDADES GENÉTICAS CAUSANTES DE
TRASTORNOS DEL MOVIMIENTO EN LA EDAD
PEDIÁTRICA**

Memoria de Tesis Doctoral Presentada por:

Marta Correa Vela, MD

Para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona

Directora de Tesis:

Dra. Belén Pérez-Dueñas MD, PhD.

Tutor de Tesis:

Dr. Antonio Moreno Galdó MD, PhD.

Programa de Doctorado en Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología y de Medicina Preventiva

Universitat Autònoma de Barcelona

2023

RESOLUCIÓ DE LA SOL·LICITUD DE PRESENTACIÓ DE TESI COM A COMPENDI DE PUBLICACIONS

Doctorat en Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia

RESOLUCIÓ

La Comissió Acadèmica del Programa de Doctorat en Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia, vista la instància presentada per **Marta Correa Vela** de sol·licitud de presentació de tesi doctoral com a compendi de publicacions:

De conformitat amb el que disposa la Normativa acadèmica de la UAB aplicable als estudis universitaris regulats de conformitat amb el RD 1393/2007, de 29 d'octubre, modificat pel RD 861/2010, de 2 de juliol (text refós aprovat per l'Acord de Consell de Govern de 2 de març de 2011),

RESOLC

Acceptar la presentació de la tesi doctoral de **Marta Correa Vela** com a compendi de publicacions amb els articles següents:

- 1) Correa-Vela, Carvalho J, Ferrero-Turrion J, Cazorro-Gutiérrez A, Vanegas M, Gonzalez V, Álvarez R, Marcé-Grau A, Moreno A, Macaya-Ruiz A, Pérez-Dueñas B. Early recognition of SGCE-myoclonus-dystonia in children. Dev Med Child Neurol. 2023 Feb;65(2):207-214. doi: 10.1111/dmcn.15298. Epub 2022 Jun 20. PMID: 3523607
- 2) Correa-Vela M, Lupo V, Montpeyó M, Sancho P, Marcé-Grau A, Hernández-Vara J, Darling A, Jenkins A, Fernández-Rodríguez S, Tello C, Ramírez-Jiménez L, Pérez B, Sánchez-Montañez Á, Macaya A, Sobrido MJ, Martínez-Vicente M, Pérez-Dueñas B, Espinós C. Impaired proteasome activity and neurodegeneration with brain iron accumulation in FBX_{O7} defect. Ann Clin Transl Neurol. 2020 Aug;7(8):1436-1442. doi: 10.1002/acn3.51095. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32767480; PMCID: PMC7448169

La comissió acadèmica del programa de doctorat en Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia, del Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i de Medicina Preventiva i Salut Pública

CARLOS RODRIGO
GONZALO DE LIRIA /
num:08130723

Signat digitalment per CARLOS RODRIGO GONZALO
DE LIRIA / num:08130723
DN: c=ES, st=BARCELONA, o=Col·legi Oficial de
Metges de Barcelona / COMB / 0005, ou=COL·LEGIAT,
title=PEDIATRIA I AREES ESP., sn=RODRIGO GONZALO
DE LIRIA, givenName=CARLOS,
serialNumber=37267381K, cn=CARLOS RODRIGO
GONZALO DE LIRIA / num:08130723,
email=130723rd@comb.cat
Data: 2023.02.21 12:53:10 +01'00'

Carlos Rodrigo Gonzalo de Liria
Coordinador/a del programa de doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 16 de febrer de 2.023

Contra aquesta resolució, que no esgota la via administrativa, les persones interessades poden interposar recurs d'alçada davant del Rector Magnífic de la UAB, en el termini d'un mes, a comptar des del dia següent a la recepció d'aquesta notificació o, si s'escau, des del dia següent de la seva publicació, de conformitat amb el que preveu l'article 115 de la Llei 30/1992, de 26 de novembre, de Règim Jurídic de les Administracions Públiques i del Procediment Administratiu Comú, modificada per la Llei 4/1999, de 13 de gener, i l'article 76 de la Llei 26/2010, de 3 d'agost, de Règim Jurídic i de Procediment de les Administracions Públiques de Catalunya de la Generalitat de Catalunya.

Lista de Publicaciones

Correa-Vela M, Carvalho J, Ferrero-Turrion J, Cazurro-Gutiérrez A, Vanegas M, González V, Álvarez R, Marcé-Grau A, Moreno A, Macaya-Ruiz A, Pérez-Dueñas B. Early recognition of SGCE-myoclonus-dystonia in children. *Dev Med Child Neurol.* 2023 Feb;65(2):207-214. doi: 10.1111/dmcn.15298. Epub 2022 Jun 20. PMID: 35723607.

Factor de Impacto: JIF 2021: 4.864

Quartil: Q1 Pediatrics (17/130); Q2 Clinical Neurology (61/212)

Correa-Vela M, Lupo V, Montpeyó M, Sancho P, Marcé-Grau A, Hernández-Vara J, Darling A, Jenkins A, Fernández-Rodríguez S, Tello C, Ramírez-Jiménez L, Pérez B, Sánchez-Montañez Á, Macaya A, Sobrido MJ, Martínez-Vicente M, Pérez-Dueñas B, Espinós C. Impaired proteasome activity and neurodegeneration with brain iron accumulation in FBXO7 defect. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020 Aug;7(8):1436-1442. doi: 10.1002/acn3.51095. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32767480; PMCID: PMC7448169.

Factor de Impacto: JIF (2021):5.430

Quartil: Q1 Clinical Neurology (47/212); Q2 Neuroscience (70/306)

En realidad, nosotros somos el conejo blanco que se saca del sombrero de copa. La diferencia entre nosotros y el conejo blanco es simplemente que el conejo no tiene sensación de participar en un juego de magia. Nosotros somos distintos. Pensamos que participamos en algo misterioso y nos gustaría desvelar ese misterio.

Jostein Gaarder

Agradecimientos

A mi padre, por enseñarme a mirar a mi alrededor, a hacerme preguntas y a tratar de comprender la realidad desde la ciencia y la cultura. Por no perder nunca la humanidad y el entusiasmo. Por ser espejo en el que mirarse.

A mi hermana, por enseñarme a estar en el otro lado, por confiar en la ciencia y en la medicina.

A Javi, compañero incansable y apoyo incondicional. A nuestros hijos, por las horas robadas, por ser fuente de vida y de alegría.

A mi madre, por esos cuidados invisibles tan necesarios para que otras rompamos techos de cristal.

A Belén, por haberme enseñado a trabajar desde el rigor científico, por el tiempo dedicado en esta tesis, por contagiar el amor a la neurociencia y por ser referente.

A Anna, a Heidy, a María y a todo el equipo del laboratorio de Neuropediatría del VHIR, por ser compañeras, por ser amigas, por compartir tanto trabajo, algún café y muchas risas en el lab 122.

A Alfons y a todo el equipo de Neuropediatría del Vall d'Hebron, por hacer clínica desde la ciencia e investigar desde una mirada clínica. Por el respeto y el cuidado a los pacientes. Por toda la ayuda que me han ofrecido durante la tesis.

A Rocío, a Mercedes, a Lucía, a Vicente, a Andrea y toda esa familia elegida que me han apoyado en los momentos malos, me han empujado en los buenos y me han acompañado en la aventura de Barcelona.

A Paco y Maribel, por el empujón final.

A Carmen Espinós y a Marta Martínez, por su disposición a colaborar y aportar su conocimiento de la ciencia básica en esta tesis.

A los pacientes, fin último de nuestro trabajo y de la investigación, por mantener la esperanza. A Aludme y las asociaciones de pacientes, que ayudan tanto a los pacientes y a los profesionales que los acompañamos.

Tabla de contenidos

Capítulo 1	Introducción general
Capítulo 2	Hipótesis y objetivos
Capítulo 3	Material y Métodos
Capítulo 4	Resultados: <i>Early recognition of SGCE-myoclonus-dystonia in children.</i>
Capítulo 5	Resultados: <i>Impaired proteasome activity and neurodegeneration with brain iron accumulation in FBXO7 defect.</i>
Capítulo 6	Discusión general
Capítulo 7	Limitaciones y futuras propuestas de investigación
Capítulo 8	Conclusiones
Capítulo 9	Bibliografía

Tablas y figuras

Figura 1. Estructuras anatómicas del circuito ganglio basal-tálamo-cortical.

Figura 2. Genes asociados a Parkinsonismo de inicio en pediatría.

Figura 3. Sistema Ubiquitina-Proteosoma.

Figura 4. Diagrama de flujo de la selección de pacientes pediátricos afectados por *SGCE*-MD y análisis de distonía tarea-específica

Figura 5. Mejoría de la escritura tras el uso del truco sensitivo (extraído de Correa-Vela et al., 2022 Figure 1 E y F).

Figura 6. Patrones distónicos de escritura (extraído de Correa-Vela et al., 2022 Figure 1A-D)

Figura 7. Patrones distónicos de la marcha (extraído de Correa-Vela et al., 2022 Figure 1G-I)

Figura 8. Estudio de neuroimagen del probando (RM) (extraído de Correa-Vela et al., 2020 Figure 1)

Figura 9. Pedigree y análisis de la mutación c.368C>G p.(Ser123*) *FBXO7* (extraído de Correa-Vela et al., 2020 Figure 2A)

Figura 10. Distribución según los dominios de la proteína *FBXO7* de las variantes patogénicas reportadas (extraído de Correa-Vela et al., 2020 Figure 2B)

Figura 11. Estudios de expresión de proteína *FBXO7* por western-blot; Cuantificación de mRNA con y sin emetina para evaluar ausencia de expresión de proteína y alteración secundaria al sistema *nonsense-mediated-decay* (NMD); Ensayo de la actividad del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS); Cuantificación de niveles de proteínas poliubiquitinizadas (extraído de Correa-Vela et al., 2020 Figure 2C-F)

Figura 12. proteínas relacionadas con la mitofagia y estudio de microscopía electrónica de las mitocondrias de la paciente. (extraído de Correa-Vela et al., 2020 Supplementary Figure 1)

Tabla 1. Clasificación de la distonía.

Tabla 2. Criterios diagnósticos de la distonía mioclónica (MD)

Tabla 3. Enfermedades que cursan con síndrome de parkinsonismo-piramidalismo (SPP) o fenotipo motor complejo y/o neuroimagen sugestiva de depósito de hierro en ganglios basales

Tabla 4. Escala modificada de la distonía de la escritura o *Writer's cramp Rating Scale + Shoulder (WCRS+S)* (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 Supplementary Table 1)

Tabla 5. Escala desarrollada para la evaluación de la distonía de la marcha o *Gait Dystonia Rating Scale (GDRS)* (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 Supplementary Table 2)

Tabla 6. Cuestionario para pacientes y evaluadores de discapacidad asociada a escritura y marcha (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 Supplementary Table 3)

Tabla 7. Frecuencia de la distonía durante la escritura y en otras acciones realizadas con el miembro superior (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 Table 1).

Tabla 8. Frecuencia de la distonía al caminar y durante la carrera. (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 Table 2).

Tabla 9. Puntuaciones medianas obtenidas en las escalas *Writer's cramp Rating Scale* (WCRS), WCRS+S, GDRS, en los cuestionarios de discapacidad asociada y análisis estadístico de correlación. (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 Table 1 y 2).

Tabla 10. Resumen del análisis estadístico descriptivo de aceptabilidad para las escalas propuestas (WCRS, WCRS+S, GDRS en marcha y carrera y escala de distonía Burke-Fahn-Marsden (BFMDRS))

Tabla 11. Resumen de las características clínicas reportadas en la literatura de los pacientes afectados por el defecto en FBXO7 (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2020 Supplementary Table S1).

Tabla 12. Tabla de anticuerpos utilizados en los estudios funcionales de FBXO7 (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 Supplementary material).

Tabla 13. Propuesta de criterios diagnósticos para pacientes pediátricos afectados por *SGCE-MD*.

Capítulo 1. Introducción general

El objetivo de esta introducción es aclarar conceptos básicos sobre los trastornos del movimiento de origen genético que se presentan en la infancia, especialmente de la distonía-mioclónica asociada al gen épsilon-sarcoglicano (*SGCE*) y del parkinsonismo y/o distonía-parkinsonismo con acumulación de hierro en ganglios basales (NBIA), a través de las últimas publicaciones e investigaciones en esta línea de investigación.

1. Trastornos del movimiento en la infancia

a. Definición y clasificación

Los trastornos del movimiento son un grupo de condiciones neurológicas debidas a una disfunción del circuito gangliobasal-tálamo-cortical que afectan al movimiento voluntario y/o la postura bien por exceso o defecto de movimiento pudiendo provocar un déficit motor o discapacidad (Singer et al., 2016).

En la infancia la mayoría de los trastornos del movimiento se manifiestan como un exceso de movimiento anormal, repetitivo e involuntario, también llamado movimientos hipercinéticos (distonía, mioclonías, corea, temblor, tics y estereotipias). Por el contrario, cuando existe una disminución del movimiento espontáneo encontramos los trastornos hipocinéticos o rígido-acinéticos, cuyo principal síndrome neurológico es el parkinsonismo y con una frecuencia mucho menor en niños. (Singer et al., 2016)

Existen varios sistemas de clasificación en función de la edad de inicio, la distribución corporal, el patrón temporal de presentación, la evolución, la localización anatómica o la causa subyacente. En función de la edad de inicio pueden debutar desde el periodo

neonatal a la adolescencia. Atendiendo a su forma de presentación, pueden aparecer de forma aguda, subaguda o crónica. En función de su evolución, en pediatría existen desde trastornos del movimiento benignos o transitorios, asociados a determinados momentos del neurodesarrollo, enfermedades con un carácter no progresivo o estático y otros de carácter progresivo asociado a condiciones neurodegenerativas que producen una morbimortalidad significativa (Kurian y Dale, 2016).

b. Etiología

Las causas implicadas en los trastornos del movimiento pediátrico son tanto adquiridas como genéticas. Dentro de las causas adquiridas se encuentran las lesiones hipóxico-isquémicas, infecciosas, postinfecciosas y/o autoinmunes, vasculares, tumorales, tóxicos e iatrogénicos. El reconocimiento de las enfermedades de origen genético que pueden causar trastorno del movimiento en niños ha aumentado de forma significativa en la última década, debido a los avances en las técnicas de diagnóstico molecular como el CGH-array o las técnicas de secuenciación masiva paralela (next generation sequencing o NGS) en las que se incluye el análisis del exoma y más recientemente de genoma (Kurian y Dale, 2016).

c. Mecanismos fisiopatológicos

En condiciones normales, el circuito gangliobasal-tálamo-cortical modula y ejecuta el movimiento iniciado por el córtex. El conocimiento de las estructuras anatómicas que forman este circuito y su sistema de neurotransmisores es fundamental para entender la fisiopatología de los trastornos del movimiento.

Los ganglios basales son un grupo de núcleos subcorticales implicados en el control motor y del comportamiento con una organización somatotópica y están formados por: el

estriado (núcleo caudado y putamen), el núcleo subtalámico (STN), el globo pálido que se divide en globo pálido externo (GPe) e interno (GPi) y la sustancia nigra pars compacta y pars reticulada. En general, el núcleo estriado y el subtálamo reciben estímulos del córtex mientras que, el globo pálido interno junto con la sustancia nigra pars reticulada proyectan la señal inhibitoria a las neuronas talamocorticales. Las proyecciones de la sustancia nigra pars reticulada al núcleo pedunculopontino, así como al colículo superior sugieren la implicación de este circuito también en los movimientos de los ojos, la cabeza y el cuello (Milardi et al., 2019). **(Figura 1)**

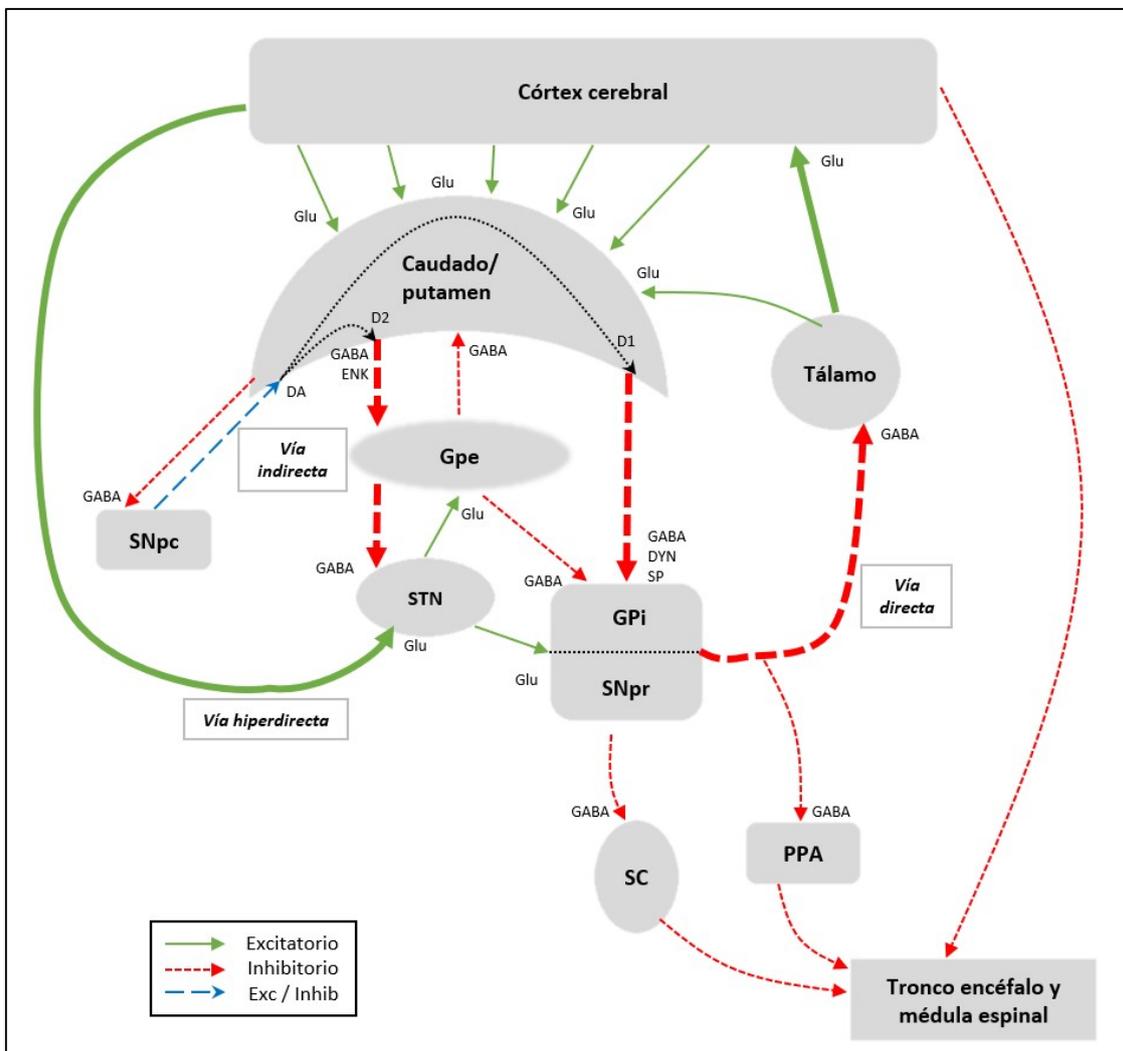


Figura 1. (Modificada de Singer, HS et al., 2016) Estructuras anatómicas del circuito gangliobasal-tálamo-cortical. Las sinapsis excitatorias están representadas en verde y

las inhibitorias en rojo. El circuito modulador dopaminérgico está representado en azul. Están representada las conexiones entre los núcleos que forman las vías directa, indirecta y la hiperdirecta. Abreviaturas: D1, Receptor dopaminérgico tipo 1; D2, Receptor dopaminérgico tipo 2; DA, Dopamina, GABA, ácido gamma aminobutírico; Glu, Glutamato; Gpe, Globo pálido parte externa; Gpi, Globo pálido parte interna; PPA área pedúnculopontina; SC colículo superior; SNpc, Sustancia nigra pars compacta; SNpr, Sustancia nigra pars reticulada; SP, sustancia P; STN, núcleo subtalámico.

La función de estas redes neuronales está modulada principalmente por tres neurotransmisores: dopamina (DA), glutamato (Glu) y ácido γ -aminobutírico (GABA).

El núcleo estriado recibe un estímulo excitatorio (Glu) de diferentes áreas del córtex que es modulado por la sinapsis dopaminérgica procedente de la Sustancia Nigra Pars compacta. La población neuronal en el estriado está formada en el 95% por las llamadas “Medium Spiny Neurons (MSN)” que, en función de los receptores, proyecciones, neurotransmisores que liberan se clasifican en dos grupos: receptor dopaminérgico tipo 1 (DRD1) y tipo 2 (DRD2). Los receptores DRD1 además de GABA, emite sustancia P en forma de proyección inhibitoria monosináptica hacia GPi y STN. Los receptores DRD2 emiten GABA y encefalina y con una sinapsis excitatoria de forma indirecta a través del GPe y STN al GPi (Chuhma et al., 2011).

De manera fisiológica, la activación de los receptores DRD1 estimula de manera directa la vía estriadopalidal y como resultado global produce una desinhibición de las neuronas talamocorticales, por tanto, facilitando el movimiento deseado. La activación de los receptores DRD2, producen una inhibición indirecta y por tanto llevan a una inhibición de las neuronas talamocorticales y supresión del movimiento (DeLong y Wichmann, 2007; Wichmann et al., 2018).

Una tercera vía, llamada la vía hiperdirecta, está formada por el núcleo subtalámico que recibe aferencias directamente del córtex cerebral, sin pasar antes por el estriado (Nambu et al., 2000) y parece facilitar la inhibición rápida de un movimiento ya iniciado (Chen et al., 2020).

Así, de forma esquemática, la hipofunción de la vía directa estriadopalidal, produciría un aumento de la señal inhibitoria que proyecta el GPi a las neuronas talamocorticales lo que se traduce en hipocinesia o parkinsonismo como ocurre en la enfermedad de Parkinson. Por el contrario, una disminución de la señal inhibitoria del GPi a la vía talamocortical produciría trastornos hiperkinéticos, como la distonía por hiperactivación de los receptores DRD1 o la corea/balismo por hipofunción de la vía indirecta o los receptores DRD2 (Abela y Kurian, 2018).

Estudios recientes de neuroimagen con secuencias de “*diffusion-weighted imaging*” (DWI) y tractografía apoyan la existencia de una vía corticopalidal, una vía corticonigral, así como una conexión directa entre ganglios basales y cerebelo. En el caso del cerebelo, además, diferentes estudios de trazado neuronal en animales han demostrado la comunicación entre el núcleo dentado, el tálamo y el estriado formando una red neuronal que estaría implicada en tareas motoras complejas (Milardi et al., 2019).

2. Distonía

a. Definición

La primera referencia al término “distonía” la encontramos en la descripción que realizó Oppenheim en 1911 de cuatro niños de diferentes familias con espasmos musculares que les causaban posturas anormales. Este neurólogo alemán, utilizó este término para describir el tono muscular que fluctuaba de la hipotonía al espasmo tónico provocado

principalmente por un movimiento voluntario en un músculo. Es debido a esta observación en la variación del tono muscular que Oppenheim acuñó el término “*dystonia musculorum deformans*” (Klein y Fahn, 2013). En 1984, un comité de expertos asignado por la “*Dystonia Medical Research Foundation*” definió la distonía como el síndrome consistente en “contracciones musculares mantenidas, que frecuentemente causan torsiones y movimientos repetitivos o posturas anormales” (Fahn et al., 1987). Este concepto ha sido revisado y la definición de consenso actual publicada en 2013 es la siguiente: “La distonía es un trastorno del movimiento caracterizado por una contracción muscular mantenida o intermitente que causa posturas y/o movimientos anormales y frecuentemente repetitivos. Los movimientos distónicos siguen habitualmente un patrón repetitivo, de torsión y en ocasiones tremorígeno. La distonía se inicia o empeora con el movimiento voluntario y se asocia con la activación muscular tipo *overflow*” (Albanese et al., 2013).

b. Clasificación

La distonía se clasifica atendiendo a dos ejes principales acordados por un comité de expertos internacional: las características clínicas (Eje 1) y la etiología (Eje 2) (Albanese et al., 2013). (**Tabla 1**)

Las características clínicas (Eje 1) respecto a las cuales describimos semiológicamente la distonía son: (1) edad de inicio: dividida en cinco grupos (lactante (0-2 años), infancia (3-12 años), adolescencia (13-20 años), adulto joven (21-40 años) y adulto tardío (>40 años); (2) la distribución anatómica presente: focal, segmentaria, multifocal, generalizada o unilateral (hemidistonía); (3) el patrón temporal que incluye tanto la evolución clínica de la distonía (estacionaria o progresiva) como a la variabilidad de los síntomas (persistentes, fluctuantes, acción específicos o paroxísticos); (4) otros signos asociados: si junto con la

distonía existen otras manifestaciones neurológicas o sistémicas o si por el contrario, la distonía se presenta de manera aislada (distonía aislada) o con otros trastornos del movimiento como parkinsonismo o mioclonías (distonía combinada).

Según la etiología (Eje 2) clasificaremos la distonía por un parte como “degenerativa” si existe alguna evidencia de alteración estructural o pérdida neuronal progresiva a nivel macroscópico, microscópico o en neuroimagen, “asociada a una lesión estática” si la anomalía encontrada es no progresiva o adquirida o “sin evidencia de lesión” estructural o neurodegenerativa. Por otro lado, atendiendo a las causas clasificaremos la distonía en función de si la distonía es adquirida o sintomática, de origen genético o idiopática (probablemente asociada a un defecto genético no conocido) (Albanese et al., 2013).

Eje I. Características clínicas	Eje II. Etiología
Características clínicas	Heredado o adquirido
<p>Edad de inicio</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Lactante (nacimiento a 2 años) ● Infancia (3-12 años) ● Adolescencia (13-20 años) ● Adulto joven (21-40 años) ● Adulto tardío (>40 años) <p>Distribución del cuerpo</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Focales ● Segmental ● Multifocales ● Generalizado ● Hemidistonia <p>Patrón temporal</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Curso de la enfermedad <ul style="list-style-type: none"> ○ Estático ○ Progresivo ● Variabilidad <ul style="list-style-type: none"> ○ Persistente ○ Acción específica ○ Diurno ○ Paroxístico 	<p>Heredado</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Autosómica dominante ● Autosómica recesiva ● Recesivo ligado al X ● Mitocondrial <p>Adquirido</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Daño cerebral perinatal ● Infección ● Droga ● Tóxico ● Vascular ● Neoplásico ● Daño cerebral adquirido ● Psicógeno/funcional <p>Idiopático</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Esporádico ● Familiar
Características asociadas	Patología del sistema nervioso
<p>Distonía aislada o combinada con otro trastorno del movimiento</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Distonía aislada ● Distonía combinada <p>Aparición de otros trastornos neurológicos o manifestaciones sistémicas</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Evidencia de degeneración ● Evidencia de lesiones estructurales estática ● No evidencia de lesiones estructurales o degenerativas

Tabla 1. Clasificación de la distonía según los ejes de características clínicas (Eje I) y de etiología (Eje II) basada en el documento de consenso de Albanese et al., 2013.

c. Distonía de origen genético

La distonía es un trastorno del movimiento clínica y genéticamente heterogéneo con una prevalencia estimada según diferentes revisiones sistemáticas y metaanálisis de 16.43 per 100000 (95% CI = 12.09–22.32) (Steeves et al., 2012) a 30.85 per 100000; 95% CI = 5.06–187.74 (Medina et al., 2022). Sin embargo, en estas revisiones no ha sido posible establecer la prevalencia por grupo de edad debido a la poca consistencia de estos datos en los estudios de población analizados. No obstante, en una revisión en la que se tiene en cuenta la prevalencia en función de la edad de inicio, se calcula una prevalencia de 24-50 per-1,000,000 para la distonía aislada en menores de 20 años (Defazio et al., 2004).

Inicialmente, el sistema de nomenclatura para la distonía de origen genético estaba compuesto por el símbolo “DYT” seguido de un número. Este número seguía el orden cronológico en el que habían sido reconocidos los diferentes loci cromosómicos en estudios de ligamiento asociados a distonía (ej. DYT1 para la distonía causada por el defecto en *TOR1A*). En algunos casos, en este sistema de nomenclatura no se conocía el gen o genes responsables del fenotipo distónico a designar (ej. DYT7, DYT13). Por otro lado, muchos genes reconocidos en la última década, en cuyo fenotipo la distonía juega un papel importante, habían quedado excluidos de esta lista de nomenclatura. Por todo ello, en las últimas recomendaciones del grupo de trabajo asignado por la asociación de Trastornos del movimiento para la clasificación y nomenclatura de los trastornos del movimiento genético, este sistema de designación ha sido sustituido por otro más amplio compuesto por el prefijo “DYT” y seguido del gen responsable (ej. DYT-TOR1A) (Marras et al., 2016).

En las últimas décadas más de 250 genes han sido asociados a distonía aislada, combinada o asociada a otros signos neurológicos o sistémicos, siendo la mayor parte de estos genes causantes de síndromes distónicos generalizados de inicio en la infancia (www.omim.org) (Zech et al., 2017). En un estudio reciente realizado por Zech et al., (2020) en el que la secuenciación del exoma completo de más de 700 pacientes con distonía sin diagnóstico ha sido analizada se consiguió el diagnóstico genético en el 19% de los casos. La rentabilidad diagnóstica del exoma, se incrementaba hasta el 45% si los pacientes con distonía presentaban inicio de la clínica en edad temprana (<21 años) y si la distonía se encontraba asociada a otros signos neurológicos o sistémicos. La heterogeneidad genética de la distonía es importante, como ejemplo en este estudio se encontraron 78 enfermedades monogénicas diferentes en 135 individuos.

En la distonía de inicio en la edad pediátrica los defectos genéticos más frecuentemente encontrados en este estudio son *KMT2B*, *ATM*, *TOR1A* y *THAP1* para la distonía aislada, *SGCE* y *ANO3* para la distonía combinada y *KMT2B*, *ADCY5*, *PANK2* y *ATPIA3* para la distonía asociada a otros signos neurológicos o sistémicos. Entre los procesos biológicos que se encuentran alterados más frecuentemente en los genes asociados, se encuentran los relacionados con el neurodesarrollo y con la señalización dopaminérgica (Zech et al., 2020).

3. Distonía asociada a síndrome de mioclonía-distonía por defecto en el gen epsilon sarcoglicano (*SGCE*-MD) en la infancia

a. Definición

El síndrome de distonía mioclónica (MDS) es una enfermedad de inicio en la infancia asociada al defecto en el gen epsilon sarcoglicano (Peall et al., 2014). Este gen codifica

una proteína transmembrana con una isoforma específica en el sistema nervioso central. El defecto genético se hereda de forma autosómica dominante con una penetrancia reducida debido a un fenómeno de “*imprinting*” materno (Grabowski et al., 2003).

b. Distonía en *SGCE*-MD

En las series de pacientes adultos afectos con *SGCE*-MD la distonía está presente en más de la mitad de los casos (Peall et al., 2014; Roze et al., 2008; Zutt et al., 2016). Respecto a su localización, se encuentra principalmente en miembros superiores y región cervical siguiendo una distribución segmentaria, focal o multifocal (Asmus et al., 2009; Peall et al., 2014; Roze et al., 2008; Zutt et al., 2016). Desafortunadamente, en estos estudios se incluyen muy pocos pacientes pediátricos, por lo que el fenotipo distónico en niños está poco descrito y probablemente infradiagnosticado.

En los niños afectos con *SGCE*-MD los datos clínicos recogidos en estudios previos refieren un fenotipo motor de mioclonías predominantemente en la parte superior del cuerpo junto con una distonía de miembros inferiores que va evolucionando durante el desarrollo y que en la infancia provoca una distonía de la marcha y caídas frecuentes (Ghosh y Indulkar, 2013; Nardocci et al., 2008; Tezenas Du Montcel et al., 2006; Vanegas et al., 2020).

En estos estudios las mioclonías son consideradas más frecuentes y severas que el fenotipo distónico. Sin embargo, la distonía ha sido evaluada a través de la escala Burke-Fahn-Marsden dystonia rating scale (BFMDRS), una escala diseñada para distonía aislada generalizada (Ghosh y Indulkar, 2013; Nardocci et al., 2008; Vanegas et al., 2020). Dado que la distonía en pacientes afectos con *SGCE*-MD es predominantemente focal o segmentaria y asociada a la marcha y/o escritura puede que exista una tendencia a infraestimar la gravedad de la distonía en estos pacientes.

c. Diagnóstico en pediatría de *SGCE-MD*

El escaso número de pacientes pediátricos analizados en la mayoría de las series de pacientes con *SGCE-MD* hacen que los criterios clínicos diagnósticos actuales no sean adecuados para una correcta identificación de la enfermedad en estadios iniciales. Entre los criterios que no se pueden aplicar durante la infancia se encuentran “mejoría de los síntomas tras ingesta de alcohol”, “la coexistencia de síntomas psiquiátricos” ausentes en los primeros años de vida, o “la remisión espontánea de la distonía de miembros inferiores tras alcanzar la adolescencia” (**Tabla 2**) (Grünewald et al., 2008; Kinugawa et al., 2009; Roze et al., 2018).

