



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA,
BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE
SEGAWA.

Epidemiological, clinical, biochemical and molecular
characterization of Segawa disease.

Memoria para optar al título de doctor por la Universidad de Córdoba presentada por:

Joaquín Alejandro Fernández Ramos

Realizada bajo la dirección de:

Dr. Eduardo López Laso, Prof. Dr. Juan Luis Pérez Navero

Programa de doctorado de Biomedicina

Fecha de depósito: 9 de diciembre de 2021

TITULO: *CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA, BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE SEGAWA*

AUTOR: *Joaquín Alejandro Fernández Ramos*

© Edita: UCOPress. 2022
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es

Agradecimientos:

A todos los pacientes y sus familias que han colaborado en este estudio.

A mis compañeros de la Unidad de Neuropediatría del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba por su apoyo, amistad y confianza, en especial a Eduardo por su tenacidad, paciencia y generosidad.

A los Dres. Juan Luis Pérez Navero, Rafael Artuch, Katrin Beyer, Beatriz Quintáns y María José De la Torre, por su participación en el trabajo.

A los neuropediatras y neurólogos de España que han colaborado en este estudio.

A mi familia por su apoyo, a mi esposa por su dedicación, a mis padres por dárme todo y en especial a mi padre que nos cuida desde arriba.

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	15
2. INTRODUCCIÓN	19
2.1. Introducción a los errores congénitos del metabolismo.....	19
2.2. Errores congénitos del metabolismo de los neurotransmisores	20
2.3. Diagnóstico diferencial de los principales fenotipos de la enfermedad de Segawa	26
2.4. Deficiencia de guanosina trifosfato ciclohidrolasa 1 de herencia autosómica dominante (enfermedad de Segawa):.....	35
3. JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA E HIPÓTESIS	43
4. OBJETIVOS	45
4.1. Objetivo principal	45
4.2. Objetivos secundarios	45
5. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	47
5.1. Métodos y diseño	47
5.2. Métodos de evaluación clínica.....	48
5.3. Métodos de las pruebas diagnósticas bioquímicas y de imagen	51

5.4.	Métodos de diagnóstico molecular	52
5.5.	Métodos en relación al tratamiento	55
5.6.	Reunión de pacientes y profesionales	56
5.7.	Análisis estadístico.....	56
5.8.	Aspectos éticos.....	57
6.	RESULTADOS	59
6.1.	Caracterización epidemiológica.....	59
6.2.	Caracterización clínica.....	61
6.3.	Pruebas diagnósticas bioquímicas y de imagen	104
6.4.	Caracterización molecular.....	105
6.5.	Tratamientos.....	124
6.6.	Investigación en herramientas diagnósticas y de seguimiento.....	129
7.	DISCUSIÓN	135
7.1.	Caracterización epidemiológica.....	136
7.2.	Caracterización clínica.....	138
7.3.	Pruebas diagnósticas bioquímicas y de imagen	150
7.4.	Caracterización molecular.....	151
7.5.	Tratamiento	155
7.6.	Investigación en herramientas de diagnóstico y seguimiento.....	159

8. CONCLUSIONES 163

ANEXOS..... 165

BIBLIOGRAFÍA 215

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Causas de distonía en el paciente pediátrico.

Tabla 2. Causas de distonía según la edad de inicio de síntomas.

Tabla 3. Causas de parkinsonismo en niños y adolescentes.

Tabla 4. Causas del síndrome parkinsonismo-piramidal.

Tabla 5. Categorías de la variable fenotipo clínico en los sujetos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 6. Variables síntomas motores y síntomas no motores en los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 7. Cebadores para el estudio de la retención del intrón 5 en las variantes intrónicas de los sujetos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 8. Descripción estadística de la penetrancia por género en los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 9. Descripción estadística de la edad de inicio de la sintomatología por grupos etarios de los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 10. Descripción estadística de la edad de inicio por fenotipos de los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 11. Descripción estadística de la latencia diagnóstica por periodos de los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 12. Descripción estadística de la latencia diagnóstica según el fenotipo clínico de los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 13. Descripción estadística de la frecuencia de síntomas de los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 14. Descripción estadística de la sintomatología según la edad de inicio de los casos

con la enfermedad de Segawa.

Tabla 15. Descripción estadística de la sintomatología según el género de los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 16. Descripción detallada de síntomas y signos de los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 17. Síntomas no motores segregados por el fenotipo clínico de los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 18. Manifestaciones clínicas motoras y no motoras de los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 19. Descripción genética de las variantes causantes en los sujetos con la enfermedad de Segawa: 19a. Descripción de variables patogénicas o probablemente patogénicas. 19b. Variantes genéticas en pacientes heterocigotos compuestos. 19c. Variantes probablemente benignas o variantes de significado incierto

Tabla 20. Referencias bibliográficas de las variantes genéticas de los sujetos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 21. Relación fenotipo-genotipo y antecedentes de enfermedad de Parkinson de los sujetos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 22. Respuesta al tratamiento segregada por fenotipos clínicos de los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 23. Datos relacionados con el fenotipo clínico y el tratamiento de los casos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 24. Determinación de prolactina sérica en sujetos con AD-GTPCHD.

Tabla 25. Determinación de pterinas en sangre seca en sujetos con AD-GTPCHD.

Tabla 26. Determinación de pterinas en orina en sujetos con AD-GTPCHD.

Figura 1. Metabolismo de los neurotransmisores monoaminérgicos.

Figura 2. Metabolismo de las pterinas.

Figura 3. Árboles genealógicos con fenotipo y genética de los sujetos con la enfermedad de Segawa.

Figura 4a. Diagrama de caja de la distribución por edades de los casos con la enfermedad de Segawa.

Figura 4b. Diagrama de barras de la distribución por edades de los casos con la enfermedad de Segawa.

Figura 5. Ilustración de la edad de inicio, latencia diagnóstica y tratamiento de los casos con la enfermedad de Segawa.

Figura 6. Alineación de las secuencias de GTPCH-1 en diferentes especies de vertebrados.

Figura 7. Secuencia de la 3'UTR de *GCHI*.

Figura 8. Representación esquemática de GTPCH-1.

Figura 9. Representación de *GCHI*.

Figura 10. Microsatélites empleados en el estudio del efecto fundador en la región de *GCHI*.

Figura 11. Estudio de haplotipo fundador de las familias A, B y D con la enfermedad de Segawa.

Figura 12. Correlación neopterina y biopterina en orina en los sujetos con AD-GTPCHD.

Figura 13. Neopterina en orina en sujetos con AD-GTPCHD y controles.

Figura 14. Biopterina en orina en sujetos con AD-GTPCHD y controles.

