

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**



**Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural**

Bases Genéticas de Ataxias y Paraparesias Espásticas

Trabajo de Fin de Grado

Eduardo Martín Ruiz

Grado en Biotecnología

Curso académico: 2020-2021

Valencia, julio de 2021

Tutora: Dra. Carmen Espinós Armero

Co-Tutora: Dra. Amparo Andrés Bordería

Tutor UPV: Dr. Máximo Ibo Galindo Orozco

Título	Bases genéticas de ataxias y paraparesias espásticas
Autor	Eduardo Martín Ruiz
Tutora	Dra. Carmen Espinós Armero
Co-Tutora	Dra. Amparo Andrés Bordería
Tutor UPV	Dr. Máximo Ibo Galindo Orozco
Localidad y fecha	Valencia, julio de 2021

RESUMEN

Las ataxias constituyen un grupo de enfermedades neurológicas caracterizadas por una amplia expresividad variable y una gran heterogeneidad genética que conllevan, entre otros, el deterioro de la capacidad de coordinación motora asociada al cerebelo. Por su parte, las paraparesias espásticas también se caracterizan por constituir un grupo muy heterogéneo de trastornos neurodegenerativos, que causan manifestaciones clínicas relacionadas con una espasticidad progresiva y debilidad en las extremidades inferiores. Ambas condiciones incluyen formas hereditarias transmitidas de forma autosómica o ligadas al cromosoma X, dominante o recesiva. El elevado número de formas de ataxias y paraparesias espásticas, así como trastornos del movimiento relacionados que han sido descritos dificulta el diagnóstico. Considerando lo anterior, el diagnóstico genético mediante la utilización de herramientas basadas en la NGS (*Next Generation Sequencing*), permite una mayor efectividad en el diagnóstico de estos y otros grupos de enfermedades mendelianas que cursan con heterogeneidad genética.

En el presente trabajo se han investigado 15 probandos con ataxia o paraparesia espástica empleando el panel de genes SureSelect Custom Constitutional Panel 17 Mb de Agilent Technologies con el fin de indagar en las bases genéticas de la enfermedad que presentan. En el filtrado de datos se priorizaron cambios localizados en genes implicados en ataxias, paraparesias espásticas o síndromes que cursaran con estos signos, empleando un *pipeline* propio del laboratorio. Se ha recurrido al uso de herramientas de predicción *in silico* para estudiar el posible efecto deletéreo de los cambios candidatos. Adicionalmente, se ha investigado la patogenicidad de algunas variantes candidatas a ser mutación causal mediante ensayos funcionales.

En un paciente de la serie clínica se ha identificado un cambio en el gen *SPAST* (NM_014946): c.870+3A>G (rs1553314979). Mutaciones en *SPAST* se asocian a SPG4, la forma más común de paraparesia espástica autosómica dominante. Los signos clínicos manifestados por el probando coinciden con este trastorno, por lo que se ha decidido realizar un estudio *in vitro* de minigenes y un análisis de los transcritos de *SPAST* en este paciente para evaluar los efectos de la mutación sobre el *splicing*.

Del mismo modo, en otro paciente de la serie se ha caracterizado la presencia de la mutación c.-168G>T en el gen *FTL* (NM_000146.4). *FTL* codifica la cadena ligera de la ferritina y está implicado en trastornos como la neuroferritinopatía o el síndrome hereditario de hiperferritinemia y cataratas. La mutación detectada se localiza en la región promotora del gen, por lo que se ha decidido estudiar el efecto que esta tiene sobre la expresión de *FTL* mediante un ensayo de expresión de luciferasa.

Palabras clave: Panel de genes; Ataxias; Paraparesias espásticas; Diagnóstico genético

Title	Genetic bases of ataxias and spastic paraplegias
Author	Eduardo Martín Ruiz
Tutora	Dra. Carmen Espinós Armero
Co-Tutora	Dra. Amparo Andrés Bordería
Tutor UPV	Dr. Máximo Ibo Galindo Orozco
Place and date	Valencia, July 2021

SUMMARY

Ataxias constitute a group of neurological diseases characterised by a wide variable expressivity and genetic heterogeneity that involve, among others, impairment of the motor coordination capacity associated with the cerebellum. Spastic paraplegias, also known as spastic paraparesis, are also characterised by being a very heterogeneous group of neurodegenerative disorders, causing clinical manifestations related to progressive spasticity and weakness in the lower limbs. Both conditions include inherited forms that are transmitted in an autosomal or X-linked, dominant or recessive manner. The large number of forms of ataxias and spastic paraplegias, as well as, related movement disorders, that have been described makes diagnosis difficult. Bearing that in mind, genetic diagnosis using NGS (Next Generation Sequencing) based tools allows a more effective diagnosis of these and other groups of Mendelian diseases with genetic heterogeneity.

In the present study, 15 probands with ataxia or spastic paraplegias have been investigated using the Agilent Technologies SureSelect Custom Constitutional Panel 17 Mb gene panel in order to explore the genetic basis of the disease they present. Data filtering prioritised changes located in genes involved in ataxias, spastic paraplegias or syndromes with these signs, using the laboratory's own pipeline. In silico prediction tools have been used to study the possible deleterious effect of candidate mutations. Additionally, the pathogenicity of some candidate causal variants has been investigated using functional assays.

The variant c.870+3A>G (rs1553314979) located in the *SPAST* gene (NM_014946) has been identified in one patient in the clinical series studied. Mutations in *SPAST* are associated with SPG4, the most common form of autosomal dominant spastic paraparesis. The clinical signs manifested by the proband are consistent with this disorder, so it was decided to perform an *in vitro* study of minigenes and an analysis of *SPAST* transcripts in this patient to evaluate the effects of the mutation on splicing.

Similarly, the presence of the c.-168G>T mutation in the *FTL* gene (NM_000146.4) has been characterised in another patient in the series. *FTL* encodes the ferritin light chain and is implicated in disorders such as neuroferritinopathy or hereditary hyperferritinaemia and cataract syndrome. The mutation detected is located in the promoter region of the gene, so it was decided to study the effect of this mutation on *FTL* expression using a luciferase expression assay.

Key words: Gen panel; Ataxias; Spastic paraplegias; Genetic diagnosis

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora Carmen por confiar en mí y permitirme hacer el TFG en su laboratorio y por tener siempre la puerta abierta para mis innumerables dudas. También me gustaría agradecer a mi co-tutora Amparo por su infinita dedicación y su amabilidad para enseñarme tantas cosas y por su paciencia para lidiar con los pequeños inconvenientes que iban surgiendo.

Igualmente, me gustaría agradecer a mis compañeras de laboratorio; Lola, Isabel, Ana, Iryna y Victoria por haberme tratado tan bien desde el primer día y haberme ayudado en todo lo que necesitaba. Habéis hecho que hayan sido unos seis meses increíbles.

No me puedo olvidar tampoco de mis compañeros y amigos; Guillem, Elia, Alicia, María, Miguel, Malén... muchas gracias por haberme dado tan buenos momentos y haber hecho de estos cuatro años una experiencia inolvidable. También quería agradecer a Carlos y Toni por haberme aguantado durante este último año y haber hecho que haya sido mucho mejor.

Por último, tengo que agradecer a mis padres y a mi hermana por todo su apoyo, porque sin vosotros habría sido imposible llegar hasta aquí. Y a ti Carla, por haber estado siempre a mi lado y haber sido mi pilar.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Enfermedades Neurodegenerativas: Ataxias y Paraparesias espásticas	1
1.1.1. <i>Ataxias</i>	1
1.1.2. <i>Paraparesias Espásticas Hereditarias (HSP)</i>	3
1.1.2.1. <i>SPG4/SPAST</i>	4
1.1.3. <i>Enfermedades neurodegenerativas con acumulación en cerebro de hierro</i>	5
1.2. Diagnóstico Genético de las Enfermedades Neurodegenerativas	6
1.2.1. <i>¿Cómo determinar si las variantes encontradas son patológicas?</i>	7
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Análisis de los probandos	10
3.2. Análisis del panel de genes	10
3.2.1. <i>Filtrado para determinar los cambios candidatos</i>	10
3.2.2. <i>Validación de los cambios candidatos</i>	11
3.2.2.1. <i>Diseño de cebadores</i>	11
3.2.2.2. <i>Condiciones de PCR de validación y secuenciación Sanger</i>	11
3.3. Ensayo de MLPA	12
3.4. Ensayo de Minigenes en SPAST (SGT-1752)	12
3.4.1. <i>Construcción del plásmido</i>	12
3.4.2. <i>Transformación en E. coli DH5α</i>	14
3.4.3. <i>Purificación de las construcciones wild-type y mutante</i>	14
3.4.4. <i>Glicerinado de las colonias de E. coli</i>	15
3.4.5. <i>Cultivo de células HeLa</i>	15
3.4.6. <i>Transfección de células HeLa</i>	15
3.4.7. <i>Extracción de RNA</i>	16
3.4.8. <i>Retrotranscripción a cDNA</i>	16
3.4.9. <i>PCR para comprobar la integridad del cDNA y efecto de la mutación</i>	16
3.5. Análisis de Transcritos de SPAST (SGT-1752)	17
3.5.1. <i>Extracción de RNA del paciente</i>	17
3.5.2. <i>Retrotranscripción a cDNA</i>	17
3.5.3. <i>Diseño de cebadores</i>	17
3.5.4. <i>PCRs para comprobar la integridad del cDNA y analizar los transcritos</i>	18
3.6. Ensayo de expresión de FTL (MD-485)	18
3.6.1. <i>Construcción del plásmido</i>	18
3.6.2. <i>Transformación en E. coli DH5α</i>	19
3.6.3. <i>Purificación de las construcciones wild-type y mutante</i>	19
3.6.4. <i>Glicerinado de las colonias de E. coli</i>	20
3.6.5. <i>Cultivo de células HEK293T</i>	20

3.6.6.	<i>CoTransfección con las construcciones plasmídicas y el vector pRL Renilla Luciferase Control Reporter Vector en células HEK293T</i>	20
3.6.7.	<i>Ensayo de luciferasa</i>	20
3.6.8.	<i>Análisis estadístico</i>	21
4.	RESULTADOS	22
4.1.	Análisis del panel de genes	22
4.2.	Ensayo de MLPA (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>)	26
4.3.	Ensayo de minigenes del cambio c.870+3A>G en el gen <i>SPAST</i>	26
4.4.	Análisis de transcritos del cambio c.870+3A>G en el gen <i>SPAST</i>	29
4.5.	Análisis del efecto de la mutación c.-168G>T sobre la expresión de <i>FTL</i>	31
5.	DISCUSIÓN	33
5.1.	Análisis del panel de genes	33
5.2.	Estudio de la mutación <i>SPAST</i> c.870+3A>G en el probando SGT-1752	34
5.3.	Estudio de la mutación <i>FTL</i> c.-168G>T en el probando MD-485	35
6.	CONCLUSIONES	36
7.	REFERENCIAS	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Representación del gen <i>SPAST</i> . (a) <i>SPAST</i> está compuesto por 17 exones. (b) Se observan dos isoformas distintas debido a la presencia de dos sitios de iniciación (M1 y M87). (c) Se distinguen tres dominios comunes a ambas isoformas: MIT (<i>Microtubule interacting and traficking domain</i>), MTBD (<i>microtubule-binding domain</i>) y AAA (<i>ATPase associated with varios celular activities</i>), y un dominio hidrofóbico (HR) que solo está presente en la isoforma M1.....	4
Fig. 2 Esquema sobre el proceso para determinar las variantes patológicas.....	8
Fig. 3 Clasificación clínica de los probandos estudiados.....	10
Fig. 4 Representación del vector pSPL3 indicando la posición de los sitios de corte donde se realiza la clonación	13
Fig. 5 Electroforesis de los productos de PCR de los diferentes fragmentos amplificados para el análisis de los 25 cambios candidatos.....	22
Fig. 6 Resultados de una de las réplicas del MPLA de PANK2/PLA2G6 en el probando MD-485.....	26
Fig. 7 Splicing alternativo según el fragmento insertado en el vector pSPL3. (a) Fragmento de 451 pb cuando el transcrito está formado por SD6, exón 5 de <i>SPAST</i> y SA2. (b) Fragmento de 263 pb, cuando el exón 5 de <i>SPAST</i> no forma parte del transcrito.....	27
Fig. 8 Resultados del ensayo de minigenes. (a) Electroforesis de los productos de PCR de las extracciones de RNA a 24 y 48 h post-transfección con cada una de las construcciones. Han sido testadas en geles de agarosa 1%, empleando 1Kb Plus DNA Ladder como marcador de peso molecular. (b) Electroferogramas de la secuenciación de las bandas de 451 y 263 pb observadas. Abreviaturas: CN: control negativo; ϕ : pSPL3 vacío; WT: pSPL3 con el fragmento WT (c.870+3A); MUT: pSPL3 con el fragmento mutante (c.870+3A>G). Marcador de peso molecular empleado en la electroforesis: 1 Kb Plus DNA Ladder.....	28
Fig. 9 Heterodúplex entre el transcrito que incluye SD6- <i>SPAST</i> _E5-SA2 y el que solo incluye SD6-SA2. Peso molecular empleado en la electroforesis: 1 Kb Plus DNA Ladder.....	28
Fig. 10 Resultados del análisis de los transcritos de <i>SPAST</i> empleando los <i>primers</i> <i>SPAST_cDNA_E3_F</i> y <i>SPAST_cDNA_E6_R</i> , además de la amplificación de <i>GAPDH</i> como medida de la integridad de los cDNAs. (a) Electroforesis de los productos de PCR tras la amplificación de cDNA de SGT-1752 (probando) y SGT-1584 (referencia) (b) Posibles amplicones considerando los diferentes patrones de <i>splicing</i> esperados. Marcador de peso molecular empleado en la electroforesis: 1 Kb Plus DNA Ladder.....	29
Fig. 11 Resultados del análisis de los transcritos de <i>SPAST</i> empleando los <i>primers</i> <i>SPAST_cDNA_E4_F</i> y <i>SPAST_cDNA_E6_R</i> , además de la amplificación de <i>GAPDH</i> como medida de la integridad de los cDNAs. (a) Electroforesis de los productos de PCR tras la amplificación de cDNA de SGT-1752 (probando) y SGT-1584 (referencia) (b) Posibles amplicones considerando los diferentes patrones de <i>splicing</i> esperados. Marcador de peso molecular empleado en la electroforesis: 1 Kb Plus DNA Ladder.....	30
Fig. 12 Heterodúplex entre el amplicón que incluye los exones E4-E5-E6 y que incluye los exones E4-E6 en el probando SGT-1752. Este heterodúplex es el responsable de la aparición de una banda a 500 pb y otra a 350 pb, siendo ambas el transcrito canónico de <i>SPAST</i> que incluye todos los exones. Marcador de peso molecular empleado en la electroforesis: 1 Kb Plus DNA Ladder.....	30
Fig. 13 (a) Secuenciación de la banda inferior (162 pb) de la amplificación del cDNA del probando SGT-1754 con los <i>primers</i> <i>SPAST_cDNA_E4_F</i> y <i>SPAST_cDNA_E6_R</i> . (b) Secuenciación del producto de PCR de la amplificación del cDNA de SGT-1584 con los <i>primers</i> <i>SPAST_cDNA_E4_F</i> y <i>SPAST_cDNA_E6_R</i>	31
Fig. 14 Promotor de <i>FTL</i> descrito en la herramienta <i>UCSC Genome Browser</i> (en rojo).....	31
Fig. 15 Expresión Luciferasa/Renilla observada en las células transfectadas con las construcciones pGL4 vacío, pGL4 WT y pGL4 mutante. (***)p-valor < 0,0002).....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación del fragmento de <i>SPAST</i> para su clonación en el vector pSPL3	13
Tabla 2. Reactivos de las mezclas de la digestión tanto del inserto <i>SPAST_E5</i> como del vector pSPL3 con <i>XhoI</i> y <i>NheI</i>	13
Tabla 3. Reactivos de las mezclas de las ligaciones entre el inserto <i>SPAST_E5</i> y el pSPL3 según el ratio 3:1 y el control negativo (CN).....	14
Tabla 4. Programa empleado para la PCR de colonias.....	15
Tabla 5. Reactivos empleados para realizar las mezclas de transfección de las células HeLa con las tres construcciones de pSPL3 y el inserto <i>SPAST_E5</i>	15
Tabla 6. Reactivos empleados en la retrotranscripción del RNA extraído a 24 y 48 horas post-transfección de las células HeLa con las tres construcciones plasmídicas (pSPL3 vacío, WT y Mut).....	16
Tabla 7. Reactivos empleados para las PCR con cDNA para un volumen final de 25 µL.....	17
Tabla 8. Cebadores utilizados para la amplificación del cDNA.....	17
Tabla 9. Reactivos empleados para la retrotranscripción del RNA extraído del paciente SGT-1752.....	17
Tabla 10. Cebadores utilizados para la amplificación del cDNA de <i>SPAST</i>	18
Tabla 11. Cebadores utilizados para la amplificación del fragmento <i>promotor_FTL</i> para su clonación en el vector pGL4.24[luc2P/minP]	18
Tabla 12. Reactivos de las mezclas de la digestión del fragmento <i>promotor_FTL</i> y el vector pGL4 con <i>KpnI</i> y <i>XhoI</i>	19
Tabla 13. Reactivos de las mezclas de las ligaciones entre el fragmento <i>promotor_FTL</i> y el pGL4 digeridos según el ratio 3:1 y el control negativo (CN).....	19
Tabla 14. Reactivos empleados para realizar las mezclas de cotransfección de las células HEK293T con las tres construcciones de pGL4 y el fragmento <i>promotor_FTL</i>	20
Tabla 15. Cambios candidatos detectados y validados en los probandos mediante el panel SureSelect Custom Constitutional Panel 17 Mb de Agilent Technologies.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

aa: aminoácido

AAA: ATPasas Asociadas a diversas Actividades celulares

ACMG: *American College of Medical Genetics and Genomics*

AD: autosómico dominante

ADCA: ataxia cerebelosa autosómica dominante (acrónimo en inglés: *autosomal dominant cerebellar ataxia*)

ADHSP: paraparesia espástica hereditaria autosómica dominante (acrónimo en inglés: *autosomal dominant hereditary spastic paraparesis*)

Amp: ampicilina

AOA: ataxia con apraxia oculomotora (acrónimo en inglés: *ataxia with oculomotor apraxia*)

AR: autosómico recesivo

ARCA: ataxia cerebelosa autosómica recesiva (acrónimo en inglés: *autosomal recessive cerebellar ataxia*)

ARHSP: paraparesia espástica hereditaria autosómica recesiva (acrónimo en inglés: *autosomal recessive hereditary spastic paraparesis*)

cDNA: DNA complementario

CNV: variaciones en el número de copias (acrónimo en inglés: *copy number variant*)

CoA: coenzima A

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EA: ataxia episódica (acrónimo en inglés: *episodic ataxia*)

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

ENACH/NBIA: enfermedades neurodegenerativas con acumulación en cerebro de hierro (acrónimo en inglés: *Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation*)

DRPLA: atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (acrónimo en inglés: *Dentato-Rubral-Pallido Luysian Atrophy*)

DNA: ácido desoxirribonucleico

HGMD: *Human Gene Mutation Database*

HHCS: síndrome hereditario de hiperferritinemia y cataratas (*Hereditary Hyperferritinaemia-Cataract Syndrome*)

HSP: paraparesias espásticas hereditarias (acrónimo en inglés: *Hereditary Spastic Paraparesis*)

IRE: elemento de respuesta al hierro (acrónimo en inglés: *Iron Responsive Element*)

IRP: proteínas reguladoras del hierro (acrónimo en inglés: *Iron Regulatory Proteins*)

LAR II: *Luciferase Assay Reagent II*

LB: medio líquido Luria Bertani

MAF: frecuencia del alelo menor (acrónimo en inglés: *Minor Allele Frequency*)

MIT: dominio de interacción con los microtúbulos (acrónimo en inglés: *Microtubule Interacting and Trafficking domain*)

MLPA: *Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification*

MRI: Imagen por resonancia magnética (acrónimo en inglés: *Magnetic Resonance Imaging*)

MTBD: dominio de unión a los microtúbulos (acrónimo en inglés: *Microtubule Binding Domain*)

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NGS: *Next Generation Sequencing*

NMD: Degradación mediada por sin sentido (acrónimo en inglés: *Non-sense Mediated Decay*)

OMIM: *Online Mendelian In Man*

pb: pares de bases

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (acrónimo en inglés: *Polymerase Chain Reaction*)

PDB: *Protein Data Bank*

PKAN: *pantothenatekinase-associated neurodegeneration*

PLAN: *PLA2G6-associated neurodegeneration*

PLB: *Passive Lysis Buffer*

RE: retículo endoplasmático

RNA: ácido ribonucleico

SCA: ataxia espinocerebelosa (acrónimo en inglés: *spinocerebellar ataxias*)

SCAR: ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva (acrónimo en inglés: *autosomal recessive spinocerebellar ataxia*)

SNC: sistema nervioso central

SNP: polimorfismo de nucleótido único (acrónimo en inglés: *Single Nucleotide Polymorphism*)

SPG: *spastic paraplegia loci*

SPG7: paraparesia espástica autosómica dominante de tipo 7 (acrónimo en inglés: *spastic paraplegia type 7*)

SRCA: *Society for Research on the Cerebellum and Ataxias*

TS: secuenciación dirigida (acrónimo en inglés: *Targeted Sequencing*)

UTR: *untranslated region*

VUS: variante de significado incierto (acrónimo en inglés: *Variant of Uncertain Significance*)

WES: secuenciación completa de exomas (acrónimo en inglés: *Whole Exome Sequencing*)

WGS: secuenciación completa del genoma (acrónimo en inglés: *Whole Genome Sequencing*)

WT: tipo silvestre (acrónimo en inglés: *Wild-Type*)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades Neurodegenerativas: Ataxias y Paraparesias espásticas

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo heterogéneo de patologías caracterizadas por la pérdida progresiva de funciones cerebrales asociada a una disfunción progresiva de determinadas neuronas y regiones del sistema nervioso central (SNC). La gran heterogeneidad que define a este tipo de trastornos se traduce en un amplio espectro de signos clínicos que, en determinadas ocasiones, se solapan dificultando un correcto diagnóstico. Así pues, dentro de este grupo distinguimos enfermedades como el Alzheimer o la demencia frontotemporal, asociadas a déficits cognitivos, y otras como el Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), las ataxias o a las paraparesias espásticas hereditarias (HSP, *hereditary spastic paraparesis*), relacionadas con manifestaciones que afectan al sistema motor (Gan et al., 2018). El mecanismo de patogenicidad de la mayoría de estas enfermedades está relacionado con la progresiva deposición y agregación de ciertas proteínas en estructuras concretas del SNC (Soto & Pritzkow, 2018).

El análisis genético ha permitido establecer la etiología de las enfermedades neurodegenerativas y aportar un mayor conocimiento sobre el mecanismo patogénico de las mismas (Rexach et al., 2019). No obstante, la gran heterogeneidad genética observada en enfermedades como las ataxias y las HSP continúa dificultando el diagnóstico preciso y la determinación de sus bases moleculares (Gan et al., 2018). Del mismo modo, se ha observado cierto solapamiento genético entre ambos trastornos, de tal forma que, un mismo gen puede estar implicado tanto en una ataxia como en una HSP, siendo este el caso del gen *SPG7*, asociado con paraparesia espástica autosómica dominante de tipo 7 (*SPG7, spastic paraplegia type 7*) y, además, con ataxia cerebelosa (Synofzik & Schüle, 2017). De hecho, ha surgido un nuevo concepto denominado espectro fenotípico de la ataxia espástica, debido a la aparición de un fenotipo híbrido entre ambas patologías (Parodi et al., 2018). Igualmente, existe un solapamiento clínico de estas y otras enfermedades neurodegenerativas, como es el caso de la neurodegeneración causada por acumulación de hierro (NBIA, *Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation*), en concreto PLAN (*PLA2G6-associated neurodegeneration*) causada por mutaciones en *PLA2G6*, cuyos pacientes cursan en una etapa temprana con ataxia cerebelosa (Hinarejos et al., 2020).

1.1.1. *Ataxias*

Las ataxias constituyen un conjunto de enfermedades neurológicas con una elevada heterogeneidad tanto genética como clínica, caracterizadas por afectar a la coordinación voluntaria de los movimientos. Los principales síntomas clínicos son alteraciones de la marcha, los movimientos oculares, el habla y el movimiento de las manos (Jayadev & Bird, 2013). Esta sintomatología está generalmente asociada a la disfunción progresiva o atrofia del cerebelo, principal centro del SNC encargado de la coordinación motora, observándose una degeneración progresiva de las células de Purkinje. Igualmente, la neurodegeneración puede afectar a otras partes del SNC como el tracto espinocerebeloso, los ganglios basales y el puente del tronco encefálico (Klockgether et al., 2019; Parodi et al., 2018). Las ataxias pueden presentarse bien como una forma de ataxia cerebelosa pura, siendo, por tanto, la manifestación clínica predominante, o bien como una ataxia compleja, siendo entonces, un signo clínico más en un proceso de neurodegeneración más complejo. Asimismo, el comienzo de la enfermedad puede ocurrir tanto en la infancia como en una etapa más adulta, dependiendo del tipo de ataxia y de las causas asociadas a su aparición y progresión (Sun et al., 2019). Todos los patrones de herencia mendelianos han sido observados en las ataxias (autosómico dominante, autosómico recesivo, ligado al cromosoma X y mitocondrial), si bien la mayoría de trastornos descritos están asociados a una herencia autosómica dominante o recesiva (Jayadev & Bird, 2013).

Las ataxias hereditarias con mayor prevalencia son aquéllas causadas por la expansión de trinucleótidos, siendo este el caso de ocho tipos de ataxias espinocerebelosas (SCA, *spinocerebellar ataxias*) (SCA 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 y 17) así como de la atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA, *dentato-rubral-pallido luisian atrophy*) y la ataxia de Friedrich. Otros cuatro tipos de SCA (SCA 10, 31, 36 y 37) están causados por expansiones intrónicas de fragmentos de mayor tamaño (Klockgether et al., 2019). Más allá de la expansión de secuencias de nucleótidos, un gran número de ataxias están causadas por mutaciones puntuales o por pequeñas inserciones y deleciones (Sun et al., 2019).