Criterios mayores
<ul style="list-style-type: none"> ● Mioclonía aislada o predominante sobre distonía ● Predominio de las manifestaciones motoras en la parte superior del cuerpo ● Ausencia de distonía de tronco ● Presencia de antecedentes familiares ● Inicio de la clínica antes de los 18 años
Criterios menores
<ul style="list-style-type: none"> ● Trastorno obsesivo compulsivo, trastorno relacionado con la ansiedad o dependencia alcohólica ● Remisión espontánea de la distonía de extremidades durante la infancia o adolescencia ● Mejoría de los síntomas tras ingesta de alcohol
Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> ● Otras manifestaciones neurológicas además de la mioclonía y/o distonía ● Resonancia magnética cerebral anormal ● Hallazgos neurofisiológicos que no apoyan el diagnóstico

Tabla 2. Criterios diagnósticos del síndrome de mioclonía-distonía adaptados de Roze et al., 2018) La mioclonía-distonía es definitiva cuando los pacientes tienen:

- cinco criterios mayores + ausencia de criterios de exclusión,
- cuatro criterios mayores + dos criterios menores + ausencia de criterios de exclusión.

La mioclonía-distonía es probable cuando los pacientes tienen:

- *cuatro criterios mayores + ausencia de criterios de exclusión*
- *tres criterios mayores + dos criterios menores + ausencia de criterios de exclusión.*

El retraso del diagnóstico de esta enfermedad de inicio en la infancia por las razones expuestas anteriormente, junto con la posible infraestimación de la gravedad del fenotipo distónico puede tener consecuencias en la adecuada actuación terapéutica en estos pacientes. En los casos moderados y graves la estimulación cerebral profunda (*deep brain stimulation* en inglés: DBS) ha demostrado una mejoría en la distonía y en las mioclonías de los pacientes afectados por *SGCE*-MD. Desafortunadamente, la edad media de intervención actualmente se sitúa entre los 30-50 años lo que hace que muchos niños y adultos jóvenes sufran discapacidad física y dificultades sociales durante muchos años hasta conseguir un tratamiento eficaz y duradero (Krause et al., 2021; Wang y Yu, 2021). En consecuencia, el estudio del fenotipo distónico de estos pacientes especialmente en la infancia para que el reconocimiento del *SGCE*-MD en estadios iniciales sea posible es necesario para poder seleccionar de forma más precoz aquellos pacientes que se beneficiarían de un tratamiento eficaz incluyendo la edad pediátrica. La aplicación y/o desarrollo de escalas que puedan evaluar la distonía tarea específica incluyendo los pacientes pediátricos son herramientas necesarias para conseguir este objetivo, así como monitorizar la respuesta al tratamiento durante el seguimiento.

d. Escalas clínicas para evaluar distonía en *SGCE*-MD

La identificación y cuantificación de la severidad de la distonía en la que se tenga en consideración en qué actividades o funciones motoras presenta el niño la distonía es un

paso necesario e importante para poder determinar el tratamiento más correcto, así como evaluar su eficacia en el paciente.

En la actualidad, la escala más utilizada para evaluar la distonía en *SGCE*-MD es la escala Burke-Fahn-Marsden dystonia rating scale (BFMDRS) (Burke et al., 1985). Ha sido utilizada para evaluar la eficacia del ensayo clínico realizado en estos pacientes con zonisamida (Hainque et al., 2016), así como en diferentes estudios realizados en pacientes afectos con *SGCE*-MD y tratados con DBS (Kosutzka et al., 2019; Rocha et al., 2016; Rughani y Lozano, 2013). Sin embargo, en el estudio realizado por Vanegas et al., 2020 en una cohorte pediátrica de pacientes con *SGCE*-MD en el análisis clinimétrico de la escala, se observa una baja consistencia interna y un “efecto suelo” que podría estar relacionado con el carácter focal/segmentario de la distonía en estos pacientes, ya que esta escala ha sido diseñada para evaluar pacientes con distonía aislada generalizada (Burke et al., 1985).

La BFMDRS se divide en dos subescalas: la de severidad del movimiento o “*movement scale*” y la escala de discapacidad o “*disability scale*”. La escala de movimiento cuantifica la severidad de la distonía observada en el paciente (de 0 a 4 puntos) en nueve regiones corporales (ojos, boca, habla y disfagia, cuello, tronco, brazos y piernas) multiplicando esta puntuación (de 0 a 4) en función de la presencia de la distonía en reposo (4), tras la realización de determinadas acciones (1-3) o si no aparece (0) (*provoking factor*). Además, se aplica un factor de ponderación (0.5) para la distonía en ojos, boca y cuello. La puntuación total mínima es 0 y la máxima 120. La escala de discapacidad consiste en un cuestionario en el que se le pregunta al paciente o a los padres del paciente sobre las dificultades en la realización de ocho actividades de la vida diaria como son el lenguaje, la escritura, la alimentación, la masticación, la disfagia, la higiene, la vestimenta y la

marcha. En la escala de discapacidad la puntuación mínima es 0 y la máxima discapacidad es 30.

Otras escalas como la Unified Dystonia Rating Scale y la Global Dystonia Rating Scale desarrolladas posteriormente incluyen 14 áreas corporales con el objetivo de ser más específicos en definir las regiones distónicas que las BFMDRS. Ambas han demostrado un índice alto de consistencia interna y fiabilidad en la evaluación de distonía aislada en el adulto (Comella et al., 2003). La escala Unified Dystonia Rating Scale además de incluir más regiones corporales, se diferencia de la BFMDRS en la ausencia de factor ponderal y su puntuación máxima es 112. La escala Global Dystonia Rating Scale puntúa durante el periodo de observación cada región desde 0 (no distonía) hasta 10 (distonía muy severa) y suma un máximo de 140 puntos. No incluye ningún factor modificador ni ponderal y es considerada la de más fácil aplicación en la práctica diaria (Comella et al., 2003).

Sin embargo, estas escalas han sido utilizadas en pocos estudios con pacientes afectados por *SGCE*-MD (Luciano et al., 2014; Mercado-Pimentel et al., 2021). Además, las diferencias de diseño en estas dos escalas no parecen estar dirigidas a mejorar el efecto suelo encontrado en la cohorte pediátrica de MDS evaluada con la escala BFMDRS (Vanegas et al., 2020)

Respecto a las escalas existentes para evaluar las distonías focales y/o tarea-específicas, es especialmente interesante para los pacientes con *SGCE*-MD, la Writer's Cramp Rating Scale (WCRS). Esta escala existe desde 1996 y está diseñada para evaluar el espasmo del escribiente idiopático propio del adulto (Wissel et al., 1996). La Writer's Cramp Rating Scale (WCRS) tiene dos subescalas: la escala de movimiento de la escritura y la de velocidad de la escritura. La postura referencia tras un estudio en 24 controles sanos del

miembro superior al escribir en condiciones estándar consiste en una flexión del codo de 90 grados, una posición neutral en cuanto a flexo-extensión y abducción ulnar/radial de la muñeca y una flexión de aproximadamente 25 grados en las articulaciones interfalángicas del primer, segundo y tercer dedo.

En función de la existencia de posturas distónicas en la escritura en dichas articulaciones se calcula una puntuación para el codo (ES 0-2) para la muñeca (WRS 0-4) y para los dedos (FS 0-6), multiplicándose por dos si está presente desde el inicio de la escritura (*latency of dystonia*) y sumándole la existencia de temblor distónico (WTS x 2). La puntuación máxima de esta escala es 28. Para la puntuación de la velocidad de escritura se puntúa de 0 (velocidad normal) a 2 (muy enlentecida) (Wissel et al., 1996).

Los pacientes con *SGCE*-MD también sufren de distonía durante la marcha especialmente en la edad pediátrica (Roze et al., 2008; Vanegas et al., 2020), bajo nuestro conocimiento, no existen escalas destinadas a evaluar la distonía de la marcha de forma específica que pueda ser una herramienta útil en la práctica diaria.

4. Parkinsonismo de inicio en la infancia

a. Definición y conceptos asociados a parkinsonismo

El parkinsonismo se define por la presencia de bradicinesia junto con al menos uno de los siguientes signos motores: temblor de reposo o rigidez. Se trata de un diagnóstico sindrómico dentro de los trastornos hipocinéticos basado en las características de la enfermedad de Parkinson cuyo mecanismo etiopatogénico se explica por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra. Con la progresión de la enfermedad también es característico la inestabilidad postural y el congelamiento o “*freezing*” de la marcha (Postuma et al., 2015).

Bradicinesia

La bradicinesia debe estar siempre presente para el diagnóstico y se puede objetivar observando si existe un decremento gradual en amplitud y velocidad (o bloqueos progresivos) en la realización de movimientos repetitivos de las manos, pronosupinación de los miembros superiores o en la maniobra de *tapping* de dedos o pies. Si lo que observamos es una disminución parcial o completa de la amplitud de los movimientos voluntarios se trata de una hipocinesia o acinesia. La bradicinesia también puede estar presente asociada a otros síntomas neurológicos como la afectación corticoespinal, la ataxia cerebelosa, la distonía o la discapacidad intelectual, por lo que su presencia por sí sola no implica necesariamente un parkinsonismo (Postuma et al., 2015).

En los pacientes pediátricos de corta edad la bradicinesia puede ser confundida por hipotonía o rigidez, e incluso en casos graves como en los defectos de tirosina hidroxilasa o por el defecto de L- Aminoácido aromático descarboxilasa puede llevar a pensar a enfermedades neuromusculares como diagnóstico inicial (Wassenberg et al., 2017). La observación de la movilidad espontánea y la disminución de la expresividad facial, junto con la presencia de reflejos osteotendinosos nos ayudan a localizar el origen central de este signo clínico en lactantes (Leuzzi et al., 2021).

Rigidez

Para evaluar la existencia de rigidez el paciente debe estar relajado y el evaluador buscar si existe una resistencia a la movilidad pasiva velocidad independiente y tipo “tubo de plomo”. En el paciente adulto o en el niño colaborador se pueden realizar maniobras de activación para evaluarla, sin embargo, en el lactante, niño preescolar, si existe una falta de cooperación o asociación de otros trastornos motores la evaluación precisa del tono es más complicada (Sanger et al., 2003).

Temblor de reposo

El temblor de reposo se refiere a un temblor en miembros en posición de reposo con una frecuencia entre 4 a 6 Hz que se suprime al iniciar un movimiento (Postuma et al., 2015). En parkinsonismo infantil el temblor es menos frecuente que en el adulto, puede ser de reposo, postural o cinético y paroxístico. En el niño se suele asociar a trastornos de las monoaminas y en el defecto por tirosina hidroxilasa o sepiapterina reductasa se ha descrito su presencia entre los 2-8 meses de vida con una remisión espontánea tras 2-6 meses (Grattan-Smith et al., 2002; Leuzzi et al., 2013).

b. Diferencias entre enfermedad de Parkinson y parkinsonismo infantil

La forma más frecuente de parkinsonismo es la enfermedad de Parkinson, una enfermedad neurodegenerativa del adulto con una edad de inicio mediana alrededor de los 60 años que se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la pars compacta de la sustancia nigra y la acumulación de α -synucleina en tronco-encéfalo, médula espinal y córtex. En esta enfermedad, además de los síntomas motores, la mayoría de los pacientes presentan síntomas no motores como hiposmia, disfunción autonómica como el estreñimiento, los trastornos del sueño o alteraciones psiquiátricas (Postuma et al., 2015). Se trata de una enfermedad esporádica cuyo principal factor de riesgo, como en otras enfermedades neurodegenerativas, es la edad. Sin embargo, un 5-10% de los pacientes presentan formas monogénicas de herencia recesiva o dominante (Lin y Farrer, 2014). Siguiendo los criterios propuestos por la Sociedad de Trastornos del Movimiento para el diagnóstico clínico de enfermedad de Parkinson, además de la presencia inequívoca de parkinsonismo es necesario que no existan criterios de exclusión (como la síntomas cerebelosos o la parálisis supranuclear de la mirada) ni “*red flags*” (como por ejemplo, una rápida progresión de la alteración de la marcha que lleve al desplazamiento

en silla de ruedas o la disfunción bulbar o autonómica en los primeros 5 años desde el debut de la enfermedad) y además, que se observen al menos dos criterios diagnósticos menores o de apoyo (como la buena respuesta clínica a L-Dopa o el inicio unilateral de los síntomas) (Postuma et al., 2015).

Por el contrario, en las formas monogénicas de Parkinson el inicio de la enfermedad habitualmente ocurre en pacientes con parkinsonismo de inicio temprano o antes de los 40-50 años (Puschmann, 2013). En los casos de inicio en la edad pediátrica, existe una falta de consenso sobre los criterios clínicos que definen el parkinsonismo y su clasificación. García-Cazorla et al. (2011) se refiere al síndrome rígido-hipocinético de la infancia como la forma de parkinsonismo de inicio en la infancia que engloba signos motores como hipocinesia o bradicinesia con rigidez o temblor de reposo. Desde un punto de vista semiológico en la infancia el parkinsonismo se suele presentarse de forma incompleta, se asocia a habitualmente a un fenotipo complejo con otros signos como la distonía, la hipotonía axial, el retraso psicomotor o el retraso en el desarrollo de los reflejos posturales y su expresión clínica puede ser variable dependiendo de la etapa del neurodesarrollo (García-Cazorla et al., 2011). Todas estas características junto con la ausencia de guías diagnósticas hacen que el parkinsonismo pediátrico sea difícil de identificar a edades tempranas.

c. Clasificación

El parkinsonismo de inicio temprano se define como el parkinsonismo de cualquier causa que aparece en un paciente menor a 40 años. A su vez, este se divide en parkinsonismo juvenil (*juvenile parkinsonism* o JP) si los signos y síntomas de parkinsonismo que aparecen antes de los 21 años y el parkinsonismo de inicio en el joven o adulto joven cuando el debut de los síntomas ocurre entre los 21-40 años (*young-onset parkinsonism*)

(Schrag y Schott, 2006). No obstante, para referirnos al parkinsonismo en pediatría en la literatura encontramos tanto los términos de parkinsonismo de inicio precoz como parkinsonismo juvenil.

Recientemente, en una publicación de Leuzzi V. et al. se ha propuesto una clasificación de parkinsonismo pediátrico estableciendo distintos grupos que comparten características como la edad de presentación (Lactante (0-2 años); Escolar (3-12 años); Adolescencia (13–20 años)), la clínica, la evolución y la etiología. Siguiendo esta clasificación los diferentes grupos de parkinsonismo en la edad pediátrica son los siguientes: parkinsonismo del desarrollo, parkinsonismo degenerativo infantil, parkinsonismo en enfermedades del neurodesarrollo, parkinsonismo en enfermedades neurológicas multisistémicas, parkinsonismo juvenil, distonía parkinsonismo y parkinsonismo adquirido (Leuzzi et al., 2021). A excepción del parkinsonismo adquirido, el resto de las categorías se tratan de parkinsonismo de origen genético que se presentan desde la infancia hasta la adolescencia (<21 años).

d. Parkinsonismo en pediatría de origen genético

El parkinsonismo de inicio precoz (<21 años) es un síndrome clínico altamente infrecuente con una incidencia de 0.8 por cada 100.000 personas-año para este grupo de edad (Bower et al., 1999) cuya principal causa es genética. Según una revisión reciente de la literatura realizada por Morales-Briceño y colaboradores (2019), en 407 pacientes con parkinsonismo de inicio precoz se observó una edad mediana de inicio de 10 años. En este estudio se demuestra una gran heterogeneidad genética siendo la gran mayoría de mutaciones transmitidas con herencia recesiva (71%) y en el 90% de los pacientes (excluyendo las mutaciones en PRKN o parkin) un fenotipo de parkinsonismo complejo. Entre los signos clínicos asociados al parkinsonismo de inicio temprano se encuentran los

siguientes: distonía (61%), alteraciones cognitivas (54%), signos piramidales (35%) alteraciones en la neuroimagen (30%), síntomas psiquiátricos (28%), alteraciones en los movimientos oculares (27%), discapacidad intelectual (19%) ataxia (17%), mioclonías (13%), epilepsia (12%), corea (8%) neuropatía (8%) e inicio rápido de los síntomas (7.6%) (Morales-Briceño et al., 2020).

Los genes más frecuentes varían en función de la edad de presentación. En los casos con inicio en los primeros dos años de vida y fenotipo de síndrome rígido-hipocinético la patología causal más frecuente suelen ser los defectos genéticos asociados con el metabolismo de monoaminas (*TH*, *DDC*, *GCHI*). En el parkinsonismo de inicio en la infancia (3-12 años) y en la adolescencia (12-21 años) los defectos genéticos más frecuentes en la literatura son *PRKN*, *HTT*, *ATP13A2*, *ATPIA3*, *FBXO7*, *PINK1* y *PLA2G6* (**Figura 2**). De todos ellos, solo *PRKN* o parkin y *PINK1* se presentan como un parkinsonismo aislado. La enfermedad de Huntington (*HTT*) en la infancia se suele presentar como distonía-parkinsonismo con corea o tics, apraxia oculomotora, mioclonías, ataxia, alteraciones psiquiátricas y cognitivas progresivas y una historia familiar positiva (Fusilli et al., 2018) y el gen *ATPIA3* se asocia a una distonía-parkinsonismo de aparición súbita (Rosewich et al., 2014). Los genes *ATP13A2*, *PLA2G6* y *FBXO7* presentan una herencia recesiva con un fenotipo motor complejo que puede solaparse entre ellos como el parkinsonismo-piramidalismo con respuesta a L-Dopa, acompañado de deterioro cognitivo y alteraciones neuropsiquiátricas e hipointensidad en secuencias sensibles para el depósito de hierro en algunos casos de *PLA2G6* y *ATP13A2*.

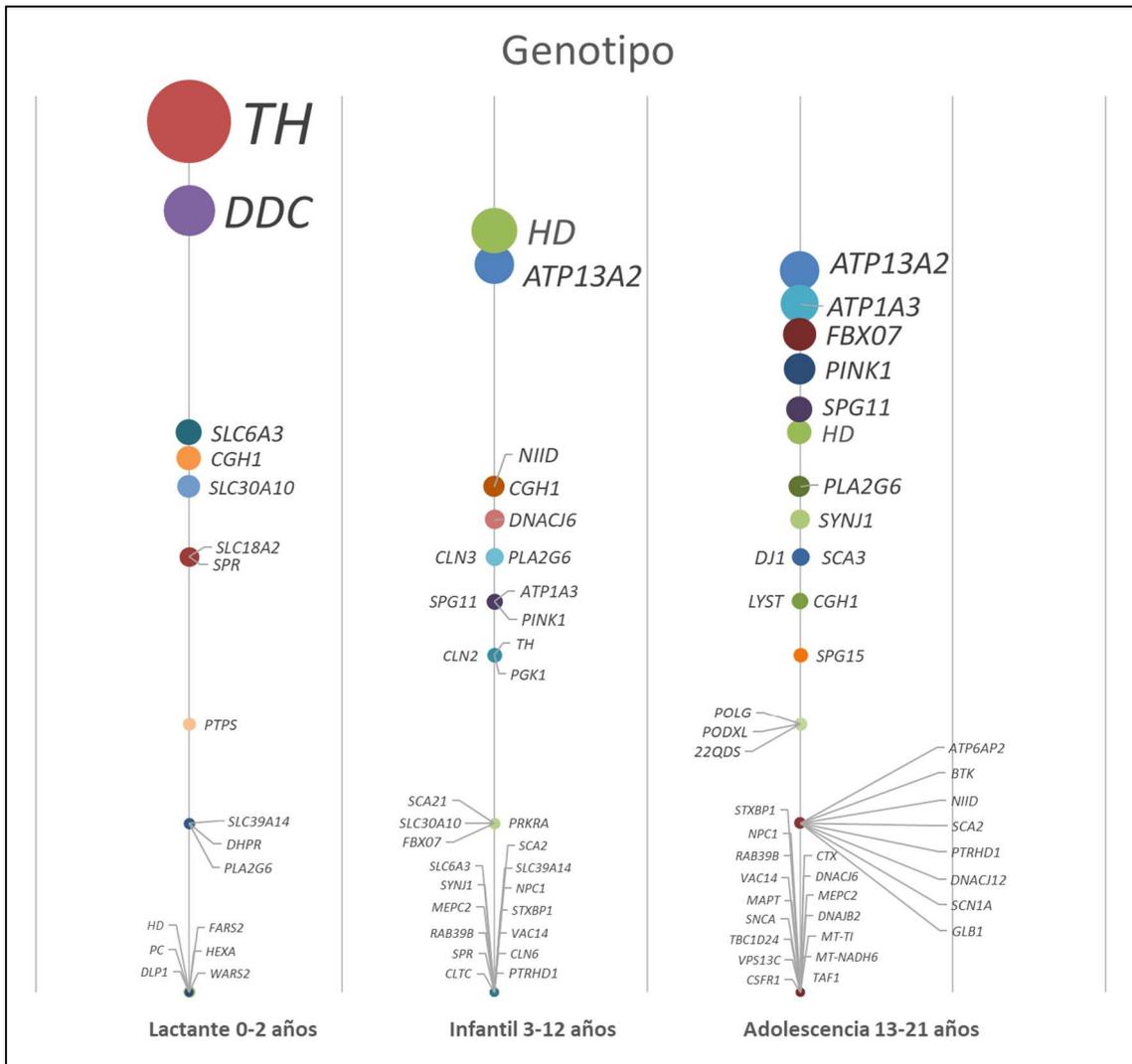


Figura 2. Genes asociados a Parkinsonismo de inicio en pediatría: Figura realizada a partir de los pacientes reportados con diagnóstico genético de parkinsonismo en una revisión bibliográfica de 407 pacientes (Morales-Briceño et al., 2019) y clasificados en función de la edad de presentación. Han sido ordenados de manera ascendente en función del número de casos encontrados y en tres grupos de edad (infancia, escolar y adolescencia)

e. Parkinsonismo-piramidalismo

El síndrome de parkinsonismo-piramidalismo (SPP) se define como la presencia de parkinsonismo (bradicinesia junto con rigidez o temblor de reposo) y signos piramidales o afectación de primera motoneurona (hiperreflexia, reflejo cutáneo plantar extensor,

paresia o espasticidad). El SPP ha sido asociado a más de 30 defectos genéticos que se manifiestan como enfermedades neurodegenerativas, entre las que se encuentran algunas paraparesias espásticas complejas hereditarias, formas de parkinsonismo de inicio juvenil, siete de las diez enfermedades por neurodegeneración con acúmulo de hierro cerebral y algunos errores innatos del metabolismo (Tranchant et al., 2017).

En 1954, se empezó a utilizar el término síndrome pálido-piramidal tras la descripción de cinco pacientes con parkinsonismo juvenil y piramidalismo y lesiones del globo pálido interno, sustancia nigra y de la vía piramidal (Davison, 1954). Desde entonces, se han reportado casos aislados de parkinsonismo juvenil o distonía parkinsonismo con signos piramidales de causa genética bajo este término. Sin embargo, en la mayoría de estos casos no existen estudios histopatológicos que confirmen la correlación entre la clínica y las estructuras anatómicas afectadas. Además, muchos de ellos, reportan parkinsonismo con buena respuesta a L-dopa, lo que se explicaría mejor por una afectación predominante de sustancia nigra más que por una afectación postsináptica palidal. Todo ello, hace que actualmente, se prefiera el término descriptivo clínico de parkinsonismo-piramidalismo, que ayuda a la clasificación fenotípica de cara al diagnóstico genético (Tranchant, 2020).

Enfermedades genéticas que causan SPP

Los genes que pueden presentar un fenotipo tipo SPP están recogidos en la **Tabla 3**. Entre estos genes, los que pueden manifestarse principalmente con un parkinsonismo de inicio precoz o parkinsonismo juvenil se encuentran *PLA2G6*, *ATP13A2*, *FBXO7*, *DNAJC6*, *VPS13C*, *ATP6AP2* o *SNCA* (**Tabla 3**). El diagnóstico de estas enfermedades es muy complejo ya que pueden existir diferentes fenotipos solapantes asociados a un mismo gen. Por ejemplo, en el caso de *PLA2G6* si la enfermedad debuta en los primeros años de vida habitualmente se corresponde con el fenotipo de distrofia neuroaxonal infantil clásica

(INAD) (MIM#256600), si el inicio es algo más tardío durante la infancia el fenotipo suele corresponder con la distrofia neuroaxonal atípica (ANAD) (MIM#610217) y en el caso de un inicio juvenil o ya en el adulto la forma más reportada es la de distonía parkinsonismo (PARK14) (MIM#612953) (Gregory et al., 2008). Otro ejemplo, es el gen *FBXO7* que se puede presentar como un SPP autosómico recesivo, una paraparesia espástica o parkinsonismo aislado (Wei et al., 2018). Es por ello, que algunos signos clínicos o radiológicos pueden ser importantes para orientar el diagnóstico genético. Este es el caso de los defectos en *PLA2G6* y *ATP3A2*, donde la neuroimagen puede ser la clave diagnóstica, ya que, en un 20-28% de los pacientes *PLA2G6* y en algunos casos de los defectos asociados a *ATP3A2* se encuentran imágenes sugestivas de depósito de hierro en ganglios basales (Magrinelli et al., 2022). Estos hallazgos a su vez, hacen que estos dos genes también forman parte del grupo NBIA o enfermedades con neurodegeneración por acumulo de hierro cerebral (**Tabla 3**).

Vías fisiopatológicas del SPP

Desde un punto de vista patogénico, muchos de los genes asociados con el parkinsonismo de inicio precoz están implicados en la disrupción de la función presináptica dopaminérgica. Las variantes patogénicas encontradas en estos genes alteran el tráfico de proteínas, la autofagia y la función mitocondrial, que en último lugar dará lugar a una pérdida de neuronas dopaminérgicas y/o alteran la postsinapsis (Pickrell y Youle, 2015; Wittke et al., 2021), mientras que los signos piramidales pueden ser el resultado de lesiones a nivel cortical, subcortical o espinal de la vía piramidal. Sin embargo, aunque se conocen varios sistemas fisiopatológicos implicados en el SPP como la vía mitocondrial, la vía lisosomal, el transporte de vesículas o la autofagia, no existe una clara correlación entre el fenotipo SPP y dichos mecanismos subyacentes, por lo que diferentes

alteraciones a nivel molecular pueden dar lugar a SPP (Tranchant et al., 2017). La vía mitocondrial puede verse afectada en genes como *PLA2G6*, *PKAN*, *C19orf12* que codifican proteínas mitocondriales o en *FBXO7* donde la proteína recluta a la proteína parkin en una mitocondria dañada para iniciar la mitofagia (Zhou et al., 2015), *WDR45* en la autofagia (Arber et al., 2016) y las proteínas implicadas en las paraparesias hereditarias complejas están implicadas en el tráfico vesicular, el transporte anterógrado y la autofagia (Vantaggiato et al., 2013). *FBXO7* participa en el sistema ubiquitina proteosoma, donde la proteína *FBXO7* es una subunidad del complejo responsable de la ubiquitinización dependiente de fosforilación de las proteínas. *FBXO7* actúa como proveedor de sustrato para este complejo y tiene una función reguladora en el proteosoma (Vingill et al., 2016). *ATP13A2* juega un papel importante tanto para la vía lisosomal como para la vía mitocondrial y posiblemente también para la eliminación de metales (Park et al., 2015).

Gen	Enfermedad	Herencia	Hipointensidad T2/GRE/SWI en ganglios basales sugestiva de depósito de hierro
Paraplejia espástica compleja			
<i>Spatacsin</i>	SPG11	AR	
<i>Spastizin</i>	SPG15	AR	
<i>KIF5A</i>	SPG10	AD	
<i>DDHD1</i>	SPG28	AR	GP
<i>AP4M1</i>	SPG50	AR	GP
<i>AP4S1</i>	SPG52	AR	GP
<i>RNASEH2B</i>	Aicardi-Goutieres	AR	GP
Parkinsonismo de inicio precoz			
<i>ATP13A2</i>	PARK9	AR	Caudado y Putamen
<i>PLA2G6</i>	PARK14	AR	GP
<i>FBXO7</i>	PARK15	AR	
<i>DNAJC6</i>	PARK19	AR	
<i>SNCA</i>	PARK1	AD	
<i>ATP6AP2</i>	XPDS	AR	
<i>VPS13C</i>	VPSC13C Parkinsonismo	AR	
NBIA			
<i>PANK2</i>	PKAN	AR	GP
<i>PLA2G6</i>	PLAN	AR	GP
<i>ATP13A2</i>	Enf. Kufor-Rakeb	AR	Caudado y putamen
<i>WDR45</i>	BPAN	XL	GP, SN y pedúnculos
<i>CI9orf12</i>	MPAN	AR	GP y SN
<i>COASY</i>	CoPAN	AR	GP
<i>FTL</i>	Neuroferritinopatía	AD	Caudado, putamen, GP, SN, Núcleo rojo
<i>CP</i>	Aceruloplasminemia	AR	Caudado, putamen, tálamo y núcleo dentado
<i>FA2H</i>	FANH	AR	GP
<i>DCAF17</i>	Enf. de Woodhouse-Sakati	AR	GP, SN
<i>SCP2</i>	Leucoencefalopatía con distonía y neuropatía motora.	AR	GP, SN, Núcleo rojo y núcleo dentado
<i>GTPBP2</i>	Sd. Jaber-Elahi	AR	GP y SN
<i>REPS1</i>	NBIA7	AR	GP y SN
<i>CRAT</i>	NBIA8	AR	GP y SN
Errores innatos del metabolismo			
<i>ATP7B</i>	Enf. de Wilson	AR	T2 hipo o hiperintensidades en Ganglios basales
<i>SLC30A10</i>	Enf. del transporte de Manganeso	AR	

<i>CYP27A1</i>	CTX	AR	
<i>GBA</i>	Enf. de Gaucher tipo 3	AR	
<i>NPC1</i>	Niemann Pick tipo C	AR	
<i>NPC2</i>	Niemann Pick tipo C	AR	
<i>CLN3</i>	Ceroidlipofuscinosis	AR	
<i>TPP1</i>	Ceroidlipofuscinosis	AR	GP y SN
<i>GLB1</i>	Gangliosidosis GM1	AR	Putamen, GP y SN
<i>FUCA1</i>	Fucosidosis	AR	GP
<i>LAMAN</i>	Manosidosis	AR	Tálamo, GP, Putamen, SN y Núcleo Rojo
<i>POLG1</i>	Enf. mitocondrial		
<i>PEO1</i>	Enf. mitocondrial		
<i>SLC6A3</i>	Defecto del transportador de dopamina	AR	
<i>SLC20A2</i>	Enf. por calcificaciones cerebral primaria familiar	AD	Ganglios basales
<i>PDGFRB</i>	Enf. por calcificaciones cerebral primaria familiar	AD	Ganglios basales
<i>PDGFB</i>	Enf. por calcificaciones cerebral primaria familiar	AD	Ganglios basales
<i>XPR1</i>	Enf. por calcificaciones cerebral primaria familiar	AD	Ganglios basales
Otras enfermedades neurodegenerativas heredadas			
<i>ATXN3</i>	SCA3	AD	
<i>CSF1R</i>	Leucoencefalopatía hereditaria con esferoides	AD	
<i>PRNP</i>	Enf. familiar por priones	AD	
<i>FMR1</i>	FXTAS	XL	
<i>C9orf72</i>	Demencia frontotemporal	AD	
<i>TBCE</i>	Encefalopatía con amiotrofia y atrofia óptica	AR	GP y SN
<i>VAC14</i>	Degeneración estriatal de inicio en la infancia	AR	GP y SN
Enfermedades neurodegenerativas NO heredadas			
	Atrofia multisistémica		GP
	Parálisis supranuclear progresiva		
	Degeneración corticobasal		
Distonías genéticas			
<i>KMT2B</i>	DYT28	AD	GP

Tabla 3. *Enfermedades que cursan con SPP o fenotipo motor complejo y/o neuroimagen sugestiva de depósito de hierro en ganglios basales. En esta tabla se describe el gen, la enfermedad asociada, el tipo de herencia y si existe una hipointensidad en RM en secuencias T2/GRE o SWI. Las enfermedades con SPP están en color negro, las enfermedades que no han presentado un fenotipo de SPP, pero si han presentado un fenotipo motor complejo con neuroimagen sugestiva de depósito de hierro en ganglios basales se han representado en fondo de color gris. GP: globo pálido, SN: Sustancia Nigra. (Trachant et al., 2017; Jinnah et al., 2019; Hinarejos et al., 2020)*

f. Parkinsonismo y distonía-parkinsonismo asociada a neurodegeneración por acumulo de hierro cerebral (NBIA)

En los pacientes pediátricos con parkinsonismo complejo o asociado a distonía, espasticidad, ataxia, alteraciones cognitivas o neuropsiquiátricas, el análisis de la neuroimagen es un paso fundamental en la caracterización del fenotipo que nos puede ayudar al uso racionalizado de las pruebas genéticas y la adecuada interpretación de los resultados de las mismas. Algunos parkinsonismos complejos de origen genético pueden asociar lesiones en ganglios basales, y el uso de secuencias específicas puede ayudar a caracterizar estas lesiones. Por ejemplo, en niños con parkinsonismo asociado a enfermedades mitocondriales, podemos encontrar lesiones de necrosis y/o edema citotóxico típicos del síndrome de Leigh. En pacientes con parkinsonismo asociado a enfermedades neurodegenerativas asociadas al acúmulo de hierro cerebral (*Neurodegeneration with brain iron accumulation* (NBIA)) encontraremos hipointensidad en ganglios basales en secuencias T2 y secuencias de susceptibilidad paramagnética. También podemos relacionar el parkinsonismo con el acúmulo de otros metales como manganeso o cobre, con depósitos de calcio, alteraciones en sustancia blanca, atrofia cerebral, etc. Si tenemos disponibilidad, otra herramienta diagnóstica que nos puede ayudar es el DAT scan o DOPA-PET, con ella, podremos diferenciar entre los

diferentes parkinsonismos en los que exista una función nigroestriatal normal o exista una degeneración nigroestriatal (Baide-Mairena et al., 2022).