ABREVIATURAS

5-HIAA	5-hidroxiindolacético
5-HTP	5-hidroxitriptófano
AADC	L-aminoácido aromático descarboxilasa
AC	Adenilatociclasa
AD-GTPCHD	Enfermedad por deficiencia de guanosina trifosfato ciclohidrolasa I autosómica dominante
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BH4	Tetrahidrobiopterina
BP	Biopterina
CI	Cociente intelectual
D	Distonía
DHPR	Dihidropteridina reductasa
DP	Distonía y parkinsonismo
DSD	Distonía dopa-sensible
ECM	Errores congénitos del metabolismo
EP	Enfermedad de Parkinson
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
<i>GCHI</i>	Gen guanosin-ciclo-hidrolasa 1
GTPCH-1	Enzima guanosina trifosfato ciclohidrolasa -1
HVA	Ácido homovanílico
iNTD	<i>The International Working Group on Neurotransmitter Related Disorders</i>

ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina
LCR	Líquido cefalorraquídeo
L-Dopa/inhibidor DC	Levodopa e inhibidor de la decarboxilasa periférico
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
NGS	<i>Next-generation-sequencing</i>
NP	Neopterina
NT	Neurotransmisores
P	Fenotipo de parkinsonismo
PE	Paraparesia espástica
PKA	Proteíncinasa A
PKAN	Pantotenato quinasa
PAH	Fenilalanina hidroxilasa
PLAN	Fosfolipasa A2 grupo 6
RIC	Rango intercuartílico
SRHI	Síndrome rígido-hipocinético infantil
SNC	Sistema nervioso central
SR	Sepiapterina reductasa
TH	Tirosina hidroxilasa
TPH	Triptófano hidroxilasa
VMA	Ácido vanilmandélico
VOUS	Variante genética de significado incierto

1. RESUMEN

Introducción

En 2009, neuropediatras y neurólogos del Hospital Universitario Reina Sofía describieron un posible efecto fundador de la enfermedad de Segawa autosómica dominante en Córdoba (España) debido a la mutación $c.265C> T$ ($p. Q89^*$) en el gen *GCHI*. Se ha coordinado un estudio multicéntrico con el objetivo de mejorar el conocimiento de la situación de la enfermedad de Segawa en España y proporcionar una descripción fenotípica y genotípica detallada de los pacientes así como la respuesta al tratamiento y valorar posibles biomarcadores.

Métodos

La información clínico-genética se obtuvo a partir de cuestionarios estandarizados que fueron completados por los neurólogos que atendieron a niños y/o adultos de 16 hospitales españoles. Se realizó el estudio *in silico* de las variantes genéticas noveles. El efecto fundador de la variante $p.Q89^*$ se analizó mediante el estudio de haplotipos satélites. Se analizaron prolactina sérica y pterinas en orina y en sangre seca como posibles biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

Resultados

Ochenta sujetos pertenecientes a 24 familias mostraron mutaciones/deleciones en el gen *GCHI* compatibles con la enfermedad de Segawa. Se describieron siete variantes genéticas exclusivas en la cohorte de pacientes, 5 de las cuales son mutaciones noveles. Se detectaron cinco familias con $p.Q89^*$, no descritas previamente, en Andalucía debido a un posible efecto fundador. La mediana de latencia diagnóstica fue de 5 años (RIC 0-16). Nueve de las 24 familias tenían miembros diagnosticados de la enfermedad de Parkinson en sus antecedentes familiares. Los signos y/o síntomas más frecuentes fueron distonía de miembros inferiores (38/56, 67,8%, $p = 0,008$) y fluctuaciones diurnas de la

sintomatología motora (38/56, 67,8%, $p = 0,008$). Las fluctuaciones diurnas no estuvieron presentes en los fenotipos distintos de la distonía. Cincuenta y tres de 56 pacientes sintomáticos fueron tratados con un L-Dopa/inhibidor de decarboxilasa periférica durante (media \pm DE) $12,4 \pm 8,12$ años. En un 81% de casos se emplearon dosis inferiores a 350 mg/día (o ≤ 5 mg/kg/día en niños). Once de 53 (20%) pacientes presentaron síntomas que no respondían a L-Dopa/inhibidor de decarboxilasa periférica y que les afectaban en las actividades de la vida diaria. Las discinesias (en 4 sujetos) fueron los efectos adversos más destacados. No se observó deterioro de la respuesta al tratamiento con L-Dopa/inhibidor de decarboxilasa periférica a largo plazo. Se analizó la prolactina sérica como posible biomarcador de seguimiento en 14 individuos, resultando normales en todos los casos. Se analizaron pterinas en orina y en sangre seca en 15 individuos afectados de la enfermedad y se comparó con un grupo control, observándose que presentaron valores significativamente más bajos tanto para la excreción de neopterina como de biopterina en orina (prueba t de Student; $p < 0,0001$).

Conclusión

Este estudio identificó 5 mutaciones noveles en el gen *GCHI* causantes de la enfermedad y 7 descritas únicamente en esta cohorte. Se detectaron 5 nuevas familias portadoras de la mutación *p.Q89**, lo que apoya la hipótesis de un efecto fundador de *p.Q89** en Andalucía. Se proporcionaron nuevos conocimientos acerca de los fenotipos y de la respuesta al tratamiento a largo plazo, lo que puede mejorar el reconocimiento temprano y el manejo terapéutico. Es destacable que las fluctuaciones diurnas de la sintomatología motora se encontraron exclusivamente en edades tempranas y fenotipos con distonía. A pesar de tratarse de una enfermedad con buena respuesta al tratamiento, el 20% de pacientes describieron síntomas no respondedores a L-Dopa que afectaban a su vida diaria. Se encontró una alta prevalencia de enfermedad de Parkinson en las familias afectadas por la enfermedad de Segawa. La prolactina sérica no parece ser útil en el seguimiento de la enfermedad, sin embargo, las pterinas en orina podrían ser de interés como biomarcador periférico de diagnóstico bioquímico.

ABSTRACT

Introduction

In 2009, neuropediatricians and neurologists from the Reina Sofia University Hospital described a possible founder effect of autosomal dominant Segawa disease in Córdoba (Spain) due to the *c.265C>T* (*p.Q89**) mutation in the *GCHI* gene. A multicenter study has been coordinated to improve the knowledge of the situation of Segawa disease in Spain and to provide a detailed phenotypic and genotypic description of the patients as well as the response to treatment and to assess possible biomarkers.

Methods

The clinical-genetic information was obtained from standardized questionnaires that were completed by neurologists who cared for children and/or adults from 16 Spanish hospitals. The *in silico* study of the novel genetic variants was carried out. The founder effect of *p.Q89** was analyzed by studying satellite haplotypes. Serum prolactin and pterins in urine and dried blood were analyzed as possible biomarkers for the diagnosis and follow-up of the disease.

Results

Eighty subjects belonging to 24 families showed mutations in *GCHI* compatible with Segawa disease. Seven exclusive genetic variants have been described in the cohort of patients, 5 of which are novel mutations. Five previously undescribed families with *p.Q89** were detected in Andalusia due to a possible founder effect. The median latency to diagnosis was 5 years (IQR 0-16). Nine of the 24 families had members diagnosed with Parkinson's disease in their family history. The most frequent signs and/or symptoms were lower limb dystonia (38/56, 67.8%, $p = 0.008$) and diurnal fluctuations in motor symptoms (38/56, 67.8%, $p = 0.008$). Diurnal fluctuations were not present in phenotypes other than dystonia. Fifty-three of 56 symptomatic patients were treated with an L-

Dopa/periferic decarboxylase inhibitor for (mean \pm SD) 12.4 ± 8.12 years. In 81% of cases, doses lower than 350 mg/day (or ≤ 5 mg / kg / day in children) were used. Eleven of 53 (20%) patients had non-responsive symptoms and that affected daily life activities. Dyskinesias (in 4 subjects) were the most prominent adverse effects. No deterioration in response to long-term L-Dopa/periferic decarboxylase inhibitor treatment was observed. Serum prolactin was analyzed as a possible follow-up biomarker in 14 individuals, all results were normal. Pterins were analyzed in urine and in dried blood in 15 individuals affected by the disease and compared with a control group, observing that they presented significantly lower values for both the excretion of neopterin and biopterin in urine (Student's t test; $p < 0.0001$).