Las ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCA, *autosomal dominant cerebellar ataxia*) engloban tanto las SCA como las ataxias episódicas (EA, *episodic ataxias*), observándose estas últimas en una prevalencia inferior a las primeras (Marsden, 2018). Por un lado, las SCA se caracterizan por una progresión lenta, un debut tardío (alrededor de los 35 años) y una prevalencia de 2-5.6/100.000 habitantes. Se han descrito más de 40 subtipos de SCA, siendo SCA3 el de mayor prevalencia a nivel global, si bien la epidemiología y la distribución de los diferentes subtipos no sigue un mismo patrón (Jayadev & Bird, 2013; Marsden, 2018). Las SCA causadas por la expansión del trinucleótido CAG en una región codificante representan más del 65% de los casos de las SCA diagnosticados. Esta expansión es responsable de la aparición de un tracto de poliglutamina (codificada por el codón CAG) que ocasionará un error en el plegamiento de la proteína codificada, su agregación y la consiguiente toxicidad. Según la manifestación clínica que ocasionan se dividen en tres clases: ADCA I, cuando manifiestan ataxia cerebelosa junto con otros signos adicionales; ADCA II, cuando se trata de una ataxia cerebelosa combinada con retinitis pigmentosa, y ADCA III, cuando se caracterizan por una ataxia cerebelosa pura (Sullivan et al., 2019).

Por otro lado, las EA se caracterizan por episodios transitorios y recurrentes de inestabilidad y fallos en la coordinación que pueden estar causados por la realización de ejercicio, el estrés emocional o la ingesta de sustancias como el alcohol. Además de un cuadro clínico de ataxia, en general, suelen observarse otros signos como temblor o calambres musculares. El debut de este tipo de trastornos suele ocurrir antes de la edad adulta, si bien en determinados casos de EA2, el más común de los 8 subtipos de EA descritos, la enfermedad puede aparecer a partir de la quinta década de vida. La duración y la severidad de los episodios de ataxia varían dependiendo del subtipo de EA, siendo de unos 15 minutos en el caso de la EA1 o de horas o días en el caso de la EA2. Ambos subtipos se caracterizan por ser canalopatías, pues están causados por mutaciones en *KCNA1* (canal de potasio) y *CACNA1A* (canal de calcio), respectivamente (Jen & Wan, 2018). Cabe destacar que el gen *CACNA1A* está asociado tanto a SCA6 como a EA2, de tal forma que en el primer caso suelen observarse expansiones del trinucleótido CAG, mientras que, en el segundo, está ocasionado por mutaciones puntuales (Sun et al., 2019).

Las ataxias cerebelosas autosómicas recesivas (ARCA, *autosomal recessive cerebellar ataxia*) se caracterizan por un debut más temprano que las ADCA (normalmente <25 años) y una clínica más compleja. En un reciente trabajo impulsado por la *Society for Research on the Cerebellum and Ataxias* (SRCA) que tenía como objetivo establecer una clasificación de las ARCA, se expone que, hasta la fecha, han sido descritos 59 tipos de ataxia recesivas primarias. En este trabajo se agrupa a las ARCA en seis grupos dependiendo de la manifestación clínica observada, estableciéndose, además, fenotipos intermedios entre los diferentes grupos (Beaudin et al., 2019). La ataxia de Friedrich es la más común de las ARCA, con una prevalencia de 2-4/100.000 habitantes, además de ser la única ARCA en la que se han descrito expansiones de trinucleótidos en el primer intrón de *FXN* como factor causante de la enfermedad. Otras ARCA a destacar son la ataxia telangiectasia o la ataxia con apraxia oculomotora (AOA, *ataxia with oculomotor apraxia*) (Jayadev & Bird, 2013; Reetz et al., 2021).

1.1.2. Paraparesias Espásticas Hereditarias (HSP)

Las HSP, al igual que las ataxias, constituyen un grupo muy heterogéneo, tanto en términos genéticos como clínicos, de trastornos motores neurodegenerativos con una prevalencia de 3-9/100.000 habitantes. La degeneración progresiva de los tractos corticoespinales motores que caracteriza a los HSP se traduce en una clínica principalmente marcada por espasticidad bilateral progresiva, debilidad en las extremidades inferiores y disfunción de la vejiga (D'Amore et al., 2018). Desde un punto de vista clínico, las HSP se clasifican como formas puras o como formas complejas. Se trata de formas puras cuando la sintomatología se limita a espasticidad progresiva, debilidad de las piernas, disfunción de la vejiga y déficits somatosensoriales leves. En el caso de la forma compleja, se observan manifestaciones neurológicas y no neurológicas adicionales tales como ataxia, convulsiones, parkinsonismo, neuropatía periférica, deterioro cognitivo y discapacidad intelectual (Erfanian Omidvar et al., 2021).

Todos los patrones de herencia mendelianos han sido descritos en las HSP: autosómica dominante (ADHSP, *autosomal dominant hereditary spastic paraparesis*), autosómica recesiva (ARHSP, *autosomal recessive hereditary spastic paraparesis*), ligada al cromosoma X (recesiva o dominante) y mitocondrial, aunque estas dos últimas son más raras. La ADHSP es la forma de herencia predominante, siendo responsable de alrededor del 80% de las HSP puras (Erfanian Omidvar et al., 2021), mientras que las formas complejas se observan principalmente en individuos que cursan con ARHSP. El número de genes asociados a HSP identificados aumenta rápidamente, contribuyendo a la enorme heterogeneidad genética que caracteriza a este tipo de patologías. Actualmente, se han identificado 81 formas genéticas diferentes de HSP, siendo estas denotadas como SPG (*spastic paraplegia loci*). De estas 81 formas, 13 aún no cuenta con un gen específico al que estén asociadas (Saputra & Kumar, 2021). Esta heterogeneidad también se observa en lo relativo a la edad de debut de las HSP, ya que está profundamente influenciada por la forma genética que padezca cada individuo. Se han descrito casos de debut en un amplio rango de edad, pero lo más común es que los síntomas comiencen entre los 20 y 30 años en el caso de las ADHSP y durante la infancia o la adolescencia en las ARHSP (de Souza et al., 2017; Erfanian Omidvar et al., 2021).

En lo que respecta a las formas de HSP más frecuente, entre los 20 tipos de ADHSP descritos, la más común es SPG4, representando el 40% de los de casos diagnosticados de HSP y el 60% de los casos diagnosticados de ADHSP. SPG4 está causada por mutaciones en la espastina (*SPAST*) (Shribman et al., 2019). Mutaciones en *ATL1* (SPG3A) y *REEP1* (SPG31) son las siguientes formas más comunes de ADHSP. Respecto a las ARHSP, SPG11 (*KIAA1840*), SPG5A (*CYP7B1*), SPG7 y SPG15 (*ZFYVE26*) son las formas más frecuentes (Erfanian Omidvar et al., 2021; Shribman et al., 2019). Se han descrito múltiples mecanismos fisiológicos causantes de la disfunción de los axones largos de los tractos corticoespinales motores y que están relacionados con las diferentes formas de HSP. Estos mecanismos afectan a procesos como el tráfico de vesículas de membrana, el mantenimiento de la morfología y la distribución de los orgánulos, el transporte axonal, el metabolismo de los lípidos, las funciones mitocondriales o el proceso de mielinización, siendo el primero de ellos el más comúnmente observado en los diferentes tipos de HSP (de Souza et al., 2017).

El diagnóstico de la HSP se basa tanto en la comprobación de los síntomas propios de este tipo de trastornos, pudiendo estos estar caracterizados por una progresión lenta o nula, como en exámenes neurológicos que muestren un deterioro en los tractos corticoespinales, el estudio del historial familiar para evaluar el modo de herencia y la realización de un estudio genético empleando tecnologías *NGS* (*Next Generation Sequencing*). El diagnóstico de las formas complejas puede resultar más difícil debido a que los síntomas neurológicos y no neurológicos que las caracterizan pueden debutar antes que los signos de paraparesia espástica (de Souza et al., 2017; Shribman et al., 2019). Igualmente, la diferenciación entre una ADHSP y una ARHSP puede resultar complicada en familias caracterizadas

por una penetrancia incompleta y en las que, por tanto, existan individuos asintomáticos portadores de la mutación causante de la enfermedad, dando lugar a una interpretación errónea del modo de herencia o el gen causal. Una penetrancia incompleta o dependiente de la edad es particularmente frecuente en ADHSP como la SPG3A (Bis-Brewer & Züchner, 2018; de Souza et al., 2017).

1.1.2.1. *SPG4/SPAST*

Como se ha mencionado anteriormente, SPG4 es la forma más común de ADHSP y está causada por mutaciones en el gen *SPAST*, que codifica la espastina. Esta proteína pertenece a la familia de las ATPasas Asociadas a diversas Actividades celulares (AAA) y participa en procesos como el transporte de membrana, la motilidad intracelular, el ensamblaje de las proteínas, la proteólisis o la formación de los túbulos del retículo endoplasmático (RE) (de Souza et al., 2017). SPG4 es considerada una forma pura de HSP, aunque también se han descrito algunos casos de pacientes SPG4 que presentan ataxia cerebelosa, deterioro cognitivo o adelgazamiento del cuerpo calloso, siendo estas manifestaciones propias de una forma compleja de HSP (Solowska & Baas, 2015).

El gen *SPAST* está compuesto por 17 axones (**Fig. 1a**) y contiene tres dominios principales (**Fig. 1c**): (i) un dominio de interacción con los microtúbulos (MIT, *microtubule interacting and trafficking domain*) crucial para los procesos de transporte intracelular y endocitosis mediados por las espastinas, (ii) un dominio de unión a los microtúbulos (MTBD, *microtubule binding domain*) y (iii) un dominio C-terminal AAA compuesto por tres dominios ATPasa, encargados de acoplar la hidrólisis del ATP al fraccionamiento de las subunidades de los microtúbulos en el proceso de despolimerización. Los dominios AAA de las espastinas interactúan entre sí para formar anillos hexaméricos, que dan lugar a un poro central por el que se introduce el extremo C-terminal de los microtúbulos (Allison et al., 2019; Solowska & Baas, 2015).

Existen dos codones de iniciación (M1 y M87) separados por 87 pb, produciéndose dos isoformas de 616 y 530 aminoácidos (aa), respectivamente (**Fig. 1b**). La diferencia principal entre ambas es la presencia o no del dominio hidrofóbico HR. Ambas isoformas son expresadas ubicuamente, si bien se ha observado que la isoforma M87 está presente tanto en el cerebro como en la médula espinal, mientras que la M1 está mayormente expresada en la médula espinal (Solowska & Baas, 2015). Sin embargo, la isoforma M87 carece del dominio HR, permitiendo que esta se encuentre en el citosol, mientras que la isoforma M1 se asocia a la membrana del RE donde interactúa con otras proteínas como la alastina-1 (SPG3A/*ATL1*) y la REEP1 (SPG31) para regular la formación de los túbulos del RE (Allison et al., 2019). Además de estas isoformas se observa la presencia de dos más debido al *splicing* alternativo en el que se produce el *skipping* del exón 4 (Solowska & Baas, 2015)

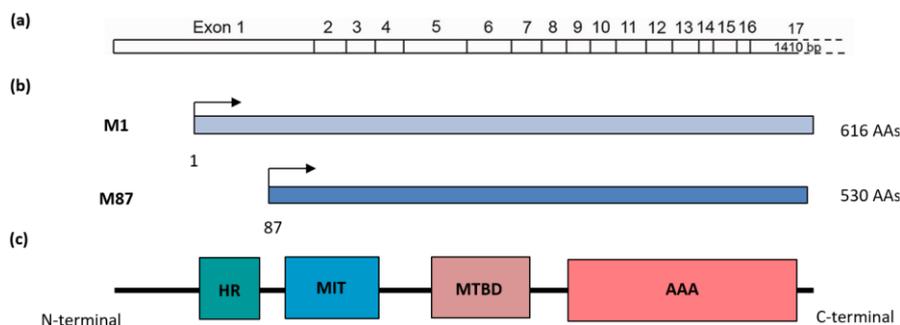


Fig. 1 Representación del gen *SPAST*. (a) *SPAST* está compuesto por 17 exones. (b) Se observan dos isoformas distintas debido a la presencia de dos sitios de iniciación (M1 y M87). (c) Se distinguen tres dominios comunes a ambas isoformas: MIT (*Microtubule interacting and trafficking domain*), MTBD (*microtubule-binding domain*) y AAA (*ATPase associated with various cellular activities*), y un dominio hidrofóbico (HR) que solo está presente en la isoforma M1. Imagen modificada de Allison et al. (2019)

1.1.3. Enfermedades neurodegenerativas con acumulación en cerebro de hierro

Las enfermedades neurodegenerativas con acumulación en cerebro de hierro (ENACH/NBIA, acrónimo en inglés) comprenden un conjunto de trastornos caracterizados por depósitos anómalos de hierro principalmente en ganglios basales. Se considera un grupo de enfermedades raras con una prevalencia de 1-3/1.000.000 habitantes, habiéndose observado un patrón de herencia autosómico dominante, recesivo o ligado al cromosoma X dominante dependiendo del tipo de NBIA presente. En lo que respecta a la manifestación clínica de este tipo de enfermedades, se caracteriza por trastornos progresivos del movimiento causados por la disfunción extrapiramidal, tales como parkinsonismo, espasticidad o distonía, además de otros síntomas como atrofia ocular o alteraciones neuropsiquiátricas. El debut de los diferentes tipos de NBIA varía desde la infancia hasta la edad adulta con una progresión lenta o rápida y periodos de estabilidad; observándose, generalmente, casos pediátricos con una esperanza de vida limitada (di Meo & Tiranti, 2018; Hinarejos et al., 2020).

Actualmente, existen diez formas ampliamente aceptadas de NBIA, las cuales están causadas por mutaciones en genes involucrados en diferentes procesos metabólicos, entre los que destacan el metabolismo del hierro y los lípidos, procesos mitocondriales como la biosíntesis de la coenzima A (CoA) o mecanismos apoptóticos o de autofagia. Estos genes son: *PANK2*, *PLA2G6*, *COASY*, *FTL1*, *CP*, *FA2H*, *ATP13A2*, *WDR45*, *C19ORF12*, *DCAF17* (Hinarejos et al., 2020).

La principal forma de NBIA es la PKAN (*pantothenatekinase-associated neurodegeneration*) provocada por mutaciones en *PANK2* y siendo responsable del 30-50% de los casos NBIA, seguida de PLAN (*PLA2G6-associated neurodegeneration*) ocasionada por mutaciones en *PLA2G6* y estando presente en el 20% de los casos NBIA. Ninguno de estos dos genes está relacionado con el metabolismo del hierro, ya que *PANK2* participa en la biosíntesis de la CoA, mientras que *PLA2G6* está asociada con el metabolismo de los lípidos y remodelaje de membranas. Ambas formas siguen un patrón de herencia autosómico recesivo (AR) y se caracterizan por un debut en la infancia y una progresión rápida (Hinarejos et al., 2020), si bien se han descrito formas atípicas que comienzan en edad adulta y presentan una progresión más lenta (di Meo & Tiranti, 2018).

En lo que respecta a los dos genes involucrados en el metabolismo del hierro, *CP* y *FTL*, estos están relacionados con formas de NBIA extremadamente raras. Por un lado, *CP* codifica la ceruloplasmina, una enzima de tipo ferroxidasa que participa en el proceso de exportación del hierro intracelular mediado por la ferroportina. Mutaciones en *CP* causan aceruloplasminemia, caracterizada por una herencia AR, y un debut tardío. Entre las manifestaciones clínicas observadas en esta forma de NBIA destacan las alteraciones cognitivas, la ataxia cerebelosa o la degeneración retinal (di Meo & Tiranti, 2018; Hinarejos et al., 2020). Por otro lado, *FTL* codifica la cadena ligera de la ferritina, una proteína que en humanos está constituida por dos subunidades (FTH y FTL) que se asocian formando un heteropolímero. Esta proteína es la principal responsable de eliminar el exceso de hierro ferroso (Fe^{2+}) de las células, evitando su toxicidad. Mutaciones en el gen *FTL* conducen a neuroferritinopatía, caracterizada por un patrón de herencia autosómico dominante (AD). Las manifestaciones clínicas de la neuroferritinopatía comienzan en edad adulta y comprenden deterioro cognitivo, ataxia cerebelosa, parkinsonismo, alteraciones psiquiátricas o blefaroespasma (Hinarejos et al., 2020).

El solapamiento clínico existente entre este tipo de trastornos y otras enfermedades neurodegenerativas, como las ataxias cerebelosas o las HSP dificulta el diagnóstico de las mismas, pudiendo resultar en la inclusión de pacientes con NBIA en una cohorte de pacientes con ataxia cerebelosa y HSP porque el rasgo principal que las define, los depósitos de hierro anómalos en ganglios basales, no siempre coexisten con el debut de los síntomas. Por ello, muchos pacientes con NBIA son en un primer momento, diagnosticados con otros trastornos del movimiento como distonías o parkinsonismo juvenil.

1.2. Diagnóstico Genético de las Enfermedades Neurodegenerativas

El uso de las tecnologías del NGS ha supuesto un cambio en el diagnóstico y el estudio de enfermedades neurodegenerativas como las ataxias y las HSP. De hecho, en los últimos 10 años se ha duplicado el número de genes identificados como causantes de enfermedades neuromotoras hereditarias (Thompson et al., 2020). El correcto diagnóstico, tanto del tipo de trastorno como del subtipo presente en cada paciente, resulta esencial para poder establecer una terapia o las condiciones de monitorización que deben ser aplicadas (Gorcenco et al., 2020). En este sentido, las técnicas de NGS constituyen un método de secuenciación paralela masiva capaz de generar una gran cantidad de datos con cada vez mayor eficacia y un menor coste, de tal forma que, empleando un solo test, es posible realizar el diagnóstico de un número elevado de paciente estudiando todos o un gran número de genes relacionados con su patología (Thompson et al., 2020).

Se distinguen tres estrategias de NGS diferentes: secuenciación dirigida (TS, *targeted sequencing*) mediante un panel de genes, secuenciación completa de exomas (WES, *whole exome sequencing*) y secuenciación completa del genoma (WGS, *whole genome sequencing*). TS se basa en la secuenciación completa de un panel compuesto por unos pocos a cientos de genes que han sido seleccionados por su relación con la patología o patologías a estudiar. Se trata del enfoque con el mayor ratio coste/beneficio, si bien el diseño del panel es esencial para el éxito del diagnóstico, al igual que la selección de pacientes. WES permite la secuenciación de las regiones codificantes del genoma humano, constituyendo menos del 2% del mismo, pero representando la localización de aproximadamente el 85% de las mutaciones descritas como causantes de enfermedad. No obstante, el uso de esta estrategia obvia las variantes observadas en sitios de *splicing*, en regiones no codificantes que ejercen importantes funciones reguladoras o en regiones intrónicas (Gorcenco et al., 2020). Tampoco serviría para la detección de mutaciones dinámicas como las debidas a expansiones de repeticiones en tándem o grandes deleciones/inserciones, así como cambios estructurales. En relación a este último grupo, el uso de WES sería incompatible con el diagnóstico de la ataxia de Friedrich, ya que está causada por expansiones del trinucleótido GAA a nivel intrónico (Klockgether et al., 2019). Por último, WGS permite analizar el 95-98% del genoma humano, cubriendo todo tipo de regiones y permitiendo identificar un mayor número de posibles mutaciones causantes de la enfermedad. Sin embargo, se trata de una estrategia más cara y que presenta una mayor complejidad en el procesamiento, el almacenamiento y la interpretación de los datos generados (Gorcenco et al., 2020; Saputra & Kumar, 2021).

El uso de las tecnologías de NGS permite identificar cambios como la sustitución de un solo nucleótido o pequeñas inserciones o deleciones de forma precisa, si bien está sujeta a un cierto grado de error, especialmente cuando los cambios se encuentran en zonas donde la profundidad de lectura durante la secuenciación ha sido baja. Igualmente, debe considerarse la posibilidad de errores en los procedimientos de amplificación mediante PCR, en la captura de las regiones dianas necesaria en TS y WES o fallos en la cobertura de la secuenciación. A esto se suma el hecho de que las tecnologías de NGS no pueden detectar de forma directa grandes inserciones o deleciones, incluyendo las variaciones en el número de copias (CNV, *copy number variant*) de tamaño medio, ni las expansiones de repeticiones en tándem, los cuales son mecanismos comúnmente observados en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, como las responsables de los tipos más frecuentes de SCA. Como consecuencia, el uso de las NGS debe completarse con otras estrategias como el MPLA (*Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification*) que permite la detección de grandes inserciones o deleciones a lo largo del gen estudiado (Gorcenco et al., 2020).

A pesar de los avances y la mejora que el uso de herramientas de NGS han proporcionado al diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas, parece que hay un techo diagnóstico de aproximadamente un 50%. La tasa de éxito del diagnóstico genético llevado a cabo con tecnologías de NGS varía dependiendo

tanto del tipo de estrategia empleada (panel de genes (TS), WES o WGS), como del trastorno estudiado. En el caso de los paneles de genes, como se ha mencionado anteriormente, su diseño también influye considerablemente sobre la tasa de diagnóstico obtenida. Gorcenco et al. (2020) analizó los 28 estudios publicados en PubMed y relacionados con diagnóstico genético de enfermedades neuromotoras empleando NGS y observó que la tasa de éxito en el caso de los estudios relacionados con ataxia y HSP es del 12,1-61,8%. Por otra parte, Sullivan et al. (2019) establece que, en el caso de las SCA, la tasa de éxito en el diagnóstico es del 17% empleando paneles de genes, y del 36% cuando se emplea WES.

1.2.1. ¿Cómo determinar si las variantes encontradas son patológicas?

Una vez se tienen los resultados de la NGS, estos se suelen filtrar por frecuencia, ya que las ataxias y HSP y, en general, las enfermedades neuromotoras monogénicas, se caracterizan por una baja prevalencia en la población. Por lo tanto, los resultados de NGS se consultan en bases de datos, como gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) o Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>), y se descartan los cambios con una frecuencia superior al 0,5-1% (Fig. 2). gnomAD es una base de datos que integra datos genómicos procedentes de WES o WGS de pacientes sanos, por lo que la frecuencia de los cambios identificados debería ser incluso menor para que puedan ser considerados patológicos (Gorcenco et al., 2020). Una vez se han seleccionado los cambios con una baja frecuencia poblacional o que no están descritos en las bases de datos anteriores, se comprueba si están incluidos en una base de datos de mutaciones patológicas, como HGMD (Human Genome Mutation Database; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) (Fig. 2). Información adicional acerca del cambio o el gen pueden obtenerse consultando bases de datos como Varsome (<https://varsome.com/>), The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), OMIM (Online Mendelian in Men; <https://www.omim.org/>) o ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Esto permitirá encontrar una relación entre la manifestación clínica del paciente y la función del gen o las enfermedades con las que esté asociadas.

Una vez se ha identificado un cambio relevante es necesario llevar a cabo estudios genéticos (Fig. 2) que confirmen la presencia del cambio en el paciente estudiado, ya que podría tratarse de un error del proceso de secuenciación. Para ello se amplificará la región donde se encuentra el cambio candidato mediante PCR y se procederá a su secuenciación por Sanger. Del mismo modo, es conveniente realizar un estudio de segregación, es decir, un estudio de los familiares del paciente, para constatar si la mutación está presente en individuos afectados o en individuos sanos y, así, determinar la patogenicidad de la misma. Igualmente, el análisis de segregación ayuda a establecer si un cambio es deletéreo o no, ya que solo lo podrán portar las personas enfermas con una herencia dominante o también personas sanas en el caso de una herencia recesiva.

Otro punto importante para determinar si las variantes candidatas son las causantes de la enfermedad es la realización de estudios *in silico* (Fig. 2). Existen diferentes herramientas informáticas que permiten predecir el efecto de los cambios a estudiar. Los softwares de predicción se pueden clasificar en dos grandes grupos: aquéllos que analizan cambios de aa y los que estudian mutaciones de *splicing*. El algoritmo empleado en las herramientas que pertenecen al primer grupo tiene en cuenta criterios como la conservación del aa afectado por la mutación, su localización en la proteína y las consecuencias bioquímica y estructurales que tendría la mutación sobre el mismo. Entre estos predictores destacan: SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>) o PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>). Este tipo de herramientas posee una precisión del 65-80% y suelen tener una baja especificidad, por lo que es necesario usar varias de ellas para aumentar la seguridad de que una predicción deletérea realmente lo es. En el caso de los predictores de alteraciones en el *splicing*, destacan: NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>), NNSPLICE 0.9 version

(https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) y Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/>). (Richards et al., 2015). Por último, en el caso de disponer del cristal de la proteína en la base de datos PDB (<https://www.rcsb.org/>) o de un modelo de buena calidad en Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) es interesante realizar un estudio de modelaje para comprobar el efecto que pudiera tener la mutación sobre la estructura de la proteína o la interacción de esta con otras proteínas usando herramientas como PyMOL (<https://pymol.org/2/>).

El último paso sería la realización de estudios funcionales (**Fig. 2**) que permitan comprobar de forma experimental la patogenicidad de la mutación estudiada. El diseño del ensayo dependerá tanto del tipo de mutación como del efecto que se espera que cause en la proteína donde se encuentra o en el proceso en el que participa. Este tipo de aproximaciones depende del conocimiento disponible del gen, ya que se trata de ensayos diseñados *ad hoc*. Dada la complejidad de los mismos y el esfuerzo que suponen están limitados a su desarrollo en el marco de proyectos de investigación. Entre los análisis que se podrían realizar destacan: estudios de localización subcelular (Lupo et al., 2015), estudios de apoptosis (Sancho et al., 2017), minigenes y análisis de transcritos para mutaciones de *splicing* (Sánchez-Montegudo et al., 2020), etc.



Fig. 2 Esquema sobre el proceso para determinar las variantes patológicas

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La elevada heterogeneidad genética y la variabilidad clínica que caracterizan a las ataxias y las paraparesias espásticas y, en general, a las enfermedades neurodegenerativas, dificulta conseguir un diagnóstico genético certero. Se conocen cientos de genes implicados en estos dos grupos de enfermedades. Por ello, postulamos que el uso de paneles de genes permitirá estudiar un gran número de genes relacionados con este tipo de trastornos, lo que facilitará la caracterización de las bases genéticas implicadas en la enfermedad en cada uno de los pacientes.

Del mismo modo, la interpretación de los resultados obtenidos mediante la secuenciación de un panel de genes suele resultar complejo debido a que se trata de variantes novedales o con una frecuencia muy baja de modo que se desconoce cómo afecta a la salud humana. Esto plantea la necesidad de desarrollar ensayos funcionales que aporten evidencias de la patología de los cambios estudiados. Planteamos aquí, que el correcto diseño y aplicación de los ensayos funcionales contribuirá a la obtención de evidencias que permitan determinar la implicación del cambio estudiado en las manifestaciones clínicas de los probandos.