El término NBIA fue utilizado por primera vez por Hayflick et al. para designar a aquellas enfermedades neurológicas con signos extrapiramidales, discapacidad intelectual y evidencia de depósito de hierro en neuroimagen (Hayflick et al., 2003). En resonancia magnética el acúmulo de hierro se observa como hipointenso en secuencias de susceptibilidad paramagnética (*susceptibility-weighted imaging* [SWI]) gradiente eco (*gradient recall echo* [GRE]), y secuencias T2. En secuencia T1 aparecerá como isointensa.

Las enfermedades NBIA son un grupo clínica y genéticamente heterogéneo asociado al menos a diez genes diferentes (**Tabla 3**). De estos genes sólo dos de ellos están directamente relacionados con la homeostasis del hierro: *FTL* y *CP*. El resto de los genes están implicados en la síntesis de coenzima A (*COASY* y *PANK2*), el metabolismo lipídico (como el gen *FA2H*, *PLA2G6* y *C19orf12* (que codifica para una proteína de la membrana externa de la mitocondria)), la degradación intracelular de las proteínas y la autofagia (*ATP13A2* y *WDR45* (miembro de la familia *WD scaffold protein*)). En el caso del gen *DCAF17* codifica una proteína nucleolar de función desconocida por el momento.

De estas enfermedades ultrararas con una prevalencia menor a 1/1.000.000, los genes *PANK2* (35-50% de los casos NBIA) y *PLA2G6* (20% de los casos NBIA) son los más frecuentes. El resto de los genes NBIA tienen una frecuencia y presentan fenotipos más heterogéneos. Cabe destacar que hasta en un 20% de los pacientes con fenotipo clínico-

radiológico de NBIA no se llega a un diagnóstico de confirmación genética (Arber et al., 2016).

Si los pacientes presentan un patrón determinado de acúmulo de hierro en neuroimagen, junto con el fenotipo clínico característico de alguna de las formas NBIA, el reconocimiento clínico lleva al diagnóstico de confirmación genética en alguno de los 10 genes NBIA. Sin embargo, en algunos fenotipos de las entidades NBIA, como las asociadas al defecto en ATP13A2 o en PLA2G6 los depósitos de hierro pueden no estar presentes, especialmente en estadios iniciales. Además, existen casos de cuadros clínicos complejos que solapan fenotipos clínico-radiológicos de NBIA con los causados por otros defectos genéticos que no pertenecen al grupo NBIA, entre los que se encuentran enfermedades de depósito lisosomal como la gangliosidosis GM1 o la fucosidosis, la deficiencia de AP4 o en los genes *GTPBP2*, *DDHD1*, o *SCP2* (Gautschi et al., 2014; Tokola et al., 2019; Tranchant et al., 2017) (**Tabla 3**). El desconocimiento de la existencia de un mecanismo fisiopatogénico común de las enfermedades NBIA hace difícil definir si estos casos son nuevos genes NBIA a confirmar en un futuro o enfermedades NBIA-mimic.

g. Parkinsonismo asociado a defecto en FBXO7

El defecto asociado a la mutación en la proteína FBXO7 (PARK15; MIM 260300) fue por primera vez reportado en 2008 como la causa de un SPP de herencia autosómica recesiva en varios miembros de una familia iraní (Shojaee et al., 2008). Desde entonces hasta la fecha de la publicación del artículo que forma parte de esta tesis se ha descrito en 27 pacientes pertenecientes a unas 11 familias, ampliando el fenotipo asociado a este defecto genético. En la mayoría de estos pacientes se ha desarrollado una paraparesia

espástica junto con un parkinsonismo de inicio temprano con buena respuesta motora a L-DOPA. Además de los signos piramidales y el parkinsonismo, otros signos neurológicos como disfagia, distonía, alteraciones en los movimientos oculares, deterioro cognitivo y afectación psiquiátrica son frecuentes en estos pacientes (Conedera et al., 2016; Fonzo et al., 2009; Gündüz et al., 2014; Lohmann et al., 2015; Paisán-Ruiz et al., 2010; Wei et al., 2018; Yalcin-Cakmakli et al., 2014). La neuroimagen en estos pacientes suele ser normal o con atrofia cerebral inespecífica y en los pacientes en los que se ha realizado un DAT-Scan o SPECT se ha observado un déficit presináptico (Fonzo et al., 2009; Paisán-Ruiz et al., 2010).

h. Proteína y función de FBXO7

El gen F-box protein7 (*FBXO7*) codifica una proteína que está implicada en la actividad del complejo ubiquitina proteosoma y la mitofagia (Joseph et al., 2018).

El sistema ubiquitina proteosoma es una de las principales vías de degradación proteica de la célula, de manera que, si en un proceso celular es necesario regular el nivel de proteínas, la señal para que éstas sean eliminadas será el marcaje con ubiquitina o ubiquitinización de la proteína. El proceso de ubiquitinización se realiza en tres pasos en los que la ubiquitina se transfiere desde la enzima ubiquitin ligasa E1 a la enzima ubiquitin ligasa E2 y esta última es transferida al complejo ubiquitin ligasa E3, que además actúa como estructura para la proteína a la que hay que ubiquitinar (Hershko y Ciechanover, 1998). Posteriormente, esta proteína marcada pasaría al proteosoma, una macromolécula compleja que degrada las proteínas poliubiquitinizadas. Para ello, el núcleo principal 20S del proteosoma, debe unirse a la unidad reguladora 19S que reconoce el sustrato y elimina la ubiquitina (Tomko y Hochstrasser, 2013) (**Figura 3**).

La proteína FBXO7, forma parte como una subunidad del complejo ubiquitina-ligasa E3, también llamado SCF (SKP1/cullin-1/F-box) por las subunidades que lo componen (**Figura 3**). La función del complejo ubiquitina ligasa E3 es la ubiquitinización fosforilación dependiente de las proteínas que hay que eliminar (Zhou et al., 2018).

En este complejo, FBXO7 realiza el reclutamiento del sustrato a degradar y, además, juega un papel como regulador del proteosoma, interactuando directamente con la subunidad del proteosoma PSMA2, una proteína fundamental para el correcto funcionamiento del mismo (Vingill et al., 2016).

Por otro lado, FBXO7 también es la proteína encargada de realizar un reclutamiento efectivo de parkin en la mitocondria que esté dañada y así iniciar la mitofagia, un proceso fundamental para mantener la homeostasis mitocondrial (Zhou et al., 2015).

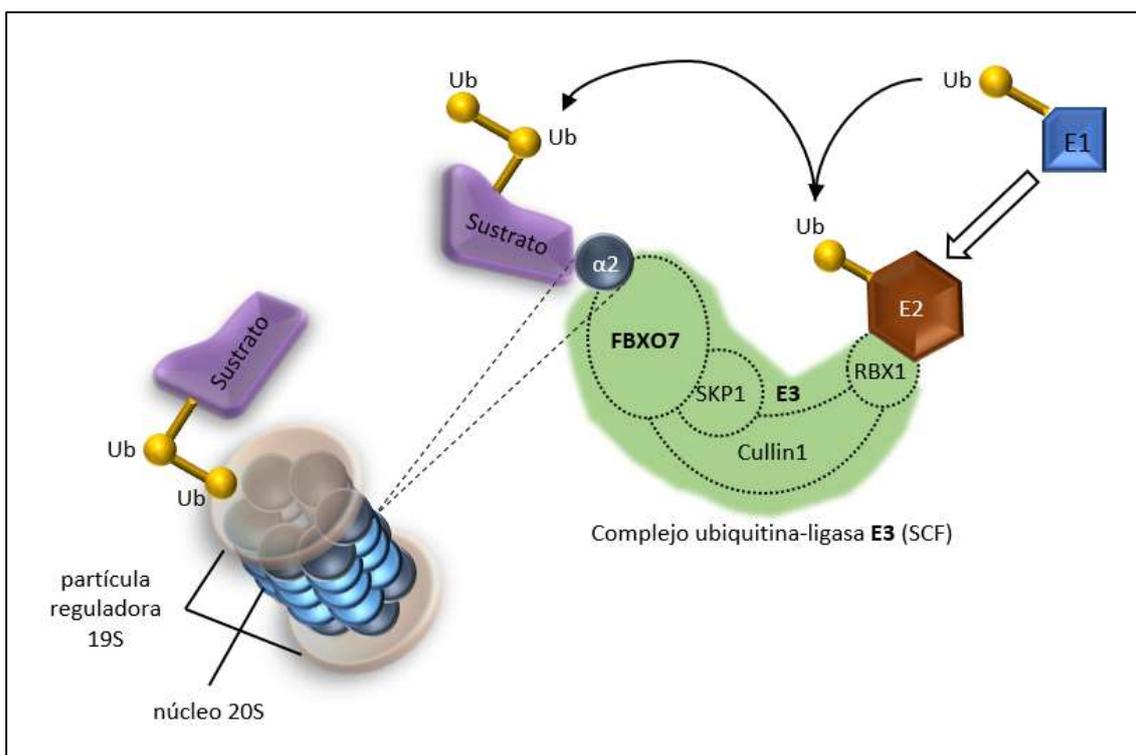


Figura 3. Sistema Ubiquitina-Proteosoma (Modificada de Joseph S, et al., 2018): En esta figura se representa el proceso de ubiquitinización y eliminación de sustrato en el proteosoma. En el primer paso la ubiquitina se transfiere a la enzima ubiquitin ligasa

E1, en el segundo paso esta ubiquitina se transfiere a la enzima ubiquitin ligasa E2 y en el tercer paso, E2 se aproxima en el espacio al sustrato a ubiquitinar gracias a la unión con la proteína RING-box protein 1 y al complejo ubiquitin ligasa E3 (SCF). El complejo E3 está formado por tres proteínas: SKP1; cullin-1;F-box7, y es FBXO7 quien realiza el reclutamiento del sustrato a degradar en el proteosoma. Además, FBXO7 se une directamente a la subunidad alfa2 del proteosoma (PSMA2), necesaria para la correcta actividad del proteosoma. El proteosoma está representado como un cilindro con el núcleo principal 20S que debe unirse a la unidad reguladora 19S que reconoce el sustrato y elimina la ubiquitina. E1: enzima ubiquitin ligasa E1; E2: enzima ubiquitin ligasa E2; FBXO7: Proteína F-box 7; PSMA2: subunidad del proteosoma α 2; RBX1: RING-box protein 1; SCF: SKP1-cullin1-F-box7; Ub: ubiquitina;

Capítulo 2. Hipótesis y objetivos

Objetivo principal

Mejorar el conocimiento sobre la semiología motora y los mecanismos moleculares en dos enfermedades monogénicas que causan trastornos del movimiento en la edad pediátrica, la distonía mioclónica (MD) y la distonía parkinsonismo con acumulación de hierro en ganglios basales (NBIA).

Objetivos secundarios

1. Describir los patrones distónicos de inicio precoz en pacientes pediátricos afectados de *SGCE*-MD
2. Diseñar y validar nuevas escalas clínicas para caracterizar y cuantificar la severidad de la distonía del escribiente y la distonía de la marcha en los pacientes pediátricos afectados de *SGCE*-MD.
3. Describir el espectro clínico-radiológico asociado a la enfermedad por defecto en el gen *FBXO7*.
4. Evaluar *in vitro* el impacto funcional de las variantes noveles identificadas en el gen *FBXO7* en una paciente con parkinsonismo-piramidalismo y neurodegeneración por acumulo de hierro.

Hipótesis

Las enfermedades genéticas que cursan con trastornos del movimiento de inicio en la infancia son enfermedades ultrararas e infradiagnosticadas. Alcanzar el diagnóstico

genético de estas enfermedades es importante para poder establecer los mecanismos moleculares subyacentes.

Asimismo, la evaluación de la semiología motora en estadios precoces, así como el desarrollo de escalas específicas, pueden ayudar al reconocimiento precoz de la enfermedad, la correcta monitorización clínica y la respuesta al tratamiento. En pacientes con distonía mioclónica asociada a mutaciones en *SGCE*, el patrón distónico tiene un debut muy precoz y se manifiesta durante el aprendizaje de ciertas actividades motoras propias de la edad pediátrica, como la marcha (caminar, correr) y la escritura. Por este motivo, es necesario desarrollar y validar nuevas escalas clínicas que permitan cuantificar la distonía durante dichas acciones. La caracterización del fenotipo distónico en edades precoces ayudará a la identificación precoz de esta enfermedad minoritaria, y, por ende, a su tratamiento en estadios iniciales del desarrollo de la enfermedad.

El parkinsonismo de inicio en la infancia es una entidad altamente infrecuente y a diferencia del parkinsonismo del adulto presenta fenotipos motores complejos. El síndrome de parkinsonismo-piramidalismo es una forma de presentación del parkinsonismo pediátrico producido por genes asociados a paraparesia espástica compleja, a parkinsonismo de inicio juvenil, a enfermedades neurodegenerativas con acumulación de hierro cerebral (NBIA) o errores innatos del metabolismo. El gen *FBXO7* es un gen que, hasta la fecha, se ha asociado principalmente con parkinsonismo aislado, paraparesia espástica y parkinsonismo-piramidalismo de inicio juvenil con respuesta a L-DOPA. La clínica de los pacientes con defecto en *FBXO7* se solapa con la de otros genes NBIA como el *PLA2G6* o el *ATP13A2*, sin embargo, la neuroimagen asociada a los pacientes con defectos en *FBXO7* suele ser inespecífica a diferencia de los genes NBIA.

Por este motivo, la identificación de un nuevo fenotipo asociado al defecto en FBXO7 que, además de características clínicas, comparte también la presencia de imágenes sugestivas de depósito de hierro puede aportar evidencia sobre mecanismo moleculares subyacentes compartidos de estas enfermedades neurodegenerativas.

Capítulo 3. Material y métodos

Cohorte *SGCE-MD*

Inclusión de pacientes con distonía combinada con mioclonías (distonía mioclónica) y debut en la edad pediátrica

Pacientes con sospecha de fenotipo clínico de distonía mioclónica (MD) procedentes de diferentes centros hospitalarios de España y Grecia, han sido incluidos en una cohorte de pacientes existente desde Septiembre 2016 hasta Septiembre 2020. Los pacientes han sido identificados en su centro de origen por neuropediatras y neurólogos pertenecientes a la Sociedad Española de Neurología Pediátrica (SENEP) o la Sociedad Española de Neurología (SEN), así como, a través de la asociación de española de pacientes con distonía mioclónica (ALUDME, www.aludme.org). Los pacientes se han incluidos siguiendo los criterios clínicos diagnósticos de Roze et al. (2018) si presentaban mioclonías o distonía mioclónica con predominio de las mioclonías, edad de inicio de los síntomas antes de los 18 años, y sin presentar otras manifestaciones neurológicas. (Roze et al., 2018)

Análisis del fenotipo clínico

En todos los pacientes se han recogido los datos demográficos y clínicos relacionados con su enfermedad a través de un cuestionario (*Checklist* MDS). Se han evaluado clínicamente de forma sistemática en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH) o en el hospital de origen junto a su médico de origen (Hospital Reina Sofía, Córdoba y Hospital Virgen del Rocío, Sevilla).

Evaluación motora a través de escalas clínicas

En la evaluación clínica se ha realizado una exploración con vídeo-protocolo desarrollado por nuestro grupo (Vanegas et al., 2020) que nos ha permitido la evaluación de las mioclonías a través de la escala Unified Myoclonus Rating Scale (UMRS) así como la distonía. La severidad de la distonía ha sido evaluada a través de la escala Burke-Fahn-Marsden Dystonia Rating Scale (BFMDRS) y utilizando tres escalas específicas para distonía de acción: Writer's Cramp Rating Scale (WCRS) (Wissel et al., 1996) para la distonía asociada a la escritura en pacientes mayores de 5 años (la edad a la que el agarre en trípode del lápiz ya es madura), su versión modificada (Writer's Cramp Rating Scale + Shoulder: WCRS+S) y la nueva escala análoga desarrollada por nuestro grupo para valorar específicamente la distonía de la marcha (Gait Dystonia Rating Scale (GDRS).

Escala modificada Writer's cramp Rating Scale

Para la distonía de la escritura se utilizó la Writer's Cramp Rating Scale, una escala desarrollada para la evaluación del espasmo del escribiente en adultos que tiene dos *scores* principales: El *score* "movimiento durante la escritura" con un rango de puntuación que va de 0-28 y el *score* "velocidad del movimiento" con un rango de puntuación de 0-2. Para obtener el resultado del *score* "movimiento durante la escritura" se puntúa la severidad de la postura distónica en codo (0-2), muñeca (0-4) y en los tres primeros dedos (0-6), multiplicando esta puntuación por dos si la distonía empieza desde el inicio de la escritura o por uno si permite que se escriban las primeras tres letras sin distonía (latencia), a dicha puntuación se le suma si existe un temblor distónico (0-2). En resumen, la fórmula de esta escala es la siguiente:

$$(\text{Severidad} \times \text{latencia}) + (\text{temblor} \times 2) \text{ (Wissel et al., 1996)}$$

En el presente estudio, partiendo de la hipótesis que en los pacientes con *SGCE*-MD pudiese haber también implicación de la musculatura proximal de miembros superiores, realizamos una modificación de la escala añadiendo la puntuación referente a las posturas distónicas del hombro durante la escritura y eliminando el ítem de temblor distónico por su poca frecuencia observada en series anteriores (WCRS+S) (**Tabla 4**).

Writer's cramp Rating Scale + Shoulder (WCRS+S)				
Part A: Writing Movement score				
1. Dystonic posture				
Shoulder score (SS)				
Pathological abduction		Pathological adduction		
0	no	0		
1	moderate	1		
2	marked	2		
Pathological Elevation		Pathological Depression		
0	no	0		
1	moderate	1		
2	marked	2		
				SS__ (0-4)
Elbow score (ES)				
Pathological flexion		Pathological extension		
0	no	0		
1	moderate	1		
2	marked	2		
				ES__ (0-2)
Wrist score (WRS)				
Pathological flexion		Pathological extension		
0	no	0		
1	moderate	1		
2	marked	2		
Pathological ulnar abduction		Pathological radial-abduction		
0	no	0		
1	moderate	1		
2	marked	2		
				WRS__ (0-4)

Finger score (FS)			
Finger I:			
Pathological flexion		Pathological extension	
0	no	0	<input type="text"/>
1	moderate	1	<input type="text"/>
2	marked	2	<input type="text"/>
Finger II:			
Pathological flexion		Pathological extension	
0	no	0	<input type="text"/>
1	moderate	1	<input type="text"/>
2	marked	2	<input type="text"/>
Finger III:			
Pathological flexion		Pathological extension	
0	no	0	<input type="text"/>
1	moderate	1	<input type="text"/>
2	marked	2	<input type="text"/>
			FS_(0-6)
2. Latency of dystonia (L)			
At least 3 letters possible		1	<input type="text"/>
With the start of writing		2	<input type="text"/>
			L_(1-2)
Part B: Writing Speed score			
Writing speed			
normal		0	<input type="text"/>
mild slowing		1	<input type="text"/>
severe slowing		2	<input type="text"/>
			WS_(0-2)
Writing movement score = (SS+ES+WRS+FS) x L (0-32)			
Writing speed score = WS (0-2)			

Tabla 4. Escala modificada de la distonía de la escritura o *Writer's cramp Rating Scale* + *Shoulder (WCRS+S)* (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 Supplementary Table 1)

Nueva escala desarrollada: Gait Dystonia Rating Scale

Para evaluar la distonía de la marcha utilizamos una nueva escala diseñada de forma análoga a la WCRS, con el nombre de “Gait Dystonia Rating Scale” (GDRS). Esta escala

está compuesta por dos *subscores* principales, el *score* “movimiento de marcha” con un rango de puntuación de 0-20 y “velocidad de marcha” con un rango de puntuación de 0-2 (**Tabla 5**). La GDRS puntúa la severidad de las posturas distónicas durante la marcha en miembros inferiores (cadera, rodilla y tobillo (0-12), la reducción de braceo o postura distónica de los brazos (0-4) y la inclinación del tronco (0-4). La velocidad de marcha se puntúa en función de si la acción se realiza con velocidad normal (0), enlentecimiento leve (1) o enlentecimiento moderado-severo (2).

Además de la evaluación de la severidad de las posturas distónicas de acción durante escritura y marcha, a través de las escalas también se ha investigado la presencia de patrones distónicos, truco sensitivo, overflow y temblor distónico.

Gait Dystonia Rating Scale			
Part A: Gait Movement score			
1. Hip dystonic posture: pathological flexion/extension, internal/external rotation or abduction/adduction of the hip			
Left hip score ___ (0-2)	<i>no</i>		0
Right hip score ___ (0-2)	<i>moderate</i>		1
Total hip score (Left + Right hip score) HS ___ (0-4)	<i>marked</i>		2
2. Knee dystonic posture: pathological flexion/extension			
Left knee score ___ (0-2)	<i>no</i>		0
Right knee score ___ (0-2)	<i>moderate</i>		1
Total knee score (Left + Right knee score) KS ___ (0-4)	<i>marked</i>		2
3. Ankle dystonic posture: pathological flexion/extension or inversion/eversion			
Left ankle score ___ (0-2)	<i>no</i>		0
Right ankle score ___ (0-2)	<i>moderate</i>		1
Total ankle score (Left + Right ankle score) AS ___ (0-4)	<i>marked</i>		2
4. Trunk pathological bending			
	<i>no</i>		0
Trunk score ___ (0-4)	<i>moderate</i>		2
TS ___ (0-4)	<i>marked</i>		4
5. Arm swing			
Left arm score ___ (0-2)	<i>normal</i>		0
Right arm score ___ (0-2)	<i>moderate</i>		1
ASS ___ (0-4)	<i>marked</i>		2
Part B: Gait Speed score			
Walking/Running speed			
	<i>normal</i>		0
	<i>mild slowing</i>		1
GS__ (0-2)	<i>severe slowing</i>		2
Gait movement score = HS+KS+AS+TS+ASS (0-20)			
Gait speed score = GS (0-2)			

Tabla 5. Escala desarrollada para la evaluación de la distonía de la marcha o Gait Dystonia Rating Scale (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 Supplementary Table 2)

Cuestionario de discapacidad asociada a la escritura y a la marcha en SGCE-MD

Por último, hemos investigado la discapacidad funcional asociada a la escritura y a la marcha a través de un cuestionario para el evaluador y para el/la paciente (**Tabla 6**).

Patient questionnaire (A, B) and rating scores while performing writing and walking test (C, D)
A. Self-reported difficulties in handwriting
0 = my handwriting is normal 1 = writing is more difficult, but I can write legibly 2 = it is difficult to read my writing 3 = my writing is illegible 4 = I cannot hold or control the pen to write
B. Self-reported difficulties in walking
0 = I walk normally 1 = I can walk without difficulty, but I am a little unsteady 2 = I can walk with difficulty, but I don't need help 3 = I can walk if someone holds on to me 4 = I cannot walk
C. Impairment on handwriting
0 = normal 1 = mild sloppiness but easily legible 2 = illegible 3 = cannot complete the words 4 = cannot hold the pen or keep the pen on the paper
D. Impairment on walking
0 = normal gait 1 = slightly abnormal. Independent gait; hardly noticeable 2 = moderately abnormal. Independent gait; occasional falls 3 = considerably abnormal, independent gait, frequent falls 4 = needs assistance to walk 6 = wheelchair bound.

Tabla 6. Cuestionario para pacientes y evaluadores de discapacidad asociada a escritura y marcha (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 Supplementary Table 3)

Análisis genético

Se ha incluido una cohorte de 49 pacientes con *SGCE*-MD con confirmación genética realizada de acuerdo con el siguiente algoritmo genético: (1) secuenciación Sanger del gen *SGCE* para la detección de variantes patogénicas. En aquellos casos negativos, se realiza (2) un estudio genético para la detección de duplicaciones o deleciones (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; MLPA) en el gen *SGCE* (SALSA MLPA Probemix P099 GCH1-TH-SGCE-PRRT2; MRC Holland, Ámsterdam, Países Bajos) y si éste es negativo, se continúa el estudio genético con (3) la secuenciación del exoma completo (*whole exome sequencing*; WES).

Análisis estadístico

Se han analizado los videos de 49 pacientes con *SGCE*-MD mediante un protocolo estandarizado (Vanegas et al., 2020) con el objetivo de caracterizar la distonía tarea-específica en estadios precoces de la enfermedad con la ayuda de escalas específicas modificadas (Writer's Cramp Rating Scale (WCRS) (Wissel et al., 1996) y desarrolladas por nuestro grupo (Gait Dystonia Rating Scale (GDRS)) ambas nombradas previamente. **(Figura 4)** El análisis de los datos se ha realizado con SPSS Statistics 20 (IBM, Nueva York, EEUU). En los datos descriptivos se han incluido medias, con desviaciones estándar para los datos demográficos o medias con rangos para los datos cuantitativos procedentes de las escalas y frecuencias con porcentajes para las variables cualitativas. La comparación de medianas entre las escalas se realizó con el test de Wilcoxon. Para evaluar si existe correlación entre las puntuaciones de severidad en distonía de las diferentes escalas (WCRS+S, GDRS y BFMDRS), las puntuaciones en discapacidad y

con la edad, se ha utilizado el test no paramétrico Spearman rank test. Se ha establecido como significativo $p < 0.05$

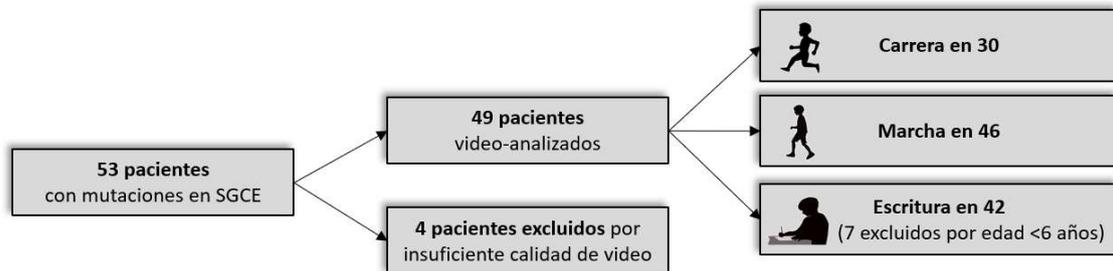


Figura 4. Diagrama de flujo de la selección de pacientes pediátricos afectados por SGCE-MD y análisis de distonía tarea-específica. De los 53 pacientes se descartaron 4 pacientes por insuficiente calidad del video. De los 49 pacientes se excluyeron los pacientes menores de 6 años para analizar la distonía asociada a la escritura. Fue posible analizar la marcha caminando en 46 pacientes y corriendo en 30 pacientes.

Cohorte NBIA

Selección de paciente

La paciente con un fenotipo de trastorno motor complejo tipo parkinsonismo-piramidalismo y curso progresivo con imágenes sugestivas de acúmulo de hierro cerebral portadora de una variante en homocigosis en el gen *FBXO7* procede de una cohorte de pacientes con trastorno del movimiento de inicio en la infancia en los que se ha identificado alteraciones en la neuroimagen sugestivas de depósito de hierro (NBIA). Esta cohorte está formada por pacientes procedentes de diferentes centros hospitalarios de España, Portugal y Grecia, incluidos desde Septiembre 2015 hasta Septiembre 2020 (Proyecto La Marató de TV3 2015-2018, Proyecto CoA Therapeutics). En todos los pacientes incluidos en esta serie se ha realizado un análisis del fenotipo clínico a través de examen neurológico sistemático, escalas específicas para la valoración de distonía

(BFMDRS, Barry-Albright Dystonia Scale (BAD)), de parkinsonismo (Unified Parkinsonian Disease Rating Scale) y análisis del fenotipo radiológico a través de una valoración conjunta con el equipo de neuro-radiología pediátrica de HUVH para definir el patrón de depósito de hierro en ganglios basales en las de secuencias de susceptibilidad magnética (SWI) o *gradient recalled echo* (GRE).

Análisis genético

En esta paciente con parkinsonismo-piramidalismo y NBIA se identificó una variante en homocigosis en el gen *FBXO7* mediante el análisis de un panel de más de 400 genes relacionados con trastornos del movimiento (Supplementary material Correa-Vela et al., 2019) tras obtener resultado negativo en la secuenciación Sanger y MLPA de los genes *PANK2/PLA2G6* (SALSA MLPA Probemix P120 PANK2/PLA2G6; MRC Holland, Amsterdam, Países Bajos) y en el CGH array.

Evaluación del impacto funcional de la variante c.368C>G encontrada en el gen *FBXO7*

Para validar la patogenicidad del cambio, y su asociación con este nuevo fenotipo se han realizado los siguientes estudios funcionales en colaboración con otros grupos de investigación.

En colaboración con el laboratorio de la Dra. Carmen Espinós (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia):

1. Obtención y cultivo de una biopsia de piel para la obtención de fibroblastos humanos de la paciente y de sujeto control.
2. Cultivo de fibroblastos de la paciente y control.

3. Extracción de proteína total a partir de fibroblastos y estudio de expresión proteica por western-blot para cuantificar los niveles de proteína FBXO7.
4. Extracción de mRNA y cuantificación de éste, con y sin emetina, con el objetivo de evaluar el efecto de la variante sobre la transcripción del gen, así como su efecto sobre la traducción mediante el mecanismo de *nonsense-mediated-decay* (NMD).

Biopsia de piel y cultivo de fibroblastos

Se ha realizado biopsia de piel y cultivo de fibroblastos del paciente y en dos controles en medio DMEM alto en glucosa (4.5 g/L; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) conteniendo 10% (v/v) suero bovino fetal suplementado con 2 mM de glutamina, 100 IU/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Análisis de Western-Blot

Para detectar proteína FBXO7 a través del análisis de western-blot (WB), los fibroblastos fueron lavados con PBS, centrifugados y el pellet celular ha sido lisado con buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM DTT, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate). El lisado celular total (TCL) y extracto proteico fue cuantificado usando el método BCA (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, MA, USA); utilizando una cantidad total de 25 µg para el análisis de WB. Los anticuerpos y sus diluciones correspondientes están indicados en el material suplementario del artículo Correa-Vela et al., 2019 (Supplementary material Correa-Vela et al., 2019). El WB se realizó por triplicado y se utilizó el test de student para el análisis estadístico.

Ensayo de la actividad *nonsense-mediated-decay*

Para evaluar el posible efecto del mecanismo de “*nonsense mediated decay*” en los transcritos de *FBXO7* se midió la qPCR de fibroblastos en sujetos controles y en el probando con y sin emetina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los fibroblastos se cultivaron en 100 µg/mL de emetina a 37°C durante 6 h antes de la extracción de RNA total. El cDNA fue obtenido con qScript cDNA SuperMix (Quantabio, Beverly, MA, USA) y una cantidad de 0.5 µL se utilizó para cada reacción qPCR usando Perfecta SyberGreen Mix (Quantabio, Beverly, MA, USA).

La siguiente pareja de primers para amplificar *FBXO7* fueron utilizados:

5'-AGTCCCTGCTGTGCACCTG-3' 5'-CGCTGGAATGTCATCTTGAAGA-3'.

Los ensayos se realizaron en sistema termociclador LightCycler® 480 (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA) y los resultados analizados con Fit Points y el software LightCycler® 480 SW 1.5. La expresión de *FBXO7* se normalizó con niveles de *GAPDH levels* y el método *2-ΔΔCT method* se utilizó para su cuantificación relativa. La expresión de *FBXO7* en los fibroblastos de los sujetos sanos sin tratamiento se asumió como fibroblastos control y los niveles de expresión de las otras muestras se calcularon en relación a la expresión de los controles. Se replicó el resultado en tres ocasiones y se realizaron para cada condición tres reacciones de cuantificación qPCR. Se utilizó el test estadístico t-Student para analizar los datos.