Conclusion

This study identified 5 novel disease-causing mutations in the *GCHI* gene and 7 uniquely described in this cohort. Five new families carrying the *p.Q89** mutation were detected, which supports the hypothesis of a founder effect of *p.Q89** in Andalusia. New insights are provided about phenotypes and long-term response to treatment, which can improve early recognition and therapeutic management. It is noteworthy that the diurnal fluctuations of motor symptoms were found exclusively in early ages and phenotypes with dystonia. Despite being a disease with good response to treatment, 20% of patients described non-responsive symptoms to L-Dopa that affected their daily life. It was found a high prevalence of Parkinson's disease in families affected by Segawa disease. Serum prolactin does not seem to be useful in monitoring the disease, however, urine pterins could be of interest as a peripheral biomarker for biochemical diagnosis.

2. INTRODUCCIÓN

En la introducción se comienza con una descripción de los aspectos generales de los errores congénitos del metabolismo (ECM) para profundizar de manera gradual en la enfermedad de Segawa o deficiencia de guanosina-trifosfato-ciclohidrolasa autosómica dominante (AD-GTPCHD) y sus características. Para asimilar el escenario en el que se encuadra este trabajo, se describen varias generalidades de los ECM, su clasificación y los hallazgos que contribuyen a sospechar un ECM. Posteriormente, se describen las características de los ECM de los neurotransmisores (NT), el diagnóstico diferencial de los fenotipos más frecuentes de AD-GTPCHD con otras patologías y por último se profundiza en la descripción detallada de la AD-GTPCHD.

2.1. Introducción a los errores congénitos del metabolismo

Los ECM constituyen un gran reto para el profesional sanitario ya que representan más de 500 entidades bien definidas. Se trata de un gran número de enfermedades de base genética que condicionan alteraciones bioquímicas. Son un grupo heterogéneo de enfermedades de especial interés para el neuropediatra puesto que muchas de ellas tienen su inicio en etapas tempranas de la vida. Se caracterizan por ser enfermedades raras, es decir, con una prevalencia menor de 1 caso entre 2000 recién nacidos vivos, sin embargo son globalmente numerosas. En muchas ocasiones, el reconocimiento, diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades raras es difícil para el profesional sanitario y se produce una demora diagnóstica mayor de lo deseable. Es conveniente que los profesionales sanitarios sepan reconocer las características diferenciales de los ECM de otras entidades y así iniciar la sospecha diagnóstica. Entre ellas, destacan una tendencia al carácter multisistémico del trastorno, la afectación combinada del sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP) o el carácter fluctuante y/o progresivo. Las clasificaciones de ECM más recientes plantean tres grandes categorías basadas en el tamaño de las moléculas:

- Trastornos relacionados con moléculas pequeñas:

Incluyen las aminoacidopatías, acidurias orgánicas, ECM de los carbohidratos, defectos cerebrales de creatina, ECM de las purinas y pirimidinas y los ECM de los NT y pterinas, entre los que se encuentra la enfermedad de Segawa.

- Trastornos del metabolismo energético:

Se relacionan con el metabolismo intermediario, la producción de la energía y su utilización. Incluyen las enfermedades mitocondriales y otros trastornos como los defectos de la beta-oxidación de ácidos grasos y defectos de la gluconeogénesis.

- Trastornos relacionados con macromoléculas:

Clásicamente se han relacionado con el depósito de compuestos anómalos y con las enfermedades lisosomales y glucogenosis. Sin embargo, las clasificaciones actuales incluyen los trastornos de síntesis, remodelación, tráfico, procesamiento y control de calidad de moléculas complejas. De este modo, también pertenecen a este grupo de los desórdenes congénitos de la glicosilación y las enfermedades peroxisomales.

2.2. Errores congénitos del metabolismo de los neurotransmisores

Introducción a los neurotransmisores

Las funciones cerebrales dependen de circuitos interneuronales que se relacionan a través de estímulos excitadores o inhibidores. Estos estímulos tienen lugar a través de la transmisión sináptica, que está mediada por los NT. El conocimiento acerca de la síntesis, el almacenamiento, la liberación y el catabolismo de los NT es fundamental para plantear el entendimiento de muchas enfermedades y las posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades del SNC. Existe un número elevado de moléculas que pueden actuar como NT en el sistema nervioso entre las que destacan ácido gamma-aminobutírico (GABA), acetilcolina, glicina, serotonina y dopamina. Pueden clasificarse según su función en NT excitatorios (glutamato, acetilcolina, histamina, dopamina, noradrenalina y adrenalina), inhibitorios (GABA, serotonina y dopamina), neuromoduladores (dopamina) y neurohormonas (oxitocina, vasopresina, entre otros).

Según su estructura química:

- Aminas biógenas: dopamina, serotonina, adrenalina y noradrenalina.
- Aminoácidos: GABA, glutamato, N-acetil-aspartato, glicina y serina.
- Acetilcolina.
- Purinas: adenosina monofosfato, adenosina difosfato y adenosina trifosfato.
- Neuropéptidos.

Los NT monoaminérgicos son fundamentales para la señalización en el SNC y SNP. Están involucrados en la regulación del movimiento, el tono muscular basal, los niveles de actividad, el estado de ánimo, la atención, el sueño, el tono vascular, la circulación, la termorregulación y la modulación del dolor. Deficiencias en la función de estos NT originan síntomas tales como trastornos del movimiento, disautonomía, trastornos neuropsiquiátricos o alteraciones del sueño. De interés para el desarrollo de esta tesis, se detalla el papel de la dopamina como NT.

Fisiología de la dopamina

La dopamina es una amina biógena que actúa como NT en el SNC. Se produce fundamentalmente en el SNC, secretada por las neuronas de la sustancia negra del mesencéfalo y en menor medida en el SNP en la médula suprarrenal. Los sistemas y vías dopaminérgicos pueden agruparse en tres principales: 1) sistemas ultracortos localizados en el bulbo olfatorio y retina; 2) sistemas de longitud intermedia que incluyen el sistema tuberohipofisario, hipotalámico y periventricular medular; 3) sistemas largos, la vía nigroestriatal y mesolímbica. Entre sus funciones a nivel del SNC está participar en la regulación de la función motora y la afectividad. A nivel del SNP, se relaciona con la modulación de la función cardíaca, el tono vascular y la motilidad gastrointestinal (*Ávila-Rojas et al. 2017*). Actúa sobre receptores a nivel del SNC y SNP con efecto excitatorio o inhibitorio según el receptor al que se una. Actualmente los receptores de dopamina se clasifican en 2 grupos y 5 tipos, pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a una proteína G heterodimérica:

- D1, está acoplada a una proteína Gs que incrementa la actividad de la adenilato ciclasa (AC). Su activación conduce a la generación de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) y la estimulación de la proteincinasa A (PKA). Incluye los subtipos D1 y D5. Tiene un papel excitatorio en el control del movimiento voluntario a nivel estriatal.
- D2, está acoplada a proteínas G α i y G α 0, que reduce la actividad de la AC. Su activación disminuye los niveles de AMPC y la actividad de la PKA. Engloba los subtipos D2, D3 y D4. Tiene un papel inhibitorio en el control voluntario del movimiento.

La dopamina se sintetiza a partir del aminoácido tirosina en el citosol de la neurona dopaminérgica en dos pasos. En primer lugar, la tirosina se convierte en L-Dopa a través de la tirosina hidroxilasa (TH). Posteriormente, la L-Dopa se descarboxila a dopamina por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC), cuyo cofactor es el piridoxal fosfato. Para el adecuado funcionamiento de la TH, precisa de la tetrahidrobiopterina (BH4), que es un cofactor fundamental en múltiples reacciones bioquímicas. La BH4 actúa como coenzima no sólo de la TH en la síntesis de dopamina sino también para la triptófano hidroxilasa (TPH) que sintetiza el 5-hidroxitriptófano (5-HTP), precursor de la serotonina, y de la fenilalanina hidroxilasa (PAH), de la óxido nítrico sintasa y de la gliceril éter monooxigenasa (*Kaufman et al. 1998*). Las principales reacciones metabólicas que conforman las vías dopaminérgica y serotoninérgica se detallan en la figura 1.