Por tanto, los objetivos planteados en el presente Trabajo de Fin de Grado son los siguientes:

1. Identificar la causa genética en 15 probandos con ataxia o paraparesia espástica mediante el uso del panel de genes Sure Select Custom Constitutional Panel 17 Mb de Agilent Technologies.
2. Analizar la patogenicidad de la variante c.870+3A>G en el gen *SPAST*, identificada en el probando SGT-1752, mediante análisis de transcritos y minigenes.
3. Investigar el efecto de la variante *FTL* c.-168G>T sobre la expresión del gen *FTL* mediante un ensayo de luciferasa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Análisis de los probandos

En este estudio se incluyen 15 muestras pertenecientes a una serie clínica de pacientes con ataxia o paraparesia espástica (**Fig. 3**) investigada en el Laboratorio de Enfermedades Raras Neurodegenerativas del CIPF. Los probandos incluidos en este estudio son seguidos en el H. U i P. La Fe de Valencia. Entre estos pacientes también se incluye el probando MD-485 que cursa con un fenotipo NBIA.

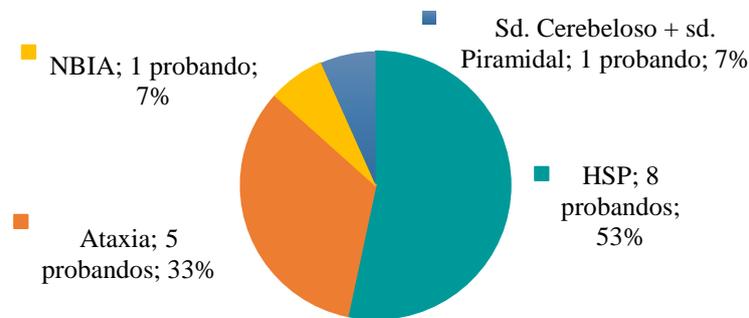


Fig. 3 Clasificación clínica de los probandos estudiados

3.2. Análisis del panel de genes

3.2.1. Filtrado para determinar los cambios candidatos

El resultado del análisis bioinformático de la secuenciación consiste en un elevado número de variaciones detectadas sobre las que se aplica un filtrado basado con el propósito de seleccionar las variantes que sean mejores candidatas a ser mutaciones causales. El Laboratorio de Enfermedades Raras Neurodegenerativas del CIPF emplea una *pipeline* propio para realizar este filtrado (Sánchez-Monteaugudo et al., 2020).

Uno de los criterios utilizados es la limitación del número de probandos que son homocigotos o heterocigotos para un mismo cambio, ya que si una misma variación se encuentra en un número elevado de pacientes podría tratarse de un artefacto introducido durante el proceso de análisis de la secuenciación. En un primer momento, el estudio se limita a las variantes “canónicas” y se centra en las variaciones que producen mutaciones de cambio de aa, inserciones o deleciones, pérdida de la pauta de lectura, ganancia de codones de iniciación o parada o mutaciones que afecten al *splicing*. Posteriormente, se estudiarán los cambios intrónicos, los cambios sinónimos, y los localizados en las regiones 5' UTR (*untranslated region*) y 3' UTR.

A continuación, se investiga la frecuencia de cada uno de los cambios en población sana, de tal forma que solo se tienen en cuenta los cambios que presenten una MAF (*minor allele frequency*) inferior al 0,01%. Este análisis puede llevarse a cabo utilizando la base de datos de cambios genéticos gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), un repositorio de datos procedentes de grandes proyectos de secuenciación, tanto WES como WGS. Igualmente, deben anotarse el número de alelos que han sido descritos en homocigosis y heterocigosis en cada una de los cambios estudiados, clasificando las variantes en 5 grupos según este criterio: “no descrita”, “1-10”, “11-50” y “51-100” y “>100” alelos descritos.

Una vez se han seleccionado los cambios menos frecuentes, se investiga la posible relación entre cada uno de los genes y cambios seleccionados y la enfermedad del probando. Para ello se recurre a bases de datos como: OMIM (*Online Mendelian In Man*; <https://www.omim.org/>), para comprobar las enfermedades y el modo de herencia asociados al gen estudiado; HGMD (*Human Gene Mutation*

Database; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), que recoge las mutaciones patológicas que han sido descritas; The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), para comprobar los tejidos en los que se expresa la proteína codificada por el gen estudiado y sus funciones fisiológicas, o ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), para comprobar si el cambio ha sido asociado con enfermedad.

Otro aspecto importante es el uso de herramientas *in silico* que permitan predecir la patogenicidad de las variantes estudiadas. En el caso de las mutaciones que producen la sustitución de un aa, se emplean los predictores SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) y PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Para comprobar el efecto que una mutación pueda tener sobre el *splicing* se emplean los predictores NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) y NNSPLICE 0.9 version (https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Por último, para las deleciones o inserciones se usan PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>) y MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>).

3.2.2. Validación de los cambios candidatos

3.2.2.1. Diseño de cebadores

Para validar la presencia de los cambios candidatos se diseñan unos cebadores o *primers* que permiten amplificar mediante PCR la región del genoma donde se encuentra el cambio. Las secuencias nucleotídicas de cada una de las regiones estudiadas se obtienen a partir de la base de datos Ensembl GRCh 37 (<https://grch37.ensembl.org/index.html>). Los parámetros de los *primers* diseñados se obtienen empleando la herramienta OligoEvaluator™ de Sigma-Aldrich® (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>). Para el diseño de los cebadores se consideran los siguientes criterios:

- i) El tamaño de los oligonucleótidos debe ser de 18-24 pb para proporcionar la suficiente especificidad.
- ii) La región a amplificar (amplicón) debe tener un tamaño de 300-700 pb
- iii) La temperatura de hibridación de los cebadores debe encontrarse en el rango de 57-65°C, con una diferencia inferior a 2°C entre cada pareja de cebadores.
- iv) El porcentaje de GC debe ser superior al 40% e inferior al 60%.
- v) Para asegurar una mejor hibridación es preferible que los *primers* posean una secuencia rica en GC en su extremo 3'.
- vi) Se debe evitar diseñar los cebadores sobre regiones que presenten polimorfismos (SNP) frecuentes y que puedan alterar la amplificación de uno de los alelos. Para ello es recomendable filtrar las mutaciones que tengan una MAF superior al 0,01% en Ensembl GrCh 37. La presencia de polimorfismos debe evitarse especialmente en la región 3' del *primer*.
- vii) Comprobar que los *primers* diseñados no formen estructuras secundarias o dímeros entre sí.

Tras diseñar los cebadores, su especificidad debe ser comprobada empleando herramientas de amplificación *in silico* como Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y UCSC *in-silico* PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>).

3.2.2.2. Condiciones de PCR de validación y secuenciación Sanger

Las PCR de validación se realizan empleando los termocicladores SimpliAmp™ Thermal Cycler y (Applied Biosystems) y Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Los cebadores empleados están descritos en la **Tabla Suplementaria 1** del **Apéndice I**. El programa que se utiliza para hacer las diferentes reacciones de amplificación por PCR se especifica en la **Tabla Suplementaria 2** del

Apéndice I. Los reactivos estándar de las mezclas para realizar las PCRs se indican en la **Tabla Suplementaria 3 del Apéndice I.**

Para comprobar la correcta amplificación de los fragmentos, los productos de PCR se visualizan en geles de agarosa al 1% preparados con agarosa baja EEO (Fisher Scientific) y tampón TAE 1% (Tris, acetato, EDTA, H₂O) empleando la agente intercalante GelRed® (Biotium). Como marcador de peso molecular se utiliza el 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Los geles se visualizan en el transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad)

La secuenciación de los productos de PCR se realiza en el Servicio de Genómica y Genética del CIPF empleando el secuenciador 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Los electroferogramas obtenidos se visualizan mediante el programa Chromas Lite versión 2.1. Por último, las secuencias nucleotídicas obtenidas de la secuenciación se alinean con las secuencias de referencia depositadas en Ensembl GRch 37 mediante la herramienta Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

3.3. Ensayo de MLPA

El ensayo de MPLA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) se lleva a cabo para comprobar la existencia de grandes deleciones o inserciones. En este caso, se realiza empleando la SALSA® Probemix P120 para los genes *PANK2/PLA2G6*, siguiendo las instrucciones indicadas en el protocolo

MPLA®	General	Protocol
-------	---------	----------

 (<https://www.mrcholland.com/products/4838/MLPA%20General%20Protocol%20MDP-v007.pdf>) de MRC Holland. Se utilizan 20 ng/μL de DNA genómico, tanto de la muestra del paciente a estudiar (MD-485), como de los controles empleados. Se deben utilizar controles diferentes como referencia: un control comercial XY (Promega) y un control interno con un paciente (NBIA-373) ya estudiado anteriormente en el laboratorio, para comprobar el correcto funcionamiento de la SALSA® Probemix P120 *PANK2/PLA2G6*.

Se realizan tres réplicas de cada muestra y la separación de los fragmentos se lleva a cabo mediante electroforesis capilar en el Servicio de Genética y Genómica, utilizando el instrumento 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del protocolo MPLA® General Protocol de MRC Holland. Como marcador de peso molecular se emplea LIZ GS 500 (ThermoFisher Scientific), utilizando la cantidad indicada en el protocolo mencionado anteriormente.

3.4. Ensayo de Minigenes en SPAST (SGT-1752)

3.4.1. Construcción del plásmido

Se parte del vector pSPL3, el fragmento a clonar incluye el exón 5 de *SPAST* flanqueado por unos 200 nucleótidos de los intrones 4 y 5 (*SPAST_E5*). Usando la herramienta NEBCutter V2.0 de New England BioLabs (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) se comprueba qué enzimas no cortan el inserto diseñado, seleccionándose los sitios de restricción *XhoI* y *NheI* para realizar la clonación, permitiendo introducir el inserto entre el sitio dador SD6 y el sitio aceptor SA2 del vector (**Fig. 4**). En la **Tabla 1** se especifican los cebadores diseñados para amplificar el inserto *SPAST_E5* añadiéndole los sitios de corte de la correspondiente enzima de restricción.

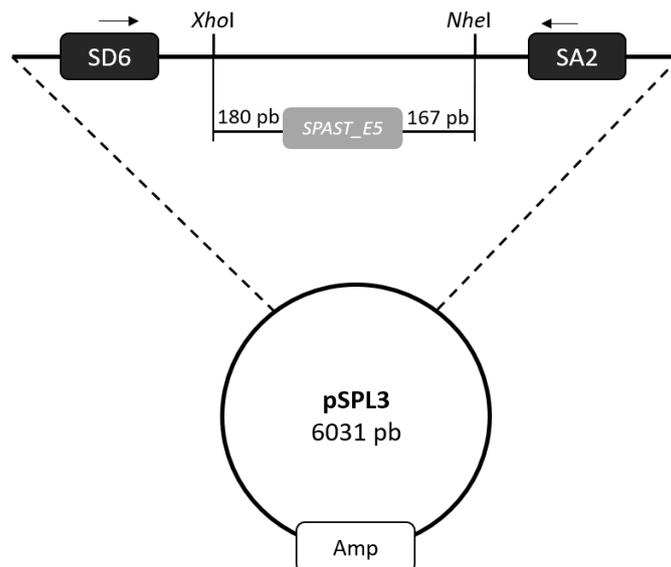


Fig. 4 Representación del vector pSPL3 indicando la posición de los sitios de corte donde se realiza la clonación

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación del fragmento de *SPAST* para su clonación en el vector pSPL3.

Cebadores	Secuencia 5' -> 3'	Temperatura de hibridación	Tamaño Amplificación
SPAST_E5_XhoI_F	GGAACTCGAGTTCCTATCTACCTAGTGACCACC	59 °C	537 pb
SPAST_E5_NheI_R	GCGCGCTAGCCCTGGAAAACAAGAGTCTCA		

La reacción de PCR para la amplificación del inserto *SPAST_E5* se realiza siguiendo el programa descrito en la **Tabla Suplementaria 2** y utilizando los reactivos indicados en la **Tabla Suplementaria 3**.

Los productos de PCR se purifican empleando el kit comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) y se procede a su digestión, junto con la del vector pSPL3 utilizando las enzimas *XhoI* y *NheI*, ambas de ThermoFisher Scientific. Los reactivos de las mezclas para ambas digestiones se muestran en la **Tabla 2**. La concentración de las enzimas de restricción y del tampón y las condiciones de la digestión doble se calculan empleando la herramienta *Double Digest Calculator* (ThermoFisher Scientific; <https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>). Una vez realizadas las mezclas, las digestiones se incuban en estufa a 37°C *overnight* (o/n).

Tabla 2. Reactivos de las mezclas de la digestión tanto del inserto *SPAST_E5* como del vector pSPL3 con *XhoI* y *NheI*.

Reactivo	Concentración inicial		Concentración final		Volumen	
	Inserto	Vector	Inserto	Vector	Inserto	Vector
DNA	49,4 ng/μL	3000 ng/μL	19,76 ng/μL	204 ng/μL	20μL	3,4 μL
Tango tampón	10x	10x	1x	1x	5 μL	5 μL
<i>XhoI</i>	10 U/μL	10 U/μL	0,4 U/μL	1,2 U/μL	2 μL	6 μL
<i>NheI</i>	10 U/μL	10 U/μL	0,1 U/μL	0,3 U/μL	0,5 μL	1,5 μL
H2O RNasa/DNasa Free	-	-	-	-	20,5 μL	34 μL
Volumen final					50μL	

Tras la digestión, tanto el inserto *SPAST_E5* como el vector pSPL3 digeridos se purifican mediante el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Para aislar el vector digerido se realiza una purificación por banda empleando un gel de agarosa al 1%.

La ligación del inserto *SPAST_E5* y el pSPL3 digeridos se lleva a cabo siguiendo el ratio molar inserto:vector, 3:1, realizándose, además un control negativo de la ligación. Las cantidades incluidas en cada una de las mezclas realizadas se detallan en la **Tabla 3**. Las ligaciones se incuban *o/n* a 4° C.

Dado que el probando estudiado (SGT-1752) presenta la mutación c.870+3A>G en heterocigosis, al realizar la ligación se obtienen dos construcciones plasmídicas: una con el fragmento WT, es decir, con c.870+3A (pSPL3-*SPAST_E5*^{WT}) y otra con el fragmento mutante, c.870+3G (pSPL3-*SPAST_E5*^{Mut}).

Tabla 3. Reactivos de las mezclas de las ligaciones entre el inserto *SPAST_E5* y el pSPL3 según el ratio 3:1 y el control negativo (CN).

Reactivo	Concentración inicial		Concentración final		Volumen	
	3:1	CN	3:1	CN	3:1	CN
pSPL3 digerido	38,5 ng/μL	38,5 ng/μL	2,5 ng/μL	2,5 ng/μL	1,3 μL	1,3 μL
<i>SPAST_E5</i> digerido	15,75 ng/μL	-	0,79 ng/μL	-	1,01 μL	-
T4 DNA Ligasa tampón	10x	10x	1x	1x	2 μL	2 μL
T4 DNA Ligasa	5 U/μL	5 U/μL	0,05 U/μL	0,05 U/μL	0,2 μL	0,2 μL
H ₂ O RNasa/DNasa Free	-	-	-	-	15,49 μL	16,50 μL
Volumen final					20 μL	20 μL

3.4.2. Transformación en *E. coli* DH5α

Se realiza una transformación mediante choque térmico para introducir las construcciones descritas en el apartado anterior en bacterias *E. coli* DH5α y, así, amplificarlas. El protocolo de transformación consiste en añadir 4 μL de ligación a 40 μL de bacterias competentes e incubarlas 30 minutos (min) en hielo. Una vez transcurrido el tiempo, se introducen en un termo-bloque a 42°C durante 45 segundos (s) para inducir el choque térmico, y se incuban dos min en hielo. Posteriormente, se añaden 500 μL de medio líquido Luria Bertani (LB) (Scharlab) pre-calentado a 37°C, y se incuban durante una hora (h) a 37°C en agitación (170-190rpm). A continuación, se siembran en placas de LB agar, con el antibiótico al que confiere resistencia el vector introducido, en este caso, ampicilina (amp). Por último, la placa se incuba en estufa a 37°C *o/n*. Este protocolo se realiza para las dos ligaciones (3:1 y CN).

3.4.3. Purificación de las construcciones wild-type y mutante

Tras la transformación, es necesario determinar qué colonias han introducido la construcción, para ello, se realizan PCR de colonias siguiendo el programa descrito en la **Tabla 4** y utilizando los reactivos indicados en la **Tabla Suplementaria 3**.

Para extraer el DNA plasmídico de las colonias en las que se ha introducido el vector con el inserto se realizan *minipreps* (extracción a pequeña escala) utilizando el kit comercial NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras su extracción y cuantificación, se secuencian en el Servicio de Genómica y Genética del CIPF. Los electroferogramas obtenidos se visualizan mediante el programa Chromas Lite versión 2.1., mientras que las secuencias nucleotídicas se alinean con la secuencia de referencia depositada en Ensembl GRCh 37 mediante la herramienta Blast para determinar si se trata de la construcción pSPL3-*SPAST_E5*^{WT} o la pSPL3-*SPAST_E5*^{Mut}.

Tabla 4. Programa empleado para la PCR de colonias.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	96 °C	7 min	1
Desnaturalización	96 °C	30 s	35
Hibridación	58 °C	30 s	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión	72 °C	7 min	1
Reposo	4 °C	∞	1

3.4.4. Glicerinado de las colonias de *E. coli*

Para preservar las colonias de *E. coli* DH5 α con las construcciones WT y mutante se realiza un glicerinado, mezclando 750 μ L de un cultivo *o/n* de *E. coli* DH5 α transformado con la construcción plasmídica determinada, con 250 μ L de glicerol (Invitrogen). Los tubos correspondientes a cada colonia se almacenan a -80°C.

3.4.5. Cultivo de células HeLa

Para la transfección se emplea la línea celular HeLa, una línea adherente inmortalizada derivada de una muestra de cáncer cérvico-uterino. Las células se cultivan en monocapa en frascos T75 de poliestireno (ThermoFisher Scientific) empleando el medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) completo, suplementado con 1% L-Glutamina (Sigma-Aldrich), 10% FBS (Sigma-Aldrich) inactivado y 1% Penicilina/Steptomycin (Sigma-Aldrich). Las células se mantienen en un incubador a 37°C, con 5% de CO₂.

Para llevar a cabo el experimento, se realizan cultivos en placas de 6 pocillos (ThermoFisher Scientific), en las que se cultivan 60.000 y 80.000 células por pocillo, respectivamente. Para realizar el cultivo, se retira el medio DMEM del frasco T75 con cuidado de no levantar las células y se añaden 5mL de tampón fosfato salino caliente (PBS, *phosphate buffered saline*) (Sigma-Aldrich) para lavar. Las células son separadas del sustrato añadiendo 3 mL Tripsina (Sigma-Aldrich) e incubando 2 min a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente, se añaden 7 mL de medio DMEM completo para neutralizar la Tripsina, se procede a su cómputo empleando la cámara de Neubauer y, una vez depositadas en las placas de 6 pocillos (80.000 y 60.000 células por pocillo), se incuban a 37°C, con 5% de CO₂ durante 24 y 48 h, respectivamente, hasta la transfección.

3.4.6. Transfección de células HeLa

Para la transfección de las células HeLa se emplea el reactivo FuGENE® HD (Promega) en un ratio 5:2 de FuGENE(μ L):DNA(μ g). Así pues, se utilizan 5 μ L de FuGENE por transfección y 2 μ g de cada construcción (pSPL3 vacío, pSPL3-*SPAST_E5*^{WT} y pSPL3-*SPAST_E5*^{Mut}). Los reactivos que se emplean para elaborar las mezclas de transfección se indican en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Reactivos empleados para realizar las mezclas de transfección de las células HeLa con las tres construcciones de pSPL3 y el inserto *SPAST_E5*.

Reactivos	pSPL3 vacío	pSPL3- <i>SPAST_E5</i> ^{WT}	pSPL3- <i>SPAST_E5</i> ^{Mut}
Opti-MEM™	100 μ L	100 μ L	100 μ L
DNA	2,2 μ L	7,3 μ L	5,4 μ L
Fugene® HD	5 μ L	5 μ L	5 μ L

Una vez se preparan las mezclas de transfección, se agitan vigorosamente durante 10 s, 5 veces, y se incuban a temperatura ambiente durante 15 min. Durante ese tiempo se cambia el medio de las células que van a ser transfectadas por medio DMEM completo nuevo. A continuación, se realiza un pequeño *spin* y se depositan 50 μ L de la mezcla de transfección sobre el pocillo correspondiente, se homogeneiza y se incuban a 37°C, con 5% de CO₂.

3.4.7. Extracción de RNA

Transcurridos 24 y 48 h post-transfección se extrae el RNA de las células de las placas de 6 pocillos con 80.000 y 60.000 células/pocillo, respectivamente. Para llevar a cabo la extracción se utiliza el protocolo Trizol:Cloroformo. Primero se lava con 500 μ L de PBS caliente el contenido de cada pocillo, se añaden 200 μ L de Tripsina/pocillo y se incuban 3 min. Posteriormente, se añaden 800 μ L de medio DMEM a cada pocillo para neutralizar la Tripsina, se transfiere todo el contenido a unos Eppendorf LoBind® de 1,5 mL (Eppendorf) y se centrifuga 5 min a 1.500 rpm a 4°C.

A continuación, se elimina el sobrenadante y se añade 1 mL de PBS a 4°C. Los tubos se centrifugan nuevamente 5 min a 2.000 rpm a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante, se resuspende el *pellet* con 1 mL de Trizol (QIAGEN) mediante pipeteo y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se añaden 200 μ L de cloroformo (Scharlab) y se centrifuga 15 min a 12.000 g a 4°C. El siguiente paso es transferir la fase acuosa, que contenía el RNA, a un nuevo tubo Eppendorf LoBind® de 1,5 mL, añadir 500 μ L de isopropanol (Scharlab) y repetir la centrifugación anterior.

Seguidamente, se elimina el sobrenadante y el *pellet* se lava con 1 mL de etanol 75% previamente preparado para centrifugarlo nuevamente durante 5 min a 7.400 g a 4°C. Tras finalizar la centrifugación, el etanol se descarta y el *pellet* se seca incubándolo 5-10 min a temperatura ambiente dentro de la campana con la tapa del tubo abierta. Finalmente, se añaden 30 μ L de agua DNasa/RNasa Free (Invitrogen) y se incuban a 55°C durante 15 min con una ligera agitación. Una vez transcurrido el tiempo los tubos se guardan a 4°C durante varias horas antes de cuantificar el RNA mediante el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher Scientific).

3.4.8. Retrotranscripción a cDNA

Para obtener cDNA a partir de RNA se utiliza el kit comercial qScript cDNA SuperMix (Quantabio) en cuyo protocolo se especifican las cantidades de reactivos a utilizar para retrotranscribir 500 ng de RNA y que se indican en la **Tabla 6**, para un volumen final de 20 μ L.

Tabla 6. Reactivos empleados en la retrotranscripción del RNA extraído a 24 y 48 horas post-transfección de las células HeLa con las tres construcciones plasmídicas (pSPL3 vacío, WT y Mut).

Reactivo	RNA 24h			RNA 48 h		
	pSPL3 vacío	WT	Mut	pSPL3 vacío	WT	Mut
SuperMix (5x)	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
H ₂ O DNasa/RNasa Free	13,5 μ L	15,57 μ L	13,84 μ L	11,3 μ L	13,95 μ L	13,04 μ L
RNA	2,50 μ L	2,43 μ L	2,16 μ L	4,7 μ L	2,05 μ L	2,96 μ L

La retrotranscripción se realiza utilizando el siguiente programa: 25°C (5 min), 42°C (30 min), 85°C (5 min) y un tiempo de reposo indefinido a 4°C.

3.4.9. PCR para comprobar la integridad del cDNA y efecto de la mutación

Se realiza una PCR para comprobar la integridad de las muestras de cDNA, amplificando una zona del gen *GADPH*. Igualmente, se lleva a cabo otra PCR para amplificar la región del plásmido entre los

dos sitios de *splicing* SD6 y SA2, donde está insertado el fragmento *SPAST_E5*. Los reactivos utilizados para preparar las mezclas se especifican en la **Tabla 7**. Se emplea el programa de PCR estándar (**Tabla Suplementaria 2**) y los *primers* indicados en la **Tabla 8**.

Tabla 7. Reactivos empleados para las PCR con cDNA para un volumen final de 25 µL.

Reactivo*	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
H ₂ O RNasa/DNasa Free	-	-	18,5 µL
Standard Reaction Buffer with MgCl ₂	10x	1x	2,5 µL
dNTPs	20 mM	0,4 mM	0,5 µL
<i>Primer</i> directo	10 µM	0,2 mM	0,5 µL
<i>Primer</i> reverso	10 µM	0,2 mM	0,5 µL
MgCl ₂	25 mM	0,5 mM	0,5 µL
Taq DNA polymerase	1 U/µL	0,02 U/µL	0,5 µL
cDNA	25 ng/µL	1,5 ng/µL	1,5 µL

*Las casas comerciales de los diferentes reactivos se especifican en el **Apéndice I**.

Tabla 8. Cebadores utilizados para la amplificación del cDNA.

Cebadores	Secuencia 5' -> 3'	Temperatura de hibridación	Tamaño Amplicón
SD6_F	TCTGAGTCACCTGGACAACC	55 °C	263 pb o 418 pb
SA2_R	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC		
GAPDH_D	CATTGACCTCAACTACATGG	55 °C	395 pb
GAPDH_R	CAAAGTTGTCATGGATGACC		

Los productos de PCR se visualizan en geles de agarosa al 1% y se secuencian siguiendo los pasos descritos en el **apartado 3.2.2.2**.

3.5. Análisis de Transcritos de *SPAST* (SGT-1752)

3.5.1. Extracción de RNA del paciente

Para poder analizar los transcritos de *SPAST*, se extrae RNA del paciente a partir de sangre periférica, empleando el kit comercial PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN) y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

3.5.2. Retrotranscripción a cDNA

Para obtener cDNA se realiza una retrotranscripción del RNA extraído mediante el kit qScript cDNA SuperMix (Quantabio), siguiendo el programa indicado en el **apartado 3.4.8**. Los volúmenes de los diferentes reactivos utilizados se especifican en la **Tabla 9**, para un volumen final de 20 µL.

Tabla 9. Reactivos empleados para la retrotranscripción del RNA extraído del paciente SGT-1752.