Posteriormente, con el objetivo de poder explicar mejor la implicación de este gen en el nuevo fenotipo se han realizado los siguientes estudios en colaboración con la Dra. Marta

Martínez del laboratorio del Dr. Miquel Vila (Laboratorio de Enfermedades neurodegenerativas, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona):

1. Ensayo de la actividad del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS)
2. Cuantificación de niveles de proteínas poliubiquitinizadas
3. Aislamiento de mitocondrias y detección de marcadores mitocondriales de mitofagia VDAC, PINK1, Parkin, pUB-K63
4. Estudio de microscopía electrónica

Ensayo de la actividad del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS)

Los fibroblastos fueron lisados en 10 mM Tris pH 7.8, 1 mM EDTA, 5 mM Mg₂Cl₂, 0.1% Triton X-100. La actividad quimiotripsina-*like* se determinó utilizando un extracto celular total de 10 µg en un volumen de *buffer* de actividad del proteosoma (10 mM tris pH 7.8, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5 mM Mg₂Cl₂, 2 mM ATP), con una incubación de 60 minutos a 37 °C con 0.5 mM de sustrato fluorescente Z-Leu-Leu-Glu-AMC (Z-LLE-AMC) (Enzo, New York, NY, USA). La intensidad de la fluorescencia se cuantificó a través del lector *Flx800 multi-detection microplate reader* (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) con una excitación y emisión de longitud de onda de 360 y 460 nm, respectivamente.

Cuantificación de proteínas poliubiquitinizadas

Los fibroblastos fueron lavados con PBS, centrifugados a 800 g, 4° durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 100 de *buffer* de lisis (Tris pH 7.5 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%) con inhibidores de proteasa, sonicados y cuantificados con el ensayo BCA Protein (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Las muestras se calentaron

durante 5 minutos a 95° tras añadir *buffer* 6x que contiene Tris 500 mM, 30% glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10% SDS y 0.6 M DTT. Las proteínas fueron separadas con SDS-PAGE en porcentajes desde un 8 a un 12% de geles de poliacrilamida durante 90 min a 120 V en un *running buffer* (25 mM Trizma R Base, 192 mM glicina y 1% SDS). Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 90 minutos a 200 mA en un *buffer transfer gel* (25 mM Trizma R Base, 192 mM glicina y 20% metanol) y después bloqueada con leche en polvo sin grasa al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (ver Anexo en material suplementario de Correa-Vela et al., 2019), diluido en un suero de albúmina bovina al 4% en PBS durante una noche a 4°C. Posteriormente, se incubó con los correspondientes anticuerpos secundarios emparejados con peroxidasa *horseradish* y diluido al 5% leche/PBS durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente, las proteínas se revelaron utilizando el sustrato West Pico SuperSignal o SuperSignal West Femto (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) en un sistema de imagen ImageQuant RT ECL (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Los *immunoblots* se cuantificaron por densitometría utilizando ImageJ 1.50a.

Aislamiento de mitocondrias y detección de marcadores mitocondriales de mitofagia VDAC, PINK1, Parkin, pUB-K63

Se aislaron fracciones enriquecidas en mitocondrias de los fibroblastos con *Mitochondrial Isolation Kit* para células de mamíferos (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) según las instrucciones del fabricante. Estas fracciones mitocondriales fueron resuspendidas en un *buffer* de lisis (Tris pH 7.5 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%) con inhibidores de la proteasa y cuantificados con BCA. La inmunodetección de los

marcadores proteicos de mitofagia (PINK1, Parkin, polyUb-K63, VDAC) se realizó con western blot.

Estudio en microscopio electrónico

Para los estudios en microscopio electrónico, los fibroblastos *wild-type* y los del paciente se cultivaron en *Lab-Tek Permanox Chamber slide pf 4 wells* (Nalge Nunc International, Naperville, IL), lavados con *buffer* fosfato 0.1M (PB) y fijados al con glutaraldehído al 3% en *buffer* fosfato 0.1M durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PB 0.1M PB, y las muestras se mantuvieron a 4°C en el mismo *buffer*. Las muestras se fijaron en OsO₄ al 2% durante una hora a temperatura ambiente y se tiñeron en acetato de uranilo al 2% en un ambiente oscuro durante 2 horas a 4 °C. En un siguiente paso, fueron lavadas en agua destilada, deshidratadas en etanol e infiltradas durante una noche en resina Durcupan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Tras la polimerización, los cultivos se sacaron de los pozos y se pegaron a bloques de Durcupan. Por último, se hicieron cortes ultrafinos (0.08 μm) con *Ultracut UC-6* (Leica microsystems, Wetzlar, Germany), y se tiñeron con citrato de plomo (Reynolds solution) y fueron examinados en un microscopio de transmisión de electrones *FEI Tecnai Spirit BioTwin* (ThermoFisher Scientific, Oregon, USA), usando una cámara digital Morada (Olympus Soft Image Solutions GmbH, Münster, Germany).

Capítulo 4. Resultados *Early recognition of SGCE-myoclonus-dystonia in children*

Los resultados en referencia a los objetivos (1) y (2) están expuestos en el artículo:

Received: 30 November 2021 | Accepted: 3 May 2022
DOI: 10.1111/dmcn.15298

ORIGINAL ARTICLE

Early recognition of SGCE-myoclonus-dystonia in children

Marta Correa-Vela^{1,2,7} | Joao Carvalho^{3,7} | Julia Ferrero-Turrion¹ | Ana Cazorro-Gutiérrez¹ |
María Vanegas^{1,4} | Victoria Gonzalez⁵ | Ramiro Álvarez⁶ | Anna Marcé-Grau¹ |
Antonio Moreno^{2,7,8} | Alfons Macaya-Ruiz^{1,2,9} | Belén Pérez-Dueñas^{1,2,8,9} 

¹Department of Pediatric Neurology, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Pediatric Department of Pediatrics, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
²Pediatric Neurology, Centro de Diagnóstico de la Crianza Tierrado da Silva, Hospital Garcia de Orta, Almada, Portugal
³Pediatric Department, Evelina Children's Hospital, London, UK
⁴Department of Neurology, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain
⁵Department of Neurology, Hospital Germans Trias, Barcelona, Spain
⁶Department of Pediatrics, Vall d'Hebron Hospital Campus, Barcelona, Spain
⁷CIBER of Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain
⁸Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain

Correspondence
Belén Pérez-Dueñas, Pediatric Neurology Research Group, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Passeig Vall d'Hebron 119-128, 08035 Barcelona, Spain.
Email: belen.perez@vhir.org

Funding information
Grant from Myoclonus Dystonia Syndrome Spanish association (ALUDME); Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Number: PI 18/0319

Abstract
Aim: To evaluate early dystonic features in children and adolescents with SGCE-myoclonus-dystonia.
Method: In this cross-sectional study, 49 patients (26 females and 23 males) with SGCE-myoclonus-dystonia (aged 15y 2mo, SD 12y) with childhood-onset (2y 10mo, SD 1y 10mo) dystonia were examined using a standardized video recorded protocol. Dystonia was rated using the Writer's Cramp and Gait Dystonia Rating Scales. Disability and impairment for handwriting and walking were also rated.
Results: Dystonia was present at rest ($n=1$), posture ($n=12$), and during specific motor tasks ($n=45$) such as writing ($n=35$), walking ($n=23$), and running ($n=20$). Most children reported disability while performing these tasks. Early dystonic patterns were identified for writer's cramp and gait dystonia, the latter named the 'circular shaking leg', 'dragging leg', and 'hobby-horse gait' patterns. Sensory tricks were used by five and eight children to improve dystonia and myoclonus during writing and walking respectively. The rating scales accurately measured the severity of action dystonia and correlated with self-reported disability.
Interpretation: Children with SGCE-myoclonus-dystonia show recognizable dystonic patterns and sensory tricks that may lead to an early diagnosis and timely therapeutic approach. Isolated writer's cramp is a key feature in childhood and should prompt SGCE analysis. The proposed action dystonia scales could be used to monitor disease course and response to treatment.

Myoclonus-dystonia syndrome is a childhood-onset movement disorder related to mutations in the SGCE gene.¹ The gene encodes e-sarcoglycan, a transmembrane protein with a brain-specific isoform. This genetic defect has autosomal dominant transmission with reduced penetrance because of maternal imprinting.² The myoclonus phenotype of SGCE-myoclonus-dystonia has been extensively assessed in previous studies, including our own paediatric cohort.³⁻⁵ In these studies, myoclonus has been reported to be more severe than dystonia. However, the dystonic phenotype has been evaluated mostly with the Burke-Fahn-Marsden Dystonia Rating Scale (BFMDRS), a scale designed for primary generalized dystonia. Because dystonia in patients with SGCE-myoclonus-dystonia is predominantly task specific and shows a segmental distribution, there could have been a

Abbreviations: BFMDRS, Burke-Fahn-Marsden Dystonia Rating Scale; GDRS/Gait Dystonia Rating Scale; WCRS, Writer's Cramp Rating Scale; WCRS-5, Writer's Cramp Rating Scale - 5 Shocks.
⁷These authors contributed equally to this paper.

Dev Med Child Neurol. 2022;00:1-8. | wileyonlinelibrary.com/journal/dmcn | © 2022 Mac Keith Press. | 1

Correa-Vela M, Carvalho J, Ferrero-Turrion J, Cazorro-Gutiérrez A, Vanegas M, Gonzalez V, Álvarez R, Marcé-Grau A, Moreno A, Macaya-Ruiz A, Pérez-Dueñas B. **Early recognition of SGCE-myoclonus-dystonia in children.** Dev Med Child Neurol. 2022 Jun 20. doi: 10.1111/dmcn.15298. Epub ahead of print. PMID: 35723607.

Los principales resultados del artículo son los siguientes:

1. La distonía acción dependiente es muy frecuente, siendo la distonía de la escritura la más observada y el único signo distónico en miembros superiores en un tercio de los pacientes. La distonía postural es infrecuente y la de reposo extremadamente rara.
2. Las características observadas en el espasmo del escribiente a diferencia de la forma idiopática propia del adulto son: mayor presencia de distribución segmentaria incluyendo al hombro y la ausencia de temblor distónico asociado.
3. Se han observado cuatro patrones de distonía del escribiente: el distal y otros tres en los que el hombro está afectado. (**Figura 6**).
4. Hemos observado distonía de la marcha en más de la mitad de los pacientes durante la carrera y en la mitad de los pacientes caminando. La distonía en miembros superiores es la región más frecuentemente afectada también durante la marcha (50%), seguida de los miembros inferiores (43%) y la musculatura axial (13%).
5. Dos patrones de marcha distónica que afecta la musculatura en miembro inferior de forma segmentaria son: el “*circular shaking leg*” o patrón flexor y el patrón “*dragging leg*” o patrón extensor. Este último, también se manifiesta como un patrón de carrera con trote o “*hobby horse ride*”. La distonía de tronco durante la marcha ha sido observada en dos pacientes de la serie (**Figura 7**).
6. En este estudio, identificamos trucos sensitivos utilizados por los pacientes de forma espontánea en el 34% y al caminar y en el 14% durante la escritura. El truco más utilizado ha sido el “self-touching”. Se observó una mejoría en la realización

de la acción junto con la velocidad de la tarea, así como una disminución de las sacudidas mioclónicas en algunos de los pacientes.

7. Hemos encontrado una discapacidad para la escritura en más de la mitad de los pacientes y para caminar en un tercio de los pacientes.
8. Utilizando las escalas propuestas Writer's Cramp Rating Scale y su versión modificada (WCRS+S), así como la Gait Dystonia Rating Scale se han obtenido unos valores mediana en el tercio inferior del valor total de la escala para la distonía de la escritura y de la marcha.
9. Ambas escalas presentaron buena correlación con la escala Burke-Fahn-Marsden (BFMDRS) lo que nos confirma la validez de constructo y mejores datos de aceptabilidad.

Early recognition of SGCE-myoclonus dystonia in children

Correa-Vela M^{1,2*}, Carvalho J^{3*}, Cazurro-Gutiérrez A¹, Vanegas M^{1,4}, González V⁵,
Álvarez R⁶, Marcé-Grau A¹, Moreno A^{2,7}, Macaya A^{1,2,8}, Pérez-Dueñas B^{1,2}

Dev Med Child Neurol. 2022 Jun 20.

Abstract

Aim

In the present cross-sectional study, we aimed to evaluate early dystonic features in children and adolescents with *SGCE*-MD.

Methods

Forty-nine *SGCE*-MD patients (15.2±12 years) with childhood-onset (2.8±1.8 years) dystonia were examined using a standardized video-taped protocol. Dystonia was rated using the Writer's Cramp and Gait Dystonia Rating Scales. Disability and impairment for handwriting and walking was also rated.

Results

Dystonia was present at rest (2%), posture (26%) and during specific motor tasks (92%), such as writing (83%), walking (50%) and running (67%). The majority of children reported disability while performing these tasks. Early dystonic patterns were identified for writer's cramp and gait dystonia, the latter named the "circular shaking leg", "dragging leg" and "hobby-horse gait" patterns. Sensory tricks were used by 14-34% of children to improve dystonia and myoclonus. The rating scales accurately measured the severity of action dystonia and correlated with self-reported disability.

Conclusions

Children with *SGCE*-MD show recognizable dystonic patterns and sensory tricks that may lead to an early diagnosis and timely therapeutic approach. Isolated writer's cramp is a key feature in childhood and should prompt *SGCE* analysis. The proposed action dystonia scales could be used to monitor disease course and response to treatment.

Introduction

Myoclonus-dystonia syndrome (MD) is a childhood onset movement disorder related to mutations in *SGCE*.¹ The gene encodes ϵ -sarcoglycan, a transmembrane protein with a brain-specific isoform. This genetic defect has autosomal dominant transmission with reduced penetrance because of maternal imprinting.²

The myoclonus phenotype of *SGCE*-MD has been extensively assessed in previous studies, including our own paediatric cohort^{3,4,5}. In these studies, myoclonus has been reported to be more severe than dystonia. However, the dystonic phenotype has been evaluated mostly with the Burke-Fahn-Marsden dystonia rating scale (BFMDRS), a scale designed for primary generalised dystonia. Because dystonia in patients with *SGCE*-MD is predominantly task specific and shows a segmental distribution, there could be a tendency to underestimate the severity of dystonia in previous studies.

In adult patients with *SGCE*-MD, dystonia is present in more than a half of cases.^{1,3,5} It predominates in the upper limbs and cervical region, and follows a segmental or multifocal distribution.^{1,3,6,7} Unfortunately, the majority of *SGCE*-MD series include a small number of paediatric patients and thus, dystonic features in children are poorly recognised, and this could contribute to misdiagnosis.^{1,3,6,7} According to available data, children with *SGCE*-MD manifest a phenotype of myoclonus involving the upper body,

combined with a distinct evolving dystonic phenotype that frequently originates in the lower limbs causing gait impairment and frequent falls.^{5,8-10}

Moreover, current diagnosis criteria for MD do not apply to the paediatric population, as they include the sensitivity of alcohol of motor features, the coexistence of psychiatric features that are not observed in the first years of life, or features that appear in the long-term, such as the spontaneous remission of limb dystonia after childhood.¹¹⁻¹³

In contrast to the limited efficacy of medical treatment, deep brain stimulation (DBS) leads to a sustained improvement of dystonia and myoclonus in *SGCE*-MD. Unfortunately, the average age of surgery is between 30-50 years old and children and young adults suffer from physical and social burdens for many years.^{14,15} Consequently, efforts are necessary to improve early recognition and therapeutic interventions in the pediatric age.

The aim of this study was to recognize early signs of dystonia in a large series of children and young adults with *SGCE*-MD. We also explored rating tools to better characterise dystonic patterns during writing, walking and running, which are the most relevant motor tasks that are impaired by dystonia in *SGCE*-MD patients, and are thus important therapeutic targets in early stages of evolution.

Methods

Patient recruitment

Patients with genetically confirmed *SGCE*-MD were included between 2016 and 2019 in this cross-sectional study. Written informed consent was obtained. The Ethics Committee at Vall d'Hebron Hospital (PR(AMI)205/2021), Barcelona, approved the study.

Clinical assessment

A detailed description of myoclonus in 43 out of 49 patients from this cohort has been recently published³. Three movement disorders experts (MCV, JC and BPD) analysed dystonia following a standardised videotaped examination protocol during rest, posture and specific actions for upper limbs (writing, finger-nose test, pouring water and using a spoon) and lower limbs (walking and running).³ We recorded dystonic patterns, sensory tricks, mirror and overflow dystonia, and tremor.

Writing dystonia was assessed with the Writer's Cramp Rating Scale (WCRS) in patients older than 5 years.¹⁶ With the hypothesis that writer's cramp could involve upper limb proximal muscles, we modified the WCRS to score shoulders (WCRS+S) (**Supp. Table 1**). Gait dystonia was assessed during walking and running with the newly developed Gait Dystonia Rating Scale (GDRS), which consists of two sub score, the gait movement score and the gait speed score. (**Supp. Table 2**). The GDRS rated the severity of dystonic features during gait at the lower limbs (including the hip, knee and ankle (0-12), the reduction of arm swings due to dystonia (0-4) and the severity of trunk bending (0-4) (total sum 0-20). The gait speed was scored as normal (0), mild slow (1) or moderate-severe slow (2).

We also investigated handwriting and walking functional impairment, as well as self-reported difficulties for both activities. (**Supp. Table 3**).

Statistical analysis

Data analyses were conducted using SPSS Statistics 20. Descriptive data included means, standard deviations (demographic data), or medians and total ranges (rating tools) for quantitative variables, and frequencies and percentages for qualitative variables.

Medians' scores for GDRS during walking and running were compared using the Wilcoxon test. Sensitivity of scales were estimated with the proportion of patients who scored higher than “0” in action dystonia scales compared to the patients identified with action dystonia following the clinical standardized assessment.

We used the nonparametric Spearman rank test for correlations of dystonia severity scores (WCRS+S, GDRS and BFMDRS) disability scores and age. Significance was set to 0.05.

Results

Videos of 49 *SGCE*-MD patients (mean age 15.2 ± 12 ; range 2.5-51) were analysed, 78% of whom were younger than 18 years. Patients were 53% female and 47% male. The mean age at symptom onset was $2.8 (\pm 1.8)$ years (range 0.5-8).

Action dystonia was present in 45/49 (92%) patients, postural dystonia on stretched arms in 12/47 (26%) and resting dystonia in 1/49 patients (2%).

Sensory tricks

Sensory tricks were present in 8/23 (34%) patients during walking and 1/20 (5%) during running. Tricks were characterised by putting hands into pockets, self-touching or holding another person's hand (**Video 1A**).

On writing 5/35 (14%) patients used a gentle touch of the writing arm (wrist, fingers and nail) by the contralateral hand (**Video 1B**).

All patients showed an improvement of the dystonic posture and speed of action when using the tricks during writing (**Figure 1E-F, Video 1B**) and walking (**Video 1A**).

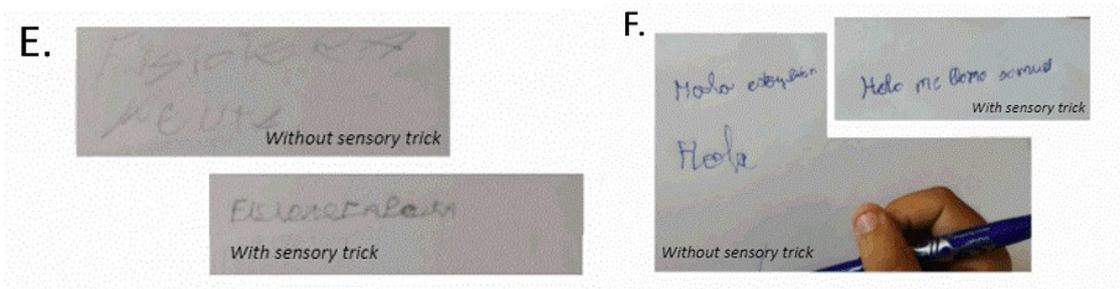


Figura 5. Mejoría de la escritura tras el uso del truco sensitivo (extraído de Correa-Vela et al., 2022 **Figure 1 E y F**). *Improvement in handwriting text using sensory trick*

Moreover, some of them also had a decrease in myoclonic jerks. As an example, Video 1 Part A shows a 3-year-old girl walking briskly and unaided while using her sensory trick. As soon as she stops touching her back to reach the toy, she suffers a myoclonic jerk, and lower limb dystonia appears, provoking gait impairment.

Action dystonia during writing and other actions

Action dystonia in the upper limbs was more frequently observed during writing (35/42, 83%) than with other actions (12/49, 24%) (**Table 1**). Of note, writing was the only task provoking dystonia in 12/35 (34%) patients.

Writer's cramp affected distal muscles in 89% of patients (wrist, metacarpophalangeal and interphalangeal joints) and proximal muscles in 40% (shoulder and elbow).

Table 1: Action dystonia during writing and other upper limb action tests

Action dystonia during writing and other upper limb action tests	n	%
Writer's Cramp	35/42	83%
Distal muscles (wrist, metacarpophalangeal and interphalangeal joints)	31/35	89%
Proximal muscles (shoulder and elbow)	14/35	40%
Associated axial abnormal postures during writing		
Laterocollis	14/35	40%
Laterocollis (Contralateral: Ipsilateral)	14 (12:2)	
Torticollis	8/35	23%
Torticollis (Contralateral: Ipsilateral)	8 (2:6)	
Lateral flexion of trunk	17/35	49%
Lateral flexion of trunk (Contralateral: Ipsilateral)	17 (17:0)	
Patterns		
Metacarpophalangeal hyperextension and hyperflexion of interphalangeal joints	13/35	37%
Shoulder hyperflexion and elbow hyperextension	6/35	17%
Shoulder hyperabduction and contralateral trunk tilt	5/35	14%
Shoulder hyperextension and elbow hyperflexion	3/35	9%
Upper limb dystonia during other actions		
Dystonia Pouring Water	10/47	21%
Dystonia Using a spoon	7/44	15%
Dystonia Finger-nose	2/47	4%
One action	12/49	24%
Two actions	4/49	8%
Three actions	1/49	2%

Tabla 7. Frecuencia de la distonía durante la escritura y en otras acciones realizadas con el miembro superior (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 **Table 1**).

Four patterns of writer's cramp were identified, three of them with proximal involvement (shoulder hyperflexion, hyperabduction or hyperextension) and one distal pattern

(metacarpophalangeal joint hyperextension with interphalangeal joints hyperflexion)

(Figure 1A-D).

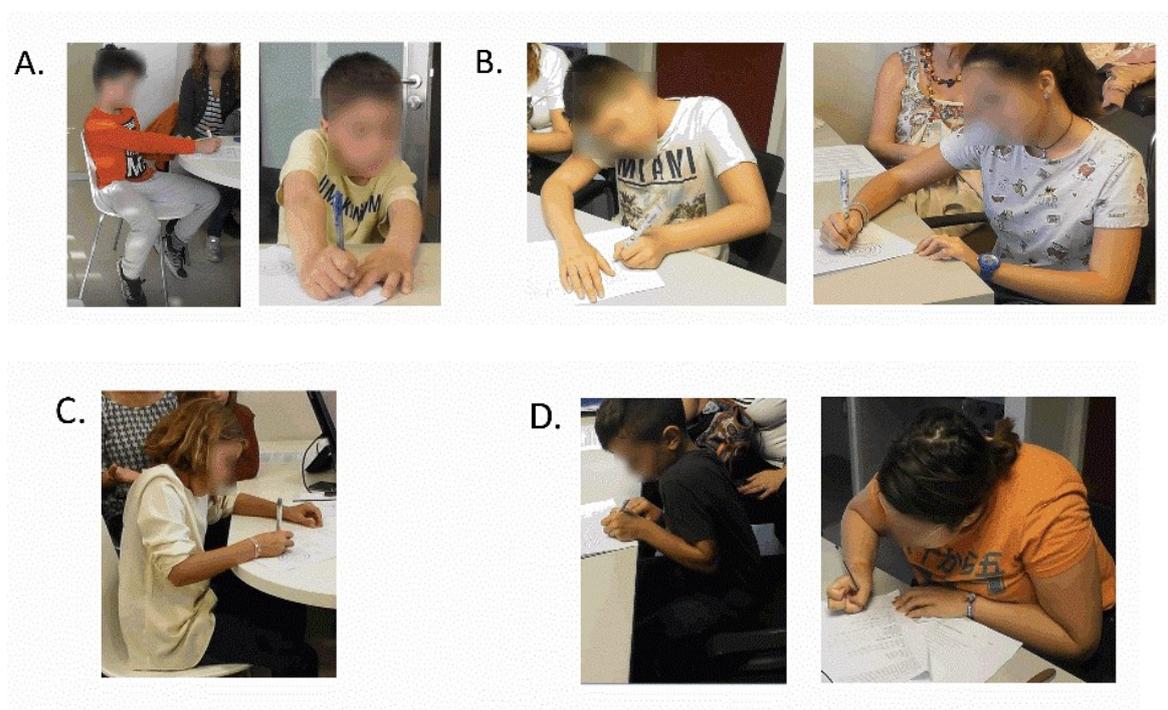


Figura 6. Patrones distónicos de escritura (extraído de Correa-Vela et al., 2022 **Figure 1A-D**). **Figure 1.** Writer's cramp patterns exposed: **A)** Shoulder hyperflexion and elbow hyperextension **B)** Shoulder hyperabduction and contralateral trunk tilt **C)** Hyperextension of the metacarpophalangeal joint with hyperflexion of interphalangeal joints **D)** Shoulder hyperextension and elbow hyperflexion.

During writing we also observed abnormal cervical and trunk postures that were dependent on the writing hand direction: most of the laterocollis were contralateral and most of the torticollis were ipsilateral to the writing hand, and all the trunk bendings were contralateral (**Table 1**). Mirror dystonia was present in 6/35 (17%), and feet overflow were noticed in 5/34 (14,7%) patients while writing. In one patient, we observed a hand tremor that stopped when the patient was distracted, and showed variability in frequency and amplitude during the task; thus, suggesting functional tremor.

During writing, 28/42 (66%) patients reported some degree of disability. Writing impairment was also recorded in 22/42 (52%) of patients by movement disorders experts while performing the task.

Action dystonia during walking and running.

On walking, 23/46 (50%) patients showed dystonic features involving the lower limbs (n=12), upper limbs (n=17) and the trunk or neck (n=7) (**Table 1**). Walking dystonia improved in 2 of 6 patients walking backwards.

On running, 20/30 (67%) manifested dystonic features in lower limbs (n=13), upper limbs (n=15) and trunk or neck (n=4) (**Table 1**).

Table 1: Action dystonia during walking and running.

Action dystonia during walking and running	n	%
Walking dystonia	23/46	50%
Lower limb	12/46	26%
Distal muscles (ankle, feet)	8/12	66%
Proximal muscles (hip and knee)	6/12	50%
Upper limb	17/46	37%
Trunk or cervical	7/46	15%
Running dystonia	20/30	67%
Lower limb	13/30	43%
Distal muscles (ankle, feet)	11/13	85%
Proximal muscles (hip and knee)	12/13	92%
Upper limb	15/30	50%
Trunk or cervical	4/30	13%
Gait and Running Patterns		
Circular shaking leg	7/26	26%
Dragging leg	5/26	19%
Hobby horse gait	4/20	20%
Truncal dystonia	2/26	7%

Tabla 8. Frecuencia de la distonía al caminar y durante la carrera. (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 **Table 2**).

Different gait dystonic patterns were identified: the “circular shaking leg”, the “dragging-leg” and the “hobby-horse gait” (**Figure 1G-I; Videos 1C-E**). Falls were video recorded in three patients.

Patients reported a 37% of disability during walking. Gait impairment was also recorded in 35% of patients by movement disorders experts while performing the walking test.



Figura 7. Patrones distónicos de la marcha (extraído de Correa-Vela et al., 2022 **Figure 1G-I**) **Figure 1:** Gait dystonic patterns exposed: **G)** Truncal action dystonia during walking and running **H)** Circular shaking leg: hip and/or knee flexion together with foot inversion. **I)** Dragging leg consisting of hip external rotation and knee extension during walking.

Action Dystonia Rating Scales

The median scores during writing (WCRS, WCRS+S) walking and running (GDRS) are reported in **Table 1** and **2**. GDRS median scores were significantly higher during running than walking (Wilcoxon test: $p=0.01$). Exceptionally, trunk dystonia disappeared while running in one patient (**Video 1F**).

The severity of the action dystonia rating scales correlated with action speed, and self-reported difficulties during the task. Moreover, BFMDRS severity scores correlated with the GDRS and WCRS (**Table 1**). We did not find any correlations between dystonia severity rating scales and age at onset, disease duration or gender. We did not find any correlations between lower limb dystonia and age at onset or disease duration.

Table 1: Action dystonia during writing and other upper limb action tests

Writer's cramp Rating Scales scores	Median (n>0) (min-max)	N>0 (%)
WCRS Score (0-28) (Finger + Wrist + Elbow Severity) X Latency) + (Tremor x 2)	8 (2-18)	33 (78.6%)
WCRS + Shoulder Score (0-32) (Finger + Wrist + Elbow + Shoulder Severity) x Latency)	8 (2-22)	35 (83.3%)
Self-reported Writing Disability (0-4)	1 (1-3)	28 (66.6%)
Writing Impairment (0-4)	1 (1-2)	22 (52.4%)
Correlations between WCRS and other variables	rs	p
WCRS Score -Writing speed	0,574	0,00
WCRS Score -self reported difficulties	0,562	0,00
WCRS Score -handwriting impairment	0,597	0,00
WCRS Score -BFMDRS	0,515	0,00
WCRS+Sh Score -writing speed	0,547	0,00
WCRS+Sh Score -self reported difficulties	0,573	0,02
WCRS+Sh Score -handwriting impairment	0,555	0,00
WCRS+Sh Score-BFMDRS	0,638	0,00
Gait Dystonia Rating Scores (0-20) (Hip + Knee + Ankle + Trunk + Arm swing Severity)	Median (n>0) (min-max)	N>0 (%)
Walking score (0-20)	2.5 (1-12)	22 (47.8%)
Running score (0-20)	4 (1-12)	10 (66.7%)
Self-reported Walking Disability (0-4)	1 (1-2)	17 (37.0%)
Walking impairment (0-6)	1 (1-3)	16 (34.8%)
Correlations between GDRS and other variables	rs	p
Walking Score - walking speed	0,605	0,00
Walking Score -self reported difficulties	0,672	0,00
Walking Score -walking impairment	0,761	0,00
Walking Score -BFMDRS	0,379	0,02
Running Score - run speed	0,631	0,00
Run Score -self reported difficulties	0,612	0,00
Run Score -walking impairment	0,506	0,00
Run Score -BFMDRS	0,769	0,00

Tabla 9. Puntuaciones medianas obtenidas en las escalas WCRS, WCRS+S, GDRS, en los cuestionarios de discapacidad asociada y análisis estadístico de correlación. (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 Table 1). Table 1: Regarding rating

scales, medians (range) score for patients rating higher than “0” during writing (WCRS, WCRS+S) walking and running (GDRS), self-reported disability and impairment are reported. In addition, rating scales sensitivity for detecting dystonia was calculated. Spearman rank test (rs) for correlations of dystonia severity scores (WCRS+S, GDRS and BFMDRS), disability scores and age are also reported (significance (p) was set to 0.05).

Discussion

This study aimed to characterise dystonic features of *SGCE*-MD at early stages of disease evolution. Despite a delay of nearly 10 years between initial presentation and age at assessment in our series, we were able to identify key dystonic features at a considerably earlier age compared to other large clinical series^{1, 4, 5}.

A detailed description of myoclonus in forty-three patients with *SGCE*-MD of this cohort has been recently published³. Myoclonus was a universal finding and followed a rostro-caudal gradient distribution (upper limbs/neck more affected). Rest myoclonus was predominantly observed in the trunk, neck, and upper limbs. Action myoclonus was more frequent and severe, spreading to the lower limbs and being present during standing and walking. Stimulus sensitivity was observed in 86.8%. In functional tests, almost all patients (95%) showed difficulties in one or more tasks, mainly pouring water, drawing Archimedes spiral, using the spoon, and handwriting.

In this study, we found a high prevalence of action dystonia, both in upper (83%) and lower limbs (67%)^{3,5,6}. Writer's cramp was the most common form of action dystonia and the unique upper limb dystonic feature in one third of patients. Upper limb dystonia was uncommon during other actions and extremely rare at rest. Therefore, it seems that writing is a very sensitive test to unmask upper limb dystonia in children with *SGCE*-MD. In contrast to writer's cramp described in *TOR1A*, *GCH*, *KMT2B*, and *THAP1* defects, which usually appears in the context of a progressive and generalized dystonic phenotype,

isolated writer's cramp in the pediatric age should prompt consideration of *SGCE* mutation analysis.¹⁷⁻¹⁹

In *SGCE* writer's cramp, elbow and shoulder were frequently involved when compared to idiopathic writer's cramp²⁰. In fact, three of the four writer's cramp patterns identified involved the shoulder. (**Figure 1A-D**) Abnormal cervical and truncal postures raised concerns regarding their origin, whether if they were compensatory or part of the dystonic pattern. Children with writer's cramp reported handwriting disability in 66% of cases. Also, they described pain when performing school tasks, and required painkillers, physiotherapy and adaptive devices such as computers. Probably, patients with *SGCE*-MD could benefit from the use of assistive technology from early childhood, in order to prevent a negative impact of motor disability on academic performance. Both, myoclonus and dystonia could have a negative impact on handwriting, as previously observed by Vanegas et al.³. In the case of dystonia, these children could benefit from botulinum toxin injections and retraining therapies similar to patients with idiopathic writer's cramp.