Tras su síntesis, la dopamina se incluye en vesículas para liberarse por exocitosis y activar receptores, en su mayoría post-sinápticos. La síntesis y liberación de dopamina es regulada por autorreceptores presinápticos, la fosforilación de la TH y la concentración de tirosina y L-Dopa. Con estos mecanismos reguladores, la dopamina es recaptada a través del transportador de la dopamina o es recogida por células gliales para su metabolización.

Respecto a su degradación, la dopamina se metaboliza a H₂O₂ y 3,4-dihidroxifenilacetaldehído por acción de la monoamino oxidasa A. Posteriormente, el aldehído se inactiva por reducción a 3,4-dihidroxifeniletanol o por oxidación a 3,4-

dihidroxifenilacetaldehído, a través de la alcohol deshidrogenasa o la aldehído deshidrogenasa, respectivamente. Así, estos productos son liberados al exterior de la terminal nerviosa dopaminérgica para ser convertidos en ácido homovanílico (HVA) por acción de la catecol-O-metiltransferasa. Del catabolismo de la noradrenalina se deriva el ácido vanilmandélico (VMA). HVA y VMA son de especial interés por ser productos medibles en líquido cefalorraquídeo (LCR), de utilidad para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con los NT.

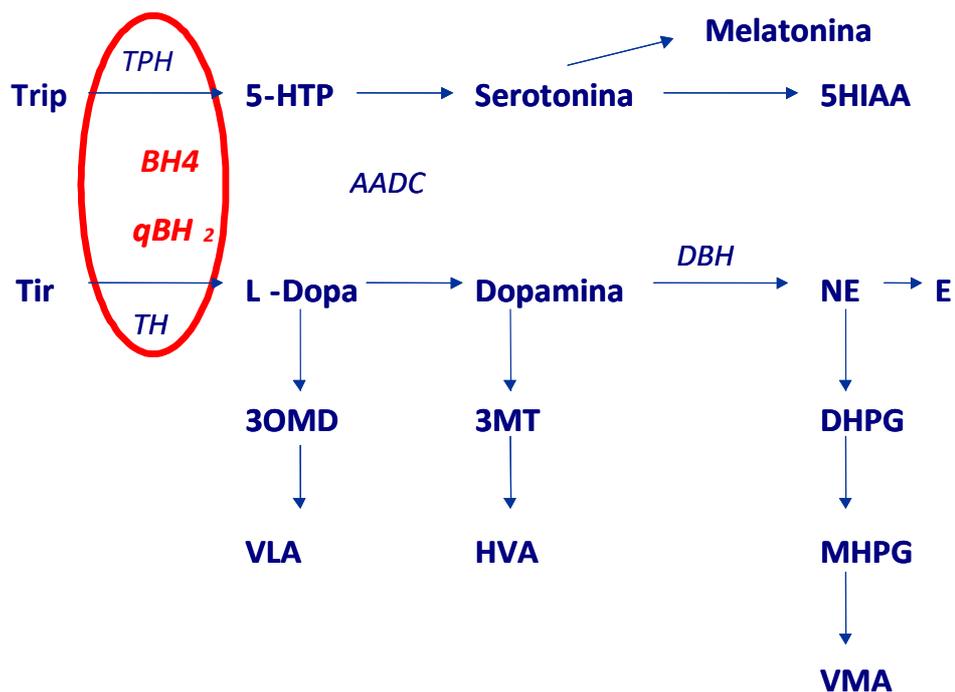


Figura 1. Metabolismo de los neurotransmisores monoaminérgicos. AADC: L-aminoácido aromático descarboxilasa; BH2: dihidrobiopterina; BH4: tetrahidrobiopterina; DBH: dopamina β-hidroxilasa; DHPG: dihidroxifenilglicol; E: epinefrina; 5-HIAA: 5-hidroxiindolacético; 5-HTP: 5-hidroxitriptófano; HVA: ácido homovanílico; MHPG: 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol; 3MT: 3-metiltirosina; NE: norepinefrina; 3-OMD: 3-ortometildopa; TH: tirosina hidroxilasa; Tir: tirosina; TPH: triptófano hidroxilasa; Trip: triptófano; VLA: ácido vaniláctico; VMA: ácido vanilmandélico. (Tomado de Tesis doctoral Eduardo López-Laso 2010)

Generalidades acerca de los errores congénitos del metabolismo de los neurotransmisores

Los ECM de los NT son un heterogéneo grupo de patologías neurológicas de base genética relacionadas con deficiencias en el metabolismo de los NT. En la última década se ha ampliado el conocimiento e identificado diferentes enfermedades monogénicas en especial de las vías dopaminérgica y serotoninérgica (Ng *et al.* 2015). La mayoría de estos trastornos pueden potencialmente ser causa de encefalopatía progresiva y trastornos del movimiento en etapas tempranas de la vida. Por ello, su conocimiento es fundamental para mejorar el diagnóstico temprano, optimizar las estrategias terapéuticas y realizar el asesoramiento genético (Blau *et al.* 2001).

Respecto a su prevalencia, se trata de enfermedades raras y en la mayoría de ellas no se conoce con precisión su frecuencia. Mercimek-Mahmutoglu publicó un trabajo en el que se buscaron ECM de los NT en una cohorte de 150 pacientes con trastornos del movimiento y epilepsia y observaron que únicamente el 4% de los pacientes presentaba un ECM de los NT como causa (Mercimek-Mahmutoglu *et al.* 2015).

En su fisiopatología, la mayoría de los ECM de los NT se debe a una deficiencia en la síntesis de los neurotransmisores (García-Cazorla *et al.* 2005). Sin embargo, otros mecanismos pueden estar implicados en su desarrollo de modo que el defecto puede producirse a nivel de la liberación, recaptación o por la disfunción de los receptores.

Se clasifican actualmente de la siguiente manera (Hübschmann *et al.* 2021):

- a) trastornos de aminas biógenas (dopamina, serotonina, adrenalina y noradrenalina)
 - Trastornos primarios del metabolismo de las aminas biógenas
 - Defectos enzimáticos primarios en la biosíntesis: deficiencia de AADC, deficiencia de TH
 - Trastornos del catabolismo: deficiencia de la monoaminoxidasa A y deficiencia de dopamina beta-hidroxilasa
 - Trastornos del transporte: deficiencia del transportador vesicular 2, deficiencia del transportador de dopamina.

- Trastornos de la biosíntesis y recaptación de BH4: deficiencia de GTPCH-1 en sus formas dominante y recesiva, deficiencia de 6-piruvil-tetrahidropterina sintasa, deficiencia de sepiapterina reductasa (SR), deficiencia de dihidropteridina reductasa y deficiencia de pterin-4-carbinolamina deshidratasa.
 - Trastornos asociados a las co-chaperonas (deficiencia asociada a *DNAJC12*)
- b) trastornos de NT aminoacídicos (glicina, glutamato, serina y GABA)

En general, los trastornos del metabolismo de los NT presentan clínica puramente neurológica a diferencia de otros ECM que pueden originar manifestaciones extraneurológicas. En una publicación reciente en la que se revisaron los datos del registro *The International Working Group on Neurotransmitter Related Disorders* (iNTD) con 275 pacientes, se observó que los síntomas iniciales más frecuentes en los defectos primarios en la biosíntesis (deficiencia de AADC y deficiencia de TH) fueron el retraso psicomotor y la hipotonía truncal, seguidos de distonía, trastornos de la termorregulación y crisis oculogiras. En los trastornos relacionados con la BH4 fueron distonía, retraso del desarrollo e hipotonía de inicio en periodo neonatal o infantil (salvo en AD-GTPCHD que puede presentarse tardíamente). Otras manifestaciones fueron temblor, marcha de puntillas, fallo de medro, crisis oculogiras y trastornos del sueño (*Hübschmann et al. 2021*).