Reactivo	Volumen
SuperMix (5x)	4µL
H ₂ O DNasa/RNasa Free	10,68 µL
RNA	5,32 µL

3.5.3. Diseño de cebadores

Los cebadores se diseñan atendiendo a los criterios descritos en el **apartado 3.2.2.1**. Para su diseño se recurre a la secuencia de cDNA del transcrito *SPAST-001* (ENST00000315285.3; NM_014946)

depositado en Ensembl GRCh 37. Se diseñan dos cebadores directos, uno en el exón 3 y otro en el exón 4, y un cebador reverso en el exón 6. Con la primera pareja se amplifican tanto el transcrito con todos los exones como el transcrito natural en el que se produce el *skipping* del exón 4, mientras que con la segunda solo se amplifica el transcrito que contiene todos los exones. Las secuencias de los cebadores diseñados se indican en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Cebadores utilizados para la amplificación del cDNA de *SPAST*

Cebadores	Secuencia 5' -> 3'	Temperatura de hibridación	Tamaño Amplicón
SPAST_cDNA_E3_F	CCAAGGACCGCTTACAAC	58 °C	369, 233 y 181 pb
SPAST_cDNA_E6_R	TCTTACGAGTAGCAGTTGTAGG		
SPAST_cDNA_E4_F	TCTAGAGAAGATGCAACCAG	57 °C	350 y 162 pb
SPAST_cDNA_E6_R	TCTTACGAGTAGCAGTTGTAGG		

3.5.4. PCRs para comprobar la integridad del cDNA y analizar los transcritos

Las reacciones de PCR se realizan amplificando el cDNA del paciente y de un control (cDNA 1584) perteneciente a otra serie clínica investigada en el Laboratorio de Enfermedades Raras Neurodegenerativas del CIPF, con el objetivo de comparar los transcritos amplificados. Las PCRs se realizan utilizando el programa de PCR estándar, indicado en la **Tabla Suplementaria 2**, y los reactivos descritos en la **Tabla 7** del **apartado 3.4.9**. Al igual que en la sección anterior, se amplifica el gen *GAPDH* (utilizando los *primers* incluidos en la **Tabla 8**), para comprobar la integridad del cDNA tras la retrotranscripción. Los *primers* empleados para la amplificación de los transcritos de *SPAST* se indican en la **Tabla 10**. Las bandas resultantes se purifican como en el **apartado 3.4.1** y se secuencian.

3.6. Ensayo de expresión de *FTL* (MD-485)

3.6.1. Construcción del plásmido

EL ensayo de expresión se realiza partiendo del vector pGL4.24[luc2P/minP], en adelante pGL4, de Promega, y de un inserto que incluye el promotor de *FTL* (promotor_*FTL*). Los *primers* diseñados para amplificar el inserto están indicados en la **Tabla 11**, e incluyen los sitios de restricción escogidos para hacer la clonación: *KpnI* y *XhoI*. Ambos sitios de restricción se encuentran en el *multiple cloning site* (MCS) del vector, situado en una zona anterior al gen de la luciferasa. Además, se comprueba, usando la herramienta NEBCutter 2.0 (descrita en el **apartado 3.4.1**), que ninguna de estas enzimas de restricción corta el amplicón diseñado. La amplificación del fragmento *promotor_FTL* se realiza utilizando las condiciones estándar de PCR (**Tabla Suplementaria 3**), añadiendo un 5% de DMSO (Sigma-Aldrich), y siguiendo el programa descrito en la **Tabla Suplementaria 2**, pero con 45 s de tiempo de extensión debido al tamaño del amplicón. Además, para la reacción de PCR se emplea el DNA del probando MD-485, que presenta la mutación a estudiar (*FTL* c.-168G>T) en heterocigosis, por lo que se espera obtener vectores que incluyan el alelo WT (pGL4_*promotor_FTL*^{WT}) y vectores que incluyan el alelo mutado (pGL4_*promotor_FTL*^{Mut}).

Tabla 11. Cebadores utilizados para la amplificación del fragmento *promotor_FTL* para su clonación en el vector pGL4.24[luc2P/minP].

Cebadores	Secuencia 5' -> 3'	Temperatura de hibridación	Tamaño Amplicón
FTL_promoter_KpnI_F	GGAAGGTACCGTTCACAGGGCTGTTAGTG	54 °C	675 pb
FTL_promoter_XhoI_R	GCGCCTCGAGGCAGCTGGAGGAAATTAGG		

El producto de PCR se purifica usando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) y se procede a su digestión, junto con la del vector siguiendo las condiciones (**Tabla 12**) descritas en la herramienta *Double Digest Calculator* de ThermoFisher Scientific, tal y como se expone en el **apartado 3.4.1**. Las digestiones se incuban en estufa a 37°C o/n.

Tabla 12. Reactivos de las mezclas de la digestión del fragmento *promotor_FTL* y el vector pGL4 con *KpnI* y *XhoI*.

Reactivo	Concentración inicial		Concentración final		Volumen	
	Inserto	Vector	Inserto	Vector	Inserto	Vector
DNA	6 ng/μL	3000 ng/μL	4,2 ng/μL	180 ng/μL	35μL	3 μL
CutSmart tampón	10x	10x	1x	1x	5 μL	5 μL
<i>KpnI</i>	20 U/μL	20 U/μL	0,12 U/μL	1,2 U/μL	0,3 μL	3 μL
<i>XhoI</i>	10 U/μL	10 U/μL	0,1 U/μL	1 U/μL	0,5 μL	5 μL
H ₂ O RNasa/DNasa Free	-	-	-	-	9μL	34 μL
Volumen final					50μL	

Tras la digestión, el fragmento *promotor_FTL* y el vector pGL4 se purifican siguiendo los pasos descritos en el **apartado 3.4.1**. La ligación del inserto y el vector digeridos se realizan según el ratio molar 3:1, por lo que se llevan a cabo dos ligaciones, incluyendo el control negativo. Las cantidades incluidas en cada una de las mezclas realizadas se detallan en la **Tabla 13**. Las ligaciones se incuban o/n a 4°C.

Tabla 13. Reactivos de las mezclas de las ligaciones entre el fragmento *promotor_FTL* y el pGL4 digeridos según el ratio 3:1 y el control negativo (CN).

Reactivo*	Concentración inicial		Concentración final		Volumen	
	3:1	CN	3:1	CN	3:1	CN
pGL4 digerido	76,5 ng/μL	76,5 ng/μL	2,49 ng/μL	2,49 ng/μL	0,65 μL	0,65 μL
<i>Promotor_FTL</i> digerido	13 ng/μL	-	1,22 ng/μL	-	1,87 μL	-
T4 DNA Ligasa tampón	10x	10x	1x	1x	2 μL	2 μL
T4 DNA Ligasa	5 U/ μL	5U/ μL	0,05 U/μL	0,05 U/μL	0,2 μL	0,2 μL
H ₂ O RNasa/DNasa Free	-	-	-	-	μL	μL
Volumen final					20 μL	20 μL

*Las casas comerciales de los diferentes reactivos se indican en la **Tabla 3** del **apartado 3.4.1**.

3.6.2. Transformación en *E. coli* DH5α

La transformación de bacterias *E. coli* DH5α usando las ligaciones preparadas en el apartado anterior se realiza siguiendo los pasos descritos en el **apartado 3.4.2**.

3.6.3. Purificación de las construcciones wild-type y mutata

Al igual que en el **apartado 3.4.3**, se determina qué colonias han introducido la construcción mediante PCR de colonias, la extracción de DNA plasmídico se lleva a cabo mediante *minipreps* y se las colonias de interés se secuencian en el Servicio de Genómica y Genética del CIPF. Los electroferogramas obtenidos se visualizan mediante el programa Chromas Lite versión 2.1. Las secuencias nucleotídicas se alinean con la secuencia de la construcción WT, para determinar si se trata de la construcción con el inserto WT (pGL4_ *promotor_FTL*^{WT}) o el mutante (pGL4_ *promotor_FTL*^{Mut}).

A continuación, se realizan *midipreps* (extracción a mediana escala) de las dos colonias seleccionadas, una con el inserto WT y otra con el mutante, empleando el kit comercial NucleoBond® XtraMidi (Macherey-Nagel). La cuantificación del DNA plasmídico extraído se realiza usando el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher Scientific).

3.6.4. Glicerinado de las colonias de *E. coli*

Para preservar las colonias de *E. coli* DH5 α que han incorporado las construcciones WT y mutante se realiza un glicerinado, mezclando 750 μ L de cultivo de *E. coli* DH5 α con la construcción plasmídica con 250 μ L de glicerol (Invitrogen). Los tubos correspondientes a cada colonia se almacenan a -80°C.

3.6.5. Cultivo de células HEK293T

Para la transfección se emplea la línea celular HEK293T, una línea adherente de tipo epitelial. Las células se cultivan en monocapa en frascos T75 de poliestireno (ThermoFisher Scientific) empleando el medio DMEM completo como en el apartado 3.4.5. Las células se mantienen en un incubador a 37°C, con 5% de CO₂.

Para llevar a cabo el experimento, se realiza un cultivo de HEK293T en una placa de 24 pocillos (ThermoFisher Scientific) en las que se cultivan 80.000 células/pocillo. El protocolo de cultivo, incluyendo los lavados, la separación del sustrato, el cómputo y la siembra en placa de 80.000 células/pocillo se corresponde con lo descrito en el apartado 3.4.5., empleando medio DMEM completo.

3.6.6. CoTransfección con las construcciones plasmídicas y el vector pRL Renilla Luciferase Control Reporter Vector en células HEK293T

Para llevar a cabo el ensayo de luciferasa se cotransfecta las células HEK293T sembradas 24 h antes con las diferentes construcciones generadas: pGL4 vacío, pGL4_promotor_FTL^{WT} y pGL4_promotor_FTL^{Mut}, junto con el plásmido pRL Renilla Luciferase Control Reporter Vectors (Promega), en adelante pRL Renilla, que funciona como un control interno de la expresión de la luciferasa, permitiendo normalizar los valores que se obtengan en la transfección con cada construcción.

Para la transfección se emplea el reactivo FuGENE® HD (Promega) en un ratio 3:1 FuGENE(μ L):DNA(μ g). Se utiliza un ratio pGL4:pRL Renilla de 5:1, las mezclas de transfección están indicadas en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Reactivos empleados para realizar las mezclas de cotransfección de las células HEK293T con las tres construcciones de pGL4 y el fragmento promotor_FTL.

Reactivos	pGL4 vacío	pGL4_promotor_FTL ^{WT}	pGL4_promotor_FTL ^{Mut}
Opti-MEM™	100 μ L	100 μ L	100 μ L
pGL4 (200 ng/ μ L)	0,75 μ L	0,75 μ L	0,75 μ L
pRL Renilla (30 ng/ μ L)	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Fugene® HD	5 μ L	5 μ L	5 μ L

Una vez se preparan las mezclas de transfección, se agitan vigorosamente durante 10 s, 5 veces, y se incuban a temperatura ambiente durante 15 min. Durante ese tiempo se cambia el medio de las células en la placa de 24 pocillos que iban a ser transfectadas, por medio DMEM completo. A continuación, se realiza a un pequeño *spin* y se depositan 45 μ L de la mezcla de transfección sobre el pocillo correspondiente, se homogeneiza y se incuban a 37°C, con 5% de CO₂ durante 24 h.

3.6.7. Ensayo de luciferasa

Para realizar el ensayo de luciferasa se utiliza el kit comercial Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). El primer paso consiste en eliminar el medio de las células transfectadas 24 h antes y lavarlas dos veces con 500 µL de PBS, previamente atemperado en un baño a 37°C. A continuación, se añaden 150 µL de PLB® (*Passive Lysis Buffer*®) 1X, preparado a partir de un stock a 5X, a cada pocillo, y se incuba 30 min a temperatura ambiente, en agitación suave y en oscuridad. Transcurrido el tiempo, se recoge el contenido de los pocillos y se deposita en tubos Eppendorf opacos que se introducen en hielo. Después, se les da un pequeño *spin* de 30 s a 4°C para depositar los restos celulares en el fondo del tubo. A continuación, se transfieren 20 µL de sobrenadante de cada transfección a pocillos de una placa Corning® 96-well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate (Corning, Kennebunk, ME, EE.UU.) y se añaden 80 µL de LAR II® (*Luciferase Assay Reagent II*®) para medir la actividad luciferasa mediante el espectrofluorímetro Victor2 (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.) durante 1s. Seguidamente, se añaden 80 µL de Stop & Glo® 1X, preparado a partir de un stock a 50X, para medir la actividad *Renilla*-luciferasa, permitiendo normalizar los datos obtenidos en la primera medición.

3.6.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realiza utilizando un t-test unpaired mediante el programa GraphPad Prism v9.1.2 para Windows (GraphPad Software, www.graphpad.com).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis del panel de genes

El uso del panel de genes SureSelect Custom Constitutional Panel 17 Mb de Agilent Technologies permitió detectar 10.962 variantes en los 15 probandos estudiados. Al aplicar el filtrado descrito en la sección de Materiales y Métodos, se obtuvieron 226 cambios, de los cuales, al comprobar su posible relevancia o su relación con la patología de los pacientes, se seleccionaron 25 cambios candidatos en 14 de los probandos; en uno de los pacientes, no se detectó ningún cambio de interés. La validación mediante secuenciación Sanger confirmó la existencia de todos los cambios, excepto un cambio en el gen *ATAD3A* (c.715G>A) en el probando MD-484 que resultó ser un artefacto de la secuenciación masiva (**Fig. 5**). Las 24 variantes candidatas confirmadas mediante secuenciación Sanger, todas ellas en heterocigosis, se indican en la **Tabla 15** En el **Apéndice II** se incluyen los electroferogramas de cada uno de los cambios validados.

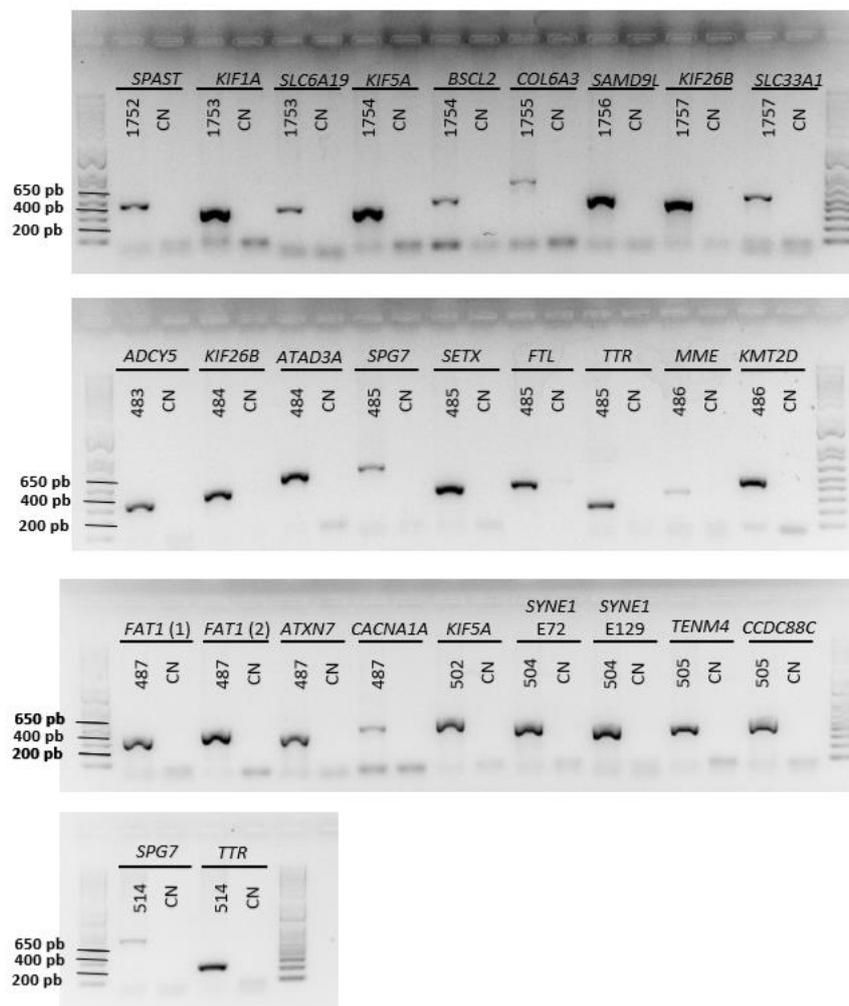


Fig. 5 Electroforesis de los productos de PCR de los diferentes fragmentos amplificados para el análisis de los 25 cambios candidatos.

En cuatro de los 15 probandos (26,67%) se identificaron variantes previamente descritas como patológicas. Este es el caso de los probandos SGT-1752, SGT-1754, SGT-1757 y MD-485.

- SGT-1752: La variante *SPAST* c.870+3A>G está asociada con SPG4, la forma más común de ADHSP (Lim et al., 2010).

- SGT-1754: La variante *KIF5A* c.3871C>G está implicada en SPG10, un tipo de ADHSP (Odgerel et al., 2019).
- SGT-1757: La variante *KIF26B* c.5710G>A presenta herencia AD y causa una forma de SCA (Nibbeling et al., 2017)
- En MD-485, se caracterizaron tres variantes previamente asociadas a patología: *SPG7* c.1529C>T (Brugman et al., 2008; Mancini et al., 2019), *TTR* c.416C>T (Harrison et al., 1991) y *FTL* c.-168G>T (Volkman et al., 2019), todos ellos presentan una herencia AD, excepto *SPG7* que podría cursar también con herencia AR. Se investigó también a su hija MD-514 quien padecía al igual que su padre de hiperferritinemia con cataratas congénitas e hipointensidad en T2 en MRI cerebral. En ella solo se analizaron los cambios en *SPG7* y *TTR* (**Fig. 5**) porque previamente se sabía que era portadora del cambio en *FTL* responsable de los signos clínicos mencionados. MD-514 porta las variantes de *SPG7* y *TTR* en heterocigosis (**Apéndice II**). Consecuentemente, el fenotipo clínico más grave descrito en el probando MD-485 no se debe a las variantes *SPG7* c.1529C>T y *TTR* c.416C>T.

Cinco variantes detectadas no estaban anotadas en las bases de datos consultadas (gnomAD, Ensembl, HGMD) y, por tanto, se trataría de cambios noveles. Todas ellas implicadas en trastornos con herencia AD. Los algoritmos predijeron que:

- *ADCY5* c.914T>A y *CACNA1A* c.3599_3601delAGA en los probandos MD-483 y MD-487, respectivamente, podrían ser deletéreas. Las otras tres variantes noveles caracterizadas, *KIF1A* c.3871C>G (SGT-1753), *KIF26B* c.4451C>T (MD-484) y *KIF5A* c.2274G>C (MD-502), serían probablemente tolerables. No obstante, no se puede confirmar la patogenicidad de ninguno de estas variantes con total certeza. Estas cinco variantes, junto con el resto de cambios identificados en el panel (**Tabla 15**), se clasifican como variantes de significado incierto (VUS, *variant of uncertain significance*), según lo establecido por la ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*) (Richards et al., 2015). Sería preciso la realización de estudios genéticos (análisis de segregación) y funcionales para ganar evidencias que muestren el carácter patológico de estas mutaciones.

En todos los probandos se han caracterizado variantes asociadas a una herencia AD, salvo en los probandos SGT-1755 y MD-504. En SGT-1755, se identificaron tres cambios en *COL6A3* dos de ellos con una frecuencia alta y, por tanto, clasificados como tolerables, (c.4311T>C y c.4533G>T), y un tercer cambio c.4436A>T, que podría considerarse como candidato a ser la mutación causal. *COL6A3* está relacionado con una forma de distonía. En MD-504, se detectaron dos variantes en *SYNE1* en heterocigosis compuesta; este gen está implicado en ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva de tipo 8 (SCAR8, *autosomal recessive spinocerebellar ataxia 8*).

Tabla 15. Cambios candidatos detectados y validados en los probandos mediante el panel SureSelect Custom Constitutional Panel 17 Mb de Agilent Technologies

Probando	Clínica	Gen (OMIM*)	Cambio DNA ^a (RefSeq) ^b	Cambio aa (RefSeq) ^b	Novedad (o rs ^c)	MAF	Enfermedad OMIM (Herencia)	NNSPLICE	NetGene2
SGT-1752	HSP	<i>SPAST</i> (*604277)	c.870+3A>G (NM_014946)	NA	rs1553314979	-	SPG4 (AD)	Pérdida de un sitio dador	Pérdida de un sitio dador
Probando	Clínica	Gen (OMIM*)	Cambio DNA ^a (RefSeq) ^b	Cambio aa (RefSeq) ^b	Novedad (o rs ^c)	MAF	Enfermedad OMIM (Herencia)	SIFT	PolyPhen2
SGT-1753	HSP	<i>KIF1A</i> (*601255)	c.3871C>G (NM_001244008)	p.R1291G (NP_001230937)	Novel	-	SPG30 (AD)	T	B
		<i>SLC6A19</i> (*608893)	c.1651G>A (NM_001003841)	p.V551M (NP_001003841)	rs142269451	9,56E-05	Hiperglicinuria (AD), Enfermedad de Harnup (AR)	D	PrP
SGT-1754	HSP	<i>KIF5A</i> (*602821)	c.2769G>A (NM_004984)	p.R923= (NP_004975)	rs35225609	0,004054	SPG10 (AD)	-	-
		<i>BSCL2</i> (*606158)	c.1280T>C (NM_001122955)	p.L363P (NP_001116427)	rs145649423	0,003451	Neuropatía distal motora, Síndrome de SPG Silver (AD)	T	B
SGT-1755	HSP	<i>COL6A3</i> (*120250)	c.4311T>C (NM_004369)	p.Ile1437= (NP_004360)	rs2646260	0,2915	Distonía 27 (AR) - Miopatía Bethlem (AD/AR) - Miopatía Ulrich (AR/AD)	-	-
			c.4436A>T	p.Q1479L	rs369449472	1,27E-04		D	PrP
			c.4533G>T	p.Gly1511=	rs2645774	0,2380		-	-
SGT-1756	Ataxia	<i>SAMD9L</i> (*611170)	c.3386G>T (NM_152703)	p.S1129I (NP_689916)	rs747181782	2,84E-05	Síndrome de ataxia-panicitopenia (AD)	D	PoP
SGT-1757	Ataxia	<i>KIF26B</i> (*614026)	c.5710G>A (NM_018012)	p.D1904N (NP_060482)	rs749953234	3,593e-05	SCA (AD)	D	PrP
		<i>SLC33A1</i> (*603690)	c.1451A>C (NM_004733.4)	p.N484T (NP_004724.1)	rs144015992	0,001686	SPG42 (AD)	T	B
MD-483	sd. cerebeloso + sd. piramidal	<i>ADCY5</i> (*600293)	c.914T>A (NP_899200)	p.L305H (NM_183357)	Novel	-	Discinesia familiar con mioquimia facial (AD)	D	PoP
MD-484	Ataxia	<i>KIF26B</i> (*614026)	c.4451C>T (NM_018012)	p.P1484L (NP_060482)	Novel	-	Hipoplasia pontocerebelosa con distrofia muscular espinal infantil (AD); SCA (AD)	T	B

^a Todos los cambios han sido descritos en heterocigosis. ^b Secuencia de referencia depositada en Ensembl GRCh37. ^c El número "rs" es un identificar de SNPs. Abreviaturas: T: Tolerable; B: Benigno; D: Deletéreo; PrP: probablemente patológico; PoP: posiblemente patológico

Tabla 15. (Continuación)

Probando	Clínica	Gen (OMIM*)	Cambio DNA ^a (RefSeq) ^b	Cambio aa (RefSeq) ^b	Novedad (o rs ^c)	MAF	Enfermedad OMIM (Herencia)	SIFT	PolyPhen2
MD-485	NBIA, ataxia cerebelosa y atrofia cerebelosa	<i>SPG7</i> (*602783)	c.1529C>T (NM_003119)	p.A510V (NP_003110)	rs61755320	0,002899	SPG7 (AD/AR)	D	PrP
		<i>SETX</i> (*608465)	c.377A>C (NM_015046)	p.H126P (NP_055861)	rs368932301	1,60E-05	AOA2	D	PrP
		<i>FTL</i> (*134790)	c.-168G>T (NM_000146.4)	NA	rs398124635	-	NBIA3 (AD), Síndrome hereditario de hiperferritinemia y cataratas (AD)	-	-
		<i>TTR</i> (*176300)	c.416C>T (NM_000371)	p.T139M (NP_000362)	rs28933981	0,001474	Amiloidosis (AD)	D	PrP
MD-486	Ataxia	<i>MME</i> (*1205209)	c.68G>A (NM_007287)	p.R23Q (NP_009218)	rs201850855	5,57E-05	SCA43 (AD), Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2T (AD/AR)	T	PoP
		<i>KMT2D</i> (*602113)	c.5921C>T (NM_003482)	p.T1974M (NP_003473)	rs777415982	5,52e-6	Síndrome de Kabuki (AD)	D	PrP
MD-487	Ataxia	<i>FAT1</i>	c.7846G>A (NM_005245)	p.V2616I (NP_005236)	rs371619837	1,20E-05	SCA (AD)	T	B
			c.6656C>T	p.T2219I	rs201477950	3,92E-05		T	B
		<i>ATXN7</i> (*607640)	c.916A>T (NM_001177387)	p.I306F (NP_001170858)	rs140270787	0,001218	SCA7 (AD)	D	PoP
MD-502	HSP	<i>KIF5A</i> (*602821)	c.2274G>C (NM_004984)	p.E758D (NP_004975)	Novel	-	SPG10 (AD)	T	B
MD-504	HSP	<i>SYNE1</i> (*608441)	c.23448G>C (NM_182961)	p.E7816D ^d (NP_892006)	rs767653103	0,003985	SCAR8 (AR)	-	PoP
			c.11848C>T	p.L3950F ^d	rs182154754	0,05567		-	PoP
MD-505	HSP	<i>TENM4</i> (*610084)	c.4723A>G (NM_001098816)	p.M1575V (NP_001092286)	rs956562026	1,20E-05	Temblor esencial tipo 5 (AD)	T	B
		<i>CCDC88C</i> (*611204)	c.1808A>G (NM_001080414)	p.N603S (NP_001073883)	rs771647881	8,02E-06	SCA40 (AD)	T	B
Probando	Clínica	Gen (OMIM*)	Cambio DNA ^a (RefSeq) ^b	Cambio aa (RefSeq) ^b	Novedad (o rs ^c)	MAF	Enfermedad OMIM (Herencia)	PROVEAN	MutationTaster
MD-487	Ataxia	<i>CACNA1A</i>	c.3599_3601delAGA (NM_001127222.2)	p.K1202del (NP_001120694.1)	Novel	-	EA2 (AD)	D	CE

^a Todos los cambios han sido descritos en heterocigosis. ^b Secuencia de referencia depositada en Ensembl GRCh37. ^c El número “rs” es un identificar de SNPs. ^d Heterocigosis compuesta. Abreviaturas: T: Tolerable; B: Benigno; D: Deletéreo; PrP: probablemente patológico; PoP: posiblemente patológico; CE: causante de enfermedad

4.2. Ensayo de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

En el probando MD-485 se detectaron dos cambios adicionales, no incluidos en la **Tabla 16**, que no fueron validados mediante secuenciación Sanger. Estos cambios son: *PANK2* c.1413-13insCCCC y *PLA2G6* c.209G>A (p.R70Q). Se decidió realizar un MLPA de estos genes para comprobar la existencia de grandes deleciones o inserciones. Como se ha mencionado anteriormente, se empleó un control XY de referencia con que el comparar el tamaño de los fragmentos detectados y un control interno, con un paciente ya estudiado previamente (NBIA-373) que permite comprobar el correcto funcionamiento de la SALSA® Probemix P120 *PANK2/PLA2G6*.