In this pediatric cohort, walking and running dystonia were present in 50% and 67% of patients, respectively. Dystonic features during gait involved the legs, arms, trunk and neck. Remarkably, one third of patients reported walking disability, which was in line with these findings. Nonetheless, the patient's questionnaire does not differentiate the impact of dystonia from myoclonus, and gait induced myoclonus can also impair walking in a number of patients³.

Two major dystonic gait patterns were identified, either associated with a circular shaking leg (rotation pattern) or dragging-leg (extensor pattern). Some of the children developed a hobby-horse gait during running resembling *TUBB4A-DYT4* patients²¹ (**Video 1E**).

Interestingly, gait-induced trunk dystonia was identified in two patients with *SGCE-MD*, a feature suggested to be non-supportive for MD diagnosis⁶.

Lower limb dystonia is described in over half of patients with *SGCE-MD* presenting in the first decade of life, and less frequently when the disease appears later¹. In our series, all patients developed symptoms in childhood, and therefore the prevalence of gait dystonia was higher than in previous adult series^{1,4}. More importantly, the prognosis of gait dystonia in patients with *SGCE-MD* is unclear due to the lack of natural history studies. Spontaneous remission of leg dystonia during adulthood has been reported^{4,8}, while others observed a milder walking dystonic pattern during disease course, but with persistent dystonia when running²².

Sensory tricks are common in primary dystonia especially in cervical and upper limb dystonia.²³ To our knowledge, the prevalence of sensory tricks in *SGCE-MD* has not been investigated. Interestingly, we noticed spontaneous tricks on writing (14%) and walking (34%) in our series. The most common trick was “self-touching”; in these cases, a combination of tactile stimulation and body position perception might be necessary to elicit the trick.²³ Strikingly, tricks not only improved dystonic postures and speed during the task but also reduced myoclonus, suggesting common pathophysiological mechanisms for both movement disorders (**Video 1A-B**).

Early identification and appropriate therapeutic interventions of patients with *SGCE-MD* in childhood might improve management and prognosis. DBS is a high effective therapy for *SGCE-MD*, however, recent meta-analysis and case series show that patients receive DBS at a mean age of 34.3 ± 16.3 years.^{14,15} The causes for this treatment delay may be multifactorial, but misdiagnosis during the pediatric age may be an important burden for these patients. Based on our results, we believe that scholars with *SGCE-MD* disease

suffering from disabling writing and gait dystonia could benefit from early DBS-GPi stimulation.

Regarding rating scales, the modified version of the WCRS was an accurate tool to measure the severity of the dystonic postures during writing, which affected shoulders, elbow, wrist and fingers. The proposed GDRS allowed us to evaluate the severity of action dystonia during gait, including lower limb dystonia, trunk bending and arm swing. We observed a significant increase of running gait scores compared to walking; even so, we speculate that running dystonia could be underestimated as some patients refused to run due to great performance difficulties. Both WCRS and GDRS showed good correlations with the BFMDRS, thus confirming construct validity for these new rating tools.

This study had some limitations. A clinical gap of 10 years was identified between initial presentation and age at assessment. We suspect that early recognition of *SGCE*-MD in the pediatric age is challenging due to several reasons, including clinical misclassification, poor availability of genetic tests, clinical variability of symptoms, and the lack of family history due to maternal imprinting phenomenon, among others. Still, we were able to identify key dystonic features at a considerably earlier age compared to the majority of large clinical series reported to date^{1,4,6}.

Another limitation is the cross-sectional nature of the study, which does not allow to explore the natural history of *SGCE*-MD. Longitudinal studies are necessary to clarify disease evolution from childhood to adult age.

Conclusion

Writer's cramp affecting distal and proximal muscles was a prominent and disabling feature of *SGCE*-MD in our series. The recognition of writing and gait dystonic patterns and sensory tricks can help clinicians to diagnose *SGCE* in early stages of evolution. Also, action specific dystonia rating scales can be used to identify therapeutic targets and monitor intervention outcome.

Acknowledgements

We thank the Spanish MD association (ALUDME), families and patients for their collaboration. We are grateful to the Vall d'Hebron Statistics and Bioinformatics Unit for support in the statistical analysis. BPD, AMR, VG are members of the European Reference Network for Rare Neurological Diseases (Project ID No 739510).

Authors' roles

- 1) Research project: A) Conception, B) Organization, C) Execution
- 2) Statistical Analysis: A) Design, B) Execution C) Review and critique
- 3) Manuscript: A) Writing of the first draft, B) Review and critique

MCV: 1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B

JC: 1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B

ACG: 1B, 2C, 3B

MV: 1B, 1C, 2C, 3B

AS: 1B, 1C, 3B

VG: 1B, 1C, 3B

RA: 1B, 1C, 3B

AMG: 1B, 2C, 3B

AM: 1A, 1B, 2C, 3B

AMR: 1A, 1B, 2C, 3B

BPD: 1A, 1B, 1C, 2A, 2C, 3A, 3B

Financial disclosures/Conflict of interest

MCV, JC, ACG, MV, AS, VG, RA, AMG, AM, AMR, BPD have no financial disclosures. This work was supported by a Grant from Myoclonus Dystonia Syndrome Spanish association (ALUDME) and PI 18/01319 from the Plan Nacional de I+D+I.

References

1. Peall KJ, Kurian MA, Wardle M, Waite AJ, Hedderly T, Lin JP, et al. SGCE and myoclonus dystonia: motor characteristics, diagnostic criteria and clinical predictors of genotype. *J Neurol*. 2014 Dec;261(12):2296-304.
2. Grabowski M, Zimprich A, Lorenz-Depiereux B, Kalscheuer V, Asmus F, Gasser T, et al. The epsilon-sarcoglycan gene (SGCE), mutated in myoclonus-dystonia syndrome, is maternally imprinted. *Eur J Hum Genet*. 2003 Feb;11(2):138-44.
3. Vanegas MI, Marcé-Grau A, Martí-Sánchez L, Mellid S, Baide-Mairena H, Correa-Vela M, et al. Delineating the motor phenotype of SGCE-myoclonus dystonia syndrome. *Parkinsonism Relat Disord*. 2020 11;80:165-74.
4. Roze E, Apartis E, Clot F, Dorison N, Thobois S, Guyant-Marechal L, et al. Myoclonus-dystonia: clinical and electrophysiologic pattern related to SGCE mutations. *Neurology*. 2008 Mar 25;70(13):1010-6.

5. Nardocci N, Zorzi G, Barzaghi C, Zibordi F, Ciano C, Ghezzi D, et al. Myoclonus-dystonia syndrome: clinical presentation, disease course, and genetic features in 11 families. *Mov Disord.* 2008 Jan;23(1):28-34.
6. Zutt R, Dijk JM, Peall KJ, Speelman H, Dreissen YE, Contarino MF, et al. Distribution and Coexistence of Myoclonus and Dystonia as Clinical Predictors of SGCE Mutation Status: A Pilot Study. *Front Neurol.* 2016; 7:72.
7. Asmus F, Langseth A, Doherty E, Nestor T, Munz M, Gasser T, et al. "Jerky" dystonia in children: spectrum of phenotypes and genetic testing. *Mov Disord.* 2009 Apr 15;24(5):702-9.
8. Asmus F, Zimprich A, Tezenas Du Montcel S, Kabus C, Deuschl G, Kupsch A, et al. Myoclonus-dystonia syndrome: epsilon-sarcoglycan mutations and phenotype. *Ann Neurol.* 2002 Oct;52(4):489-92.
9. Tezenas du Montcel S, Clot F, Vidailhet M, Roze E, Damier P, Jedynak CP, et al. Epsilon sarcoglycan mutations and phenotype in French patients with myoclonic syndromes. *J Med Genet.* 2006 May;43(5):394-400.
10. Ghosh D, Indulkar S. Primary Myoclonus-Dystonia: A Diagnosis Often Missed in Children. *J Child Neurol.* 2013 Nov;28(11):1418-22.
11. Grünewald A, Djarmati A, Lohmann-Hedrich K, Farrell K, Zeller JA, Allert N, et al. Myoclonus-dystonia: significance of large SGCE deletions. *Hum Mutat.* 2008 Feb;29(2):331-2.
12. Kinugawa K, Vidailhet M, Clot F, Apartis E, Grabli D, Roze E. Myoclonus-dystonia: an update. *Mov Disord.* 2009 Mar 15;24(4):479-89.

13. Roze E, Lang AE, Vidailhet M. Myoclonus-dystonia: classification, phenomenology, pathogenesis, and treatment. *Curr Opin Neurol.* 2018 08;31(4):484-90.
14. Wang X, Yu X. Deep brain stimulation for myoclonus dystonia syndrome: a meta-analysis with individual patient data. *Neurosurg Rev.* 2021 Feb;44(1):451-62.
15. Krause P, Koch K, Gruber D, Kupsch A, Gharabaghi A, Schneider GH, et al. Long-term effects of pallidal and thalamic deep brain stimulation in myoclonus dystonia. *Eur J Neurol.* 2021 05;28(5):1566-73.
16. Wissel J, Kabus C, Wenzel R, Klepsch S, Schwarz U, Nebe A, et al. Botulinum toxin in writer's cramp: objective response evaluation in 31 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996 Aug;61(2):172-5.
17. Grundmann K, Laubis-Herrmann U, Bauer I, Dressler D, Vollmer-Haase J, Bauer P, et al. Frequency and phenotypic variability of the GAG deletion of the DYT1 gene in an unselected group of patients with dystonia. *Arch Neurol.* 2003 Sep;60(9):1266-70.
18. Trender-Gerhard I, Sweeney MG, Schwingenschuh P, Mir P, Edwards MJ, Gerhard A, et al. Autosomal-dominant GTPCH1-deficient DRD: clinical characteristics and long-term outcome of 34 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009 Aug;80(8):839-45.
19. Meyer E, Carss KJ, Rankin J, Nichols JME, Grozeva D, Joseph AP, et al. Corrigendum: Mutations in the histone methyltransferase gene KMT2B cause complex early-onset dystonia. *Nat Genet.* 2017 05 26;49(6):969.
20. Goldman JG. Writer's cramp. *Toxicon.* 2015 Dec 1;107(Pt A):98-104.

21. Wilcox RA, Winkler S, Lohmann K, Klein C. Whispering dysphonia in an Australian family (DYT4): a clinical and genetic reappraisal. *Mov Disord.* 2011 Nov;26(13):2404-8.
22. Kyllerman M, Forsgren L, Sanner G, Holmgren G, Wahlström J, Drugge U. Alcohol-responsive myoclonic dystonia in a large family: dominant inheritance and phenotypic variation. *Mov Disord.* 1990;5(4):270-9.
23. Ramos VF, Karp BI, Hallett M. Tricks in dystonia: ordering the complexity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014 Sep;85(9):987-93.

Video legends

Video 1 Part A. Four patients are recorded while walking and running. Patient 1 walks briskly and unaided and free of myoclonic and dystonic features while touching her back and leg with both hands. She suffers a myoclonic jerk when she raises both hands to reach a toy. A dystonic gait is observed while she holds the toy and her mother's hand which prevents her from using the self-touching sensory trick. Patients 2 show the sensory trick while walking (she touches her leg) but not while running. Patient 3 keeps her arms tight to the trunk and intermittently holds both hands while running. Patient 4 improves his walking while holding his father's hand, touching the wall and walking backwards.

Video 1 Part B. Three patients are recorded during writing, spontaneously and after being asked to avoid the sensory tricks. A gentle touch to a distal point of the writing arm or the pencil is used by all patients. This led to an improvement of the dystonic posture and speed of writing.

Video 1 Part C. Two patients walking with dragging-leg due to a hip external rotation and knee extension. In the first patient, we can observe an evolution of the gait pattern at 2 and 4 years old.

Video 1 Part D. This patient shows knee flexion together with foot eversion, and as a result, a peculiar “circular shaking leg” gait pattern is observed.

Video 1 Part E. Two patients show a particular “hobby-horse gait” including hip external rotation and knee extension while running. In the last patient, we can observe a similar pattern at 6 and 9 years old.

Video 1 Part F. This patient shows truncal dystonia during walking and running.

Resumen análisis estadístico descriptivo de aceptabilidad para las escalas propuestas

	WCRS_Score	WCRS_Sh_Score	GDRS_Walkin_g_Score	GDRS_Runnin_g_Score	BFMDRS
Missing data	0%	0%	0%	0%	0%
Theoretical score range	0-28	0-32	0-20	0-20	0-120
Observed score range	0-18	0-22	0-12	0-12	0-26
Theoretical median score	14	16	10	10	60
Observed median score	6	7	0	2.5	4
Floor effect	21%	17%	51%	33%	26%
Ceiling effect	0	0	0	0	0

Tabla 10. Resumen del análisis estadístico descriptivo de aceptabilidad para las escalas propuestas (WCRS, WCRS+S, GDRS en marcha y carrera y BFMDRS): datos perdidos,

rango de puntuación teórico de la escala, rango de puntuación observado, mediana de puntuación teórica, mediana de puntuación observada, efecto suelo definido por el porcentaje de pacientes con la mínima puntuación de la escala y efecto techo definido por el porcentaje de pacientes con la puntuación máxima para la escala (datos no publicados en Correa-Vela et al., 2022)

Capítulo 5. Resultados: *Impaired proteasome activity and neurodegeneration with brain iron accumulation in FBXO7 defect*

Los resultados en referencia a los objetivos (3) y (4) están expuestos en el artículo:



Correa-Vela M, Lupo V, Montpeyo M, Sancho P, Marcé-Grau A, Hernández-Vara J, Darling A, Jenkins A, Fernández-Rodríguez S, Tello C, Ramírez-Jiménez L, Pérez B, Sánchez-Montañez Á, Macaya A, Sobrido MJ, Martínez-Vicente M, Pérez-Dueñas B, Espinós C. **Impaired proteasome activity and neurodegeneration with brain iron accumulation in FBXO7 defect.** Ann Clin Transl Neurol. 2020 Aug;7(8):1436-1442. doi: 10.1002/acn3.51095. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32767480; PMCID: PMC7448169.

Los principales resultados del artículo son:

1. Se presenta un nuevo fenotipo clínico y radiológico asociado al defecto genético de *FBXO7*. Dicho fenotipo clínico incluye un trastorno motor complejo de parkinsonismo piramidismo, parálisis de la mirada vertical, signos cerebelosos, epilepsia refractaria y mioclonías.
2. En la neuroimagen se ha observado atrofia cerebelosa progresiva, degeneración pontocerebelosa y signos sugestivos de depósito de hierro en núcleos pálidos y sustancia nigra, así como un DATscan normal. Estos hallazgos sugieren un parkinsonismo postsináptico.
3. La variante novel nonsense p.(Ser123*) en *FBXO7* produce una ausencia de proteína en el western blot. El estudio de mRNA en los fibroblastos del paciente demuestra una disminución del mRNA comparado con fibroblastos control. Estos niveles se normalizan tras tratar los fibroblastos del paciente con un inhibidor de la traducción de proteínas, lo que sugiere que un mecanismo de “*nonsense mediated decay*” producido por el efecto pérdida de función que causa la mutación.
4. *FBXO7* parece estar implicado en el reclutamiento de sustrato en el sistema ubiquitina proteosoma. En el análisis funcional de los fibroblastos del paciente encontramos una disminución significativa de la actividad del sistema ubiquitina proteosoma y un aumento de las proteínas poliubiquitinizadas no degradadas.
5. La proteína *FBXO7* también ha sido relacionada con el inicio de la mitofagia. En los fibroblastos del paciente encontramos un aumento de las proteínas mitocondriales. Además, el análisis morfológico con microscopía electrónica mostró una alteración en las crestas mitocondriales.

Impaired proteasome activity and neurodegeneration with brain iron accumulation in *FBXO7* defect

Marta Correa-Vela, MD,^{1,2#} Vincenzo Lupo, PhD,^{3,4#} Marta Montpeyó, MSc,⁵ Paula Sancho, PhD,^{3,4} Anna Marcé-Grau, PhD¹, Jorge Hernández-Vara, MD⁶, Alejandra Darling, MD, PhD,⁷ Alison Jenkins, MSc,³ Sandra Fernández-Rodríguez, MSc,³ Cristina Tello, MSc,³, Laura Ramírez-Jiménez, MBChB,⁸ Belén Pérez, PhD,⁹ Angel Sánchez-Montañez, MD,¹⁰ Alfons Macaya, MD, PhD^{1,2}, María J. Sobrido, MD, PhD,¹¹ Marta Martínez-Vicente, PhD,⁶ Belén Pérez-Dueñas, MD, PhD,^{1,2§*}, Carmen Espinós, PhD,^{3,4§*}
Ann Clin Transl Neurol. 2020 Aug;7(8):1436-1442.

Abstract

FBXO7 is implicated in the ubiquitin-proteasome system and parkin-mediated mitophagy. *FBXO7* defects cause a levodopa-responsive parkinsonian-pyramidal syndrome. We investigated the disease molecular bases in a child with parkinsonian-pyramidal syndrome and brain iron accumulation.

A novel homozygous c.368C>G (p.S123*) *FBXO7* mutation was identified in a child with spastic paraplegia, epilepsy, cerebellar degeneration, levodopa non-responsive parkinsonism and brain iron deposition.

Patient's fibroblasts assays demonstrated an absence of *FBXO7* RNA expression leading to impaired proteasome degradation and accumulation of poly-ubiquitinated proteins.

This novel *FBXO7* phenotype associated with impaired proteasome activity overlaps with neurodegeneration with brain iron accumulation disorders.

Introduction

Parkinsonism-pyramidal syndrome (PPS) is a complex movement disorder that may present in childhood associated with complex hereditary spastic paraplegia (SPG), young-onset Parkinsonism, neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) disorders and inborn errors of metabolism.¹ *FBXO7* deficiency (PARK15; MIM 260300) is a rare cause of PPS with 26 known patients since 2008.²⁻⁹ Most of these patients develop spastic paraparesis and/or levodopa-responsive young onset parkinsonism with normal brain magnetic resonance imaging (MRI) and reduced dopamine uptake on DaTSCAN.²⁻⁹ The F-box only protein7 (*FBXO7*) gene encodes for a protein involved in ubiquitin proteasome activity (UPS) and mitophagy. *FBXO7* protein is a subunit of a complex responsible for the phosphorylation-dependent ubiquitination, the SKP1/cullin-1/F-box protein (SCF) E3 ubiquitin ligase complex. *FBXO7* acts as a substrate recruiter in this complex and has a regulatory role in proteasome through the direct interaction with the core proteasome subunit PSMA2, an essential protein required for a fully functional proteasome. Another role of *FBXO7* protein is to provide an effective recruitment of parkin to damaged mitochondria and initiate mitophagy.¹⁰⁻¹³

The genetic analysis of a child with a complex phenotype including epilepsy, progressive PPS with no response to levodopa, cognitive decline and MRI features suggestive of NBIA revealed the novel homozygous *FBXO7* c.368C>G (p.S123*) variant. We detected for the first time in patient's fibroblasts an impairment in ubiquitin-protein degradation and poly-ubiquitinated (poly-UB) proteins accumulation, (highlighting the essential role of the UPS activity of *FBXO7* in human disease.

Methods

Used methodology is summarized in the main manuscript. Complete procedures and protocols are detailed in Supporting Information.

Consent and Approval

All protocols complied with the ethics guidelines according to Declaration of Helsinki and were approved by participating institutional review boards. The proband and relatives signed an informed consent for the study.

Genetic studies

Genetic test was performed in the proband using a customized gene panel. Because of second-grade parental consanguinity, homozygous variants were prioritized.

Cell culture and western blot

Skin cultured fibroblasts from the patient and controls were grown in standard medium. *FBXO7* expression and mitophagy-related proteins (PINK1, Parkin, K63 poly-UB, VDAC1) were studied by western-blot in homogenate and mitochondrial enriched fractions.

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) assay

Proband and control fibroblasts cultures were treated with emetine dihydrochloride hydrate,¹⁴ a specific inhibitor of translation. RNA was extracted and retro-transcribed, and the resulting cDNAs underwent qPCR for the quantification of *FBXO7* RNA expression.

Ubiquitin-proteasome system activity and expression assays

Chymotrypsin-like activity determination was done measuring fluorescence intensity after incubation of the proband and control fibroblasts' protein extract with a proteasome activity buffer and a fluorogenic substrate. Ubiquitinated-protein levels were quantified through a WB assay using an anti-UB antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Electronic microscopy

Ultra-thin sections were examined under a transmission electron microscope FEI Tecnai Spirit BioTwin using a digital camera Morada (see Supplemental File).

Results

Case Presentation

The proband is currently a 21-year-old girl born to healthy consanguineous parents from Morocco. After a normal perinatal history, she presented with mild global developmental delay followed by acute ataxia triggered by a viral gastroenteritis at 2 years. When she was 5 years old, valproate was started for absence epilepsy. She was lost to follow-up until the age of 12, when she was admitted to the intensive care unit due to acute parainfectious H1N1 encephalopathy. Neurological examination identified horizontal nystagmus, head tremor, dysmetria, lower limb spasticity, hyperreflexia, clonus, bilateral Babinski sign and bladder dysfunction.

Between the age of 12 and 18 years the patient suffered progressive deterioration, including progressive spastic paraparesia and gait loss at 13 years, language and cognitive regression, drug-resistant seizures, severe dysphagia and optic neuropathy. At the age of

15, hypokinesia, rigidity, kinetic tremor and upgaze limitation were identified. A trial with levodopa (100g/day) did not show a positive response (Video).

Serial brain and medulla MRI studies from 10 to 17 years disclosed slight vermian atrophy progressing to cerebral and cerebellar atrophy, and a hot cross bun sign suggesting ponto-cerebellar tract degeneration. Excessive brain iron deposition in the pallidum and substantia nigra appeared as hypointense signal on iron-sensitive sequences at 15 years, which led us to suspect a causative relation with the onset of parkinsonian features (Fig.1). At 20 years, a brain DaTSCAN showed normal uptake.

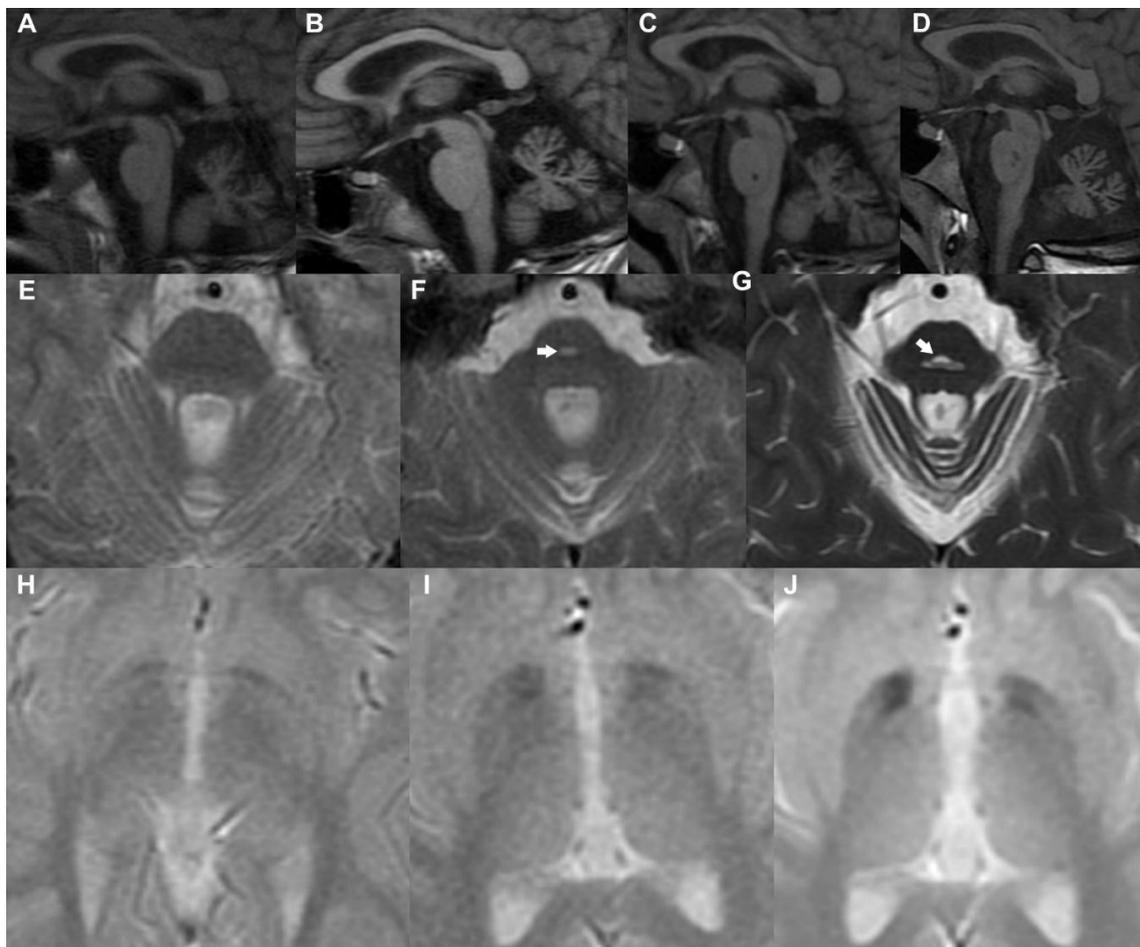


Figura 8. Estudio de neuroimagen del probando (RM) (extraído de Correa-Vela et al., 2020 Figure 1) Figure 1 (Fig. 1): MRI proband's studies: T1WI sagittal images (A) at 10 years-old (B), 12 years-old (C), 15 years-old and (D) 17 years-old show a progression from slight vermian atrophy to cerebellar atrophy of vermis and hemispheres, cerebral

volume loss and brainstem atrophy, enlarged ventricles and cerebral sulci at the age of 17. Axial T2WI of the pons at (E) 12 years-old, (F) 15 years-old and (G) 17 years-old. T2 hyperintensity delineating a cross through the pons known as the 'hot cross bun' sign and representing selective degeneration of pontocerebellar tracts appear at the age of 17. Gradient recall echo [GRE] sequence Ganglios basales at (H) 12 years-old (I), 15 years-old and (J) and 17 years. Bilateral hypointensities in pallidum suggest that iron deposition appeared at 15 years.

Genetic Findings

Data analysis of a custom gene panel identified two homozygous variants: c.100A>G (p.T34A) in *DLD* (NM_000108.4) and c.368C>G (p.S123*) in *FBXO7* (NM_012179.3) (Fig.2A). In parallel, exome sequencing analysis revealed the same findings (data not shown). *In silico* predictors showed that *DLD* p.T34A (rs138002793; MAF=5.1x10⁻⁴) was probably benign. *DLD* enzyme activity assay in patient's fibroblasts was considered within the normal range of activity. According to these findings and the patient's clinical record, we ruled out the implication of *DLD*. Although gene panel data analysis disclosed a moderate number of single-exon CNVs in the proband, array-CGH found no pathological results (data not shown).

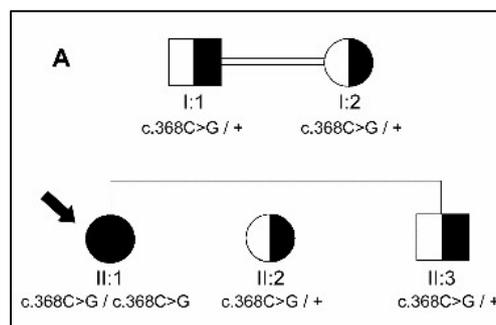


Figura 9. Pedigree y análisis de la mutación c.368C>G p.(Ser123*) *FBXO7* (extraído de Correa-Vela et al., 2020 Figure 2A) (**Fig. 2**): Pedigree and analysis of the *FBXO7* p.S123* mutation: **Figure 2A:** *FBXO7* c.368C>G (p.S123*) mutation family's pedigree.

The index case (II:1) is homozygous for the mutation (black circle with an arrow). Her healthy relatives are heterozygous carriers (half-shaded symbols).

TABLE S1: Genetic, clinical and neuroimaging features of FBXO7 deficiency

FBXO7 features		n	%
Gender (n=27)			
	Female	12	44,4
	Male	15	55,6
Country (n=27)			
	Iran	10	37
	Turkey	8	29,6
	Pakistan	3	11,1
	Italy	2	7,4
	Netherlands	2	7,4
	China	1	3,7
	Morocco	1	3,7
Genetics			
	Parental consanguinity	21/27	77,7
	Missense mutation	14/27	51,9
	Nonsense mutation	13/27	48,1
Pathogenic reported variants			
	p.Arg498*: hom	11/27	40,7
	p.Arg378Gly: hom	10/27	37
	p.Leu34Arg: hom	2/27	7,4
	c.1144+1G>T + p.Thr22Met	2/27	7,4
	p.Glu470* + p.Asn51Ser	1/27	3,7
	p.Ser123*: hom	1/27	3,7
Onset features (n=27)			
Mean onset age	23,4 ± 10,2		
	Spasticity	11/27	40,7
	Bradykinesia/Rigidity	11/27	40,7
	Tremor	3/27	11,1
	Walking difficulties	1/27	3,7
	Chorea, tics	1/27	3,7
Motor phenotype (n=27)			
	Parkinsonian-pyramidal	15	55,5
	Spastic paraplegia	7	25,9
	Early onset parkinsonism	5	18,5

Common features (>50% patients reported)			
Parkinsonian signs	Postural instability	15/16	93,8
	Bradykinesia	20/27	74
	Rigidity	20/27	74
Pyramidal signs	Hyperactive tendon reflexes	22/27	81,5
	Babinski reflex	21/26	80,7
	Spasticity	19/25	76
Mixed signs	Dysarthria	13/15	86,7
Less common features (<50% patients reported)			
Parkinsonian signs	Hypomimia	11/20	55
	Monotonous speech	7/14	50
	Resting tremor	10/27	37
	Action tremor	7/23	30,4
Oculomotor signs	Reduced upgaze	7/11	63,6
	Slow saccades	6/10	60
Extrapyramidal signs	Dystonic features	10/16	62,5
	Myoclonic jerks	3/3	
	Chorea	1/5	
	Tics	2/5	
	Frequent blinking	5/5	
Other signs	Dysphagia	10/13	76,9
	Urinary incontinence	3/7	42,3
Outcome			
	Cognitive decline	10/26	38,5
	Wheelchair bound	6/16	37,5
	Exitus	3/13	23,1
	Bed bound	2/13	15,4
Neuroimaging			
MRI (n=20)	Normal	12	60
	Cortical atrophy	6	30
	NBIA	1	
Nuclear imaging (n=4)	123I-FP-CIT (DaTSCAN) Abnormal	2	
	123I-FP-CIT (DaTSCAN) Normal	1	
	123I-IBZM-SPECT Normal	1	
Treatment with levodopa			
	LDOPA positive response	17/18	94,4
	LDOPA induced Behavioural problems	12/13	92,3
	LDOPA induced Dyskinesia	11/13	84,6
	LDOPA Motor fluctuations	7/10	70

Tabla 11. Resumen de las características clínicas reportadas en la literatura de los pacientes afectados por el defecto en *FBXO7* (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2020 Supplementary Table S1). Table S1: Supplementary Table: Summary of clinical features of patients reported with *FBXO7* mutation (Shojaee et al., 2008; Di Fonzo et al., 2009; Paisan-Ruiz, 2010; Gunduz et al., 2014; Yalcin-Cakmakli et al., 2014; Lohmann, 2015; Conedera et al., 2016; Wei et al., 2018). Data of the present study is also included. MRI: Magnetic Resonance Imaging; NBIA: Neurodegeneration with brain iron accumulation; 123I-FP-CIT (DaTSCAN): Ioflupane I 123 DaTSCAN; 123I-IBZM-SPECT: I 123 Iodobenzamide Single photon emission computed tomography; LDOPA: levodopa.

Functional Studies

The novel *FBXO7* c.368C>G (p.S123*) change would produce a very short protein where the only functional domain preserved would be the ubiquitin-like domain (Fig.2B). Protein expression analysis showed the absence of *FBXO7* protein in WB (Fig.2C). mRNA expression was investigated by NMD assay confirming a significant decrease of *FBXO7* mRNA in patient's fibroblasts compared to control (P<.05). Emetine incubation increased total mRNA in patient's fibroblasts up to control levels, thus confirming a NMD mechanism as a cause of loss of function effect (Fig.2D).

Loss of *FBXO7* is related to decreased proteasome activity.¹⁰ A significant reduction of 20% in UPS activity was observed in patient's fibroblasts (Fig.2E). We hypothesized that impaired UPS would not be able to degrade the poly-UB labeled proteins and we found an increase of these proteins in proband's fibroblasts (Fig.2F).