Respecto al diagnóstico, los trastornos que cursan con hiperfenilalaninemia son detectados en el cribado neonatal. Los demás son diagnosticados tras iniciarse los síntomas o por estudios de extensión familiar. Respecto al diagnóstico molecular, los estudios de secuenciación masiva en los últimos años ha permitido avanzar en él sin embargo no se alcanza en todos los casos y requieren el diagnóstico bioquímico. Cuando no se alcanza el diagnóstico genético, el diagnóstico bioquímico puede requerir de procedimientos de elevada complejidad e invasividad puesto que generalmente las pruebas complementarias en muestras periféricas son normales. La escasa disponibilidad de los estudios que se realizan en el LCR para el diagnóstico de estos trastornos monogénicos del metabolismo de los NT exige que se realicen en centros especializados con experiencia (*Hoffmann et al. 1998*). El diagnóstico bioquímico se realiza mediante la

determinación cuantitativa de NT, aminas biógenas y pterinas en LCR, incluyendo glutamato, GABA y glicina (*Hoffmann et al. 1998*), ya que estos metabolitos reflejan la interacción de diferentes aspectos del metabolismo incluyendo la biosíntesis, la degradación y el estado de los receptores de los NT (*Hoffmann et al. 1998*).

Con el fin de mejorar el conocimiento en epidemiología, correlación genotipo/fenotipo, impacto en la calidad de vida y evaluar estrategias diagnóstico-terapéuticas de los ECM del metabolismo de los NT, se fundó en 2013 el grupo de trabajo internacional para los trastornos relacionados con los NT (iNTD). En él colaboran 26 países y en España participan el Hospital Sant Joan de Deu de Barcelona y el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. De esta red internacional de expertos, nació la reciente guía clínica para el diagnóstico y tratamiento de las deficiencias de BH4 y diversas publicaciones derivadas del registro (*Opladen et al. 2020; Hübschmann et al. 2021*).

2.3 Diagnóstico diferencial de los principales fenotipos de la enfermedad de Segawa

Fenotipo distónico

En la última década se ha actualizado la definición y clasificación de las distonías, que fue revisada por un grupo internacional de expertos. Definieron la distonía como un trastorno del movimiento caracterizado por contracciones musculares sostenidas o intermitentes que causan movimientos y/o posturas anormales, a menudo repetitivas. Los movimientos distónicos son típicamente estereotipados. La distonía a menudo se inicia o empeora por una acción voluntaria y se asocia con una sobreactivación del músculo involucrado (*Albanese et al. 2013; Klein et al. 2014*). Puede presentarse de manera aislada, siendo la única manifestación, o como distonía combinada, en la que se asocia a otros trastornos neurológicos. La tendencia actual para clasificar las distonías se basa en criterios como la edad de inicio, la distribución, el modelo temporal y la asociación con otros síntomas (*Klein et al. 2014*). Se enumeran las causas de distonía en el paciente

pediátrico en la tabla 1.

Tabla 1. Causas de distonía en el paciente pediátrico.

Adquiridas	Yatrógena asociada a fármacos; origen vascular tipo parálisis cerebral infantil; infecciosa o inmunomediada como las encefalitis por anticuerpos antirreceptor de NMDA; traumatismos; tumorales o metabólicas.
Genéticas o primarias	Para evitar largas listas, las recomendaciones actuales acerca de la designación de cada distonía primaria de base genética consisten en nombrar con el prefijo "DYT" seguido del nombre del gen o del lugar del gen, por ejemplo, "DYT-TOR1A" (anteriormente conocido como DYT1). Se recogen DYT-1 a DYT-28.
Asociadas a enfermedades degenerativas	Ataxia-teleangiectasia, neurodegeneración asociada a deficiencia de PKAN, enfermedad de Huntington, atrofia olivopontocerebelosa, síndrome de Rett, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, distrofia neuroaxonal infantil, entre otras.
Asociadas a ECM	Suelen ser distonías que se acompañan de otros síntomas neurológicos. Puede deberse a trastornos del metabolismo de los aminoácidos y ácidos orgánicos, metabolismo lipídico y enfermedades mitocondriales, entre otras.

ECM = Errores congénitos del metabolismo; LCR = Líquido cefalorraquídeo, NMDA = ácido N-metil-D-aspartico; NT = neurotransmisores; PKAN = Pantotenato quinasa

Para el diagnóstico de un ECM en un paciente distónico pueden plantearse las siguientes pruebas: determinación de aminoácidos, ácidos orgánicos, homocisteína, NT en LCR, glucosa y folato en LCR, metabolismo del cobre y actividad de biotinidasa (Ng *et al.* 2015). Respecto al diagnóstico de ECM como causa de distonía en el paciente pediátrico, según la edad de inicio de la distonía (tabla 2):

Tabla 2. Causas de distonía según la edad de inicio de síntomas.

Congénita	Se relacionan con ECM de la dopamina, déficit de piruvato-deshidrogenasa, acidurias orgánicas y enfermedades mitocondriales tipo Leigh.
Primeros años de vida	Lesch-Nyhan, defectos en la síntesis de creatina, acidurias orgánicas y enfermedades mitocondriales tipo Leigh.
Primera década de la vida	Gangliosidosis, ECM de la dopamina, neurodegeneración asociada a deficiencia de PKAN y neurodegeneración asociada a deficiencia de PLAN. Inducida por ejercicio: déficit de GLUT-1. Focal: homocistinuria. De presentación aguda puede relacionarse con aciduria glutárica tipo I.
Adolescentes	Enfermedad de Wilson, neurodegeneración asociada a deficiencia de PKAN y enfermedades lisosomales.

ECM = Errores congénitos del metabolismo; GLUT-1= Transportador de glucosa tipo 1; PKAN = neurodegeneración asociada a deficiencia de pantotenato quinasa; PLAN = fosfolipasa A2 del grupo 6

Fenotipo de parkinsonismo

El parkinsonismo se define por la bradicinesia, asociada a temblor o rigidez, según los criterios de la International Parkinson and Movement Disorder Society (*Postuma et al. 2015*). También se considera parkinsonismo la asociación de dos o más signos cardinales de la enfermedad de Parkinson (EP). El diagnóstico de síndrome parkinsoniano aún por tanto:

- Bradicinesia (lentitud en el inicio del movimiento voluntario con reducción progresiva en la velocidad y amplitud de acciones repetitivas) y una de las siguientes características:
 - Rigidez muscular
 - Temblor de reposo
 - Inestabilidad postural, no provocada por una causa primaria visual, cerebelosa o propioceptiva

El parkinsonismo puede iniciarse desde los primeros meses de vida hasta una edad avanzada en función de su etiología:

- En edad adulta se corresponde generalmente con la EP
- El parkinsonismo de inicio precoz, considerado desde los primeros meses de edad hasta los 21 años. Es un síndrome clínico heterogéneo que en ocasiones se combina con trastornos del movimiento hiperkinéticos y otros signos neurológicos.