Las tres réplicas realizadas son consistentes y en todas ellas se observa la ausencia de grandes inserciones y deleciones en los genes *PANK2* y *PLA2G6* (**Fig. 6**) en la muestra del probando MD-485. El resultado obtenido para el paciente NBIA-373 también es negativo (**Apéndice III**), corroborando el buen funcionamiento de la SALSA empleada.

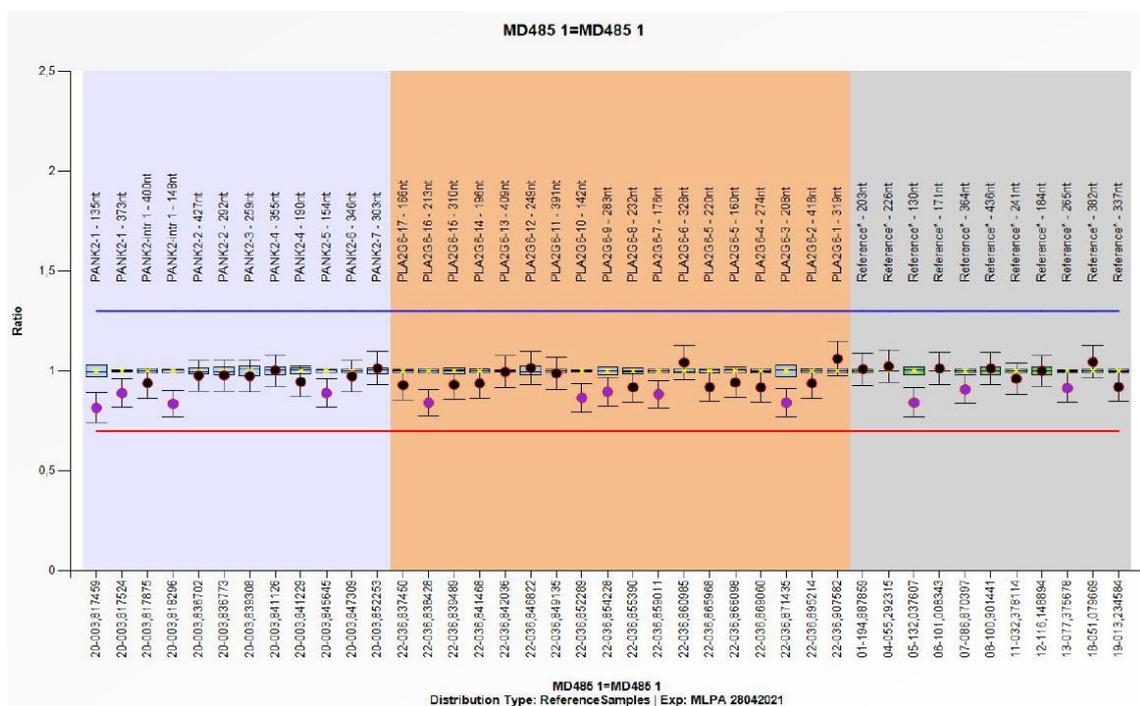


Fig. 6 Resultado de una de las réplicas del MPLA de *PANK2/PLA2G6* en el probando MD-485

Además del MPLA de *PANK2/PLA2G6*, se subcontrató en un laboratorio externo la realización de un MPLA de *SETX*, ya que no se disponía de la SALSA necesaria para realizarlo en el laboratorio. MD-485 era portador del cambio *SETX* c.377A>C en heterocigosis y este gen es responsable de la ataxia con apraxia oculomotora de tipo 2 (AOA2, *ataxia with oculomotor apraxia*), que presenta herencia AR. La contribución de defectos en *SETX* al cuadro clínico fue descartada porque no se detectaron grandes deleciones ni inserciones.

4.3. Ensayo de minigenes del cambio c.870+3A>G en el gen *SPAST*

Para el cambio *SPAST* c.870+3A>G, los dos predictores *in silico* utilizados (NetGene2 y NNSPLICE) mostraron que se produciría una pérdida de un sitio dador con respecto al WT, generando una alteración en el *splicing* del gen *SPAST* que podría resultar en el *skipping* del exón 5. Para poder determinarlo, dado que se disponía de DNA del paciente SGT-1752, se decidió realizar un ensayo de minigenes para estudiar el efecto de la mutación *SPAST* c.870+3A>G en el *splicing* del exón 5.

Como se indica en la sección de Materiales y Métodos, se llevaron a cabo extracciones de RNA a 24 y 48h tras la transfección con las construcciones pSPL3 vacío (pSPL3 ϕ), pSPL3-*SPAST_E5*^{WT} y pSPL3-*SPAST_E5*^{Mut}. La PCR de *GAPDH* mostró que todas las muestras de cDNA estaban íntegras, observándose una buena amplificación en las tres extracciones tanto de 24 como de 48 h post-transfección. Al realizar la PCR empleando los *primers* SD6_F y SA2_R (**Tabla 8**) se esperaban dos posibles fragmentos: uno de 263 pb, correspondiente al vector vacío y otro de 451 pb, si el exón 5 de *SPAST* forma parte del transcrito junto con SD6 y SA2 (**Fig. 7**).

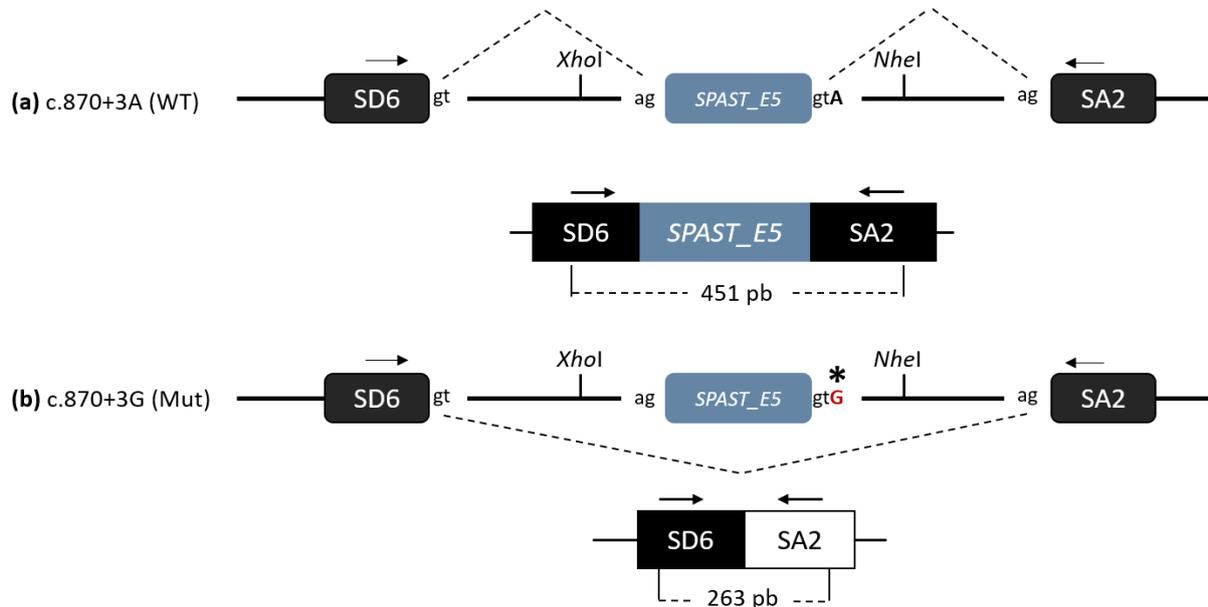


Fig. 7 *Splicing* alternativo según el fragmento insertado en el vector pSPL3. **(a)** Fragmento de 451 pb cuando el transcrito está formado por SD6, exón 5 de *SPAST* y SA2. **(b)** Fragmento de 263 pb, cuando el exón 5 de *SPAST* no forma parte del transcrito.

En las muestras transfectadas con el pSPL3-*SPAST_E5*^{Mut} se observó un fragmento de 263 pb, indicando que la mutación c.870+3A>G ha producido el *skipping* del exón 5, de tal forma que el sitio donador de SD6 ha interactuado con el sitio aceptor de SA2 y el exón 5 ha sido eliminado junto con los fragmentos intrónicos flanqueantes. No obstante, en el caso de las muestras transfectadas con pSPL3-*SPAST_E5*^{WT} se identificaron dos fragmentos: uno correspondiente al fragmento WT (451 pb), en el que el exón 5 permanece en el transcrito, y otro de 263 pb resultante de la pérdida del exón 5 (**Fig. 8a**).

Al secuenciar las dos bandas amplificadas en las muestras WT, se observa un heterodúplex en la banda superior. Este heterodúplex corresponde al solapamiento entre la secuencia WT (SD6-E5-SA2) y la banda del vector vacío (SD6-SA2) (**Fig. 9**). La banda inferior corresponde al fragmento en el que se produce el *skipping* del exón 5. Por tanto, contrario a lo esperado, en el caso de las muestras WT, se observa tanto el fragmento WT, en el que el exón 5 permanece en el transcrito debido a que el sitio donador estudiado permanece intacto, como el fragmento en el que se produce el *skipping* del exón 5 (**Fig. 8b**).

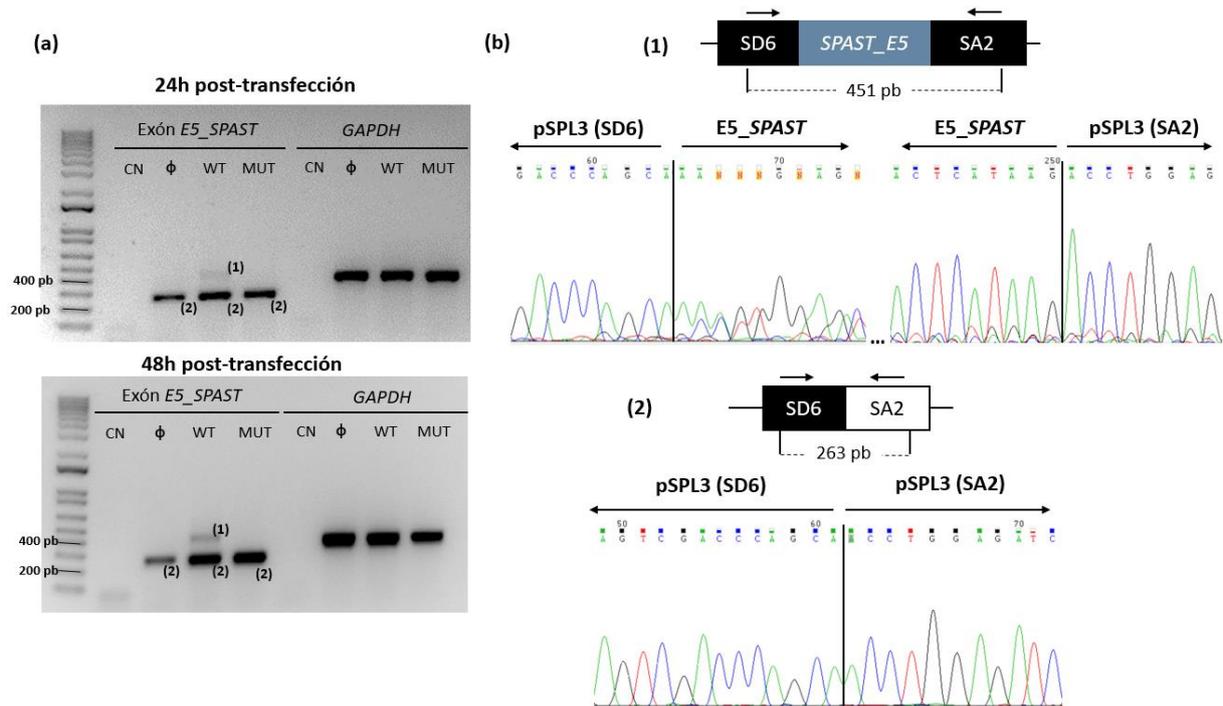


Fig. 8 Resultados del ensayo de minigenes. **(a)** Electroforesis de los productos de PCR de las extracciones de RNA a 24 y 48 h post-transfección con cada una de las construcciones. Han sido testadas en gels de agarosa 1%, empleando 1Kb Plus DNA Ladder como marcador de peso molecular. **(b)** Electroferogramas de la secuenciación de las bandas de 451 y 263 pb observadas. Abreviaturas: CN: control negativo; ϕ: pSPL3 vacío; WT: pSPL3 con el fragmento WT (c.870+3A); MUT: pSPL3 con el fragmento mutante (c.870+3A>G). Marcador de peso molecular empleado en la electroforesis: 1 Kb Plus DNA Ladder.

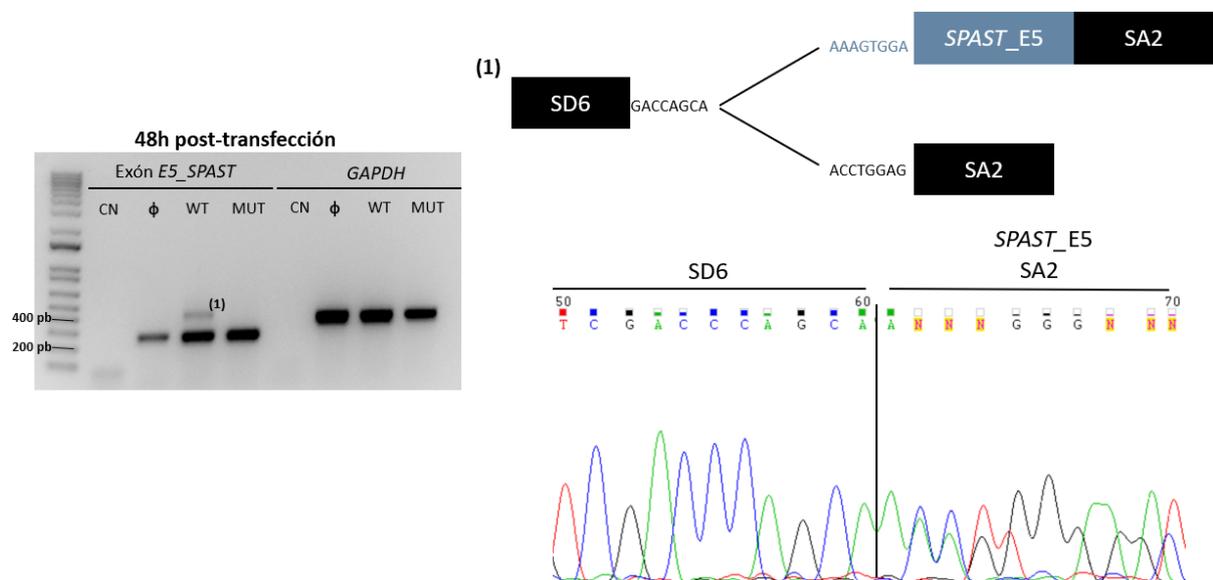


Fig. 9 Heterodúplex entre el transcrito que incluye SD6-*SPAST_E5*-SA2 y el que solo incluye SD6-SA2. Marcador de peso molecular empleado en la electroforesis: 1 Kb Plus DNA Ladder.

4.4. Análisis de transcritos del cambio c.870+3A>G en el gen *SPAST*

Como se ha mencionado en la sección de Materiales y Métodos, se diseñó un cebador directo en el exón 3 (*SPAST_cDNA_E3_F*) y un cebador reverse en el exón 6 (*SPAST_cDNA_E6_R*) (**Tabla 10**) para amplificar dos transcritos canónicos de *SPAST*, uno que contiene todos los exones (E3-E4-E5-E6) y otro en el que se produce el *skipping* del exón 4. En Ensembl GRCh 37, el primero de estos transcritos se identifica como *SPAST-001* (ENST00000315285.3) y el segundo, como *SPAST-002* (ENST00000345662.1).

El testado en agarosa de los productos de PCR permitió observar que la amplificación de *GAPDH* era correcta tanto en el caso del cDNA del probando (SGT-1752) como en el cDNA del control (SGT-1584), indicando una buena integridad de las muestras. Respecto a los transcritos de *SPAST*, se identificaron tres amplicones de 500, 369 y 181 pb en SGT-1752, y otros tres de 500, 369 y 273 pb en SGT-1584 (**Fig. 10a**). Los fragmentos de 369 y 273 pb se asocian a los dos transcritos canónicos de *SPAST* previamente descritos, mientras que el fragmento de 181 pb corresponde con el transcrito en el que se produce el *skipping* del exón 5, indicando que la mutación c.870+3A>G está relacionada con esta pérdida del exón 5 de *SPAST* (**Fig. 10b**).

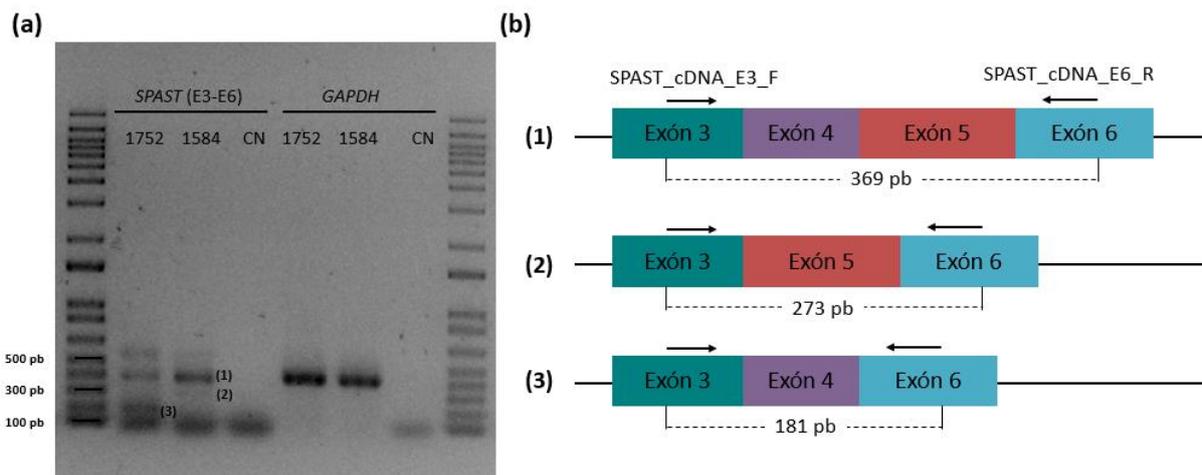


Fig. 10 Resultados del análisis de los transcritos de *SPAST* empleando los *primers* *SPAST_cDNA_E3_F* y *SPAST_cDNA_E6_R*, además de la amplificación de *GAPDH* como medida de la integridad de los cDNAs. (a) Electroforesis de los productos de PCR tras la amplificación de cDNA de SGT-1752 (probando) y SGT-1584 (referencia) (b) Posibles amplicones considerando los diferentes patrones de *splicing* esperados. Marcador de peso molecular empleado en la electroforesis: 1 Kb Plus DNA Ladder.

Con el objetivo de visualizar con mayor claridad la pérdida del exón 5 y secuenciar las bandas amplificadas, para así comprobar a qué correspondía la banda de 500 pb, se diseñó un nuevo *primer* directo situado entre el final del exón 3 y el comienzo del exón 4 (*SPAST_cDNA_E4_F*) (**Tabla 10**). Usando este nuevo cebador directo y el cebador reverse *SPAST_cDNA_E6_R* se amplifica únicamente el transcrito canónico *SPAST-001*. Al analizar los productos de PCR se detectaron tres amplicones en la carrera del probando SGT-1752: 500, 350 y 162 pb. En el caso de la muestra de referencia, se observa una banda de 350 pb con mayor intensidad, correspondiente al transcrito canónico (**Fig. 11**).

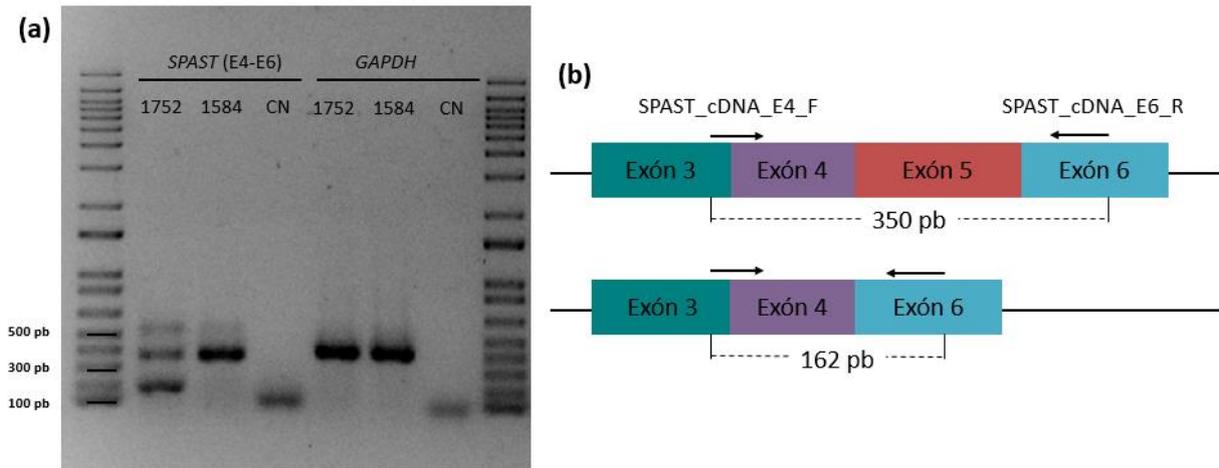


Fig. 11 Resultados del análisis de los transcritos de *SPAST* empleando los *primers* SPAST_cDNA_E4_F y SPAST_cDNA_E6_R, además de la amplificación de *GAPDH* como medida de la integridad de los cDNAs. (a) Electroforesis de los productos de PCR tras la amplificación de cDNA de SGT-1752 (probando) y SGT-1584 (control) (b) Posibles amplicones considerando los diferentes patrones de *splicing* esperados. Marcador de peso molecular empleado en la electroforesis: 1 Kb Plus DNA Ladder.

La secuenciación de las bandas de 500 y 350 pb visualizadas en la carrera de SGT-1752 mostraron la existencia de un heterodúplex debido al solapamiento del transcrito canónico y el truncado. Este heterodúplex es el responsable de la aparición de la banda inesperada a 500 pb, la cual se corresponde con el transcrito canónico E4-E5-E6 (Fig. 12). Igualmente, la secuenciación de la banda de inferior (162 pb) observada en SGT-1752 confirmó la amplificación del transcrito mutante en el que se produce el *skipping* del exón 5. Dicha banda no se caracterizó en SGT-1584, en el que solo se amplificó el transcrito canónico (E4-E5-E6). La secuenciación de la banda de 162 pb de SGT-1752 y de SGT-1584 se presentan en la Fig. 13.

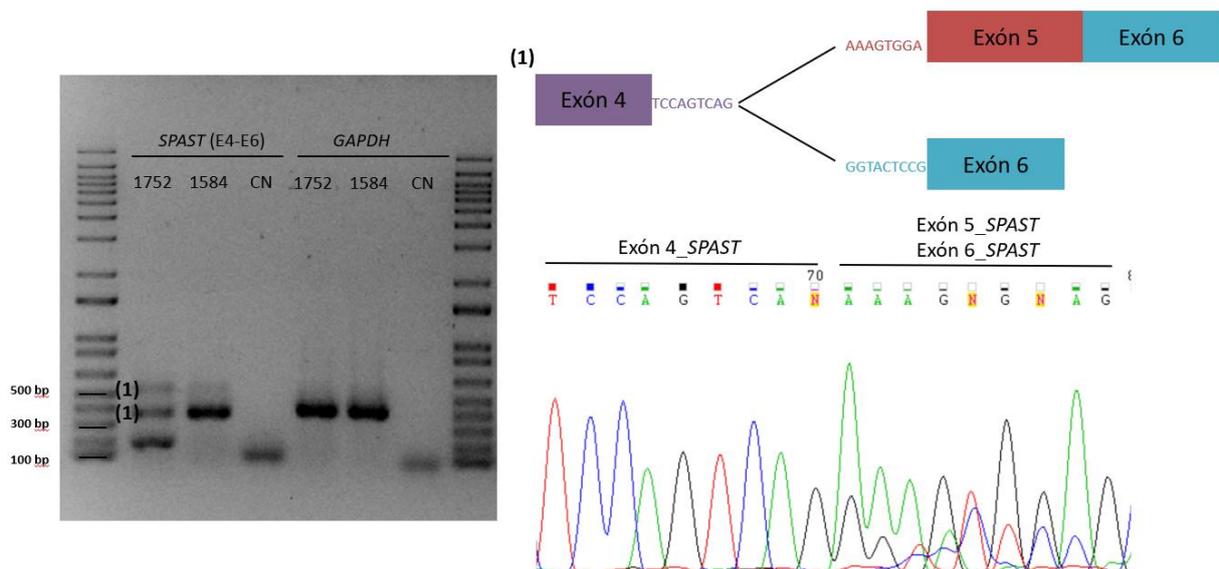
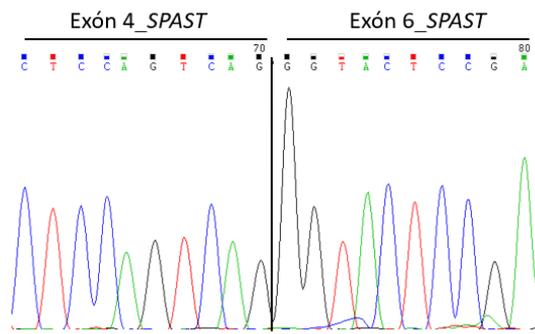


Fig. 12 Heterodúplex entre el amplicón que incluye los exones E4-E5-E6 y que incluye los exones E4-E6 en el probando SGT-1752. Este heterodúplex es el responsable de la aparición de una banda a 500 pb y otra a 350 pb, siendo ambas el transcrito canónico de *SPAST* que incluye todos los exones. Marcador de peso molecular empleado en la electroforesis: 1 Kb Plus DNA Ladder.