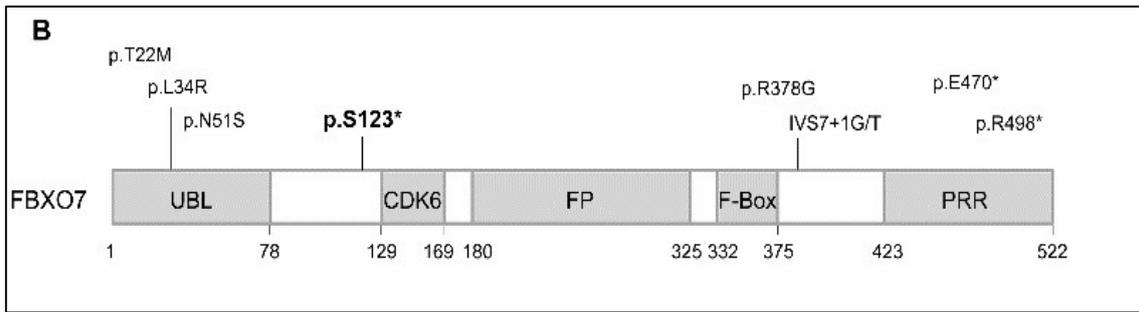


Figura 10. Distribución según los dominios de la proteína FBXO7 de las variantes patogénicas reportadas (extraído de Correa-Vela et al., 2020 Figure 2B) **Figure 2B:** Distribution of pathogenic mutations reported in FBXO7 according to protein domains; *p.S123** (in bold) is located in an inter-domain between the UBL and the CDK6 domains.

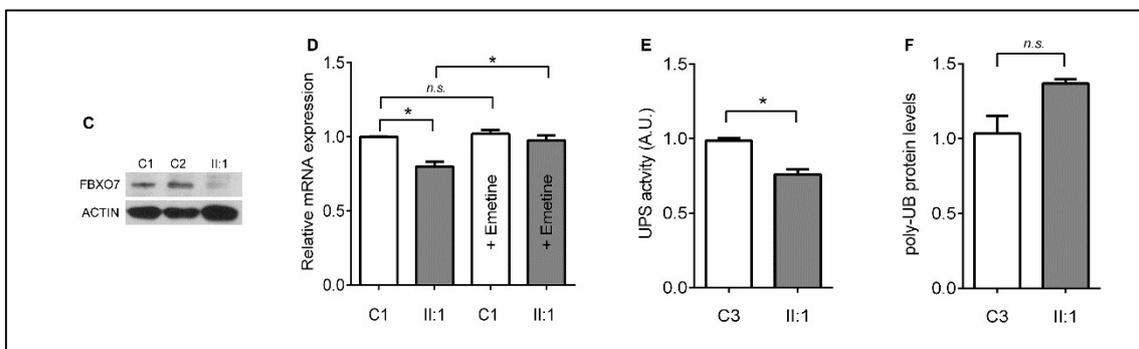


Figura 11. Estudios de expresión de proteína FBXO7 por western-blot; Cuantificación de mRNA con y sin emetina para evaluar ausencia de expresión de proteína y alteración secundaria al sistema nonsense-mediated-decay (NMD); Ensayo de la actividad del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS); Cuantificación de niveles de proteínas poliubiquitinizadas (extraído de Correa-Vela et al., 2020 Figure 2C-F).

Figure 2C: Absence of FBXO7 protein western blot in patient's fibroblasts (II:1) compared to two controls fibroblasts' lysates (C1 and C2) immunodetected with an antibody against FBXO7.

Figure 2D: mRNA expression was evaluated by qPCR in fibroblasts from the patient (II:1) and one control with and without emetine treatment, a translation inhibitor. FBXO7 mRNA levels in patient's fibroblasts (II:1) are rescued when treated with emetine. Data were obtained from one biological sample and three independent technical replicates. Error bars represent SEM. Mann-Whitney-Wilcoxon test: * $P < 0.05$; n.s.: non-significant.

Figure 2E: UPS activity assay performed in fibroblasts from the patient (II:1) and one control (C3) shows a reduction of 20% ubiquitin proteasome system activity in patient. Data were obtained from one biological sample and six independent technical replicates. Error bars represent SEM. Mann-Whitney-Wilcoxon test: $*P < 0.05$.

Figure 2F: Detection of a trend to increase of poly-UB proteins in patient (II:1) fibroblasts by western-blot and SDS-PAGE. Actin was used to validate equal protein loading. Data were obtained from one biological sample and three independent technical replicates. Error bars represent SEM. Mann-Whitney-Wilcoxon test. *n.s.*: non-significant.

FBOX7 is also involved in mitophagy^{12,13}. Mitophagy-related proteins studies showed no significant differences in mitochondrial enriched fractions in patient's fibroblasts (Fig.S1A). However, elevated mitochondrial proteins in mutant cells were observed, possibly due to accumulated mitochondria (Fig.S1B). Mitochondria analysis by electron microscopy revealed abnormal cristae morphology in ultra-thin sections images (Fig.S1C).

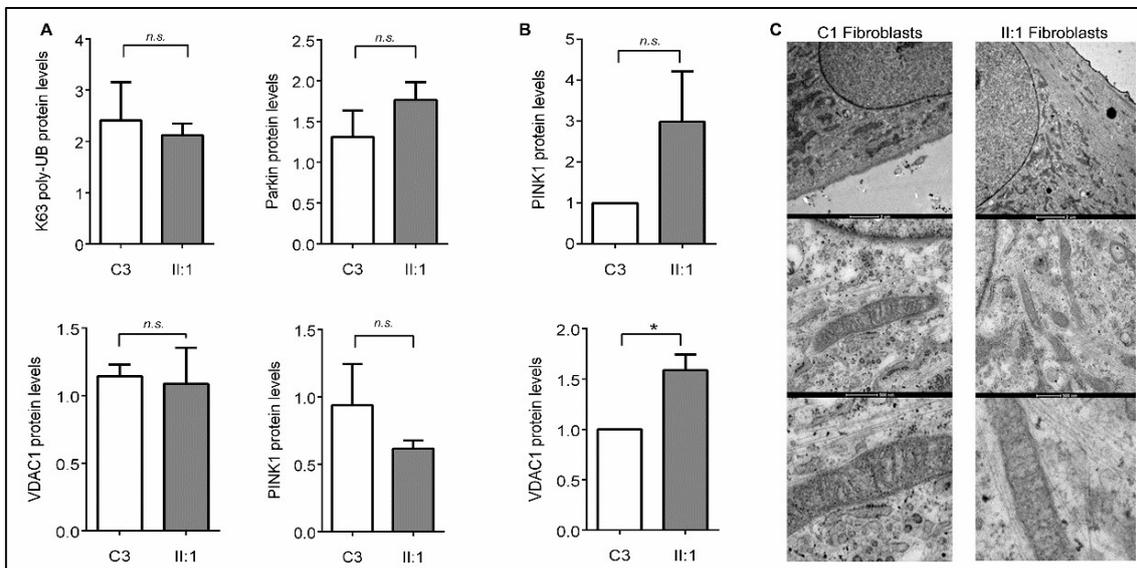


Figura 12. proteínas relacionadas con la mitofagia y estudio de microscopía electrónica de las mitocondrias de la paciente. (extraído de Correa-Vela et al., 2020 Supplementary Figure 1) **Supplementary Figure 1 (Fig. S1):** Mitophagy-related proteins and electron microscopy:

- A. *Mitophagy markers (PINK1, Parkin, K63-polyUb and VDAC) levels analyzed by western-blot in mitochondria enriched fractions from patient's and control's fibroblasts. Error bars represent SEM. n.s.: non-significant.*
- B. *Elevated levels of mitochondrial specific proteins PINK1 and VDAC1 were detected in mutant cells compared to controls. Error bars represent SEM. Mann-Whitney-Wilcoxon test: * $P < 0.05$; n.s.: nonsignificant.*
- C. *Analysis of mitochondrial morphology by electron microscopy revealed in ultra-thin sections images of mitochondria in control's and patient's fibroblasts. Internal scales marker are indicated in the figure.*

Discussion

FBXO7 deficiency is a rare genetic condition described in 26 patients from ten unrelated families, giving three major phenotypes: autosomal recessive juvenile-onset levodopa responsive PPS (14 patients), SPG (7 patients) and isolated parkinsonism (5 patients).²⁻⁹ We report a patient with a novel, complex and severe form of childhood onset FBXO7-PPS with initial developmental delay and progressive SPG, drug-resistant epilepsy, levodopa non-responsive parkinsonism, and signs of cerebellar degeneration and Ganglios basales iron deposition.

We observed a striking association between the onset of parkinsonian features and the occurrence of brain iron accumulation on MRI at 15 years. These findings, together with poor levodopa response and normal dopamine uptake suggested a likely post-synaptic degeneration condition overlapping with NBIA disorders. This contrasts previous reports showing a severe nigrostriatal dopaminergic defect in two patients carrying *FBXO7* mutations.^{3,4}

Moreover, the patient suffered from cerebellar ataxia, oculomotor dysfunction, severe dysphagia and cognitive decline. These features could be related to the progression of cerebellar atrophy and the appearance of a hot cross bun sign at the pons, also described

in patients with multiple system atrophy or spinocerebellar ataxia.¹⁵ Neither brain iron accumulation nor the hot cross bun sign have been reported in *FBXO7* patients, mostly having normal structure or mild global brain atrophy on MRI (Table S1).

Previous *FBXO7* patients with nonsense variants had the onset of core features within the second decade of life, and progression to severe parkinsonism, major disability or early death in five of 13 cases.^{3-6,8,9} However, neither of them developed epilepsy or cerebellar ataxia, two atypical features of our patient. On the other hand, patients with missense variants showed milder phenotypes, such as young onset parkinsonism or isolated SPG, probably due to a possible residual activity of *FBXO7*⁷ (Table.S1).

The *FBXO7* c.368C>G (p.S123*) nonsense mutation is located in the proximal region of the protein. According to our results, it would produce an aberrant mRNA, which was degraded by NMD, leading to a complete absence of *FBXO7* protein and a loss of function effect. NMD is a well-known RNA quality control that limits the expression of mRNAs with premature termination codons.^{16,17} Previously, two additional nonsense *FBXO7* mutations (p.R498* and p.E470*) were reported.^{3,9} The absence of expression of p.R498* was demonstrated in a human cell model, however, NMD process was discarded probably due to its location near the C-ter.¹⁸

FBXO7 plays a regulatory role in proteasome and mitochondria. The *FBXO7* knockdown in mice results in a decrease of UPS activity.¹⁰ We have demonstrated that the UPS activity was reduced in *FBXO7*-PPS patient's fibroblasts, and as a consequence, the poly-UB proteins showed a trend to accumulate. Moreover, our findings suggest a likely mechanistic relationship between proteasome impairment and iron accumulation, previously observed in experimental models of PD. A mice model of PD induced by the proteasome inhibitor lactacystin showed loss of dopamine neurons, abnormal iron

accumulation and elevated iron regulatory protein 2 (IRP2) and divalent metal transporter 1 (DMT1) in the substantia nigra.¹⁹ Also, the *in vitro* lactacystin dopamine cell line model showed an increase of labile iron, disruption in iron regulatory proteins and aggregation of ubiquitin conjugated proteins, leading to cell premature death.²⁰ Taken together, these findings suggest that alterations in iron regulatory proteins due to proteasome dysfunction may lead to dopamine neuron degeneration.

In addition, PINK1/Parkin mediated mitophagy is facilitated by FBXO7 and dependent on ubiquitin.^{11,13,21-23} We have not found differences in the expression of mitophagy-related proteins between mutant and healthy fibroblasts. However, elevated mitochondrial proteins in mutant cells were observed, possibly due to accumulated mitochondria.

Mitochondrial cristae alterations are associated with mitochondria impairment.²⁴ In a transgenic *Drosophila* model, the overexpression of *FBXO7* leads to broken cristae and accumulated high density material in the swollen mitochondria.¹¹ We observed abnormal mitochondrial cristae morphology in patient's fibroblasts, likely as a secondary consequence, since it is commonly seen in neurodegenerative diseases, including NBIA forms.²⁵⁻²⁷

Our results have major limitations and should be interpreted with caution as they have been demonstrated in a single patient harbouring *FBXO7* p.S123* mutation. Further studies are needed to clarify if proteasome impairment, mitophagy dysfunction and iron accumulation are the main biological mechanisms leading to PPS in *FBXO7* patients.

In conclusion, we describe a complex and severe *FBXO7*-related phenotype with a likely post-synaptic mechanism of neurodegeneration, which overlaps with other NBIA monogenic diseases. The absence of *FBXO7* led to impaired proteasome degradation and

accumulation of poly-ubiquitinated proteins, which highlights the essential role of the UPS in the disease mechanism.

Appendix

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Acknowledgments

We thank the patient and her family for agreeing to participate in this study. We are very grateful to María Rosario Abellán for her technical assistance with the analysis of the array-CGH. We are also in debt with José M. Garcia-Verdugo, David Pla-Martín and Candela Machuca-Arellano who helped us with the electronic microscopy, and with Francisco García-García who helped us with the statistical analysis. This work was supported by the Fundació La Marató de TV3 [Grants 20143130 to BPD, and 20143131 to CE], by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación within the framework of the National R+D+I Plan co-funded with ERDF funds [Grants PI18/01319 to BPD and PI18/00147 to CE], and by the Generalitat Valenciana [Grant PROMETEO/2018/135 to CE]. Part of the equipment employed in this work has been funded by Generalitat Valenciana and co-financed with ERDF funds (OP ERDF of Comunitat Valenciana 2014-2020). SFR had a contract funded by the Spanish Foundation Per Amor a l'Art (FPAA). PS had an FPU-PhD fellowship funded by the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport [FPU15/00964].

Authors' contributions

1. Research project: A. Conception, B. Organization, C. Execution: VL, MCV, AD, JHV, BPD, CE.
2. Experimental studies and statistical analysis: A. Design, B. Execution: PS, VL, MM, AMG, SFR, AJ, CT, LR, BP, MJS, MMV. C. Review and critique MCV, VL, MMV, BPD, CE.
3. Manuscript preparation: A. Writing of the first draft, B. Review and critique MCV, VL, AMG, MMV, BPD, CE.

All the authors have reviewed and criticized the manuscript.

References

1. Tranchant C, Koob M, Anheim M. Parkinsonian-Pyramidal syndromes: A systematic review. *Parkinsonism & related disorders* 2017;39:4-16.
2. Shojaee S, Sina F, Banihosseini SS, et al. Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays. *American journal of human genetics* 2008;82(6):1375-1384.
3. Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, et al. *FBXO7* mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 2009;72(3):240-245.
4. Paisan-Ruiz C, Guevara R, Federoff M, et al. Early-onset L-dopa-responsive parkinsonism with pyramidal signs due to *ATP13A2*, *PLA2G6*, *FBXO7* and *spatacsin* mutations. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 2010;25(12):1791-1800.

5. Yalcin-Cakmakli G, Olgiati S, Quadri M, et al. A new Turkish family with homozygous FBXO7 truncating mutation and juvenile atypical parkinsonism. *Parkinsonism & related disorders* 2014;20(11):1248-1252.
6. Gunduz A, Eken AG, Bilgic B, et al. FBXO7-R498X mutation: phenotypic variability from chorea to early onset parkinsonism within a family. *Parkinsonism & related disorders* 2014;20(11):1253-1256.
7. Lohmann E, Coquel AS, Honore A, et al. A new F-box protein 7 gene mutation causing typical Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 2015;30(8):1130-1133.
8. Conedera S, Apaydin H, Li Y, et al. FBXO7 mutations in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiology of aging* 2016;40:192 e191-192 e195.
9. Wei L, Ding L, Li H, et al. Juvenile-onset parkinsonism with pyramidal signs due to compound heterozygous mutations in the F-Box only protein 7 gene. *Parkinsonism & related disorders* 2018;47:76-79.
10. Vingill S, Brockelt D, Lancelin C, et al. Loss of FBXO7 (PARK15) results in reduced proteasome activity and models a parkinsonism-like phenotype in mice. *The EMBO journal* 2016;35(18):2008-2025.
11. Zhou ZD, Xie SP, Sathiyamoorthy S, et al. F-box protein 7 mutations promote protein aggregation in mitochondria and inhibit mitophagy. *Human molecular genetics* 2015;24(22):6314-6330.
12. Zhou ZD, Lee JCT, Tan EK. Pathophysiological mechanisms linking F-box only protein 7 (FBXO7) and Parkinson's disease (PD). *Mutation research* 2018;778:72-78.

13. Burchell VS, Nelson DE, Sanchez-Martinez A, et al. The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nature neuroscience* 2013;16(9):1257-1265.
14. Kawarai T, Yamasaki K, Mori A, et al. MFN2 transcripts escaping from nonsense-mediated mRNA decay pathway cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2A2. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2016;87(11):1263-1265.
15. Lee YC, Liu CS, Wu HM, et al. The 'hot cross bun' sign in the patients with spinocerebellar ataxia. *European journal of neurology* 2009;16(4):513-516.
16. Fatscher T, Boehm V, Gehring NH. Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 2015;72(23):4523-4544.
17. Miller JN, Pearce DA. Nonsense-mediated decay in genetic disease: friend or foe? *Mutation research Reviews in mutation research* 2014;762:52-64.
18. Zhao T, De Graaff E, Breedveld GJ, Loda A, et al. Loss of Nuclear Activity of the FBXO7 Protein in Patients with Parkinsonian-Pyramidal Syndrome (PARK15). *PLoS ONE* 2011;6(2): e16983.
19. Xie W, Li X, Li C, Zhu W, et al. Proteasome inhibition modeling nigral neuron degeneration in Parkinson's disease. *J Neurochem* 2010;115:188–199.
20. Li XP, Xie WJ, Zhang Z, Kansara S, et al. A mechanistic study of proteasome inhibition-induced iron misregulation in dopamine neuron degeneration. *Neurosignals* 2012;20(4):223–236.
21. Scarffe LA, Stevens DA, Dawson VL, Dawson TM. Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends in neurosciences* 2014;37(6):315-324.

22. Whitworth AJ, Pallanck LJ. PINK1/Parkin mitophagy and neurodegeneration- what do we really know in vivo? *Current opinion in genetics & development* 2017;44:47-53.
23. Fritsch LE, Moore ME, Sarraf SA, Pickrell AM. Ubiquitin and Receptor-Dependent Mitophagy Pathways and Their Implication in Neurodegeneration. *Journal of molecular biology* 2019.
24. Cogliati S, Enriquez JA, Scorrano L. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in biochemical sciences* 2016;41(3):261-273.
25. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 2001;21(9):3017-3023.
26. Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, et al. Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. *Nature communications* 2017;8:15500.
27. Tello C, Darling A, Lupo V, et al. On the complexity of clinical and molecular bases of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Clinical genetics* 2018;93(4):731-740.

Video legend of FBXO7 p.S123* patient (Video)

Segment A: The patient at 13 years old is in a wheelchair due to spastic paraplegia.

Segment B: The patient at 15 years old has severe hypomimia, bradykinesia and low amplitude kinetic tremor while throwing the ball.

Segment C: Oculomotor features of patient at 16 years old are horizontal nystagmus and reduced upgaze during smooth pursuit.

Segment D: Neurologic assessment at 21 years old reveals lower limbs hyperreflexia, bilateral Babinski sign and Achilles clonus. On a second frame, we also observe upper limb bradykinesia, action tremor and myoclonus.

Supplementary File:

Additional information regarding materials and methods, a supplementary figure and a supplementary table are included in a supplementary material file.

Supplementary information:

Methods

Genetic studies

Genetic test was carried out in the proband using a custom gene panel MovDisord-498 (genes included are listed in the Annex) based on SureSelectQXT technology (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) for Illumina (San Diego, CA, USA). Data processing from FASTQ file to the Variant Call Format (VCF) files followed Best Practices from Genome Analysis Toolkit (GATK).{Van der Auwera, 2013 #4063} Finally, variant calls were functionally annotated with Variant Effect Predictor (VEP) from Ensembl.{McLaren, 2016 #4064} Variants in homozygosity were prioritized when filtering data, since this family reported consanguinity. Sanger sequencing on an ABI Prism 3130XL analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was performed for validation and segregation analysis. To investigate the novelty of the variants, several databases were consulted (1000G, ESP6500, ExAC, gnomAD, ClinVAR, and HGMD® Professional 2018.X). Conservation was analyzed using the GERP and PhyloP software,

and pathogenicity was *in silico* predicted with the SIFT, PolyPhen-2 and PROVEAN algorithms.

A read depth approach using gene panel sequencing data was also implemented for the detection of copy number variants (CNVs). Normalized mean coverage (NMC) was divided by the media obtained from all samples' NMC, and a ratio <0.7 and >1.3 was considered for a loss and gain of exonic targets, respectively.

For the array-CGH, genomic DNA was fragmented and labelled according to manufacturer's instructions from Agilent Technologies (Genomic DNA Analysis Enzymatic Labeling for Blood, Cells, or Tissues' protocol Version 7.3 March 2014), and subsequently hybridized with a SurePrint G3 Human High-Resolution Discovery Microarray 1x1M: (AMADID-023642) containing 963331 distinct biological features (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Arrays were scanned in an Agilent Microarray Scanner (Agilent G2565C) according to the manufacturer's protocol and data extracted using Agilent Feature Extraction Software 12.0.3.2 following the Agilent protocol CGH_1200_Jun14, grid template 023642_D_F_20111015 and the QC Metric Set CGH_QCMT_Jun14. Array-CGH data were analyzed with Cytogenomics 4.0 and interpretation of results were carried out with Cartagenia both software from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

List of genes included in the gene panel MovDisord-498

AARS2, ABCB7, ABCD1, ABHD12, ACAT1, ACO2, ACTB, ADAR, ADCK3, ADCY5, AFG3L2, AH11, AIFM1, AIMP1, ALDH18A1, ALDH3A2, ALG6, ALS2, AMACR, AMPD2, AMT, ANO10, ANO3, AP4B1, AP4E1, AP4M1, AP4S1, AP5Z1, APTX, ARG1, ARL13B, ARL6IP1, ARSA, ARSI, ARX, ASPA, ASS1, ATCAY, ATLI, ATM, ATN1, ATP13A2, ATP1A2, ATP1A3, ATP2B3, ATP6AP2, ATP7A, ATP7B, ATP8A2, ATR, ATXN1, ATXN10, ATXN2, ATXN3, ATXN7, B4GAL

*NT1,BCAP31,BCKDHA,BCKDHB,BCS1L,BEANI,BICD2,BSCL2,BTD,C10ORF2,C12
ORF65,C19ORF12,C5ORF42,C9ORF72,CA8,CACNA1A,CACNA1B,CACNA1G,CACN
B4,CAMTA1,CASK,CC2D2A,CCDC88C,CCT5,CEP290,CEP41,CHCHD2,CHMP1A,C
IZI,CLCN2,CLN5,CLN6,CLP1,COASY,COL18A1,COL6A3,COQ2,COQ4,COQ7,COQ9
,COX10,COX15,COX20,COX8A,CP,CPT1C,CSTB,CTDP1,CTSD,CUL4B,CWF19L1,C
YP27A1,CYP2U1,CYP7B1,DARS2,DBT,DCAF17,DCLRE1B,DCTN1,DDB2,DDC,DD
HD1,DDHD2,DKC1,DLAT,DLG,DLG2,DNAJC13,DNAJC19,DNAJC6,DNMT1,DYRK1A,EA
RS2,ECHS1,EEF2,EIF2B1,EIF2B2,EIF2B3,EIF2B4,EIF2B5,EIF4G1,ELOVL4,ELOVL
5,EMC1,ENTPD1,EPM2A,ERCC2,ERCC3,ERCC5,ERCC6,ERCC8,ERLIN1,ERLIN2,E
TFA,ETFB,ETFDH,ETHE1,EXOSC3,EXOSC8,FA2H,FAAH2,FAM126A,FAM134B,FA
RS2,FBXL4,FBXO7,FGF14,FLRT1,FLVCR1,FMRI,FOLR1,FOXC1,FOXG1,FOXRED
1,FTH1,FTL,FUCA1,FUS,FXN,GAD1,GALC,GAMT,GAN,GATM,GBA,GBA2,GCDH,
GCH1,GFAP,GFM1,GFM2,GJB1,GJC2,GLB1,GLDC,GLRX5,GNAL,GNAO1,GOSR2,
GPR56,GRID2,GRM1,GTPBP2,GTPBP3,HACE1,HEXA,HEXB,HIBCH,HPCA,HPRT1,
HSD17B4,HSPD1,HTRA1,HTRA2,HTT,IARS2,IBA57,IFIH1,IFRD1,INPP5E,ISG15,IT
M2B,ITPR1,JPH3,KCNA1,KCNA2,KCNC3,KCND3,KCNJ10,KCTD17,KCTD7,KDM6
A,KIAA0196,KIAA0226,KIF1A,KIF1C,KIF5A,KIF7,KLC2,KMT2B,KMT2D,L1CAM,L2
HGDH,LAMA1,LIAS,LIPT1,LMNB1,LMNB2,LRPPRC,LRRK2,LYST,MAG,MAN2B1,M
ARS,MARS2,MCEE,MECP2,MECR,MICU1,MLC1,MMACHC,MMADHC,MME,MPZ,
MRE11A,MRPL10,MTFMT,MTHFR,MTPAP,MTTP,MUT,NALCN,NARS2,NDUFA1,N
DUFA10,NDUFA11,NDUFA12,NDUFA2,NDUFA4,NDUFA9,NDUFAF2,NDUFAF5,N
DUFAF6,NDUFS1,NDUFS2,NDUFS3,NDUFS4,NDUFS7,NDUFS8,NDUFV1,NDUFV
2,NHLRC1,NIPAI,NKX2-
1,NOL3,NOP56,NPC1,NPC2,NPHPI,NT5C2,NUP62,OFD1,OPAI,OPA3,OPHN1,PAN*

K2,PARK2,PARK7,PARN,PAX6,PC,PCBD1,PCCA,PCCB,PCNA,PDE10A,PDE8B,PDGFB,PDGFRB,PDHA1,PDHB,PDHX,PDSSI,PDSS2,PDYN,PET100,PEX10,PEX7,PGAPI,PHYH,PIK3R5,PINK1,PITX2,PLA2G6,PLEKHG4,PLP1,PMM2,PMPCA,PNKD,PNKP,PNPLA6,PNPT1,POLG,POLR3A,POLR3B,PPCDC,PPCS,PPP2R2B,PRICKLE1,PRKCG,PRKRA,PRNP,PRPS1,PRRT2,PSENI,PTEN,PTS,QDPR,RAB39B,RAB3GAP2,RAD1,RARS,RARS2,REEP1,REEP2,RELN,RIPPLY1,RNASEH2A,RNASEH2B,RNASEH2C,RNF170,RNF216,RPGRIPI1,RPIA,RTELI,RTN2,SACS,SAMD9L,SAMHD1,SCARB2,SCN1A,SCN4A,SCO2,SCP2,SCYL1,SDHA,SDHAF1,SEPSECS,SERAC1,SETX,SGCE,SIL1,SLC16A2,SLC17A5,SLC19A3,SLC1A3,SLC20A2,SLC25A15,SLC25A19,SLC25A42,SLC2A1,SLC30A10,SLC33A1,SLC39A14,SLC46A1,SLC52A2,SLC52A3,SLC6A19,SLC6A3,SLC6A8,SLC9A1,SLC9A6,SMPD1,SNAP25,SNCA,SNX14,SPAST,SPG11,SPG20,SPG21,SPG7,SPR,SPTAN1,SPTBN2,SQSTM1,STUB1,SUCLA2,SUCLG1,SUOX,SURF1,SYNE1,SYNJ1,SYT14,TACO1,TAF1,TARDBP,TBCE,TBP,TCTN1,TCTN2,TCTN3,TDPI,TDP2,TECPR2,TENM4,TERT,TFG,TGFB1,TGM6,TH,THAP1,TIMM8A,TINF2,TK1,TMEM138,TMEM216,TMEM231,TMEM237,TMEM240,TMEM67,TOR1A,TPK1,TPPI,TRAPPC11,TREX1,TRMU,TRPC3,TSEN2,TSEN54,TSFM,TTBK2,TTC19,TTPA,TTR,TUBB4A,TXN2,UBA5,UCHL1,UQCRCQ,USP8,VAMP1,VCP,VHL,VLDLR,VPS13A,VPS35,VPS37A,VPS53,VRK1,VWA3B,WDR45,WDR48,WDR73,WDR81,WFS1,WWOX,XK,XPA,XPC,XPRI,ZFR,ZFYVE26,ZFYVE27,ZNF592

Cell culture, immunofluorescence and western-blot

Skin cultured fibroblasts derived from the patient and controls were grown in high-glucose DMEM medium (4.5 g/L; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 10% (v/v) fetal bovine serum supplemented with 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

For immunofluorescence assay, primary fibroblasts culture were first treated *in vivo* with 75 nM MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) during 30 min at 37°C, then cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 4% paraformaldehyde. After permeabilization with 0.25% Triton X-100/ PBS, cells were blocked and immunostained in 5% horse-serum/PBS. Finally, coverslips containing stained fibroblasts were assembled with Vecta-Shield Mounting Medium containing DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Mitochondrial staining was achieved in living cells using MitoTracker Red CMXRos Anti-DLD (Novusbio Littleton, CO, USA) was used at 1/100 dilution for the endogenous DLD detection. Images were visualized using a SP8 Leica confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

For western-blot (WB) analysis, fibroblasts were scraped with PBS, centrifuged and cell pellets were lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM DTT, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate). Total cell lysates (TCL) protein extracts were quantified using the BCA method (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, MA, USA); a final amount of 25 µg was employed for WB analysis. For each WB, three independent technical replicates were done. The Mann-Whitney test was used for statistical analysis. Antibodies and their corresponding dilutions are indicated at the end of this section.

Dihydrolipoamide dehydrogenase assay

Activity of the DLD (dihydrolipoamide dehydrogenase) enzyme was measured using a modified protocol based on previously reported procedures (Becker DM et al. Clin Chim Acta 1982; 121: 1-9; Chuang et al. Biochem J 1981; 200: 59-67).

Nonsense-mediated mRNA decay assay

The effect of nonsense-mediated decay (NMD) mechanism over *FBXO7* transcripts was evaluated by qPCR using fibroblasts from control subjects and from the proband, that were investigated with and without treatment with emetine dihydrochloride hydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), as previously reported. {Kawarai, 2016 #3872} Treated fibroblasts were cultured with 100 µg/mL of emetine dihydrochloride hydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37°C for 6 h before extraction of total RNA. cDNA was obtained with qScript cDNA SuperMix (Quantabio, Beverly, MA, USA) and 0.5 µL were used for each qPCR reaction using Perfecta SyberGreen Mix (Quantabio, Beverly, MA, USA). The following forward and reverse *FBXO7* primers were used: 5'-AGTCCCTGCTGTGCACCTG-3' and 5'-CGCTGGAATGTCATCTTGAAGA-3'. Reactions were carried out in LightCycler® 480 System thermocycler (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). Data was analyzed by Fit Points with LightCycler® 480 SW 1.5 software. *FBXO7* expression levels were normalized to *GAPDH* levels and $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method was used for relative quantification. The expression levels of fibroblasts from healthy individuals without treatment were assumed as control fibroblasts, and expression levels from the remaining samples were expressed as percentage of the controls. Three independent assays of NMD and three qPCR reactions were done for each assay. A Mann-Whitney-Wilcoxon test was used for analyzing the experimental data.

Ubiquitin-proteasome system (UPS) activity assay

Fibroblasts cells were lysed in 10 mM Tris pH 7.8, 1 mM EDTA, 5 mM Mg₂Cl, 0.1% Triton X-100. Chymotrypsin-like activity was determined using 10 µg of total cell extracts in a total volume of proteasome activity buffer (10 mM tris pH 7.8, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5 mM Mg₂Cl, 2 mM ATP), incubating for 60 min at 37 °C with 0.5 mM of

the fluorogenic substrate Z-Leu-Leu-Glu-AMC (Z-LLE-AMC) (Enzo, New York, NY, USA). Fluorescence intensity was quantified by using the Flx800 multi-detection microplate reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) with excitation and emission wavelengths at 360 and 460 nm, respectively. Values correspond to six independent samples (from independent wells), each sample was performed in triplicates in the UPS assay and mean value were used.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Fibroblasts cells were collected with phosphate buffered saline 1X (PBS 1X) and centrifuged at 800 g, 4°C for 5 minutes. The pellet was resuspended in 100 µl of lysis buffer (Tris pH 7.5 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%) with protease inhibitors, sonicated and quantified by BCA Protein assay (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Samples were heated at 95°C for 5 min after adding loading buffer 6x containing Tris 500 mM, 30% glycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10% SDS and 0.6 M DTT. Proteins were resolved by SDS-PAGE on different percentage of polyacrylamide gels, ranging from 8% to 12% and run around 90 min at 120 V in running buffer (25 mM Trizma R Base, 192 mM glycine and 1% SDS). Resolved proteins were transferred onto nitrocellulose membranes during 90 minutes at 200 mA per gel in transfer buffer (25 mM Trizma R Base, 192 mM glycine and 20% methanol) and then blocked with 5% non-fat milk powder in PBS for 1 h at room temperature (RT). Membranes were incubated with the corresponding primary antibodies (indicated at the end of this section) diluted in 4% bovine serum albumin in PBS overnight at 4°C. Then, we proceeded to the incubation with the corresponding secondary antibodies coupled with horseradish peroxidase and diluted in 5% milk/PBS for 1h at RT. Finally, proteins were visualized using either West Pico SuperSignal Substrate or SuperSignal West Femto (Thermo

Fisher, Waltham, MA, USA) on an ImageQuant RT ECL imaging system (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Immunoblots were quantified by densitometry using ImageJ 1.50a.