Respecto a la EP del adulto, es el parkinsonismo más frecuente. La EP se debe a un daño progresivo o deterioro de las neuronas de la sustancia negra y en consecuencia una reducción dopaminérgica y un desbalance de los NT involucrados en el circuito nigroestriatal que provoca una alteración en el control del movimiento. Se trata de una enfermedad de origen multifactorial con factores genéticos y ambientales involucrados. Se han descrito múltiples genes y se han localizado loci asociados con el desarrollo de EP (Nalls *et al.* 2019). Otros factores tales como la edad, el género masculino, la menopausia o la deficiencia de folatos se han relacionado con el desarrollo de la enfermedad. Los mecanismos implicados en la progresión de la EP son múltiples y están vinculados con la función sináptica, mitocondrial, procesos de autofagia, degradación lisosomal y neuroinflamación, entre otros. Desde el punto de vista neuropatológico, en ella se produce una pérdida de neuronas dopaminérgicas en sustancia negra, la presencia de cuerpos de Lewy en tronco y se observan agregados de alfa-sinucleína. Las pruebas de imagen son de gran utilidad en el diagnóstico diferencial con otras entidades como el temblor esencial. El DAT-Scan es una técnica de neuroimagen funcional con un marcador del transportador de dopamina presináptico, ioflupano, que permite identificar la degeneración dopaminérgica presináptica característica de la EP.

Los síntomas motores clásicos son:

- Bradicinesia: se refiere a la lentitud de los movimientos. La hipocinesia se caracteriza por disminución general del número de movimientos, tanto voluntarios como involuntarios. La bradicinesia es el signo más relevante, inicialmente asimétrico, afectando a la amplitud más que a la velocidad. Se manifiesta a nivel facial con hipomimia, dificultad para iniciar los movimientos voluntarios, dificultad para ejecutar actos motores simultáneos y repetidos, micrografía y lentitud de

movimientos.

- Temblor: trastorno del movimiento involuntario, oscilatorio y rítmico de uno o varios grupos musculares. Se trata de un temblor de reposo, que desaparece con la acción voluntaria y se desarrolla de manera asimétrica y progresiva aunque puede estar ausente en el 20% de los pacientes con EP. Inicialmente comienza en un miembro o en el mentón, lengua o mandíbula. Tiene una frecuencia de 4-6Hz. Menos frecuente es el temblor postural (muy raramente de acción) que es de menor amplitud y mayor frecuencia.
- Rigidez: se refiere al aumento de la resistencia al movimiento pasivo. El hombro doloroso es una manifestación inicial frecuente condicionando en ocasiones un desgarramiento del supraespinoso en los pacientes con la EP.
- Alteración de reflejos posturales, caídas.

Entre los síntomas no motores de la EP destacan:

- Disfunción autonómica: disfunción urinaria, incontinencia fecal, sialorrea, desequilibrio térmico, estreñimiento, trastorno deglutorio y disfunción sexual.
- Conductuales: ansiedad, depresión, apatía, disfunción cognitiva y demencia que aparece en fases avanzadas de la enfermedad.
- Trastornos del sueño: somnolencia diurna con ataques de sueño, insomnio, síndrome de piernas inquietas.
- Otros: Trastornos sensoriales, visuales, fatiga y alteraciones en el peso.

La enfermedad se comporta de modo progresivo, de manera que pueden establecerse diferentes fases del desarrollo de la EP: Fase inicial prodrómica o pre-motora: en la que puede aparecer estreñimiento, hiposmia, depresión, somnolencia diurna excesiva. Fase precoz: bradicinesia, rigidez, temblor, fatiga, dolor, ligero deterioro cognitivo. Fase de estado: a los 5-10 años del inicio de la enfermedad, en la que aparecen las fluctuaciones y discinesias. Fase avanzada: entre los 10 y 20 años del inicio del cuadro desarrollan inestabilidad postural, congelación de la marcha (episodios intermitentes y breves de incapacidad para iniciar o mantener la locomoción o realizar un giro), caídas, demencia y psicosis.

La expresión clínica de la EP sin embargo varía entre sujetos y se describen características diferenciales que permiten identificar varios subtipos de la enfermedad. Thenganatt y Jankovic (*Thengannat & Jankovic, 2014*) realizaron una revisión sistemática de la evidencia y propusieron varios subtipos de EP:

- EP con predominio de inestabilidad postural con trastorno de la marcha: peor pronóstico por rápida progresión, cursa con bradicinesia y rigidez. Desarrollan depresión y demencia. La degeneración se produce en sustancia negra ventrolateral. La neuroimagen típica es de “egg-shaped”.
- EP con predominio de temblor: mejor pronóstico, tiene buena respuesta a L-Dopa aunque desarrollan wearing-off (deterioro con fluctuaciones motoras a final del efecto de las dosis, cuya latencia disminuye progresivamente). La degeneración se produce en sustancia negra medial, globo pálido ventral y región mesencefálica. La neuroimagen típica se conoce como “Eagle wing”.
- Formas mixtas.
- EP de inicio tardío autosómico dominante.
- EP de inicio precoz: antes de los 60 años, suele presentarse entre los 21 y 45 años, además de los síntomas clásicos de parkinsonismo se presenta con posturas distónicas de predominio en miembros inferiores incluso siendo éstas las primeras manifestaciones de la enfermedad (*García-Cazorla et al. 2014*). Tienen buena respuesta a L-Dopa, preservación del área cognitiva y con más frecuencia fluctuaciones motoras y discinesias. Tiene una evolución más lenta.

En pediatría, el parkinsonismo es muy infrecuente. Las formas tempranas de parkinsonismo tienen características diferentes a las del EP del adulto. En lugar del término parkinsonismo en ocasiones se denomina síndrome rígido-hipocinético. Otras denominaciones empleadas para los pacientes pediátricos son “disonía-parkinsonismo”, “parkinsonism-like” o “parkinsonismo-plus”.

El parkinsonismo tiene una base genética con más frecuencia que en el adulto. Puede deberse a ECM de los NT, del metabolismo energético o enfermedades lisosomales, entre otros. En general, se piensa que cuanto más joven es el paciente más

probable es que tenga una etiología monogénica incluyendo a los ECM (*García-Cazorla et al. 2014*). Es importante tener en cuenta que varios de ellos tienen tratamiento específico.

Clínicamente, el parkinsonismo de presentación en edad pediátrica puede ser incompleto, atípico o complejo, es decir, asociado a otras manifestaciones neurológicas como el retraso psicomotor, piramidalismo y otros trastornos del movimiento. Una de las diferencias con la EP del adulto es que el temblor de reposo es raro en edad pediátrica. Entre las teorías que justifican estas presentaciones peculiares en la edad pediátrica están la diferencia en los circuitos neuronales dependientes de la edad, la plasticidad propia del niño y las diferentes etiologías. Existe una mayor variabilidad en la neuroimagen. A continuación se enumeran causas de parkinsonismo en niños y adolescentes (tabla 3).

Tabla 3. Causas de parkinsonismo en niños y adolescentes.