(a) SGT-1752 (Banda 162 pb) (E4-E6)



(b) SGT-1584 (E4-E6)

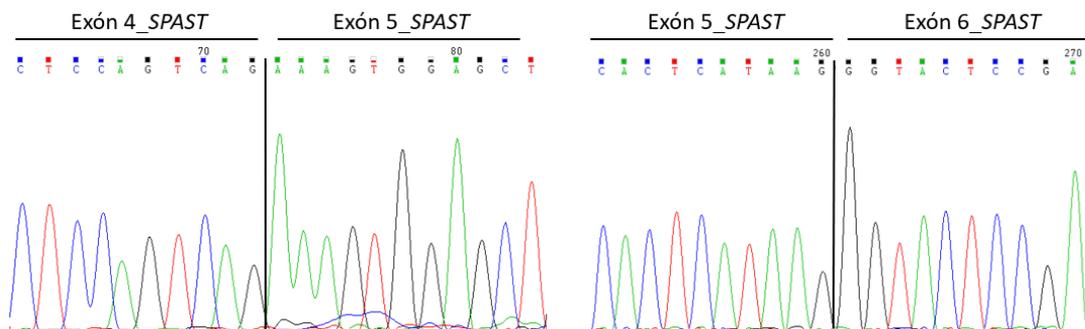


Fig. 13 (a) Secuenciación de la banda inferior (162 pb) de la amplificación del cDNA del probando SGT-1754 con los *primers* SPAST_cDNA_E4_F y SPAST_cDNA_E6_R. (b) Secuenciación del producto de PCR de la amplificación del cDNA de SGT-1584 con los *primers* SPAST_cDNA_E4_F y SPAST_cDNA_E6_R.

4.5. Análisis del efecto de la mutación c.-168G>T sobre la expresión de *FTL*

Para evaluar el efecto de la mutación c.-168G>T sobre la expresión del gen *FTL* se realizó un ensayo de luciferasa, en el que se comprobó la expresión de la proteína luciferasa modulada por el promotor de *FTL* con y sin la mutación. La secuencia correspondiente al promotor se estableció mediante la herramienta *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), escogiendo la zona determinada como promotor (E1960478/prom, en rojo **Fig. 14**) hasta el ATG en el exón 1 (en verde).

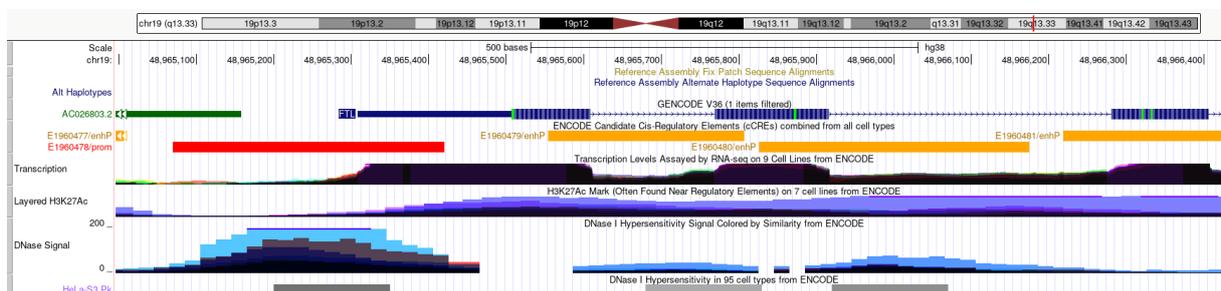


Fig. 14 Promotor de *FTL* descrito en la herramienta *UCSC Genome Browser* (en rojo).

La relación luciferasa:renilla permite normalizar los datos y comparar el nivel de expresión de la luciferasa entre las condiciones WT (c.-168G) y mutante (c.-168G>T). Para analizar correctamente el nivel de expresión es necesario comparar ambos resultados con la expresión de luciferasa observada en las células transfectadas con el pGL4 vacío. Se realizó la medición de 3 muestras independientes. Los

resultados mostraron que la actividad de la luciferasa se encuentra significativamente aumentada (**p-valor < 0,0002) en la muestra con el promotor *FTL* mutado (c.168G>T), respecto al WT (**Fig. 15**).

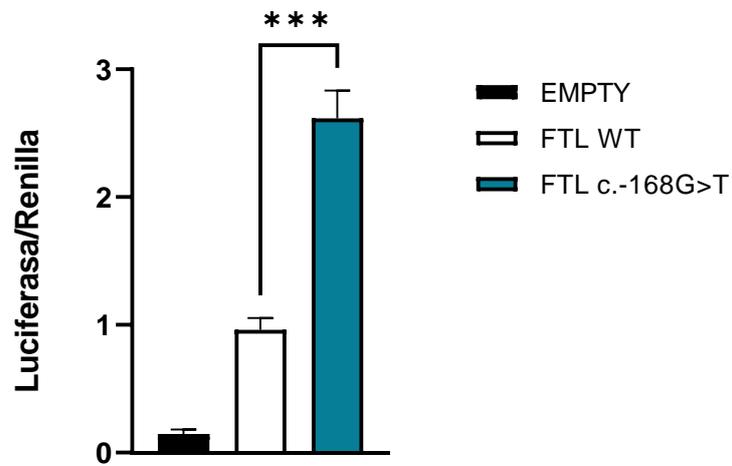


Fig. 15 Expresión Luciferasa/Renilla observada en las células transfectadas con las construcciones pGL4 vacío, pGL4 WT y pGL4 mutante. (**p-valor < 0,0002)

5. DISCUSIÓN

5.1. Análisis del panel de genes

En el presente TFG se han investigado las bases genéticas de 15 pacientes que cursan con ataxia o paraparesia espástica, para lo cual se ha empleado el panel de genes SureSelect Custom Constitutional Panel 17 Mb de Agilent Technologies. Definir la causa genética de enfermedades neurodegenerativas como las ataxias o las paraparesias espásticas resulta complejo debido a la enorme heterogeneidad genética con cientos de genes implicados que causan muy diversas formas clínicas. El uso de paneles de genes permite analizar un elevado número de genes relacionados con las patologías estudiadas de forma simultánea, reduciendo el tiempo y el coste necesarios para alcanzar el diagnóstico genético.

En este trabajo, se ha validado la presencia de 24 variantes en 14 de los 15 probandos. Se han identificado variantes previamente descritas como patológicas en heterocigosis en cuatro casos: SGT-1752, SGT-1754, SGT-1757 y MD-485. Todas estas variantes cursan con una herencia AD, por lo que estarían implicadas en la enfermedad. Las variantes *SPAST* c.870+3A>G y *KIF5A* c.3871C>G están asociadas a dos tipos de ADHSP, SPG4 (Lim et al., 2010) y SPG10 (Odgerel et al., 2019), respectivamente. SGT-1752 y SGT-1754 padecen paraparesia espástica y consecuentemente, estas mutaciones explicarían el cuadro clínico. La variante *KIF26B* c.5710G>A ha sido asociada con SCA (Nibbeling et al., 2017), una forma dominante de ataxia, e igualmente, justificaría el fenotipo observado en SGT-1757. Finalmente, en MD-485 se detectaron varias variantes de interés, en todos los casos en heterocigosis. MD-485 y su hija MD-514 son portadores de *FTL* c.-168G>T lo que explicaría parcialmente el cuadro clínico descrito en MD-485 y por completo en MD-514. Mutaciones en *FTL* conducen a hiperferritinemia con cataratas congénitas e hipointensidad en T2 en MRI cerebral (Ferro et al., 2018; Volkmann et al., 2019). Ambos cursan con estos síntomas, pero la ataxia cerebelosa y la atrofia cerebelosa detectada en MD-485 tendría una etiología diferente. Las variantes *SPG7* c.1529C>T y *TTR* c.416C>T también las presentaban tanto padre como hija por lo que se descartó su contribución al fenotipo clínico de MD-485. El padre también era portador de tres mutaciones en genes asociados con enfermedades con herencia autosómica recesiva causadas por mutaciones en *PANK2*, *PLA2G6* y *SETX*. Para estas tres formas, el análisis de grandes deleciones y/o duplicaciones resultó negativo, y, por tanto, no participan de los síntomas de MD-485. En conclusión, las bases genéticas determinantes de la ataxia cerebelosa y la atrofia cerebelosa de MD-485 no se han podido establecer.

Se han identificado dos cambios noveles que han sido predichos como probablemente deletéreos, por lo que se han clasificado como variantes posiblemente patogénicas. La primera de ellas es *ADCY5* c.914T>A, identificada en el probando MD-483. Mutaciones en el gen *ADCY5* han sido asociadas con discinesia familiar con mioquimia facial, la cual presenta una herencia AD. No obstante, este trastorno está caracterizado por un debut temprano (<19 años) (Chen et al., 2012), por lo que no concuerda con la aparición tardía de los síntomas observada en MD-483. La otra mutación clasificada como posiblemente deletérea es *CACNA1A* c.3599_3601delAGA, descrita en MD-487. El gen *CACNA1A* codifica la subunidad α_{1A} del canal de calcio dependiente de voltaje Cav2.1; mutaciones en este gen están asociadas con EA2 (Sintas et al., 2017), lo cual explicaría la clínica del paciente MD-487, ya que ha sido diagnosticado con ataxia episódica. El resto de cambios se clasificaron como variantes de significado incierto, requiriéndose de mayores evidencias para concluir sobre su patogenicidad.

La mayoría de los pacientes son casos esporádicos de ataxia o paraparesia espástica, por lo que resulta más complicado establecer un diagnóstico preciso debido a la ausencia de familiares que permitan estudiar la cosegregación de la mutación causal con la enfermedad. A pesar de ello, la tasa de éxito ha sido del 26,67% (4/15). Esto podría considerarse bajo, pero se encuentra dentro del rango establecido por Gorcenco *et al.* (2020) de entre 12,1-61,8%, identificado tras analizar 11 trabajos en los que se

empleaban paneles de genes para el diagnóstico genético de ataxias y paraparesias espásticas. La gran diferencia de rendimiento está relacionada principalmente con la selección de los genes incluidos en el panel y la cohorte objeto de estudio. Evidentemente, el diagnóstico será mayor si los genes que se estudian están implicados en la clínica de los pacientes, pese a la dificultad de establecer qué genes incluir dada la gran heterogeneidad genética de estas enfermedades y las limitaciones técnicas de un panel.

Una forma de mejorar el rendimiento diagnóstico sería ampliar el estudio genético de los pacientes sin resultado concluyente tras panel, con secuenciación del exoma. Esta estrategia de NGS es más compleja que el uso de paneles de genes, pero presenta una tasa diagnóstica del 40-60% cuando se trata de ataxias (Sun et al., 2019). Estos porcentajes son más razonables y son habituales para la gran mayoría de enfermedades mendelianas. De hecho, se considera que actualmente WES presenta un techo diagnóstico de ~50% (Cordeiro et al., 2018), si bien se le atribuye la mejor aproximación si se secuencia tanto padres como hijo afecto (Jin et al., 2018; Wright et al., 2018). Probablemente el *gap* diagnóstico se deba a la existencia de otros tipos de mutaciones (CNVs, repeticiones en tándem, cambios estructurales, etc) que WES no nos permite detectar.

5.2. Estudio de la mutación *SPAST* c.870+3A>G en el probando SGT-1752

La mutación *SPAST* c.870+3A>G detectada en el probando SGT-1752 se estudió mediante dos tipos de análisis, minigenes y transcritos, con el propósito de establecer si esta alteraba el *splicing*, en tanto que los predictores *in silico* mostraron que c.870+3A>G podría causar la pérdida de un sitio dador localizado en el final del exón 5 de *SPAST* con respecto al WT. Ambas aproximaciones experimentales mostraron variaciones asociadas a la mutación, si bien alguna no resultaba esperable lo que exigió un estudio en mayor profundidad.

En el estudio de minigenes, WT presentaba dos bandas en la construcción WT: una en la que se mantiene el exón 5, siendo, por tanto, lo esperado por la construcción WT, y otra en la que se produce el *skipping* del exón 5. En el caso de la construcción mutante, solo se amplifica una banda que corresponde con el transcrito truncado (SD6-SA2). La presencia del transcrito truncado en la construcción WT implicaría que el *spliceosome*, el complejo proteico encargado llevar a cabo el proceso de *splicing* (Anna & Monika, 2018), haya utilizado el sitio dador de SD6, en lugar del sitio WT del exón 5 de *SPAST*, resultando en el *skipping* del mismo. Según el predictor NNSPLICE, el sitio dador SD6 sería más fuerte que el sitio WT del exón 5 de *SPAST*. La generación del transcrito mutante en la construcción WT también se ha observado en un ensayo de minigenes realizado para investigar el efecto sobre el *splicing* de las mutaciones *CDH23* c.6049G>A y *MYO7A* c.470G>A (Aparisi et al., 2013). En ambos casos, al igual que en el presente trabajo, las mutaciones afectan a un sitio dador localizado al final del exón. Aunque no se aporta una razón por la que esto pueda ocurrir se comenta que los procesos de *splicing* observados en el ensayo de minigenes no reflejan necesariamente lo que ocurre a nivel fisiológico, pero que en cualquier caso evidencian que el *splicing* sería anómalo. Otro trabajo en el que se estudian mutaciones que afectan al *splicing* del gen *EYC* muestra que el ensayo de minigenes también puede estar influenciado por el tipo celular empleado, observándose diferencias en la longitud de los transcritos obtenidos cuando se transfectaban células HEK293T y células ARPE-19 (Westin et al., 2021). Por tanto, sería conveniente emplear un tipo celular distinto a las células HeLa para comprobar si el tipo celular es un factor que está afectando al *splicing* de la construcción WT.

En el análisis de transcritos de *SPAST* c.870+3A>G se confirmó en cDNA del paciente que este conserva todos los exones, y el transcrito truncado donde se produce el *skipping* del exón 5. Sin embargo, se detectó también una banda adicional que posteriormente se determinó era un artefacto, un heterodúplex

formado al hibridar los amplicones. Estas estructuras son relativamente frecuentes y una mejor optimización de las condiciones experimentales ayuda a que no se generen. Independientemente de estas, se concluyó que la mutación c.870+3A>G está asociada con la pérdida del exón 5 de *SPAST*. Este resultado coincide con lo observado por Lim et al. (2010) al analizar los transcritos de una familia coreana afectada por esta mutación. No obstante, a diferencia de lo observado en el presente trabajo, en el que el transcrito mutante se amplifica con una intensidad similar al transcrito canónico, Lim et al. (2010) observaron una amplificación significativamente inferior del transcrito en el que se producía el *skipping* del exón 5 en comparación con el transcrito canónico.

La pérdida del exón 5 resulta en un cambio de pauta de lectura que genera la aparición de varios codones de terminación prematuros, impidiendo la traducción de los dominios MTBD y AAA. Estos dominios son esenciales para la función fisiológica desempeñada por la espastina, proteína codificada por *SPAST*, por lo que la proteína resultante presentará una función anómala o no será funcional. La creación de codones de terminación prematuros también se ha observado en otras mutaciones que afectan a *SPAST*, como c.1004+3A>C, que produce el *skipping* del exón 6. Como consecuencia de la parada prematura de la traducción, los transcritos en los que se produce la pérdida del exón 6 serían degradados por el mecanismo NMD (*non-sense mediated decay*), que evita la síntesis de proteínas truncadas (Kawarai et al., 2017). Este proceso se ha descrito en otras enfermedades tales como parkinsonismo juvenil causado por mutaciones en *FBXO7* (Correa-Vela et al., 2020) o atrofia cerebelosa debida a mutaciones en *PRDX3* (Rebello et al., 2021). En su conjunto, los datos indicarían que en el paciente la espastina es afuncional.

5.3. Estudio de la mutación *FTL* c.-168G>T en el probando MD-485

Como se ha mencionado anteriormente, el cambio *FTL* c.-168G>T parece ser el responsable parcial de la clínica del probando MD-485. En el ensayo de luciferasa se observó que el promotor que incorpora esta mutación producía una expresión significativamente aumentada. Por tanto, la variante *FTL* c.-168G>T estaría produciendo una sobreexpresión del gen codificante de la cadena ligera de la ferritina. Esto coincide con lo observado en estudios anteriores en los que alteraciones en la región IRE (*iron responsive element*) del promotor del *FTL*, región en la que se localiza la mutación estudiada, se asocian con un aumento de los niveles séricos de ferritina. Los estudios en los que se analiza la mutación *FTL* c.-168G>T, también conocida como Paris2, coinciden en la presencia de unos niveles de ferritina superiores a los normales (Cosentino et al., 2016; Ferro et al., 2018; Volkmann et al., 2019).

La regulación de la expresión de *FTL* por parte de la región IRE se basa en que cuando los niveles de hierro intracelular son bajos, esta región forma una estructura en forma de *stem-loop* moderadamente estable a la que se unen las proteínas reguladoras del hierro (IRPs, *iron regulatory proteins*), impidiendo así la expresión del gen *FTL*. Por el contrario, cuando la concentración de hierro aumenta, este se une a las IRPs, liberando la región IRE y permitiendo la expresión de *FTL* (Volkmann et al., 2019). No obstante, la presencia de mutaciones en la región del IRE reducen significativamente la interacción entre esta región y las IRPs, lo cual conlleva una desrepresión de la expresión de *FTL* (Luscieti et al., 2013).

La mutación *FTL* c.-168G>T se encuentra en una región específica de la *stem-loop* del promotor de *FTL*, conocida como *C-bulge*. Las mutaciones detectadas en esta región están asociadas con la forma más severa del síndrome hereditario de hiperferritinemia y cataratas (HHCS, *hereditary hyperferritinaemia-cataract syndrome*), así como con los niveles séricos más alto de ferritina (Volkmann et al., 2019). Sería conveniente realizar una medición de los niveles séricos de la ferritina en el paciente MD-485 para corroborar los posibles efectos asociados a la mutación estudiada.

6. CONCLUSIONES

1. El uso de paneles de genes constituye una herramienta útil en el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas como las ataxias o las paraparesias espásticas, caracterizadas por una gran heterogeneidad genética, pues permiten analizar de forma simultánea un elevado número de genes. En el presente TFG se ha logrado un diagnóstico definitivo en cuatro pacientes (26,67%) de los 15 probandos estudiados.
2. En 10 de los 15 probandos se han detectado variantes candidatas clasificadas como VUS. Para determinar su causalidad sería preciso la realización de estudios funcionales que esclarecieran la patogenicidad de las mismas.
3. En el probando restante no se pudo encontrar ninguna variante candidata que explicase su clínica por lo que sería necesario ampliar el estudio genético empleando técnicas diferentes al panel de genes como la secuenciación de exoma.
4. La validación de los cambios candidatos mediante secuenciación Sanger es esencial para evitar errores en el diagnóstico, ya que las variantes detectadas en el panel podrían ser artefactos generados durante el procesamiento de los datos de NGS. Este proceso de validación ha permitido comprobar que el cambio *ATAD3A* c.715G>A realmente identificado en el probando MD-484 realmente era un artefacto de la técnica.
5. La disponibilidad de muestra de la hija afecta MD-514 del probando MD-485 ha permitido confirmar que la variante en *FTL* c.-168G>T causa el cuadro caracterizado por hiperferritinemia con cataratas congénitas e hipointensidad en T2 en MRI cerebral observado en ambos, y ha posibilitado descartar que los cambios *SPG7* c.1529C>T y *TTR* c.416C>T pudieran estar implicados en la ataxia cerebelosa y atrofia cerebelosa que presenta MD-485.
6. Se ha comprobado mediante el estudio de minigenes y el análisis de transcritos que la mutación c.870+3A>G en el gen *SPAST*, identificada en el probando SGT-1752, conduce al *splicing* anómalo de este gen al causar la pérdida del exón 5, que origina la aparición de codones de terminación prematuros.
7. El ensayo de luciferasa ha mostrado que la mutación *FTL* c.-168G>T parece inducir una sobreexpresión del gen que codifica la cadena ligera de la ferritina, alterando la expresión correcta del gen.

7. REFERENCIAS

- ALLISON, R.; EDGAR, J. R. & REID, E. (2019). Spastin MIT domain disease-associated mutations disrupt lysosomal function. *Frontiers in neuroscience*, 13, 1179.
- ANNA, A. & MONIKA, G. (2018). Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *Journal of applied genetics*, 59(3), 253-268.
- APARISI, M. J.; GARCÍA-GARCÍA, G.; ALLER, E.; SEQUEDO, M. D.; DE LA CÁMARA, C. M. F.; RODRIGO, R.; ARMENGOT, M.; CORTIJO, J.; MILARA, J.; DÍAZ-LLOPIS, M.; JAIJO, T. & MILLÁN, J. M. (2013). Study of USH1 splicing variants through minigenes and transcript analysis from nasal epithelial cells. *PLoS One*, 8(2)
- BEAUDIN, M.; MATILLA-DUEÑAS, A.; SOONG, B. W.; PEDROSO, J. L.; BARSOTTINI, O. G.; MITOMA, H.; TSUJI, S.; SCHMAHMANN, J. D.; MANTO, M.; ROULEAU, G. A.; KLEIN, C. & DUPRE, N. (2019). The classification of autosomal recessive cerebellar ataxias: a consensus statement from the society for research on the cerebellum and ataxias task force. *The Cerebellum*, 18(6): 1098-1125.
- BIS-BREWER, D. M. & ZÜCHNER, S. (2018). Perspectives on the genomics of HSP beyond Mendelian inheritance. *Frontiers in neurology*, 9, 958.
- BRUGMAN, F.; SCHEFFER, H.; WOKKE, J. H. J.; NILLESEN, W. M.; DE VISSER, M.; ARONICA, E.; VELDINK, J. H. & VAN DEN BERG, L. H. (2008). Paraplegin mutations in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes. *Neurology*, 71(19), 1500-1505.
- CHEN, Y. Z.; MATSUSHITA, M. M.; ROBERTSON, P.; RIEDER, M.; GIRIRAJAN, S.; ANTONACCI, F.; LIPE, H.; EICHLER, E. E.; NICKERSON, D. A.; BIRD, T. D. & RASKIND, W. H. (2012). Autosomal dominant familial dyskinesia and facial myokymia: single exome sequencing identifies a mutation in adenylyl cyclase 5. *Archives of neurology*, 69(5), 630-635.
- CORDEIRO, D.; BULLIVANT, G.; SIRIWARDENA, K.; EVANS, A.; KOBAYASHI, J.; COHN, R. D. & MERCIMEK-ANDREWS, S. (2018). Genetic landscape of pediatric movement disorders and management implications. *Neurology Genetics*, 4(5).
- CORREA-VELA, M.; LUPO, V.; MONTPEYÓ, M.; SANCHO, P.; MARCÉ-GRAU, A.; HERNÁNDEZ-VARA, J.; J.; DARLING, A.; JENKINS, A.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S.; TELLO, C.; RAMÍREZ-JIMÉNEZ, L.; PÉREZ, B.; SÁNCHEZ-MONTÁÑEZ, Á.; MACAYA, A.; SOBRIDO, M. J.; MARTINEZ-VICENTE, M.; PÉREZ-DUEÑAS, B.; & ESPINÓS, C. (2020). Impaired proteasome activity and neurodegeneration with brain iron accumulation in FBXO7 defect. *Annals of clinical and translational neurology*, 7(8), 1436-1442.
- COSENTINO, I.; ZERI, F.; SWANN, P. G.; MAJORE, S.; RADIO, F. C.; PALUMBO, P.; GRAMMATICO, P. & PETITTI, V. (2016). Hyperferritinemia-cataract syndrome: Long-term ophthalmic observations in an Italian family. *Ophthalmic genetics*, 37(3), 318-322.
- D'AMORE, A.; TESSA, A.; CASALI, C.; DOTTI, M. T.; FILLA, A.; SILVESTRI, G.; ANTENORA, A.; ASTREA, G.; BARGHIGIANI, M.; BATTINI, R.; BATTISTI, C.; BRUNO, I.; CEREDA, C.; DATO, C.; DI IORIO, G.; DONADIO, V.; FELICORI, M.; FINI, N.; FIORILLO, C.; ... & SANTORELLI, F. M. (2018). Next generation molecular diagnosis of hereditary spastic paraplegias: an Italian cross-sectional study. *Frontiers in neurology*, 9, 981.
- DE SOUZA, P. V. S.; DE REZENDE PINTO, W. B. V.; DE REZENDE BATISTELLA, G. N.; BORTHOLIN, T. & OLIVEIRA, A. S. B. (2017). Hereditary spastic paraplegia: clinical and genetic hallmarks. *The Cerebellum*, 16(2): 525-551.