Mitophagy-related proteins

Mitochondrial enriched fractions were isolated from fibroblast with Mitochondrial Isolation Kit for Mammalian Cells (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) according to manufacturer's instructions. Mitochondrial fraction was resuspended in 100 µl of lysis buffer (Tris pH 7.5 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%) with protease inhibitors and quantified with BCA.

Protein markers of mitophagy (PINK1, Parkin, polyUb-K63, VDAC) were immunodetection by WB. Antibodies and their corresponding dilutions are indicated at the end of this section.

Electronic microscopy

For electron microscopy studies, wild-type and mutant primary fibroblasts culture were grown in a Lab-Tek Permanox Chamber slide pf 4 wells (Nalge Nunc International, Naperville, IL), washed with fresh 0.1M phosphate buffer (PB) and fixed with 3% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB) for 2 hours at 37°C. Subsequently, samples were washed with 0.1M PB, 5 times (5 min. each) and stored at 4°C in the same buffer. The samples were post-fixed in 2% OsO₄ for 1 hour at room temperature and stained in 2% uranyl acetate in the dark for 2 h at 4°C. Then, they were rinsed in distilled water, dehydrated in ethanol and infiltrated overnight in Durcupan resin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Following polymerization, embedded cultures were detached from the wells and glued to Durcupan blocks. Finally, ultra-thin sections (0.08 µm) were cut with

an Ultracut UC-6 (Leica microsystems, Wetzlar, Germany), stained with lead citrate (Reynolds solution) and examined under a transmission electron microscope FEI Tecnai Spirit BioTwin (ThermoFisher Scientific company, Oregon, USA), using a digital camera Morada (Olympus Soft Image Solutions GmbH, Münster, Germany).

Antibodies

Antibody	Origin	Reference	Dilution
Anti-FBXO7	Polyclonal mouse	Abnova	1/1000
Anti-actin⁽¹⁾	Polyclonal rabbit	Abcam	1/5000
Anti-actin⁽²⁾	Monoclonal mouse	Sigma-Aldrich A5441	1/2000
Anti-Parkin	Polyclonal rabbit	Abcam Ab15954	1/2000
Anti-VDAC	Polyclonal rabbit	Abcam Ab15895	1/2000
PolyUB-K63	Monoclonal rabbit	Millipore 05-1308	1/2000
PINK1	Polyclonal rabbit	Novusbio BC100-494SS	1/2000
β-actin	Monoclonal mouse	Sigma-Aldrich A5441	1/2000

(1) Used as protein loading control in WB for detection of FBXO7.

(2) Used as protein loading control in WBs related to UPS activity assay and mitochondrial studies.

Tabla 12. *Tabla de anticuerpos utilizados en los estudios funcionales de FBXO7 (extraída del artículo Correa-Vela et al., 2022 Supplementary material).*

Capítulo 6. Discusión general

Considerando los avances en la última década de las técnicas de secuenciación del genoma, los estudios realizados para el uso racional de los tests de diagnóstico genéticos concluyen que la caracterización clínico-radiológica de las enfermedades minoritarias sigue siendo el primer paso para conseguir la mayor rentabilidad diagnóstica y la adecuada interpretación de estos resultados genéticos (Morales-Briceño et al., 2019).

En las enfermedades genéticas que cursan con trastornos del movimiento en pediatría además del conocimiento de las características clínicas en este grupo etario, es necesario el desarrollo y el uso de herramientas clínicas válidas que incluyan a la población pediátrica ya que en muchas de ellas solo disponemos de información y herramientas clínicas diseñadas para adultos. Por tanto, la falta de estudios clínicos en estadios precoces de la enfermedad, así como de escalas aplicables en la práctica clínica en el niño, hacen que no siempre sea posible el diagnóstico precoz de la enfermedad y consecuentemente, su adecuado manejo terapéutico desde la infancia. Este peor manejo de la enfermedad con tratamientos menos específicos y eficaces o en el mejor de los casos el retraso hasta la edad adulta de tratamientos eficaces como la estimulación cerebral profunda, provoca que en pacientes pediátricos afectados por enfermedades minoritarias que cursan con trastornos del movimiento (como *SGCE*-MD) muchos años de discapacidad motora y/o social potencialmente evitable.

Por otro lado, el descubrimiento de nuevos genes, así como de nuevos fenotipos asociados a genes conocidos nos ha permitido investigar sobre los mecanismos moleculares y funcionales de las proteínas que codifican estos genes y así ampliar el conocimiento

existente sobre las bases fisiopatológicas de estas enfermedades genéticas que cursan con trastornos del movimiento como el parkinsonismo y las enfermedades NBIA.

1. Identificar signos motores precoces y patrones distónicos en la infancia en una serie amplia de pacientes pediátricos afectos de *SGCE-MD*

Edad y edad de inicio

Para este trabajo de tesis, se reclutaron 49 pacientes con distonía mioclónica por defecto en el gen épsilon sarcoglicano (*SGCE-MD*) procedentes de diferentes centros hospitalarios de España. Se trata de un estudio transversal realizado en una serie eminentemente pediátrica (n=49 edad media de 15 años (rango 2-51 años)), en la que ha sido posible identificar patrones distónicos y signos motores clave de la enfermedad en edades más precoces que en otras series similares de pacientes con *SGCE-MD* publicadas anteriormente. Por citar algunos ejemplos, podemos comparar nuestra serie pediátrica con la serie de Peall et al. (n=27; edad media 28 años (rango 3–74 años), Roze et al. (n=41; edad media 29 años (rango 4-75 años) y Zutt et al. (n=19 edad media 41 años (15–75 años)) (Peall et al., 2014; Roze et al., 2008; Zutt et al., 2016)

La edad de inicio media 2.8 (± 1.8) años con rango (0.5-8) es más baja a la edad de inicio de otras series, habiéndose relacionado este dato con una predicción positiva de ser portador de la mutación en *SGCE* en los pacientes afectos con MD (Zutt et al., 2016).

Variabilidad: Distonía de la escritura y la marcha

La distonía desencadenada por alguna acción (escribir, caminar o correr) ha sido observada en la gran mayoría de los pacientes *SGCE-MD*. En especial, la distonía del

escribiente fue la forma más frecuente de distonía de acción y el único signo distónico en diferentes acciones de miembros superiores en un tercio de los pacientes. En contraposición, la distonía postural o en reposo de miembros superiores fue muy infrecuente (26% y 2% respectivamente). Por tanto, el acto de escribir parece ser una tarea especialmente afectada en niños con *SGCE*-MD y una prueba exploratoria que muestra alta sensibilidad para evaluar la presencia de distonía en estos niños en la práctica clínica diaria.

Distonía del escribiente

Una de las características que hemos observado en el espasmo del escribiente que presentaron los niños afectados con *SGCE*-MD es la implicación frecuente del codo y el hombro en relación con el espasmo del escribiente idiopático del adulto. En este último, se observa habitualmente una distonía de musculatura distal del brazo, afectando especialmente mano y muñeca (Goldman et al., 2015). De hecho, de los cuatro patrones de distonía del escribiente que hemos observado en estos pacientes, es llamativo que en tres de ellos el hombro está afectado (**Figura 6**). Otra característica del espasmo del escribiente idiopático del adulto es su asociación con temblor hasta en un 45% de los casos (Marsden y Sheehy, 1990), en esta serie no se ha observado temblor distónico durante la escritura lo que también puede ser un signo clave de la distonía del escribiente en los niños con *SGCE*-MD. Ambas características han sido consideradas en la modificación de la escala para la evaluación de la severidad de la distonía del escribiente en estos pacientes.

Curso estático

La distonía asociada al gen *SGCE* parece presentar diferencias en su forma de presentación y en su curso clínico respecto a otras distonías genéticas que se presentan en la edad pediátrica. Según lo que hemos observado en este trabajo de tesis, la distonía en *SGCE*-MD aparece durante una acción específica e involucra a un grupo de músculos con una distribución focal o segmentaria. Sin embargo, en la mayoría de las distonías genéticas de inicio en la edad pediátrica, el primer síntoma suele ser una distonía de acción con una distribución focal seguida de un curso progresivo con generalización a otras regiones corporales. Como ejemplo, la distonía asociada al defecto en *KMT2B* suele aparecer en miembros inferiores con generalización secundaria y predominio craneal, cervical y laríngeo (Cif et al., 2020). En la distonía asociada a *TOR1A* el inicio suele ser focal en miembro inferior o miembro superior con generalización secundaria en más del 60% de los casos con afectación de la musculatura axial y cervical (Lange et al., 2021). En la distonía asociada a *THAPI* el debut suele ser en miembro superior seguido de musculatura craneal, cervical y una progresión rostro caudal, con un curso generalizado o multifocal en la mayoría de los pacientes y predominio importante de afectación craneal/laríngea (Blanchard et al., 2011). En la distonía asociada a *ANO3* existe una combinación variable de temblor cervical distónico, disfonía laríngea y distonía oromandibular de inicio entre los 3 y los 6 años, presentando una progresión de los síntomas durante la adolescencia o en el adulto (Zorzi et al., 2018). En consecuencia, observar una distonía del escribiente aislada y de curso estable, sin progresión a otras regiones corporales durante la infancia o adolescencia, debe hacernos pensar principalmente en un defecto genético en *SGCE*.

Distonía de la marcha

Respecto a la distonía en la marcha, en esta serie pediátrica de pacientes afectados con *SGCE*-MD hemos observado distonía de la marcha al caminar en 23 pacientes (50%) y al correr en 20 pacientes (67%).

La distonía en miembros superiores es la región más frecuentemente afectada también durante la marcha (50%), seguida de los miembros inferiores (43%) y el eje axial (tronco y cuello) (13%), en línea con lo observado en otros estudios pediátricos (Vanegas et al., 2020). Sin embargo, en un estudio longitudinal con población adulta donde analizan la presencia de distonía en pacientes con *SGCE*-MD a lo largo de una década se observa una distribución diferente con un predominio de la distonía en musculatura cervical (86%) seguido de miembros superiores (24%). Esta distribución anatómica persiste en la visita de seguimiento, aunque con aumento significativo de la distonía en miembros superiores (Timmers et al., 2020). Por tanto, la distribución de la distonía del *SGCE*-MD en pediatría parece presentar un predominio en miembros superiores incluyendo acciones como caminar o correr, seguida de la afectación en piernas y por último cuello y tronco, a diferencia del adulto.

La distonía en miembros inferiores se ha descrito en otras series aproximadamente en la mitad de los pacientes afectados de *SGCE*-MD cuando la presentación se produce en los primeros diez años (Peall et al., 2014). En nuestra serie todos los pacientes presentaron sintomatología antes de los 10 años y la frecuencia observada en distonía de miembros inferiores (43% de los pacientes durante la carrera) es similar a la descrita por Peall et al., y superior a la descrita en otras series con población adulta (Peall et al., 2014; Roze et al., 2008).

Dos patrones de marcha distónica han sido identificados en esta serie: el “*circular shaking leg*” donde una hiperflexión de la cadera y/o la rodilla junto con una inversión del pie, da lugar a este patrón rotacional y el patrón “*dragging leg*” consistente en una rotación externa de cadera junto con una extensión de la rodilla. Algunos de estos pacientes, también presentaron al correr un patrón de carrera con trote o carrera en “caballo de cartón” denominado “*hobby horse ride*” y ya descrito en otras distonías genéticas como la distonía *TUBB4A–DYT4* (**Video S1e**) (Wilcox et al., 2011). Es interesante destacar que estos patrones observados, implican musculatura distal y proximal de miembros inferiores por lo que también se trata de una distonía segmentaria en la mayoría de los casos.

Otro hecho interesante observado en esta serie pediátrica es que se han identificado dos pacientes con distonía de tronco (inclinación) durante la marcha, un tipo de distonía que en publicaciones previas ha sido sugerido como sugestivo de otros diagnósticos frente a *SGCE-MD* (Zutt et al., 2016).

Trucos sensitivos

El truco sensitivo se define como aquellos gestos que a través de una aferencia sensitiva cutánea o propioceptivas, mejora la distonía, sin estar relacionadas con la tarea o postura que se está realizando (Dagostino et al., 2019).

Considerando otros signos precoces relacionados con la distonía, los trucos sensitivos son frecuentes en las distonías aisladas especialmente en aquellas con afectación cervical y de miembros superiores (Ramos et al., 2014). Sin embargo, su frecuencia no ha sido investigada en *SGCE-MD*. En este estudio, identificamos trucos sensitivos utilizados por los pacientes de forma espontánea en el 34% al caminar y en el 14% durante la escritura. El truco más utilizado ha sido el “*self-touching*”; en estos casos, la combinación del

estímulo táctil cutáneo junto con la propiocepción podría ser necesaria para que el truco sensitivo sea efectivo y apoya la idea de que la plasticidad anormal del circuito sensorimotor es una pieza clave de la patogenia de la distonía, en la que la vía cerebelo-tálamo-estriatal podría estar implicada (Kaji et al., 2018; Ramos et al., 2014). Como ejemplo de este truco sensitivo hemos observado en esta serie de pacientes tocarse una parte distal de la mano que está escribiendo con la otra mano, o meter las manos en los bolsillos o tocarse la pierna mientras caminan o corren. Cabe destacar, que estos gestos sensitivos no solo mejoran la postura distónica y la velocidad a la que se realiza la tarea, hallazgos también observados en otro estudio a través de medidas cinemáticas (Newby et al., 2022) sino que, además, se ha observado una reducción de los movimientos mioclónicos, lo cual sugiere mecanismos patofisiológicos compartidos para distonía y mioclonía (**Video S1a, b**) (**Figura 5**).

Discapacidad y diagnóstico precoz

La identificación temprana junto con las intervenciones terapéuticas más indicadas en pacientes con *SGCE*-MD podría mejorar el manejo y el pronóstico de estos pacientes. La estimulación cerebral profunda, ha demostrado ser una técnica terapéutica muy eficaz para el control de los trastornos del movimiento en estos pacientes incluyendo la edad pediátrica. En nuestro estudio, hemos encontrado una discapacidad para la escritura en más de la mitad de los pacientes y para caminar en un tercio de los pacientes y, en consecuencia, pensamos que en algunos de estos niños en los que la discapacidad motora es moderada o severa podrían beneficiarse de estimulación cerebral profunda en el globo pálido interno. Sin embargo, un metaanálisis reciente muestra una edad media de intervención de 34 años 4 meses, SD 16 años 4 meses (Krause et al., 2021; Wang y Yu, 2021). Las causas de este retraso en el tratamiento pueden ser multifactoriales, pero el

retraso del diagnóstico durante la infancia puede ser un factor causal importante. Por tanto, creemos que es conveniente modificar los criterios diagnósticos actuales para que puedan ser aplicados de una forma más enfocada a la edad pediátrica y esto permita mejorar la detección precoz de esta enfermedad, de inicio en la infancia. En la **Tabla 13** se proponen unos criterios diagnósticos para niños menores de 18 años, teniendo en cuenta los hallazgos más frecuentes encontrados en la serie más grande de niños afectados con *SGCE*-MD publicadas hasta la fecha, como la distonía del escribiente y la distonía de la marcha con los distintos patrones descritos (Vanegas et al., 2020 y Correa-Vela et al., 2022).

Criterios diagnósticos más de los síntomas principales:	
Mioclonías de acción cervicales o en miembros superiores	70% (27/41 pacientes) ¹
Distonía del escribiente	83% (35/42 pacientes) ²
Distonía de la marcha (caminar o carrera) Diferentes patrones de marcha pueden estar presentes: circular shaking leg, dragging-leg or hobby-horse ride running	67% (20/30 pacientes) ²
y además:	
Desarrollo normal	90% (43/48 pacientes) ¹
Historia familiar	58% (28/48 pacientes) ¹
Criterios de exclusión	
Lesiones en neuroimagen relacionadas con los síntomas clínicos	
Presencia de otras alteraciones neurológicas	
¹ Vanegas et al., 2021; ² Correa-Vela et al., 2022	

Tabla 13. Propuesta de criterios diagnósticos para pacientes pediátricos afectados por *SGCE*-MD. En la primera parte de la tabla se encontrarían los criterios que apoyarían el diagnóstico y en la segunda parte los criterios de exclusión de la enfermedad. (Estos

critérios no estão publicados en la actualidad y no forman parte del artículo publicado Correa-Vela et al., 2022)

2. Caracterizar y cuantificar la severidad de la distonía del escribiente y la distonía de la marcha en los pacientes pediátricos afectados de *SGCE-MD* con el desarrollo de escalas tarea-específicas

En un análisis clinimétrico realizado para la evaluación de la escala motora BFMDRS en la distonía de pacientes pediátricos afectados con *SGCE-MD* realizado por nuestro grupo, pudimos demostrar que la escala BFMDRS no cumplía con criterios de aceptabilidad y validez apropiados (Vanegas et al., 2020). Además, en otro estudio en el que se observó un aumento significativo de la presencia de la distonía en MMSS a lo largo del tiempo, la escala BFMDRS no pudo demostrar el incremento de la severidad clínica en dicha serie (Timmers et al., 2020). La distribución focal o el carácter leve de la distonía han sido razones consideradas para obtener estos resultados.

Con el objetivo de cuantificar la severidad de la distonía asociada a la escritura y a la marcha en estos pacientes, se han utilizado escalas de distonía más apropiadas a las características clínicas de los pacientes con mutaciones en *SGCE*. Por este motivo, se han seleccionado escalas que evalúan la distonía de acción en tareas básicas de la vida diaria de pacientes en edad pediátrica. Por un lado, hemos modificado y validado una escala existente para el espasmo del escribiente (Wissel et al., 1996) en la que se ha eliminado el ítem “temblor” y se ha añadido el ítem “posturas distónicas en el hombro” para poder puntuar tanto la región distal como la región proximal del miembro superior durante la escritura (**Tabla 4**). De forma análoga, una escala que puntúa la severidad de las posturas distónicas en miembros inferiores, braceo y postura del tronco durante la marcha y la

carrera ha sido desarrollada por nuestro grupo y propuesta en una de las publicaciones que forman este trabajo de tesis (**Tabla 5**).

Tanto la mediana de puntuación de la distonía de la marcha como la de la escritura se sitúan en el rango leve de severidad clínica de las escalas (definida como un valor en el tercio inferior del valor total de la escala) (**Tabla 9**). Sin embargo, para el 30% de los pacientes con la escala WCRS y para el 24% de los pacientes con la escala modificada WCRS+S las puntuaciones de la distonía asociada a la escritura fueron moderadas (situadas en el tercio medio del valor total de las escalas) y severa para 5% con la escala WCRS+S (definida como un valor en el tercio superior del valor total de la escala). Por lo tanto, parece existir una mejor detección de la severidad de la distonía del escribiente en estos pacientes con dichas escalas.

La escala modificada WCRS+S ha demostrado tener una mejor aceptabilidad para valorar la distonía en estos pacientes, sin presentar efecto suelo ni efecto techo, y con unos valores medianas más cercanos a la mediana teórica que los mostrados en la BFMDRS (**Tabla 10**) (Kosutzka et al., 2019; Popa et al., 2014; Vanegas et al., 2020). Estas observaciones, van acordes con la alta frecuencia de la distonía en la escritura y en otras actividades de los miembros superiores observada y la discapacidad asociada que estos pacientes reportan a lo largo de su vida. Probablemente, la escala BFMDRS diseñada para distonías generalizadas no sea la escala óptima para detectar cambios en la severidad de la distonía y en este sentido, la escala WCRS+S se plantea como una buena herramienta para estos pacientes.

Respecto a la nueva escala GDRS, por el contrario, sigue obteniendo una aceptabilidad insuficiente presentando también efecto suelo, el carácter leve de la distonía podría ser causante de este hecho (**Tabla 10**).

Un dato interesante de esta última es que se observa un aumento de la puntuación en la severidad de la escala durante la carrera comparado con la marcha (Wilcoxon test $p < 0,01$). Es un hecho relevante ya que, al realizar la evaluación, muchos de los pacientes que realizaron la marcha, se negaron a correr debido a encontrar en esta actividad una dificultad importante, por lo que, podría ser que la severidad de la distonía asociada a la carrera en estos pacientes podría estar infraestimada.

Ambas escalas presentaron buena correlación con la escala actualmente más utilizada para la evaluación de distonía en estos pacientes, la escala Burke-Fahn-Marsden (BFMDRS) lo que nos confirma la validez de constructo de estas herramientas clínicas propuestas en este estudio (**Tabla 9**).

Las puntuaciones en severidad de distonía asociada la marcha y la carrera también presentó buena correlación con la puntuación en discapacidad percibida y objetivada por en la evaluación del paciente, así como la puntuación en velocidad al realizar la tarea específica (**Tabla 9**).

3. Describir el espectro clínico-radiológico asociado a la enfermedad por defecto en el gen *FBXO7*

El defecto asociado a *FBXO7* hasta la fecha en la que se ha publicado el artículo que forma parte de esta tesis se ha descrito en unos 27 pacientes de 11 familias distintas procedentes de Europa, Asia y Oriente Medio con un alto grado de consanguinidad (incluyendo el caso presentado en esta tesis) con los siguientes fenotipos: 7 pacientes con paraparesia espástica (Shojaee et al., 2008), 5 pacientes con parkinsonismo aislado de inicio precoz (Paisan-Ruiz et al., 2010; Yalcin-Cakmakli et al.; 2014, Lohmann et al., 2015) y 15 pacientes como un SPP (**Tabla 11**) (Shojaee et al., 2008; Fonzo et al., 2009;

Paisan-Ruiz 2010; Gunduz et al., 2014; Conedera et al., 2016; Wei et al., 2018). En el caso presentado en los resultados de esta tesis reportamos un nuevo fenotipo severo y complejo asociado a *FBXO7* con nuevas características clínicas y radiológicas relevantes para su diagnóstico precoz.

Edad y síntomas al debut

Se trata de una enfermedad con una edad media de inicio entre la segunda y tercera década de la vida, siendo la espasticidad y la bradicinesia los síntomas más frecuentes en la primera evaluación clínica (**Tabla 11**). Los pacientes que debutaron antes de los 10 años, incluyendo nuestra paciente, presentan un fenotipo de parkinsonismo o SPP con retraso psicomotor y/o déficit cognitivo junto con signos adicionales muy discapacitantes como son la disfagia, la incontinencia de esfínteres y otros trastornos del movimiento como las mioclonías. (Fonzo et al., 2009; Yalcin-Cakmakli et al., 2014; Jin et al., 2020). Por otro lado, en los pacientes reportados con debut por encima de los 30 años el fenotipo principal es un parkinsonismo de inicio precoz más similar a la enfermedad de Parkinson clásica (Lohmann et al., 2015; Kim et al., 2022; Keller Sarmiento et al., 2022).

Fenotipo clínico de pacientes con defecto en *FBXO7*

Un parkinsonismo rígido-acinético con inestabilidad postural, signos piramidales y disartria son los signos clínicos más frecuentemente reportados en los pacientes. Además, más de la mitad de los pacientes presentan movimientos oculares sacádicos lentos, limitación de la mirada vertical, distonía y disfagia, mientras que sólo un tercio reportan temblor de reposo o de acción. Los trastornos del movimiento no causados por la medicación dopaminérgica como las mioclonías, corea, tics y movimientos estereotipados solo han sido reportados en casos aislados. El curso progresivo de la

enfermedad produce un deterioro cognitivo junto con pérdida de deambulación o encamamiento entre el 15-38% de los pacientes (**Tabla 11**).

Parkinsonismo asociado a *FBXO7* y acumulo de hierro en ganglios basales

Nuestra paciente comparte la mayoría de los signos neurológicos descritos asociados al defecto *FBXO7*, sin embargo, se trata del único caso de la literatura que no presenta una buena respuesta del parkinsonismo a L-DOPA y en el que, además, se observa una recaptación normal de la dopamina en el DATscan (**Tabla 11**). Todo ello sugiere una disfunción postsináptica, como ocurre en los defectos NBIA. De hecho, en la paciente presentada en esta tesis, se han observado signos sugestivos de acúmulo de hierro en globo pálido y sustancia nigra de forma similar a la que aparecen en los pacientes con defectos en *PANK2*, *PLA2G6* y *ATP13A2* (Kruer et al., 2012). Además, existe una clara correlación en el tiempo entre la aparición de los signos de parkinsonismo y el hallazgo de depósitos de hierro en la neuroimagen. Este hallazgo amplía el fenotipo asociado al defecto *FBXO7*, ya que en la mayor parte de los casos se observan estudios de neuroimagen normales o con atrofia cerebral inespecífica (**Tabla 11**). Recientemente, Kim EY et al. han presentado otro paciente con defecto en *FBXO7* con un parkinsonismo de inicio precoz sin buena respuesta a L-DOPA y con hipointensidades en globo pálido bilateral en secuencias sensibles al depósito de hierro (Kim et al., 2022). Este hecho es relevante ya que existen otras enfermedades neurodegenerativas de inicio en la infancia y no perteneciente al grupo NBIA, en las que también se han observado imágenes sugestivas de acúmulo cerebral como algunas distonías genéticas (*KMT2B*) o algunas enfermedades lisosomales (gangliosidosis GM1 y alfafucosidosis) (Cif et al., 2020; Hinarejos et al., 2020; Mohammad et al., 2020). Por tanto, teniendo en cuenta nuestros resultados, la clasificación de genes NBIA puede resultar algo confusa actualmente, y el

defecto por *FBXO7* no debería ser descartado ante un cuadro neurodegenerativo de parkinsonismo o SPP que asocie en la neuroimagen signos de acumulo de hierro en ganglios basales.

***FBXO7* y disfunción cerebelosa**

Entre los trastornos recesivos más reportados en la literatura que también presentan SPP y características clínicas solapantes con los defectos *FBXO7* se encuentran principalmente los genes *PLA2G6* y *ATP13A2*. Además, otro hallazgo similar entre la paciente de esta tesis y los pacientes con defecto en *PLA2G6* son los signos clínicos y radiológicos de disfunción cerebelosa. Publicaciones recientes, han señalado que la atrofia cerebelosa puede ser la clave diagnóstica de un parkinsonismo o SPP de inicio precoz para los defectos en *PLA2G6* (Magrinelli et al., 2022).

***FBXO7* y epilepsia**

Además, de estos signos clínicos y radiológicos la paciente también presenta una epilepsia resistente a fármacos. El parkinsonismo asociado a epilepsia de difícil control de inicio en la infancia ha sido asociado a distintas formas de ceroidlipofuscinosis, mutaciones en *STXBPI* (Álvarez Bravo y Yusta Izquierdo, 2018) o en *SCN1A* entre otros (Fasano et al., 2014). En este caso, además de la epilepsia y el parkinsonismo con poca respuesta a L-DOPA, la ausencia de temblor de reposo o la atrofia cerebelosa progresiva son características clínicas compartidas tanto por la paciente presentada como por los pacientes con ceroidlipofuscinosis tipo 2 por TPP1. Curiosamente en el único caso reportado de un defecto genético en *FBXO7* e imagen sugestiva de acumulo de hierro palidal bilateral, además del presentado en esta tesis, el paciente también presenta crisis epilépticas (Kim et al., 2022). Es interesante, que tanto en la ceroidlipofuscinosis tipo 2,

así como en otras enfermedades lisosomales, también se han reportado imágenes hipointensas en ganglios basales en secuencias T2 similares a las encontradas en los trastornos NBIA, lo que sugiere posibles mecanismos etiopatogénicos compartidos por estos genes (Martínez-Rubio et al., 2022).

Fenotipo radiológico de *FBXO7*

Por último, además de la hipointensidad palidal bilateral en las secuencia “*Gradient recall echo*” [GRE], la atrofia cerebelosa progresiva, en esta paciente se ha observado el signo radiológico identificado de “*hot cross bun*” que representa la degeneración selectiva de los tractos pontocerebelosos (**Figura 8**). Este hallazgo radiológico, junto a la pobre respuesta a levodopa y la recaptación de dopamina normal en el DATscan, sugiere un parkinsonismo postsináptico similar a lo que encontramos en otros parkinsonismo atípicos no monogénicos como la atrofia multisistémica, y contrasta con reportes de fenotipos previos asociados a *FBXO7* donde se observa un degeneración nigroestriatal severa en dos pacientes (Fonzo et al., 2009 y Paisán-Ruiz et al., 2010)

Variantes genéticas patogénicas en *FBXO7*

Atendiendo a las características genéticas, nuestra paciente es portadora recesiva de la variante *nonsense* p.(Ser123*). Los pacientes reportados previamente con variantes *nonsense* también han presentado el inicio de los síntomas principales en la segunda década de la vida con una evolución hacia un parkinsonismo progresivo, discapacidad severa o muerte prematura en 5 de los 13 casos de la literatura. (Conedera et al., 2016; Fonzo et al., 2009; Gündüz et al., 2014; Paisán-Ruiz et al., 2010; Wei et al., 2018; Yalcin-Cakmakli et al., 2014). Por otro lado, los pacientes portadores de variantes *missense* asocian fenotipos menos severos, como parkinsonismo de inicio juvenil o paraparesia

espástica aislada, en probable relación a una actividad residual de *FBXO7* (Lohmann et al., 2015) (**Tabla 11**).

En resumen, en esta tesis reportamos 3 características clínicas y neuroradiológicas nuevas para el fenotipo asociado por el defecto en el gen *FBXO7* que se solapan con otros fenotipos de parkinsonismo-piramidalismo de herencia autosómica recesiva (*ATP13A2*, *PLA2G6* y *CLN2*) y con otras formas de parkinsonismo atípico no monogénico. Esta observación sugiere que defectos en el gen *FBXO7* deben sospecharse en pacientes con clínica de parkinsonismo e imagen sugestiva de acumulo de hierro en ganglios basales. Además, *FBXO7* debe ser considerado en formas de parkinsonismo de inicio precoz con afectación clínica y radiológica cerebelosa y/o epilepsia. Finalmente, el solapamiento clínico hace pensar que probablemente existan mecanismos etiopatogénicos compartidos entre la neurodegeneración de *FBXO7* y otras enfermedades monogénicas NBIA

4. Evaluar *in vitro* el impacto funcional de las variantes noveles identificadas en el gen *FBXO7* en una paciente con parkinsonismo-piramidalismo y neurodegeneración por acumulo de hierro

La variante c.368C>G p.(Ser123*) en el gen *FBXO7* se localiza en la parte proximal de la proteína. Según nuestros resultados, se produciría un mRNA aberrante, que sería degradado por el mecanismo de control “*nonsense mediated decay*” (NMD), lo que produciría una ausencia completa de proteína *FBXO7* y efecto de pérdida de función. El sistema “*nonsense mediated decay*” es un mecanismo de control de calidad del RNA que evita la expresión de mRNAs con codon stop prematuros (Fatscher et al., 2015 y Miller et al., 2014). En estudios previos con mutaciones *nonsense* [p.(Arg498*) y p.(Glu470*)],

la ausencia de proteína ha sido demostrada en modelos de célula humana con la mutación *nonsense* p.(Arg498*), sin embargo, no se demostró la implicación del sistema “*nonsense mediated decay*”, probablemente debido a la localización C-terminal de esta variante (Zhao et al., 2011).

Funcionalmente, FBXO7 ha demostrado su participación en el proteosoma y la mitocondria. En ratones *knockdown Fbxo7* se ha observado una disminución de la actividad del sistema ubiquitina-proteosoma (Vingill et al., 2016). En la misma dirección, en este estudio, hemos demostrado una disminución de la actividad del sistema ubiquitina-proteosoma en los fibroblastos del paciente afecto de *FBXO7-SPP* y consecuentemente, una acumulación de proteínas poliubiquitinizadas.

Estos hallazgos, sugieren una relación entre la alteración en el proteosoma y el acúmulo de hierro, que también se ha observado en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson. Como ejemplo, en un modelo animal de enfermedad de Parkinson en la que se induce la inhibición del proteosoma con lactacisteína se observó una pérdida de neuronas dopaminérgicas, acumulación de hierro anormal y un aumento tanto de la proteína reguladora del hierro 2 (IRP2) como del transportador divalente de metal 1 (DMT1) en la sustancia nigra (Xie et al., 2010). Además, modelos *in vitro* de neuronas dopaminérgicas con lactacisteína demostraron un aumento de hierro labil, disrupción de las proteínas reguladoras de hierro y agregación de las proteínas conjugadas con ubiquitina lo que produce una muerte celular prematura (Li et al., 2012). Todos estos resultados experimentales, sugieren que la alteración en proteínas reguladoras del hierro, debido a la disfunción del proteosoma, podría conllevar la degeneración de neuronas dopaminérgicas.

De forma similar, también se han observado un acúmulo de proteínas ubiquitinizadas en diferentes modelos animales o en estudios histológicos de pacientes con defectos en algunos de los genes NBIA. Como ejemplo, se han observado en estudios anatomopatológicos del globo pálido de pacientes PKAN y formando la composición de los esferoides, considerados el marcador histopatológico de los pacientes con defecto en *PLA2G6*. También en modelos animales de WDR45 se han observado agregados ubiquitin-positivos en las neuronas y los axones (Hinarejos et al., 2020).