Estructurales	Malformaciones de troncoencéfalo, eventos vasculares como la encefalopatía hipóxico-isquémica, hidrocefalia o tumores en ganglios basales.
Infecciosas y parainfecciosas	Meningoencefalitis y procesos inmunomediados.
Metabólicas adquiridas	Hipoparatiroidismo y pseudohipoparatiroidismo.
Efectos adversos de fármacos e intoxicaciones	Antipsicóticos, antiarrítmicos, antidepresivos, entre otros.
Genéticas	Parkinsonismo: <i>SNCA, LRRK2, EIF4G1, VPS35, PARKIN, PINK1, DJ1, SYNJ1, DNAJC6, PD8B, GCH1</i> . Distonía-parkinsonismo: <i>ATP1A3, PRKRA, PARKIN, TAF1</i> , enfermedades con acúmulo cerebral de hierro (<i>ATP13A2, C19orf12, COASY, CP, DCAF17, FA2H, FTL, PANK2, PLA2G6</i> y <i>WDR45</i>), <i>SCL20A2, PDGFRB, HTT, TUBB4A</i> , entre otros Parkinsonismo-ataxia: <i>ATXN2, ATXN3, FMR1, ATN1, TUBB4A</i> , enfermedades con acúmulo cerebral de hierro.

	Parkinsonismo+piramidalismo: <i>FBX07</i> , <i>SPG11</i> , enfermedades con acúmulo cerebral de hierro.
Genéticas debidas a ECM	<p>ECM de depósito de metales: enfermedad de Wilson, neurodegeneración asociada a deficiencia de PKAN, neurodegeneración asociada a deficiencia de PLAN, o neurodegeneración asociada a proteínas de membrana mitocondrial, neuroferritinopatía, hemocromatosis, hipermanganesemia hereditaria, entre otras.</p> <p>ECM del metabolismo de los NT: AD-GTPCHD y AR-GTPCHD, deficiencia de TH, deficiencia de SR, deficiencia del transportador de la dopamina, defecto del transportador de la dopamina-serotonina cerebral (<i>SLC18A2</i>), deficiencia de la dihidropteridina-reductasa, deficiencia de la 6-piruviltetrahydropterina-sintetasa.</p> <p>Enfermedades lisosomales: ceroidolipofuscinosis, gangliosidosis GM1, GM2, mucopolisidosis III, Niemann-Pick tipo C o enfermedad de Gaucher.</p> <p>Defectos del metabolismo energético: neuropatía óptica hereditaria de Leber plus, deficiencia de piruvato-carboxilasa, defectos de la cadena respiratoria mitocondrial, mutaciones <i>POLG</i>, deficiencia de piruvato-deshidrogenasa.</p> <p>Otros ECM: enfermedad de Lesch-Nyhan, xantomatosis cerebrotendinosa, fenilcetonuria no tratada, deficiencia del cofactor del molibdeno y homocistinuria.</p>

AD-GTPCHD = deficiencia de GTPCH-1 autosómica dominante; AR-GTPCHD = deficiencia de GTPCH-1 autosómica recesiva; ECM = Errores congénitos del metabolismo; NT = neurotransmisores; PKAN = pantotenato quinasa; PLAN = fosfolipasa 2 del grupo 6; SR = Sepiapterina reductasa; TH = tirosina hidroxilasa

Fenotipo de paraparesia espástica

Las causas que afectan a la vía piramidal son variadas. Las principales causas son estructurales y menos frecuentemente genéticas o debidas a ECM (*Sedel et al. 2007*). De interés para el presente estudio, en el diagnóstico diferencial del paciente con espasticidad, se resalta el término emergente “síndrome parkinsoniano-piramidal”, que se

define por la combinación de parkinsonismo y signos piramidales, consistentes en hiperreflexia, reflejo plantar extensor y espasticidad. Puede deberse a múltiples causas, varias de ellas hereditarias, entre ellas la AD-GTPCHD. Se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Causas del síndrome parkinsoniano-piramidal.

PE complejas	Representa un grupo complejo y heterogéneo de entidades que cursan con PE y asocian anomalías neurológicas o sistémicas adicionales, tales como ataxia, discapacidad intelectual, epilepsia, neuropatía, alteraciones visuales o alteraciones cutáneas. Entre ellas, destacan las debidas a mutaciones en <i>SPG11</i> , <i>SPG15</i> , <i>SPG10</i> y <i>KIF5A</i> .
Parkinsonismo y PE de inicio juvenil	Se asocia con genes <i>ATP13A2</i> , <i>PLA2G6</i> , <i>FBXO7</i> , <i>DNAJC6</i> , <i>SNCA</i> , <i>ATP6AP2</i> , <i>PANK2</i> , <i>WDR45</i> y <i>FTL</i> .
ECM	Se debe sospechar ante un paciente con PE sin daño estructural cerebromedular que lo justifique, curso progresivo o se acompañe de otros signos de deterioro neurológico. En esta situación, no deben descuidarse las entidades tratables. Entre los ECM destacan: enfermedad de Wilson, enfermedad del transportador de manganeso, xantomatosis cerebrotendinosa, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Zellweger, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, ceroidlipofuscinosis, gangliosidosis tipos 1 a 3, enfermedad de Segawa, enfermedades mitocondriales, síndrome de deficiencia del transportador de la dopamina, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, entre otras (<i>Tranchant et al. 2017</i>).

ECM = Errores congénitos del metabolismo; PE = paraparesia espástica

2.4. Deficiencia de guanosina trifosfato ciclohidrolasa 1 de herencia autosómica dominante (enfermedad de Segawa)

Concepto clásico y concepto actual

El concepto clásico de la enfermedad se corresponde a la distonía dopa-sensible (DSD) siendo la enfermedad debida al defecto genético en *GCHI* la causa más común de DSD (*Segawa et al. 1976*). Sin embargo no es la única causa por lo que no es adecuado correlacionar exactamente DSD con AD-GTPCHD ya que se soslayarían otras causas de DSD. Las distonías genéticas que cursan como DSD obedecen a diferentes causas:

- Deficiencia autosómica dominante de GTPCH-1 (AD-GTPCHD) (DYT5a)
- Otras formas de deficiencia de BH4
 - Deficiencia autosómica recesiva de GTPCH-1
 - Deficiencia de 6-piruvil-tetrahidropterina sintasa (6PTPS)
 - Deficiencia de dihidropteridina reductasa (DHPR)
- Deficiencia de SR
- Deficiencia de TH (DYT5b)

Además ciertas distonías secundarias y el parkinsonismo juvenil (relacionado con el gen *PARKIN*) clínicamente pueden ser muy similares. De este modo, actualmente se puede asimilar síndrome de Segawa a la DSD de manera genérica y el concepto actual de la enfermedad de Segawa se ajustaría a la entidad debida a variantes en heterocigosis en el gen *GCHI*.

La AD-GTPCHD o enfermedad de Segawa se refiere a la enfermedad monogénica debida a alteraciones en el gen *GCHI* que condiciona una deficiencia enzimática de la guanosina trifosfato ciclohidrolasa I (GTPCH-1) involucrada en la síntesis de NT, en la vía dopaminérgica y serotoninérgica. Este ECM del metabolismo de los NT se conoce de distintas maneras:

1. Síndrome de Segawa autosómico dominante
2. Deficiencia de GTPCH-1 autosómica dominante (AD-GTPCHD)
3. DYT5a
4. OMIM 128230

La primera descripción de la enfermedad la realizó el Dr. Masaya Segawa en 1971 como una enfermedad hereditaria progresiva de los ganglios basales con una marcada fluctuación diurna (Segawa et al. 1971). En ella describió dos pacientes pediátricos emparentados con clínica distónica que mejoraba tras el sueño y respondía de manera marcada a L-Dopa. Fue en 1976 cuando en su artículo: “*Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation*”, definió brillantemente el fenotipo que había reconocido (Segawa et al. 1976). Fueron Nygaard et al. quienes acuñaron el término de DSD (Nygaard et al. 1988). Inicialmente se sugirió la deficiencia de la enzima TH en el terminal de la neurona nigroestriatal dopaminérgica como la causa de esta enfermedad pero posteriormente se reveló que se debía a la deficiencia parcial de BH4 causada por mutaciones en el gen *GCHI* (Ichinose et al. 1994).