- DI MEO, I. & TIRANTI, V. (2018). Classification and molecular pathogenesis of NBIA syndromes. *European journal of paediatric neurology*, 22(2): 272-284.
- ERFANIAN OMIDVAR, M.; TORKAMANDI, S.; REZAEI, S.; ALIPOOR, B.; OMRANI, M. D.; DARVISH, H. & GHAEDI, H. (2021). Genotype–phenotype associations in hereditary spastic paraplegia: a systematic review and meta-analysis on 13,570 patients. *Journal of neurology*, 268: 2065–2082
- FERRO, E.; CAPRA, A. P.; ZIRILLI, G.; MEDURI, A.; URSO, M.; BRIUGLIA, S.; & LA ROSA, M. A. (2018). FTL c.-168G> C mutation in hereditary hyperferritinemia cataract syndrome: a new Italian family. *Pediatric and Developmental Pathology*, 21(5), 456-460.
- GAN, L.; COOKSON, M. R.; PETRUCCELLI, L. & LA SPADA, A. R. (2018). Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nature neuroscience*, 21(10): 1300-1309.
- GORCENCO, S.; ILINCA, A.; ALMASOUDI, W.; KAFANTARI, E.; LINDGREN, A. G. & PUSCHMANN, A. (2020). New generation genetic testing entering the clinic. *Parkinsonism & related disorders*, 73: 72-84.
- HARRISON, H. H.; GORDON, E. D.; NICHOLS, W. C.; & BENSON, M. D. (1991). Biochemical and clinical characterization of prealbumin CHICAGO: An apparently benign variant of serum prealbumin (transthyretin) discovered with high-resolution two-dimensional electrophoresis. *American journal of medical genetics*, 39(4), 442-452.
- HINAREJOS, I.; MACHUCA-ARELLANO, C.; SANCHO, P. & ESPINÓS, C. (2020). Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress and Neuroinflammation in Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation (NBIA). *Antioxidants*, 9(10), 1020.
- JAYADEV, S. & BIRD, T. D. (2013). Hereditary ataxias: overview. *Genetics in Medicine*, 15(9): 673-683.
- JEN, J. C. & WAN, J. (2018). Episodic ataxias, en: *Handbook of clinical neurology*, 3^a Ed. (Vol. 155). Elsevier, 205-215.
- JIN, Z. B.; LI, Z.; LIU, Z.; JIANG, Y.; CAI, X. B.; & WU, J. (2018). Identification of de novo germline mutations and causal genes for sporadic diseases using trio-based whole-exome/genome sequencing. *Biological Reviews*, 93(2), 1014-1031.
- KAWARAI, T.; MONTECCHIANI, C.; MIYAMOTO, R.; GAUDIELLO, F.; CALTAGIRONE, C.; IZUMI, Y.; KAJI, R. & ORLACCHIO, A. (2017). Spastic paraplegia type 4: A novel SPAST splice site donor mutation and expansion of the phenotype variability. *Journal of the neurological sciences*, 380, 92-97.
- KLOCKGETHER, T.; MARIOTTI, C. & PAULSON, H. L. (2019). Spinocerebellar ataxia. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1): 1-21.
- LIM, J. S.; SUNG, J. J.; HONG, Y. H.; PARK, S. S.; PARK, K. S.; CHA, J. I.; LEE, J. Y. & LEE, K. W. (2010). A novel splicing mutation (c. 870+ 3A> G) in SPG4 in a Korean family with hereditary spastic paraplegia. *Journal of the neurological sciences*, 290(1-2): 186-189.
- LUPO, V.; PASCUAL-PASCUAL, S. I.; SANCHO, P.; CALPENA, E.; GUTIÉRREZ-MOLINA, M.; MATEO-MARTÍNEZ, G.; ESPINÓS, C. & ARRIOLA-PEREDA, G. (2015). Complexity of the hereditary motor and sensory neuropathies: clinical and cellular characterization of the MPZ p. D90E mutation. *Journal of child neurology*, 30(11), 1544-1548.
- LUSCIETI, S.; TOLLE, G.; ARANDA, J.; CAMPOS, C. B.; RISSE, F.; MORÁN, É.; MUCKENTHALER, M. U. & SÁNCHEZ, M. (2013). Novel mutations in the ferritin-L iron-responsive element that only mildly impair

IRP binding cause hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*, 8(1), 1-10.

MANCINI, C.; GIORGIO, E.; RUBEGNI, A.; PRADOTTO, L.; BAGNOLI, S.; RUBINO, E.; PRONTERA, P.; CAVALIERI, S.; DI GREGORIO, E.; FERRERO, M.; POZZI, E.; RIBERI, E.; FERRERO, P.; NIGRO, P.; MAURO, A.; ZIBETTI, M.; TESSA, A.; BARGHIGIANI, M.; ANTENORA, A.; ... & BRUSCO, A. (2019). Prevalence and phenotype of the c. 1529C> T SPG 7 variant in adult-onset cerebellar ataxia in Italy. *European journal of neurology*, 26(1), 80-86.

MARSDEN, J. F. (2018). Cerebellar ataxia, en: *Handbook of clinical neurology*, 3^a Ed. (Vol. 159). Elsevier, 261-281.

NIBBELING, E. A.; DUARRI, A.; VERSCHUUREN-BEMELMANS, C. C.; FOKKENS, M. R.; KARJALAINEN, J. M.; SMEETS, C. J.; DE BOER-BERGSMA, J. J.; VAN DER VRIES, G.; DOOIJES, D.; BAMPI, G. B.; VAN DIEMEN, C.; BRUNT, E.; IPPEL, E.; KREMER, B.; VLAK, M.; ADIR, N.; WIJMENGA, C.; VAN DE WARRENBURG, B. P. C.; FRANKE, L.; ... & VERBEEK, D. S. (2017). Exome sequencing and network analysis identifies shared mechanisms underlying spinocerebellar ataxia. *Brain*, 140(11), 2860-2878.

ODGEREL, Z.; SONTI, S.; HERNANDEZ, N.; PARK, J.; OTTMAN, R.; LOUIS, E. D.; & CLARK, L. N. (2019). Whole genome sequencing and rare variant analysis in essential tremor families. *PloS one*, 14(8).

PARODI, L.; COARELLI, G.; STEVANIN, G.; BRICE, A. & DURR, A. (2018). Hereditary ataxias and paraparesias: clinical and genetic update. *Current opinion in neurology*, 31(4): 462-471.

REBELO, A. P.; EIDHOF, I.; CINTRA, V. P.; GUILLOT-NOEL, L.; PEREIRA, C. V.; TIMMANN, D.; TRASCHÜTZ, A.; SCHÖLS, L.; COARELLI, G.; DURR, A.; ANHEIM, M.; TRANCHANT, C.; VAN DE WARRENBURG, B.; GUISSART, C.; KOENIG, M.; HOWELL, J.; MORAES, C. T.; SCHENCK, A.; STEVANIN, G.; ... & PREPARE NETWORK. (2021). Biallelic loss-of-function variations in PRDX3 cause cerebellar ataxia. *Brain*, 144(5), 1467-1481.

REETZ, K.; DOGAN, I.; HILGERS, R. D.; GIUNTI, P.; PARKINSON, M. H.; MARIOTTI, C.; NANETTI, L.; DURR, A.; EWENCZYK, C.; BOESCH, S.; NACHBAUER, W.; KLOPSTOCK, T.; STENDEL, C.; RODRÍGUEZ DE RIVERA GARRIDO, F. J.; RUMMEY, C.; SCHÖLS, L.; HAYER, S. N.; KLOCKGETHER, T.; GIORDANO, I.; ... & VASCO, G. (2021). Progression characteristics of the European Friedreich's Ataxia Consortium for Translational Studies (EFACTS): a 4-year cohort study. *The Lancet Neurology*, 20(5), 362-372.

REXACH, J.; LEE, H.; MARTINEZ-AGOSTO, J. A.; NÉMETH, A. H. & FOGEL, B. L. (2019). Clinical application of next-generation sequencing to the practice of neurology. *The Lancet Neurology*, 18(5), 492-503.

RICHARDS, S.; AZIZ, N.; BALE, S.; BICK, D.; DAS, S.; GASTIER-FOSTER, J.; GRODY, W. W.; HEGDE, M.; LYON, E.; SPECTOR, E.; VOELKERDING, K. & REHM, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*, 17(5): 405-423.

SÁNCHEZ-MONTEAGUDO, A.; ÁLVAREZ-SAUCO, M.; SASTRE, I.; MARTÍNEZ-TORRES, I.; LUPO, V.; BERENQUER, M. & ESPINÓS, C. (2020). Genetics of Wilson disease and Wilson-like phenotype in a clinical series from eastern Spain. *Clinical genetics*, 97(5), 758-763.

SANCHO, P.; SÁNCHEZ-MONTEAGUDO, A.; COLLADO, A.; MARCO-MARÍN, C.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, C.; CAMACHO, A.; KNECHT, E.; ESPINÓS, C. & LUPO, V. (2017). A newly distal hereditary motor neuropathy caused by a rare AIFM1 mutation. *Neurogenetics*, 18(4), 245-250.

- SAPUTRA, L. & KUMAR, K. R. (2021). Challenges and Controversies in the Genetic Diagnosis of Hereditary Spastic Paraplegia. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 21(4): 1-15.
- SHRIBMAN, S.; REID, E.; CROSBY, A. H.; HOULDEN, H. & WARNER, T. T. (2019). Hereditary spastic paraplegia: from diagnosis to emerging therapeutic approaches. *The Lancet Neurology*, 18(12), 1136-1146.
- SINTAS, C.; CARREÑO, O.; FERNÁNDEZ-CASTILLO, N.; COROMINAS, R.; VILA-PUEYO, M.; TOMA, C.; CUENCA-LEÓN, E.; BARROETA, I.; ROIG, C.; VOLPINI, V.; MACAYA, A. & CORMAND, B. (2017). Mutation spectrum in the CACNA1A gene in 49 patients with episodic ataxia. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
- SOLOWSKA, J. M. & BAAS, P. W. (2015). Hereditary spastic paraplegia SPG4: what is known and not known about the disease. *Brain*, 138(9): 2471-2484.
- SOLOWSKA, J. M.; RAO, A. N. & BAAS, P. W. (2017). Truncating mutations of SPAST associated with hereditary spastic paraplegia indicate greater accumulation and toxicity of the M1 isoform of spastin. *Molecular biology of the cell*, 28(13), 1728-1737.
- SOTO, C. & PRITZKOW, S. (2018). Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, 21(10), 1332-1340.
- SULLIVAN, R.; YAU, W. Y.; O'CONNOR, E. & HOULDEN, H. (2019). Spinocerebellar ataxia: an update. *Journal of neurology*, 266(2): 533-544.
- SUN, M.; JOHNSON, A. K.; NELAKUDITI, V.; GUIDUGLI, L.; FISCHER, D.; ARNDT, K.; MA, L.; SANDFORD, E.; SHAKKOTTAI, V.; BOYCOTT, K.; CHARDON, J. W.; LI, Z.; DEL GAUDIO, D.; BURMEISTER, M.; GOMEZ, C. M.; WAGGONER, D. J. & DAS, S. (2019). Targeted exome analysis identifies the genetic basis of disease in over 50% of patients with a wide range of ataxia-related phenotypes. *Genetics in Medicine*, 21(1): 195-206.
- SYNOFZIK, M. & SCHÜLE, R. (2017). Overcoming the divide between ataxias and spastic paraplegias: shared phenotypes, genes, and pathways. *Movement Disorders*, 32(3): 332-345.
- THOMPSON, R.; SPENDIFF, S.; ROOS, A.; BOURQUE, P. R.; CHARDON, J. W.; KIRSCHNER, J.; HORVATH, R. & LOCHMÜLLER, H. (2020). Advances in the diagnosis of inherited neuromuscular diseases and implications for therapy development. *The Lancet Neurology*, 19(6): 522-532.
- VOLKMANN, M.; RICHTER, R.; HERRMANN, T.; HENTZE, S.; HÖR, M.; HASCHE, H.; SELLE, B.; STREMMEL, W. & GEHRKE, S. G. (2019). Hereditary hyperferritinaemia-cataract syndrome (HHCS) - an underestimated condition: ferritin light chain variant spectrum in German families. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 57(12): 1837-1845
- WESTIN, I. M.; JONSSON, F.; ÖSTERMAN, L.; HOLMBERG, M.; BURSTEDT, M. & GOLOVLEVA, I. (2020). EYS Mutations and Implementation of Minigene Assay for Variant Classification in EYS-Associated Retinitis Pigmentosa in Northern Sweden. *Scientific Reports*, 11: 7696
- WRIGHT, C. F.; FITZPATRICK, D. R. & FIRTH, H. V. (2018). Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. *Nature Reviews Genetics*, 19(5), 253-268.

Apéndice I

Tabla Suplementaria 1. Cebadores empleados para amplificar las regiones donde se encuentran los cambios candidatos para su validación

Probando	Gen	Cebadores	Secuencia 5' -> 3'	Temperatura de hibridación	Tamaño Amplicón
SGT-1752	SPAST	SPAST_E5_F*	CTTGTCTTTATGTTTCAGCTACAATT	59°C	461pb
		SPAST_E5_R*	AGGCGGAGGTTGCAAT		
SGT-1753	KIF1A	KIF1A_E37_F	CCACCAGGTGTGAGCCTCT	59°C	375pb
		KIF1A_E37_R	CCAGGTCCAAGGCTCTCCT		
	SLC6A19	SLC6A19_E11_F	GCTGGTAGCAGCAGTGAC	59°C	402pb
		SLC6A19_E11_R	GGTGTGACACATTGGTGTC		
SGT-1754	KIF5A	KIF5A_E25_F	GCAACTCAGTTCAACCCCA	60°C	381pb
		KIF5A_E25_R	CTAATCATAGGCATGAAGTTGAG		
	BSCL2	BSCL2_E11/12_F	CTCCTTCAGTGTCTGGGTC	57°C	489pb
		BSCL2_E11/12_R	GAACCCATTTTCAGAGTCAAGG		
SGT-1755	COL6A3	COL6A3_E10_F	AGGTTGATTAGGATTATGGTGC	57°C	751pb
		COL6A3_E10_R	GTTGATGTCACACTCTGTAGTCAT		
SGT-1756	SAMD9L	SAMD9L_E5_F	CATTAATGGAAGCTTTACAGAAT	55°C	472pb
		SAMD9L_E5_R	GTGAGCTGAAGAATCTGGATAG		
SGT-1757	KIF26B_1	KIF26B_E12_F	GCCCTACAGCAAGATCACGCC	60°C	412pb
		KIF26B_E12_R	AGTTCGCCACCTGCAAGGA		
	SLC33A1	SLC33A1_E5_F	ATACCATGAAAATTAATTTTCAGGT	55°C	504pb
		SLC33A1_E5_R	TGCTGATTTGAATGATTATAACC		
MD-483	ADCY5	ADCY5_E1_F2	TGTACCAGCGCTACTTCTTC	59°C	342pb
		ADCY5_E1_R2	GCAGCGTGTAGATGGTGTAG		
MD-484	KIF26B_2	KIF26B_E12_F2	AACATCCAAGAGCCGGAG	61°C	406pb
		KIF26B_E12_R2	GAAGGCTGCTGGACTTGAC		
	ATAD3A	ATAD3A_E6_F	CTTAGCCTGTCAGCAGTGTG	61°C	563pb
		ATAD3A_E6_R	CAGGAAGGACACGAAGATC		
MD-485	SPG7	SPG/E11-d*	GTTGGCCAGACTGCCCACTTCAG	65°C	626pb
		SPG/E11-R*	ACACATCAGCTCCCTCCCAGGCTT		
	TTR	TTR/E4-d*	ATGTGTGTCATCTGTCACG	55°C	224pb
		TTR/E4-r*	TTACATGAAATCCCATCCC		
	SETX	SETX/E4-d*	GAAAAGGCTTTCTAGGTCG	55°C	379pb
		SETX/E4-r*	AATTTGCAATATAGATAAGCC		
	FTL	FTL_E1_F	GCAGATTGGCCGCTAG	60°C	429pb
		FTL_E1_R	GCAGCTGGAGGAAATTAGG		
MD-486	MME	MME/E2-D*	CCACATTAAGCATTTGGACA	58°C	315pb
		MME/E2-R*	AGATGGTAAAAGCATGGAGG		
	KMT2D	KMT2D_E28_F	GACTCCTGCAGCACTTC	61°C	463pb
		KMT2D_E28_R	AGACTTGGCAGGCGACTC		
MD-487	FAT1	FAT1_E10_F1	AATATCTTGTTACAGTGGTTGC	57°C	383pb
		FAT1_E10_R1	GATGTCGTCTACTATGATGTCC		
		FAT1_E10_F2	GGTCACGTTACTTACCATATTG	57°C	467pb
		FAT1_E10_R2	GACCCATTATCCACAGCTC		
	CACNA1A	CACNA1A_E21_F	GCTATACAAGGGTTCAGTGATG	59°C	453pb
		CACNA1A_E21_R	TGACTTACGGAAGGAGCATC		
ATXN7	ATXN7_E7_F	TTCTCACTTCCTCTGTGA	57°C	378pb	

		ATXN7_E7_R	GGAATTCTAGATTGCAGTTGAT		
MD-502	KIF5A	KIF5A_E20_F	AGGAGACACATGGAATAACG	59°C	542pb
		KIF5A_E20_R2	AACCTCCTTCCATACTGGTG		
MD-504	SYNE1	SYNE1_E129_F	TGTGTGAAGTTGCATTATCCAG	62°C	477pb
		SYNE1_E129_R	GCCACCTTCTGTACCTGTGA		
		SYNE1_E72_D	AACTACCCTGTGAGTTGCAC	57°C	421pb
		SYNE1_E72_R	CGGACTAATACAGACCTGATTC		
MD-505	TENM4	TENM4_E28_F	CTGGAGACGATGGTTATGC	59°C	411pb
		TENM4_E28_R	CTCTTGAGTGCACCTGTTGG		
	CCDC88C	CCDC88C_E15_F	AGGTAGGACAGCCGTTCAAG	59°C	509pb
		CCDC88C_E15_R	CACGTTCTGCAAGGTGTCC		

*Estos cebadores estaban en la base de datos del Laboratorio de Enfermedades Raras Neurodegenerativas del CIPF

Tabla Suplementaria 2. Programa general de PCR empleado para la amplificación de los genes candidatos

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	5min	1
Desnaturalización	95°C	30s	35
Hibridación	*	30s	
Extensión	72°C	30s**	
Extensión	72°C	7min	1
Reposo	4°C	∞	1

*La temperatura de hibridación depende de los *primers* empleados. **En el caso de *SPG7* y *COL6A3* la extensión fue de 40s y 45s, respectivamente.

Tabla Suplementaria 3. Cantidades estándar de los reactivos de la mezcla (25 µL) para PCR por muestra

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Empresa suministradora
H ₂ O RNasa/DNasa Free	-	-	19,5µL	Invitrogen
Standard Reaction Buffer with MgCl ₂	10x	1x	2,5µL	Thermo Fisher Scientific
dNTPs	20mM	0,4mM	0,5µL	IBIANLab Technologies
<i>Primer</i> directo	10µM	0,2mM	0,5µL	Integrated DNA Technologies
<i>Primer</i> reverso	10µM	0,2mM	0,5µL	Integrated DNA Technologies
Taq DNA polymerase	1U/µL	0,02U/µL	0,5µL	Thermo Fisher Scientific
DNA**	50ng/µL	2ng/µL	1 µL	-

*En el caso de *KIF26B_1* y *ADCY5*, se añadieron 1µL MgCl₂ (25mM) (Thermo Fisher Scientific) y 1,25µL DMSO (Sigma-Aldrich), siendo el volumen de agua añadido 17,25µL. En el caso de *SPG7* y *CACNA1A*, se añadió 1,25µL DMSO, siendo el volumen de agua añadido 18,25µL. **En el caso de las PCR de colonia se trata de picar una colonia y depositarla en la mezcla.

Apéndice II

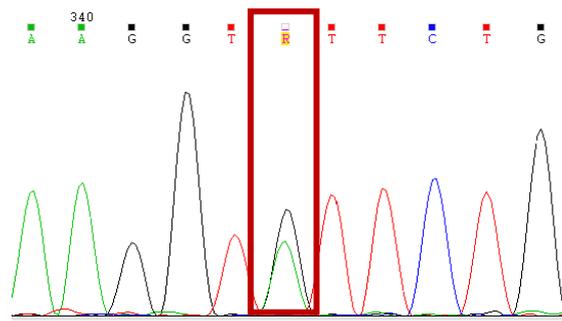


Fig. Suplementaria 1. Electroferograma de la validación del cambio *SPAST* c.870+3A>G en el probando SGT-1752 en heterocigosis.

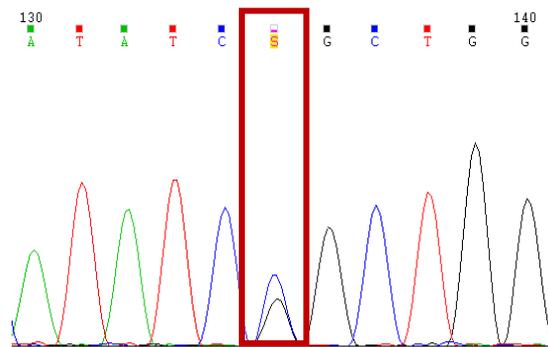


Fig. Suplementaria 2. Electroferograma de la validación del cambio *KIF1A* c.3871C>G en el probando SGT-1753 en heterocigosis.

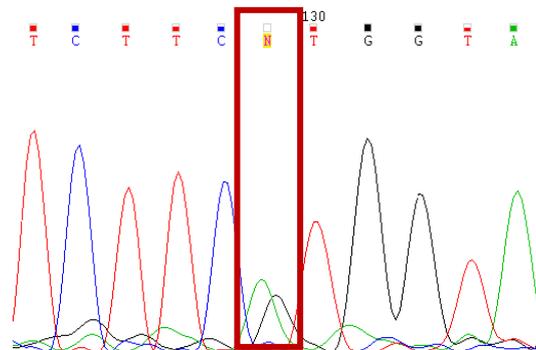


Fig. Suplementaria 3. Electroferograma de la validación del cambio *SLC6A19* c.1651G>A en el probando SGT-1753 en heterocigosis.

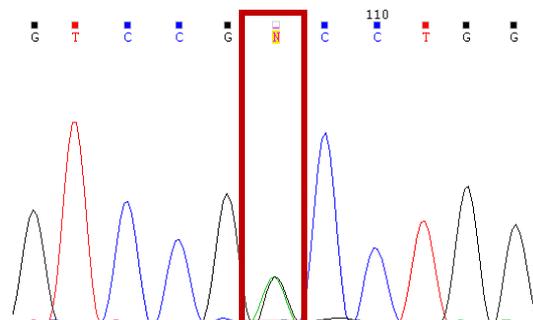


Fig. Suplementaria 4. Electroferograma de la validación del cambio *KIF5A* c.2769G>A en el probando SGT-1754 en heterocigosis.

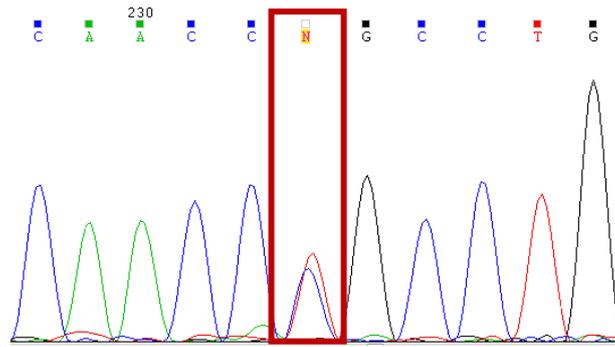


Fig. Suplementaria 5. Electroferograma de la validación del cambio *BSCL2* c.1280T>C en el probando SGT-1754 en heterocigosis.

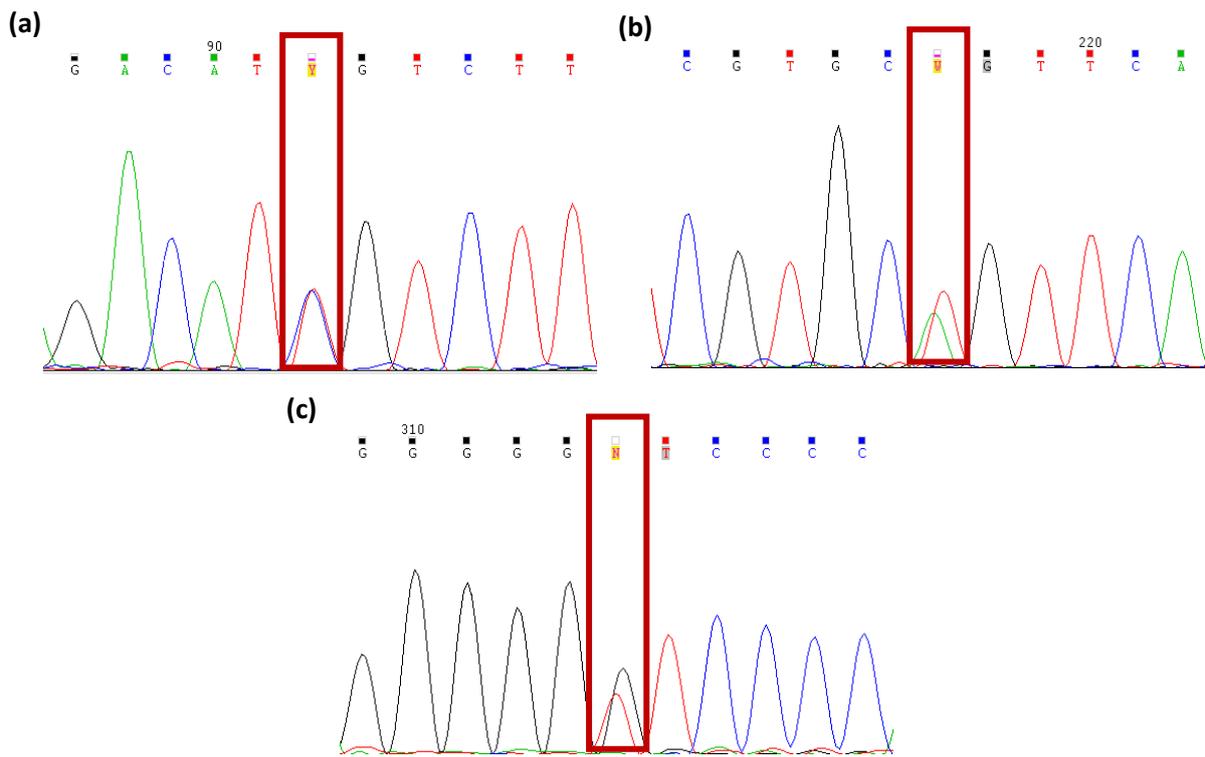


Fig. Suplementaria 6. Electroferograma de la validación los cambios (a) c.4311T>C, (b) c.4436A>T y (c) c.4533G>T en el gen *COL6A3* en el probando SGT-1755, todos ellos en heterocigosis.

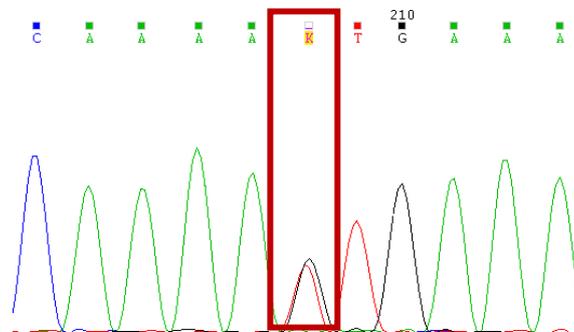


Fig. Suplementaria 7. Electroferograma de la validación del cambio *SAMD9L* c.3386G>T en el probando SGT-1756 en heterocigosis.