Por otro lado, *FBXO7* participa en la mitofagia mediada por PINK1/parkin y dependiente de ubiquitina (Burchell et al., 2013; Zhou et al., 2018; Scarffe LA 2014). En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias en la expresión de proteínas relacionadas con la mitofagia entre fibroblastos de la paciente con *FBXO7*-SPP y fibroblastos control. Sin embargo, sí se observaron un aumento de proteínas mitocondriales, probablemente debido a un acúmulo de mitocondrias. Por otro lado, las alteraciones en las crestas mitocondriales se asocian a mitocondrias alteradas (Cogliati et al., 2016). En un modelo transgénico de *Drosophila*, la sobreexpresión de *FBXO7* supuso la ruptura de las crestas mitocondriales y la acumulación de material de alta densidad en la mitocondria alterada (Zhou et al., 2015). Asimismo, en los fibroblastos de nuestra paciente observamos una morfología anormal de las crestas, probablemente un efecto secundario que se observa frecuentemente en otras enfermedades neurodegenerativas entre las que se encuentran los trastornos NBIA (Hirai et al., 2001 y Tello et al., 2018).

En esta misma vía responsable del mantenimiento mitocondrial también parece estar implicado el gen *ATP13A2*, que presenta un fenotipo solapante con la paciente presentada en el estudio. En el caso de *ATP13A2*, la proteína juega un papel importante en la fusión del autofagosoma con el lisosoma, a lo que sigue la degradación lisosomal de la

mitocondria dañada (Park et al., 2015). De hecho, muchos otros trastornos lisosomales (*FUCA1*, *GLB1*, *TPPI1*, etc.) pueden causar trastornos del movimiento y presentar una imagen radiológica de hipointensidad palidal bilateral, probablemente causada por acumulo de hierro (Martinez-Rubio et al., 2022). Por tanto, la alteración en la degradación lisosomal de la mitocondria podría ser un mecanismo común en enfermedades que causan parkinsonismo de inicio precoz y neurodegeneración por acúmulo de hierro.

Estos resultados, deben ser interpretados con precaución, ya que se trata de un solo caso con defecto en *FBXO7* asociado a la mutación p.(Ser123*). Es necesario ampliar estudios para clarificar la relación entre alteración del proteosoma, la disfunción mitocondrial y la acumulación de hierro anormal como mecanismos principales subyacentes en pacientes afectados de parkinsonismo piramidalismo por *FBXO7*.

En conclusión, la ausencia de *FBXO7* lleva a una alteración en la degradación de proteínas a través del proteosoma y una acumulación de las proteínas poliubiquitinizadas, lo cual destaca el papel fundamental del sistema ubiquitina proteosoma en el mecanismo patogénico de la enfermedad.

Capítulo 7. Limitaciones y futuras propuestas de investigación

La falta de estudios longitudinales en esta patología hace que el pronóstico de la distonía de la marcha no esté claro, tanto la remisión espontánea de esta distonía (Roze et al., 2008; Asmus et al., 2002) como la persistencia de esta e incluso empeoramiento de la distonía al correr (Kyllerman et al., 1990) han sido reportadas. Además, nuestro estudio transversal que no permite inferir conclusiones sobre evolución y pronóstico presenta un gap de tiempo medio de unos 12 años entre el inicio de los síntomas y la evaluación de los pacientes, por lo que serían necesarios estudios longitudinales de historia natural en pacientes afectados con SGCE- MD en un futuro para aclarar estas cuestiones.

Durante la escritura se han observado posturas axiales que generan controversia sobre su origen distónico o compensatorio. La realización de un estudio comparativo con población pediátrica de similar edad para evaluar las posturas durante la escritura a través de la escala WCRS o su versión modificada podría arrojar luz sobre este tema y sobre la evolución de los movimientos anormales en el desarrollo normal de una actividad motora compleja como es la escritura.

Las escalas de distonía de acción propuestas han demostrado tener buena validez de constructo y mejorar algunas características respecto a la escala BFMDRS en términos de aceptabilidad, estudios de validez de escala en esta enfermedad y en otras distonías focales o segmentarias serían necesarios para comprobar estos resultados.

En relación con la paciente con defecto por *FBXO7* se trata del reporte de un solo caso en el que la clínica y los estudios de neuroimagen explican un nuevo fenotipo para esta condición genética, no obstante, son necesarios nuevos estudios de otros pacientes para confirmar los hallazgos clínicos de este nuevo fenotipo asociado a *FBXO7*.

A partir del hallazgo neuroradiológico de depósito de hierro en globo pálido y sustancia negra presentado en esta tesis en una paciente con defecto de *FBXO7*, esta condición genética se encuentra junto con otras enfermedades neurodegenerativas con clínica y neuroimagen sugestiva de NBIA. Sin embargo, la falta de estudios post-mortem no permite establecer una correlación histopatológica por el momento que confirme la neurodegeneración por acúmulo de hierro en este gen.

Es necesario ampliar estudios para clarificar la relación entre alteración del proteosoma, la disfunción mitocondrial y la acumulación de hierro anormal como mecanismos principales subyacentes en pacientes afectados de parkinsonismo piramidalismo por *FBXO7*.

Capítulo 8. Conclusiones

1. En conclusión, esta tesis amplía el conocimiento sobre los signos motores precoces y patrones distónicos en pacientes con síndrome de distonía mioclónica relacionado con mutaciones en *SGCE*. Hemos podido realizar una descripción precisa de los signos más característicos de la distonía de estos pacientes, así como de su distribución corporal, su gravedad y la discapacidad asociada. Hemos podido identificar diferentes patrones distónicos tanto para la distonía de la escritura como para la distonía de la marcha y hemos descrito los diferentes trucos sensitivos realizados por los pacientes que les mejoran la distonía y las mioclonías.
2. Hemos utilizado la escala más específica para valorar la forma de distonía más frecuente en estos pacientes, la distonía de la escritura (Writer's Cramp Rating Scale). Además, hemos desarrollado nuevas escalas específicas para la distonía de la escritura y de la marcha (Writer's Cramp Rating Scale modificada o WCRS+S y la Gait Dystonia Rating Scale o GDRS) que nos han permitido cuantificar la severidad de la distonía de acción asociada al *SGCE*-MD en las diferentes acciones. Hemos comprobado que ambas escalas han presentado una buena correlación con la escala Burke-Fahn-Marsden (BFMDRS) lo que nos confirma la validez de constructo, así como, unos mejores datos de aceptabilidad. Por todo ello, concluimos que las escalas propuestas se presentan como buenas herramientas clínicas para la evaluación de los pacientes con *SGCE*-MD.
3. En esta tesis hemos reportamos tres características clínicas y neuroradiológicas nuevas para el fenotipo asociado por el defecto en *FBXO7* por la variante novel c.368C>G p.(Ser123*) en homocigosis. Estos hallazgos amplían el fenotipo del

defecto *FBXO7* y solapan con otros fenotipos de parkinsonismo-piramidalismo de herencia autosómica recesiva (*PLA2G6*, *ATP13A2* y *CLN2*), así como con otras formas de parkinsonismo atípico no monogénico. Por tanto, concluimos que el defecto por *FBXO7* debe sospecharse en pacientes con clínica de parkinsonismo de inicio temprano o SPP e imagen sugestiva de acumulo de hierro en ganglios basales. Adicionalmente, *FBXO7* debe ser considerada en formas de parkinsonismo de inicio precoz o SPP con afectación clínica y radiológica cerebelosa y/o epilepsia.

4. Además, hemos identificado en el estudio en fibroblastos de la paciente con *FBXO7*-SPP, que la ausencia de *FBXO7* lleva a una alteración en la degradación de proteínas a través del proteosoma y una acumulación de las proteínas poliubiquitinizadas, lo cual destaca el papel fundamental del sistema ubiquitina proteosoma en el mecanismo patogénico de la enfermedad.

Capítulo 9. Referencias bibliográficas

1. Abela L, Kurian MA. Postsynaptic movement disorders: clinical phenotypes, genotypes, and disease mechanisms. *J Inherit Metab Dis* 2018;41. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0205-0>.
2. Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, Delong MR, Fahn S, Fung VSC, et al. Phenomenology and classification of dystonia: A consensus update. *Movement Disorders* 2013;28. <https://doi.org/10.1002/mds.25475>.
3. Álvarez Bravo G, Yusta Izquierdo A. The adult motor phenotype of Dravet syndrome is associated with mutation of the STXBP1 gene and responds well to cannabidiol treatment. *Seizure* 2018;60. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.06.010>.
4. Arber CE, Li A, Houlden H, Wray S. Review: Insights into molecular mechanisms of disease in neurodegeneration with brain iron accumulation: Unifying theories. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2016;42. <https://doi.org/10.1111/nan.12242>.
5. Asmus F, Langseth A, Doherty E, Nestor T, Munz M, Gasser T, et al. “Jerky” Dystonia in children: Spectrum of phenotypes and genetic testing. *Movement Disorders* 2009;24. <https://doi.org/10.1002/mds.22426>.
6. Asmus F, Zimprich A, Tezenas Du Montcel S, Kabus C, Deuschl G, Kupsch A, et al. Myoclonus-dystonia syndrome: epsilon-sarcoglycan mutations and phenotype. *Ann Neurol*. 2002;52. <https://doi.org/10.1002/ana.10325>.
7. Baide-Mairena H, Marti-Sánchez L, Marcé-Grau A, Cazurro-Gutiérrez A, Sanchez-Montanez A, Delgado I, et al. Genetic diagnosis of basal ganglia disease in childhood. *Dev Med Child Neurol* 2022;64. <https://doi.org/10.1111/dmcn.15125>.
8. Blanchard A, Ea V, Roubertie A, Martin M, Coquart C, Claustres M, et al. DYT6 dystonia: Review of the literature and creation of the UMD locus-specific database (LSDB) for mutations in the THAP1 gene. *Hum Mutat* 2011;32. <https://doi.org/10.1002/humu.21564>.
9. Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurology* 1999;52. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.6.1214>.

10. Burchell VS, Nelson DE, Sanchez-Martinez A, Delgado-Camprubi M, Ivatt RM, Pogson JH, et al. The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nat Neurosci* 2013;16. <https://doi.org/10.1038/nn.3489>.
11. Burke RE, Fahn S, Marsden CD, Bressman SB, Moskowitz C, Friedman J. Validity and reliability of a rating scale for the primary torsion dystonias. *Neurology* 1985;35. <https://doi.org/10.1212/wnl.35.1.73>.
12. Chen W, de Hemptinne C, Miller AM, Leibbrand M, Little SJ, Lim DA, et al. Prefrontal-Subthalamic Hyperdirect Pathway Modulates Movement Inhibition in Humans. *Neuron* 2020;106. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.012>.
13. Chuhma N, Tanaka KF, Hen R, Rayport S. Functional connectome of the striatal medium spiny neuron. *Journal of Neuroscience* 2011;31. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3833-10.2011>.
14. Cif L, Demailly D, Lin JP, Barwick KE, Sa M, Abela L, et al. KMT2B-related disorders: Expansion of the phenotypic spectrum and long-term efficacy of deep brain stimulation. *Brain* 2020;143. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa304>.
15. Comella CL, Leurgans S, Wu J, Glenn ST, Chmura T. Rating scales for dystonia: A multicenter assessment. *Movement Disorders* 2003;18. <https://doi.org/10.1002/mds.10377>.
16. Cogliati S, Enriquez JA, Scorrano L. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem Sci*. 2016;41. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.001>
17. Conedera S, Apaydin H, Li Y, Yoshino H, Ikeda A, Matsushima T, et al. FBXO7 mutations in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiol Aging* 2016;40. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.01.003>.
18. Dagostino S, Ercoli T, Gigante AF, Pellicciari R, Fadda L, Defazio G. Sensory trick in upper limb dystonia. *Parkinsonism Relat Disord* 2019;63. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.01.006>.
19. Davison C. Pallido-pyramidal disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1954;13. <https://doi.org/10.1097/00005072-195401000-00007>.
20. Defazio G, Abbruzzese G, Livrea P, Berardelli A. Epidemiology of primary dystonia. *Lancet Neurol*. 2004;3. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00907-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00907-X).

21. DeLong MR, Wichmann T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 2007;64. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.1.20>.
22. Fahn S, Marsden CD, Calne DB. Classification and investigation of dystonia. In: Marsden CD, Fahn S, editors. *Movement disorders*. Vol. 2. London: Butterworths; 1987. 332–58
23. Fasano A, Borlot F, Lang AE, Andrade DM. Antecollis and levodopa-responsive parkinsonism are late features of dravet syndrome. *Neurology* 2014;82. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000521>.
24. Fatscher T, Boehm V, Gehring NH. Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2017-9>.
25. Fonzo AD, Dekker MCJ, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Guedes LC, et al. FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian- pyramidal syndrome. *Neurology* 2009;72. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000338144.10967.2b>.
26. Fusilli C, Migliore S, Mazza T, Consoli F, de Luca A, Barbagallo G, et al. Biological and clinical manifestations of juvenile Huntington's disease: a retrospective analysis. *Lancet Neurol* 2018;17. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30294-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30294-1).
27. García-Cazorla A, Ortez C, Pérez-Dueñas B, Serrano M, Pineda M, Campistol J, et al. Hypokinetic-rigid syndrome in children and inborn errors of metabolism. *European Journal of Paediatric Neurology*, 2011;15. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2011.04.013>.
28. Gautschi M, Merlini L, Calza AM, Hayflick S, Nuoffer JM, Fluss J. Late diagnosis of fucosidosis in a child with progressive fixed dystonia, bilateral pallidal lesions and red spots on the skin. *European Journal of Paediatric Neurology* 2014;18. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2014.02.005>.
29. Ghosh D, Indulkar S. Primary myoclonus-dystonia: A diagnosis often missed in children. *J Child Neurol* 2013;28. <https://doi.org/10.1177/0883073813488677>.
30. Goldman JG. Writer's cramp. *Toxicon.* 2015;1. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.024>

31. Grabowski M, Zimprich A, Lorenz-Depiereux B, Kalscheuer V, Asmus F, Gasser T, et al. The epsilon-sarcoglycan gene (SGCE), mutated in myoclonus-dystonia syndrome, is maternally imprinted. *European Journal of Human Genetics* 2003;11. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200938>.
32. Grattan-Smith PJ, Wevers RA, Steenbergen-Spanjers GC, Fung VSC, Earl J, Wilcken B. Tyrosine hydroxylase deficiency: Clinical manifestations of catecholamine insufficiency in infancy. *Movement Disorders* 2002;17. <https://doi.org/10.1002/mds.10095>.
33. Gregory A, Westaway SK, Holm IE, Kotzbauer PT, Hogarth P, Sonek S, et al. Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A2. *Neurology* 2008;71. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000327094.67726.28>.
34. Grünewald A, Djarmati A, Lohmann-Hedrich K, Farrell K, Zeller JA, Allert N, et al. Myoclonus-dystonia: significance of large SGCE deletions. *Hum Mutat* 2008;29. <https://doi.org/10.1002/humu.9521>.
35. Gündüz A, Eken AG, Bilgiç B, Hanagasi HA, Bilgüvar K, Günel M, et al. FBXO7-R498X mutation: Phenotypic variability from chorea to early onset parkinsonism within a family. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.07.016>.
36. Hainque E, Vidailhet M, Cozic N, Charbonnier-Beaupel F, Thobois S, Tranchant C, et al. A randomized, controlled, double-blind, crossover trial of zonisamide in myoclonus-dystonia. *Neurology* 2016;86. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002631>.
37. Hayflick SJ, Westaway SK, Levinson B, Zhou B, Johnson MA, Ching KHL, et al. Genetic, Clinical, and Radiographic Delineation of Hallervorden–Spatz Syndrome. *New England Journal of Medicine* 2003;348. <https://doi.org/10.1056/nejmoa020817>.
38. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998;67. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>.
39. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001;21. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-09-03017.2001>.

40. Hinarejos I, Machuca-Arellano C, Sancho P, Espinós C. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neuroinflammation in neurodegeneration with brain iron accumulation (Nbia). *Antioxidants* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/antiox9101020>.
41. Jin X, An L, Hao S, Liu Q, Zhang Q, Wang X, et al. Compound heterozygous variants of the FBXO7 gene resulting in infantile-onset Parkinsonian-pyramidal syndrome in siblings of a Chinese family. *J Clin Lab Anal* 2020;34. <https://doi.org/10.1002/jcla.23324>.
42. Joseph S, Schulz JB, Stegmüller J. Mechanistic contributions of FBXO7 to Parkinson disease. *J Neurochem* 2018;144. <https://doi.org/10.1111/jnc.14253>.
43. Kaji R, Bhatia K, Graybiel AM. Pathogenesis of dystonia: is it of cerebellar or basal ganglia origin? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018;89. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-316250>.
44. Keller Sarmiento IJ, Afshari M, Kinsley L, Silani V, Akhtar RS, Simuni T, et al. Novel bi-allelic FBXO7 variants in a family with early-onset typical Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2022;104. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2022.10.014>.
45. Kim EY, Kim SY, Seo Y, Shin C. Nearly Abolished Dopamine Transporter Uptake in a Patient With a Novel FBXO7 Mutation. *J Mov Disord.* 2022;15. <https://doi.org/10.14802/jmd.22006>.
46. Kinugawa K, Vidailhet M, Clot F, Apartis E, Grabli D, Roze E. Myoclonus-dystonia: An update. *Movement Disorders* 2009;24. <https://doi.org/10.1002/mds.22425>.
47. Klein C, Fahn S. Translation of Oppenheim's 1911 paper on dystonia. *Movement Disorders* 2013;28. <https://doi.org/10.1002/mds.25546>.
48. Kosutzka Z, Tisch S, Bonnet C, Ruiz M, Hainque E, Welter ML, et al. Long-term GPi-DBS improves motor features in myoclonus-dystonia and enhances social adjustment. *Movement Disorders* 2019;34. <https://doi.org/10.1002/mds.27474>.
49. Krause P, Koch K, Gruber D, Kupsch A, Gharabaghi A, Schneider GH, et al. Long-term effects of pallidal and thalamic deep brain stimulation in myoclonus dystonia. *Eur J Neurol* 2021;28. <https://doi.org/10.1111/ene.14737>.

50. Kruer MC, Boddaert N, Schneider A, Houlden H, Bhatia KP, Gregory A, et al. Neuroimaging features of neurodegeneration with brain iron accumulation. *American Journal of Neuroradiology* 2012;33. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2677>.
51. Kurian MA, Dale RC. Movement Disorders Presenting in Childhood. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology* 2016;22. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000367>.
52. Kyllerman M, Forsgren L, Sanner G, Holmgren G, Wahlström J, Drugge U. Alcohol-responsive myoclonic dystonia in a large family: Dominant inheritance and phenotypic variation. *Movement Disorders* 1990;5. <https://doi.org/10.1002/mds.870050403>.
53. Lange LM, Junker J, Loens S, Baumann H, Olschewski L, Schaake S, et al. Genotype–Phenotype Relations for Isolated Dystonia Genes: MDSGene Systematic Review. *Movement Disorders* 2021;36. <https://doi.org/10.1002/mds.28485>.
54. Leuzzi V, Carducci Claudia, Tolve M, Giannini MT, Angeloni A, Carducci Carla. Very early pattern of movement disorders in sepiapterin reductase deficiency. *Neurology* 2013;81. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000437299.51312.5f>.
55. Leuzzi V, Nardecchia F, Pons R, Galosi S. Parkinsonism in children: Clinical classification and etiological spectrum. *Parkinsonism Relat Disord* 2021;82. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.10.002>.
56. Li XP, Xie WJ, Zhang Z, Kansara S, Jankovic J, Le WD. A mechanistic study of proteasome inhibition-induced iron misregulation in dopamine neuron degeneration. *Neurosignals*. 2012;20. <https://doi.org/10.1159/000332954>.
57. Lin MK, Farrer MJ. Genetics and genomics of Parkinson’s disease. *Genome Med* 2014;6. <https://doi.org/10.1186/gm566>.
58. Lohmann E, Coquel AS, Honoré A, Gurvit H, Hanagasi H, Emre M, et al. A new F-box protein 7 gene mutation causing typical Parkinson’s disease. *Movement Disorders* 2015;30. <https://doi.org/10.1002/mds.26266>.
59. Luciano AY, Jinnah HA, Pfeiffer RF, Truong DD, Nance MA, LeDoux MS. Treatment of myoclonus-dystonia syndrome with tetrabenazine. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.09.029>.

60. Magrinelli F, Mehta S, di Lazzaro G, Latorre A, Edwards MJ, Balint B, et al. Dissecting the Phenotype and Genotype of PLA2G6-Related Parkinsonism. *Movement Disorders* 2022;37. <https://doi.org/10.1002/mds.28807>.
61. Marras C, Lang A, van de Warrenburg BP, Sue CM, Tabrizi SJ, Bertram L, et al. Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Movement Disorders* 2016;31. <https://doi.org/10.1002/mds.26527>.
62. Marsden CD, Sheehy MP. Writer's cramp. *Trends Neurosci.* 1990;13. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90007-w](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90007-w).
63. Martínez-Rubio D, Hinarejos I, Sancho P, Gorriá-Redondo N, Bernadó-Fonz R, Tello C, et al. Mutations, Genes, and Phenotypes Related to Movement Disorders and Ataxias. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19):11847. <https://doi.org/10.3390/ijms231911847>.
64. Medina A, Nilles C, Martino D, Pelletier C, Pringsheim T. The Prevalence of Idiopathic or Inherited Isolated Dystonia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mov Disord Clin Pract.* 2022;9. <https://doi.org/10.1002/mdc3.13524>.
65. Mercado-Pimentel R, Piedimonte F, Micheli F, Montilla-Uzcátegui V, Barbosa N, Ramírez-Gómez C, et al. Successful Unilateral Surgical Approach to Internal Globus Pallidus and Ventral Intermediate Nucleus of the Thalamus in 3 Cases of Myoclonus-Dystonia Syndrome. *Stereotact Funct Neurosurg* 2021;99. <https://doi.org/10.1159/000511715>.
66. Milardi D, Quartarone A, Bramanti A, Anastasi G, Bertino S, Basile GA, et al. The Cortico-Basal Ganglia-Cerebellar Network: Past, Present and Future Perspectives. *Front Syst Neurosci* 2019;13. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2019.00061>.
67. Miller JN, Pearce DA. Nonsense-mediated decay in genetic disease: friend or foe? *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2014;762. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.05.001>.
68. Mohammad SS, Angiti RR, Biggin A, Morales-Briceño H, Goetti R, Perez-Dueñas B, et al. Magnetic resonance imaging pattern recognition in childhood bilateral basal ganglia disorders. *Brain Commun* 2020;2. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa178>.

69. Morales-Briceño H, Mohammad SS, Post B, Fois AF, Dale RC, Tchan M, et al. Clinical and neuroimaging phenotypes of genetic parkinsonism from infancy to adolescence. *Brain* 2020;143. <https://doi.org/10.1093/brain/awz345>.
70. Nambu A, Tokuno H, Hamada I, Kita H, Imanishi M, Akazawa T, et al. Excitatory conical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. *J Neurophysiol* 2000;84. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.1.289>.
71. Nardocci N, Zorzi G, Barzaghi C, Zibordi F, Ciano C, Ghezzi D, et al. Myoclonus-dystonia syndrome: Clinical presentation, disease course, and genetic features in 11 families. *Movement Disorders* 2008;23. <https://doi.org/10.1002/mds.21715>.
72. Newby R, Muhamed S, Alty J, Cosgrove J, Jamieson S, Smith S, et al. Geste Antagoniste Effects on Motor Performance in Dystonia-A Kinematic Study. *Mov Disord Clin Pract*. 2022;9. <https://doi.org/10.1002/mdc3.13505>.
73. Paisán-Ruiz C, Guevara R, Federoff M, Hanagasi H, Sina F, Elahi E, et al. Early-onset L-dopa-responsive Parkinsonism with pyramidal signs due to ATP13A2, PLA2G6, FBXO7 and Spatacsin mutations. *Movement Disorders* 2010;25. <https://doi.org/10.1002/mds.23221>.
74. Park JS, Blair NF, Sue CM. The role of ATP13A2 in Parkinson's disease: Clinical phenotypes and molecular mechanisms. *Movement Disorders* 2015;30. <https://doi.org/10.1002/mds.26243>.
75. Peall KJ, Kurian MA, Wardle M, Waite AJ, Hedderly T, Lin JP, et al. SGCE and myoclonus dystonia: motor characteristics, diagnostic criteria and clinical predictors of genotype. *J Neurol* 2014;261. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7488-3>.
76. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in parkinson's disease. *Neuron* 2015;85. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>.
77. Popa T, Milani P, Richard A, Hubsch C, Brochard V, Tranchant C, et al. The neurophysiological features of myoclonus-dystonia and differentiation from other dystonias. *JAMA Neurol* 2014;71. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.99>.
78. Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2015;30. <https://doi.org/10.1002/mds.26424>.

79. Puschmann A. Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: Clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.01.020>.
80. Ramos VFML, Karp BI, Hallett M. Tricks in dystonia: Ordering the complexity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-306971>.
81. Rocha H, Linhares P, Chamadoira C, Rosas MJ, Vaz R. Early deep brain stimulation in patients with myoclonus-dystonia syndrome. *Journal of Clinical Neuroscience* 2016;27. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.08.034>.
82. Rosewich H, Ohlenbusch A, Huppke P, Schlotawa L, Baethmann M, Carrilho I, et al. The expanding clinical and genetic spectrum of ATP1A3-related disorders. *Neurology* 2014;82. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000212>.
83. Roze E, Apartis E, Clot F, Guyant-Marechal L, Tranchant C, Damier P, et al. Myoclonus-dystonia: Clinical and electrophysiologic pattern related to sgce mutations. *Neurology* 2008;70. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000297516.98574.c0>.
84. Roze E, Lang AE, Vidailhet M. Myoclonus-dystonia: Classification, phenomenology, pathogenesis, and treatment. *Curr Opin Neurol* 2018;31. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000577>.
85. Rughani AI, Lozano AM. Surgical treatment of myoclonus dystonia syndrome. *Movement Disorders* 2013;28. <https://doi.org/10.1002/mds.25326>.
86. Sanger TD, Delgado MR, Gaebler-Spira D, Hallett M, Mink JW. Classification and definition of disorders causing hypertonia in childhood. *Pediatrics*, vol. 111, 2003. <https://doi.org/10.1542/peds.111.1.e89>.
87. Scarffe LA, Stevens DA, Dawson VL, Dawson TM. Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends Neurosci.* 2014;37. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.03.004>
88. Schrag A, Schott JM. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. *Lancet Neurology* 2006;5. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70411-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70411-2).
89. Shojaee S, Sina F, Banihosseini SS, Kazemi MH, Kalhor R, Shahidi GA, et al. Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by

- 500 K SNP arrays. *Am J Hum Genet.* 2008;82. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.05.005>.
90. Singer HS, Mink JW, Gilbert DL, Jankovic J. Classification of Movement Disorders. *Movement Disorders in Childhood*, 2016. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-411573-6.00003-6>.
91. Steeves TD, Day L, Dykeman J, Jette N, Pringsheim T. The prevalence of primary dystonia: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders* 2012;27. <https://doi.org/10.1002/mds.25244>.
92. Tello C, Darling A, Lupo V, Pérez-Dueñas B, Espinós C. On the complexity of clinical and molecular bases of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Clin Genet.* 2018;93 <https://doi.org/10.1111/cge.13057>.
93. Tezenas Du Montcel S, Clot F, Vidailhet M, Roze E, Damier P, Jedynak CP, et al. Epsilon sarcoglycan mutations and phenotype in French patients with myoclonic syndromes. *J Med Genet* 2006;43. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.036780>.
94. Timmers ER, Peall KJ, Dijk JM, Zutt R, Tijssen CC, Bergmans B, et al. Natural Course of Myoclonus-Dystonia in Adulthood: Stable Motor Signs But Increased Psychiatry. *Movement Disorders* 2020;35. <https://doi.org/10.1002/mds.28033>.
95. Tokola A, Laine M, Tikkanen R, Autti T. Susceptibility-weighted imaging findings in aspartylglucosaminuria. *American Journal of Neuroradiology* 2019;40. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A6288>.
96. Tomko RJ, Hochstrasser M. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annu Rev Biochem* 2013;82. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060410-150257>.
97. Tranchant C. Is Pallido-Pyramidal Syndrome Still a Useful Concept? Yes. *Mov Disord Clin Pract* 2020;7. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12845>.
98. Tranchant C, Koob M, Anheim M. Parkinsonian-Pyramidal syndromes: A systematic review. *Parkinsonism Relat Disord* 2017;39. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.02.025>.
99. Vanegas MI, Marcé-Grau A, Martí-Sánchez L, Mellid S, Baide-Mairena H, Correa-Vela M, et al. Delineating the motor phenotype of SGCE-myoclonus dystonia syndrome. *Parkinsonism Relat Disord* 2020;80. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.09.023>.

100. Vantaggiato C, Crimella C, Airoidi G, Polishchuk R, Bonato S, Brighina E, et al. Defective autophagy in spastizin mutated patients with hereditary spastic paraparesis type 15. *Brain* 2013;136. <https://doi.org/10.1093/brain/awt227>.
101. Vingill S, Brockelt D, Lancelin C, Tatenhorst L, Dontcheva G, Preisinger C, et al. Loss of FBXO 7 (PARK 15) results in reduced proteasome activity and models a parkinsonism-like phenotype in mice . *EMBO J* 2016;35. <https://doi.org/10.15252/emboj.201593585>.
102. Wang X, Yu X. Deep brain stimulation for myoclonus dystonia syndrome: a meta-analysis with individual patient data. *Neurosurg Rev* 2021;44. <https://doi.org/10.1007/s10143-019-01233-x>.
103. Wassenberg T, Molero-Luis M, Jeltsch K, Hoffmann GF, Assmann B, Blau N, et al. Consensus guideline for the diagnosis and treatment of aromatic l-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency, *Orphanet J. Rare Dis.* 2017;12. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0522-z>.
104. Wei L, Ding L, Li H, Lin Yinyao, Dai Y, Xu X, et al. Juvenile-onset parkinsonism with pyramidal signs due to compound heterozygous mutations in the F-Box only protein 7 gene. *Parkinsonism Relat Disord* 2018;47. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.11.332>.
105. Wichmann T, Bergman H, DeLong MR. Basal ganglia, movement disorders and deep brain stimulation: advances made through non-human primate research. *J Neural Transm* 2018;125. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1736-5>.
106. Wilcox RA, Winkler S, Lohmann K, Klein C. Whispering dysphonia in an Australian family (DYT4): A clinical and genetic reappraisal. *Movement Disorders* 2011;26. <https://doi.org/10.1002/mds.23866>.
107. Wissel J, Kabus C, Wenzel R, Klepsch S, Schwarz U, Nebe A, et al. Botulinum toxin in writer's cramp: Objective response evaluation in 31 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;61. <https://doi.org/10.1136/jnnp.61.2.172>.
108. Wittke C, Petkovic S, Dobricic V, Schaake S, Arzberger T, Compta Y, et al. Genotype–Phenotype Relations for the Atypical Parkinsonism Genes: MDSGene Systematic Review. *Movement Disorders* 2021;36. <https://doi.org/10.1002/mds.28517>.

109. Xie W, Li X, Li C, Zhu W, Jankovic J, Le W. Proteasome inhibition modeling nigral neuron degeneration in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2010;115. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06914.x>.
110. Yalcin-Cakmakli G, Olgiati S, Quadri M, Breedveld GJ, Cortelli P, Bonifati V, et al. A new Turkish family with homozygous FBXO7 truncating mutation and juvenile atypical parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.06.024>.
111. Zech M, Boesch S, Jochim A, Weber S, Meindl T, Schormair B, et al. Clinical exome sequencing in early-onset generalized dystonia and large-scale resequencing follow-up. *Movement Disorders* 2017;32. <https://doi.org/10.1002/mds.26808>.
112. Zech M, Jech R, Boesch S, Škorvánek M, Weber S, Wagner M, et al. Monogenic variants in dystonia: an exome-wide sequencing study. *Lancet Neurol* 2020;19. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30312-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30312-4).
113. Zhao T, De Graaff E, Breedveld GJ, Loda A, Severijnen LA, Wouters CH, et al. Loss of nuclear activity of the FBXO7 protein in patients with parkinsonian-pyramidal syndrome (PARK15). *PLoS One.* 2011;6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016983>.
114. Zhou ZD, Lee JCT, Tan EK. Pathophysiological mechanisms linking F-box only protein 7 (FBXO7) and Parkinson's disease (PD). *Mutat Res Rev Mutat Res* 2018;778. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.10.001>.
115. Zhou ZD, Xie SP, Sathiyamoorthy S, Saw WT, Sing TY, Ng SH, et al. F-box protein 7 mutations promote protein aggregation in mitochondria and inhibit mitophagy. *Hum Mol Genet* 2015;24. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv340>.
116. Zorzi G, Carecchio M, Zibordi F, Garavaglia B, Nardocci N. Diagnosis and treatment of pediatric onset isolated dystonia. *European Journal of Paediatric Neurology* 2018;22. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2018.01.006>.
117. Zutt R, Dijk JM, Peall KJ, Speelman H, Dreissen YEM, Contarino MF, et al. Distribution and coexistence of myoclonus and dystonia as clinical predictors of SGCE mutation status: A pilot study. *Front Neurol* 2016;7. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00072>.