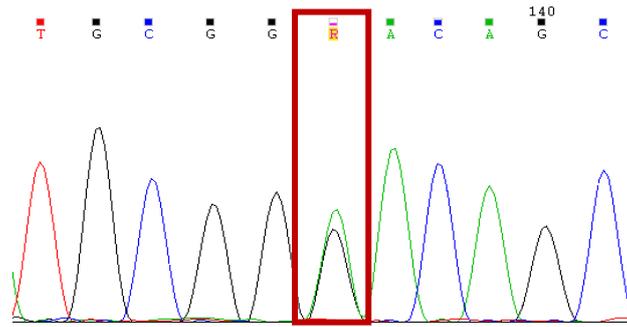


Fig. Suplementaria 8. Electroferograma de la validación del cambio *KIF26B* c.571G>A en el probando SGT-1757 en heterocigosis.

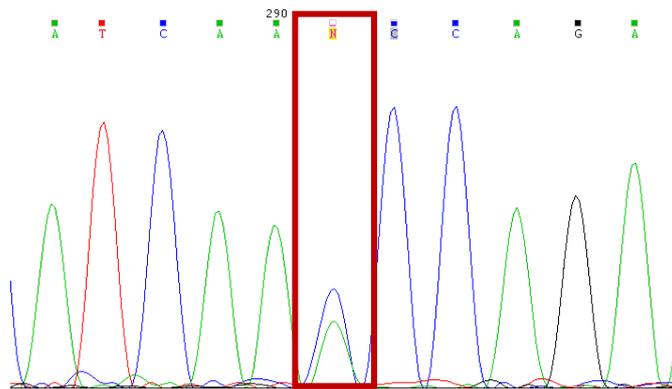


Fig. Suplementaria 9. Electroferograma de la validación del cambio *SLC33A1* c.1451A>C en el probando SGT-1757 en heterocigosis.

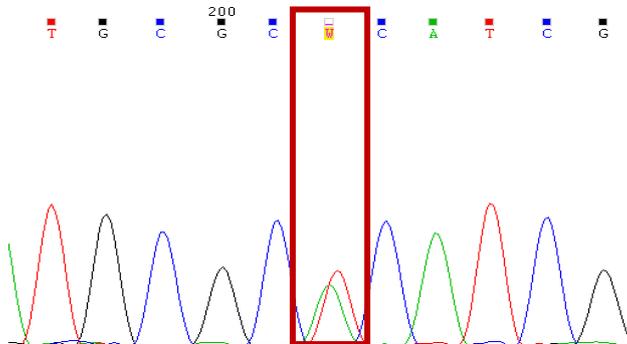


Fig. Suplementaria 10. Electroferograma de la validación del cambio *ADCY5* c.914T>A en el probando MD-483 en heterocigosis.

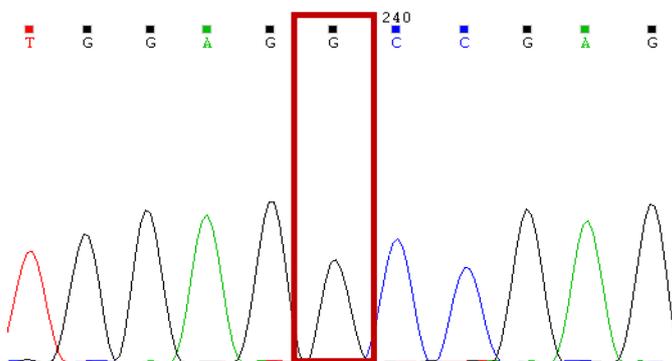


Fig. Suplementaria 11. El electroferograma muestra que el cambio el cambio *ATAD3A* c.715G>A no está en el probando MD-484, tratándose, por tanto, de un artefacto de la técnica de secuenciación.

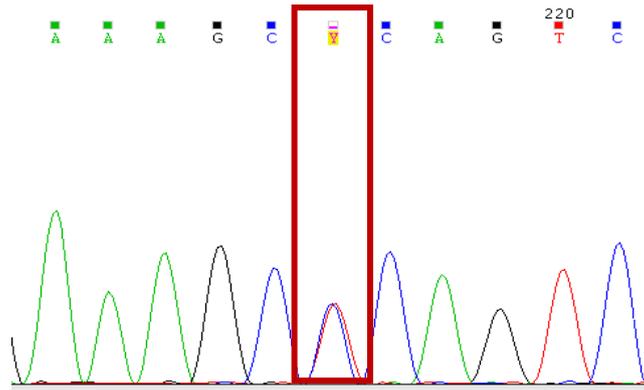


Fig. Suplementaria 12. Electroferograma de la validación del cambio *KIF26B* c.4451C>T en el probando MD-484 en heterocigosis.

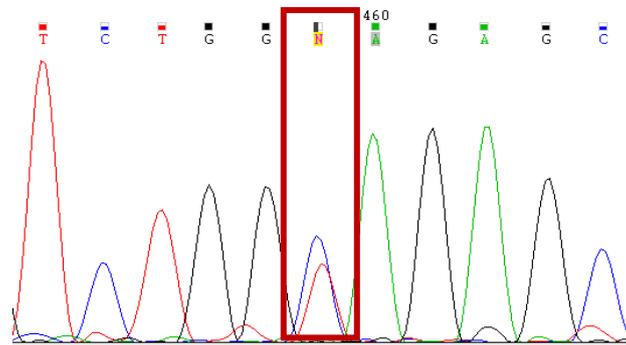


Fig. Suplementaria 13. Electroferograma de la validación del cambio *SPG7* c.1529C>T en el probando MD-485 en heterocigosis.

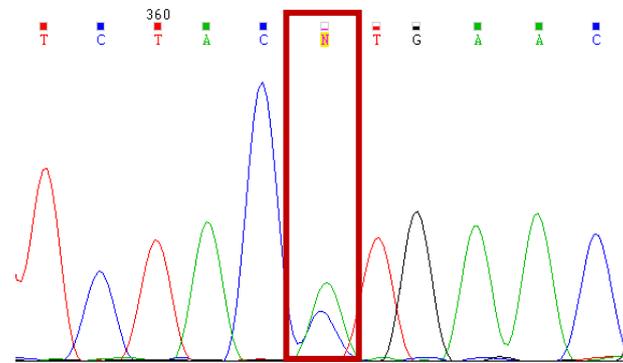


Fig. Suplementaria 14. Electroferograma de la validación del cambio *SETX* c.377A>C en el probando MD-485 en heterocigosis.

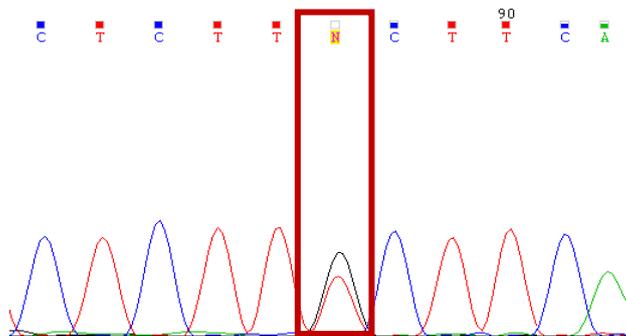


Fig. Suplementaria 15. Electroferograma de la validación del cambio *FTL* c.-168G>T en el probando MD-485 en heterocigosis.

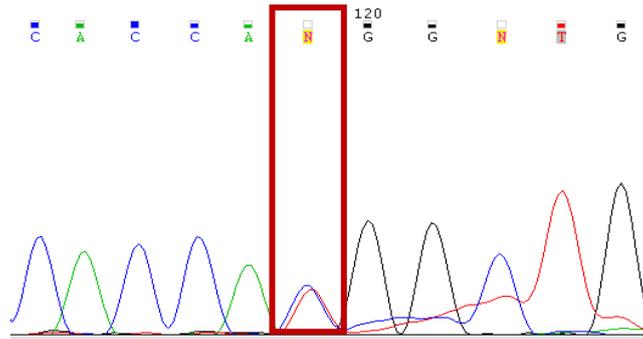


Fig. Suplementaria 16. Electroferograma de la validación del cambio *TTR* c.416C>T en el probando MD-485 en heterocigosis.

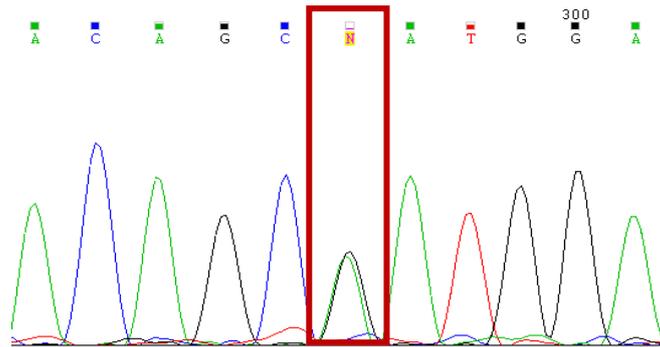


Fig. Suplementaria 17. Electroferograma de la validación del cambio *MME* c.68G>A en el probando MD-486 en heterocigosis.

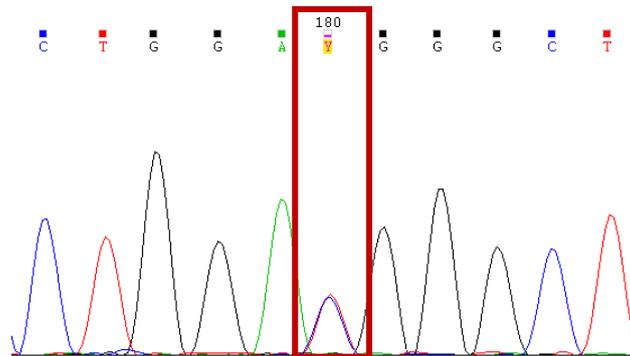


Fig. Suplementaria 18. Electroferograma de la validación del cambio *KMT2D* c.5921C>T en el probando MD-486 en heterocigosis.

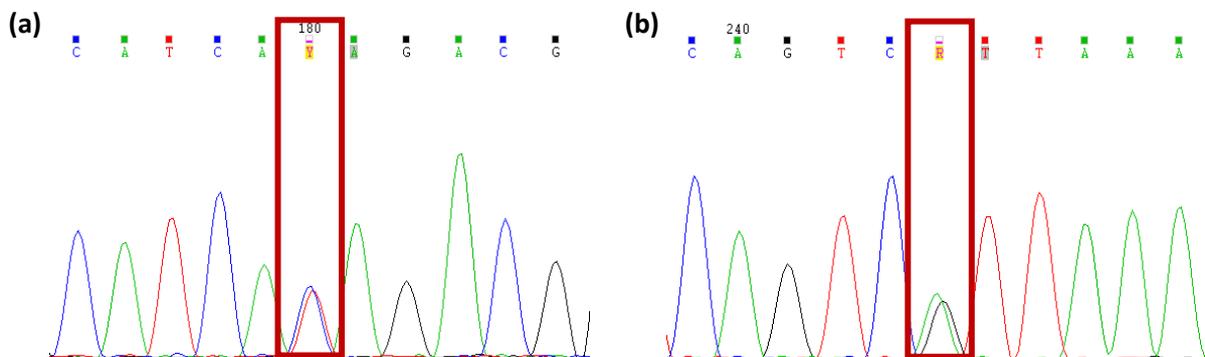


Fig. Suplementaria 19. Electroferograma de la validación los cambios (a) c.6656C>T y (b) c.7846G>A en el gen *FAT1* en el probando MD-487, ambos en heterocigosis.

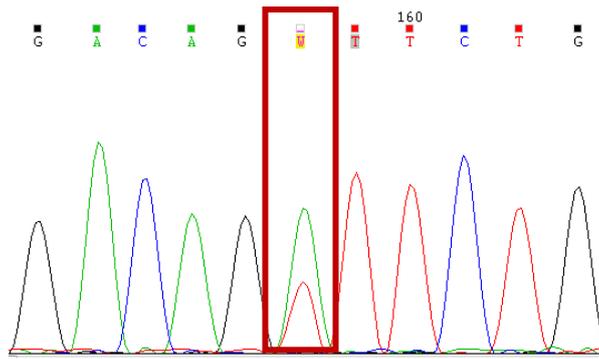


Fig. Suplementaria 20. Electroferograma de la validación del cambio *ATXN7* c.916A>T en el probando MD-487 en heterocigosis.

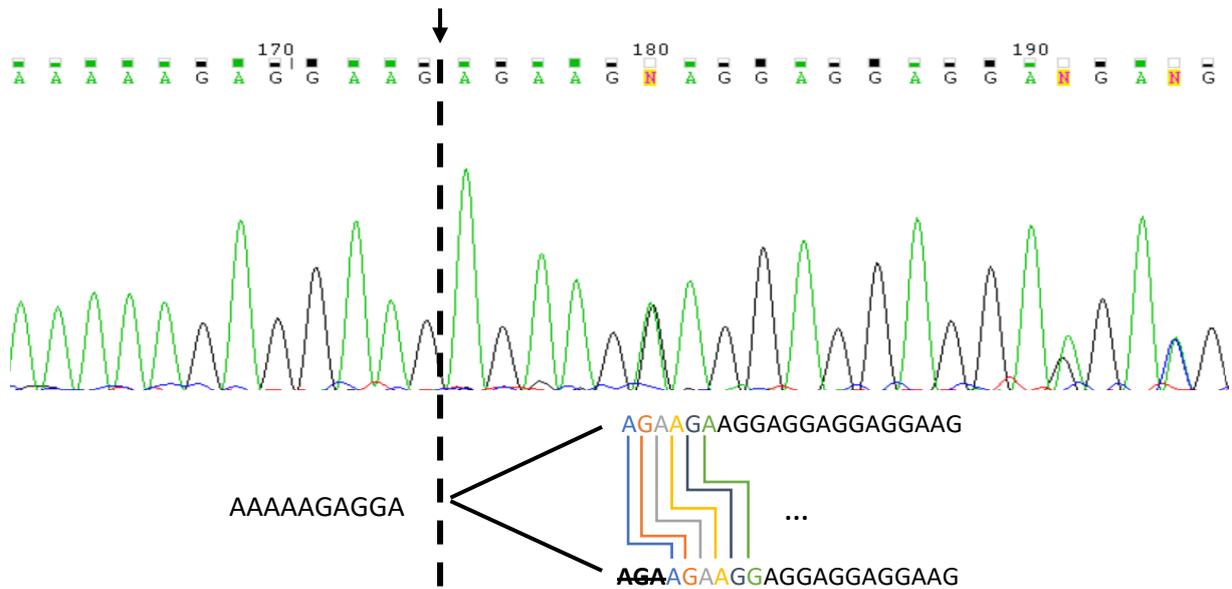


Fig. Suplementaria 21. El electroferograma muestra un heterodúplex formado como consecuencia del solapamiento de dos alelos, uno de los cuales presenta la deleción c.3599_3601delAGA. El análisis manual de ambas pautas de lectura ha permitido identificar la deleción y el punto en que comienza la superposición de ambas secuencias (marcado con una línea discontinua). Se confirma la presencia de la deleción c.3599_3601delAGA en el gen *CACNA1A* en el probando MD-487 en heterocigosis.

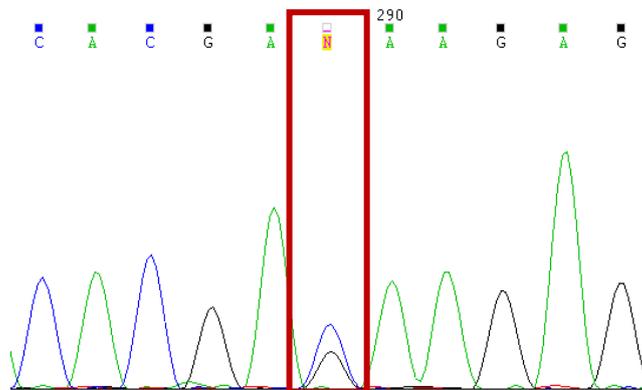


Fig. Suplementaria 22. Electroferograma de la validación del cambio *KIF5A* c.2274G>C en el probando MD-502 en heterocigosis.

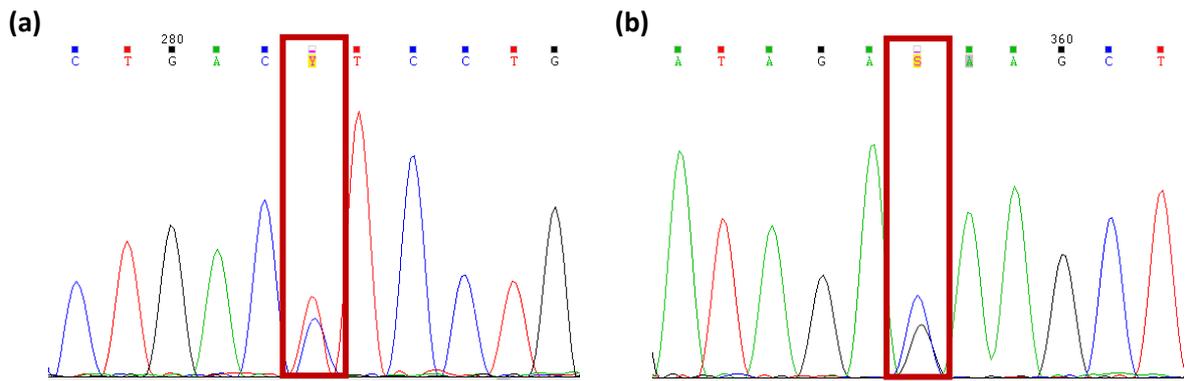


Fig. Suplementaria 23. Electroferograma de la validación los cambios (a) c.11848C>T y (b) c.23448G>C en el gen *SYNE1* en el probando MD-504, ambos en heterocigosis.

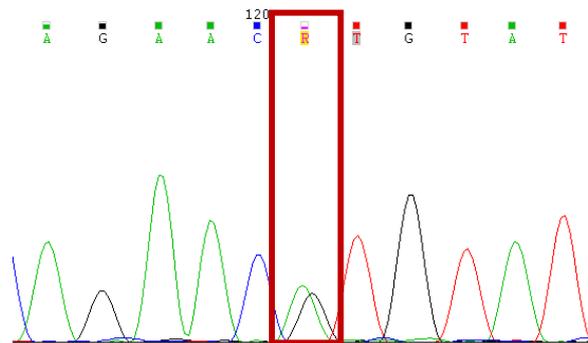


Fig. Suplementaria 24. Electroferograma de la validación del cambio *TENM4* c.4723A>G en el probando MD-505 en heterocigosis.

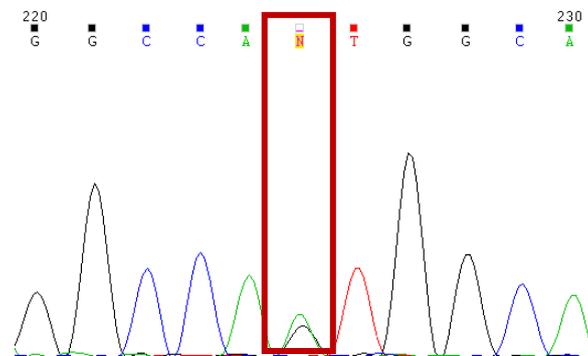


Fig. Suplementaria 25. Electroferograma de la validación del cambio *CCDC88C* c.1808A>G en el probando MD-505 en heterocigosis.

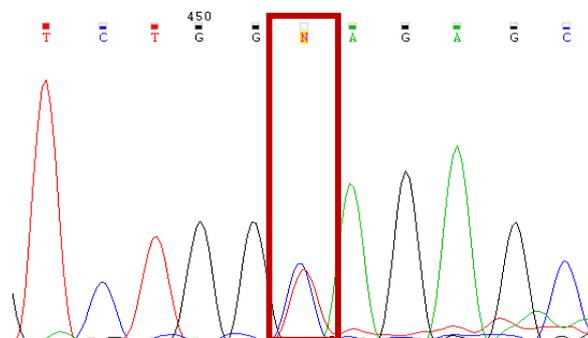


Fig. Suplementaria 26. Electroferograma de la validación del cambio *SPG7* c.1529C>T en el probando MD-514 en heterocigosis.

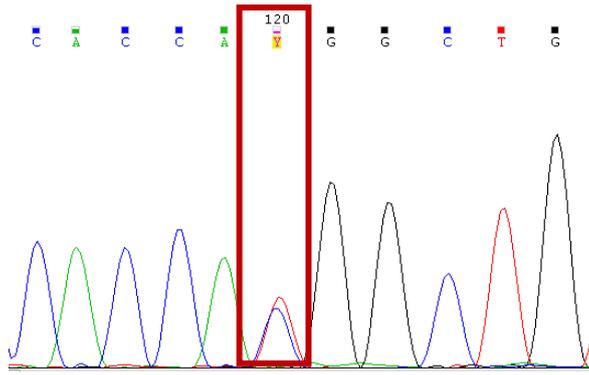


Fig. Suplementaria 27. Electroferograma de la validación del cambio *TTR* c.416C>T en el probando MD-514 en heterocigosis.

Apéndice III

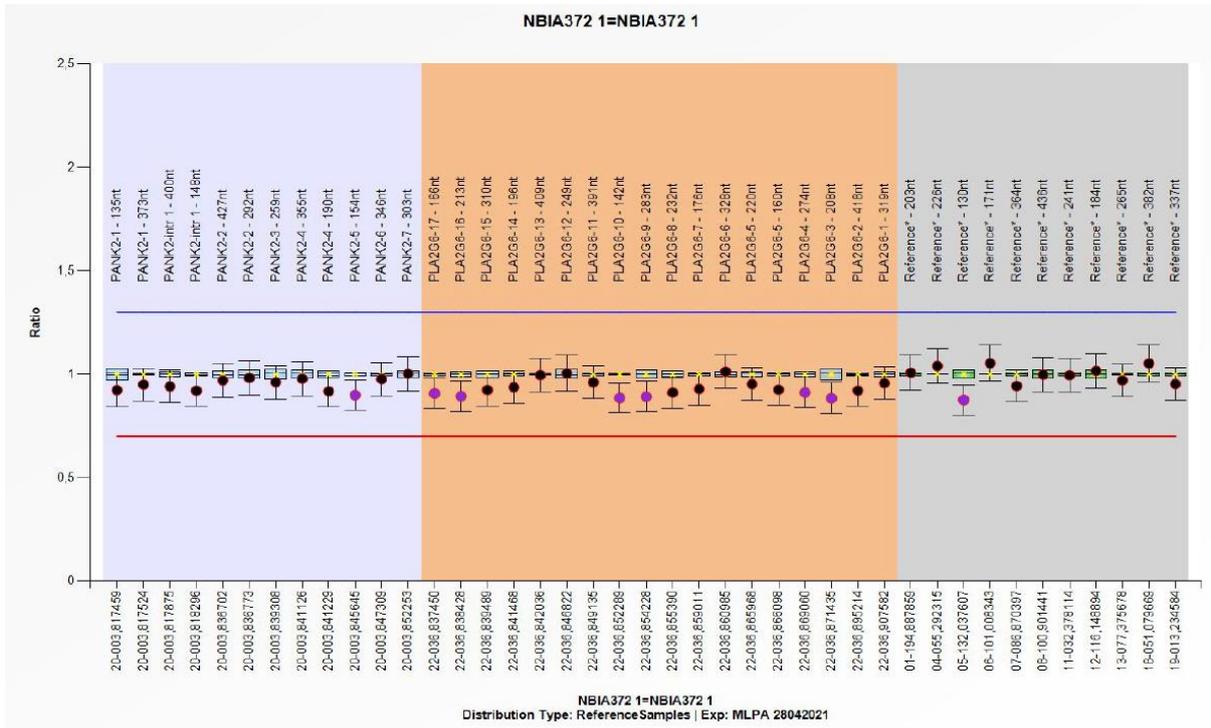


Fig. Suplementaria 28 Resultado de una de las réplicas del MPLA de *PANK2/PLA2G6* en el paciente NBIA-372

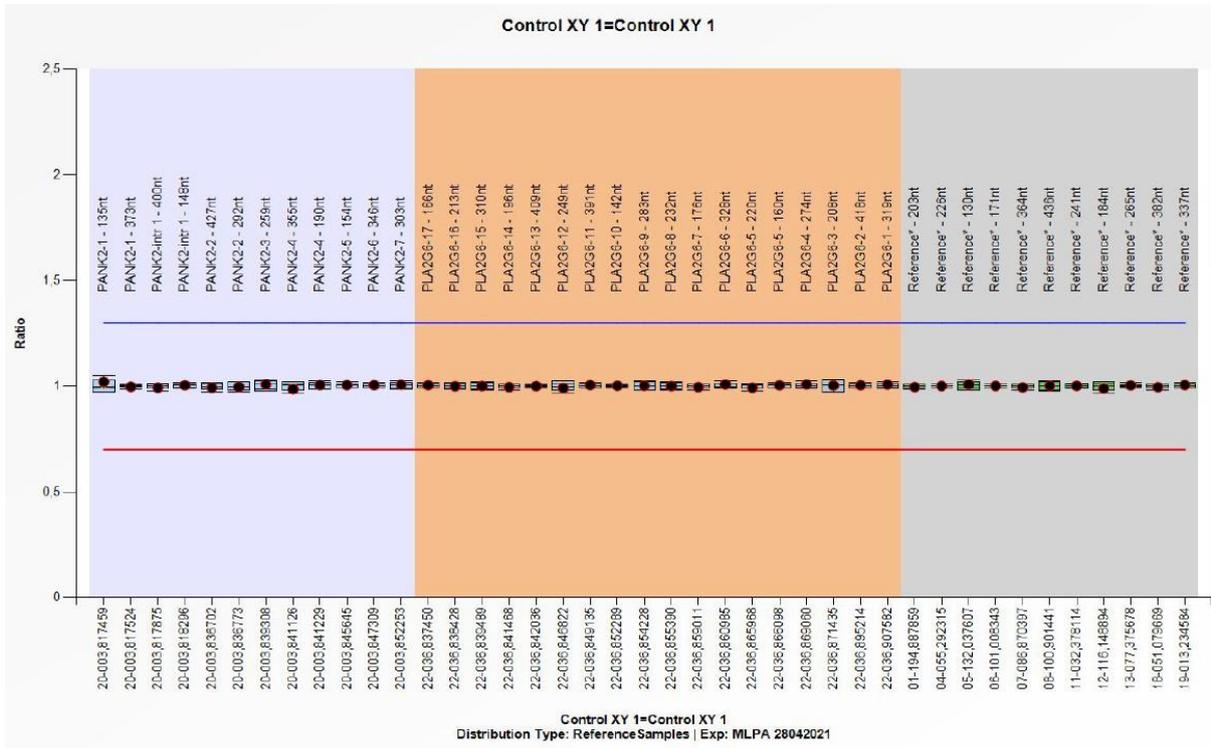


Fig. Suplementaria 29 Resultado de una de las réplicas del MPLA de *PANK2/PLA2G6* en el control XY