Fisiopatología

Los sujetos heterocigotos con mutaciones/deleciones de *GCHI* pueden desarrollar la enfermedad debido a la deficiencia de BH4, que conduce a una disminución de la biosíntesis de dopamina y serotonina. En la figura 2 puede observarse que un déficit de la enzima GTPCH-1 puede condicionar una menor concentración de BH4. A su vez, el déficit de BH4 afecta al paso de fenilalanina a tirosina, así como de tirosina a L-Dopa porque BH4 es cofactor tanto de PAH, TH como triptófano-hidroxilasa. Entre los catabolitos derivados de la cascada metabólica de la síntesis de BH4, se encuentran la neopterinina (NP), biopterina (BP) y sepiapterina, metabolitos finales inactivos, pero de interés para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con los NT por ser medibles en diferentes muestras biológicas.

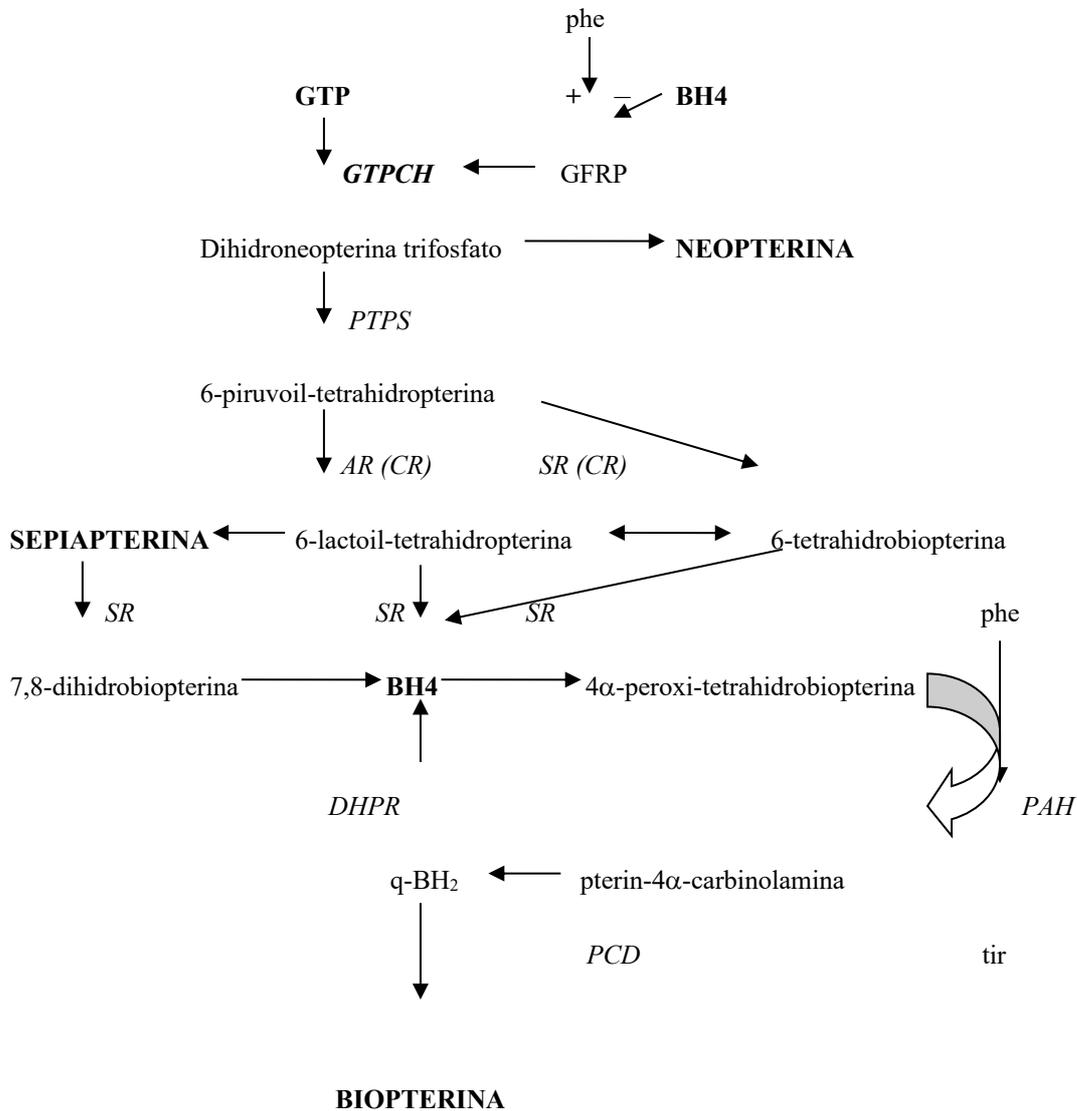


Figura 2. Metabolismo de las pterinas. GTP: guanosina trifosfato; GTPCH: guanosina trifosfato ciclohidrolasa 1; GFRP: GTPCH proteína reguladora de retrocontrol; PTPS: 6-piruvoil-tetrahydropterina sintasa; AR: aldosa reductasa; CR: carbonil reductasa; SR: sepiapterina reductasa; BH4: tetrahydrobiopterina; DHPR: dihidropteridina reductasa; phe: fenilalanina; tir: tirosina; q-BH2: quininoide dihidrobiopterina; PAH: fenilalanina hidroxilasa; PCD: pterin-4 α -carbinolamina deshidratasa. (Tomado de Tesis doctoral Eduardo López-Laso 2010)

Características epidemiológicas

Siendo una enfermedad rara, es difícil establecer de manera exacta una prevalencia que se estima en 0,5 por millón en AD-GTPCHD (Nygaard *et al.* 1991). La enfermedad tiene un claro predominio femenino por su mayor penetrancia, siendo de hasta el 87% en

mujeres y 35% en varones. Para el Dr. Segawa, el marcado predominio femenino podría depender de una diferencia de género determinada genéticamente de la neurona DA84 (Segawa et al. 2003).

Características clínicas

En la literatura, la latencia promedio hasta el diagnóstico es de 13 años (Tadic et al. 2012). Esto es importante porque AD-GTPCHD es una condición eminentemente tratable.

El fenotipo clásico de la enfermedad se presenta típicamente durante la primera década de la vida con distonía de miembros inferiores con fluctuaciones diurnas y puede progresar a distonía multifocal o generalizada y parkinsonismo. En la segunda década son frecuentes la distonía y el temblor de las extremidades superiores, y en la edad adulta predomina el parkinsonismo. La distonía frena su progresión en la segunda-tercera década de la vida estabilizándose (Segawa et al. 2003).

Es conocido que la enfermedad muestra un amplio espectro fenotípico. Así, muestra de esta heterogeneidad clínica son los fenotipos atípicos que se han descrito: calambre del escribiente, distonías inducidas por ejercicio, distonía mioclónica, disfunción cerebelosa, retraso motor en la primera infancia y el síndrome rígido-hipocinético infantil (López-Laso et al. 2007; Wijemanne et al. 2015; Segawa et al. 2008). Esta heterogeneidad clínica se produce también a nivel intrafamiliar, es decir, con la misma variante genética en la misma unidad familiar.

Se han publicado varios trabajos acerca de los síntomas no motores relacionados con la AD-GTPCHD (Van Hove et al. 2006; López-Laso et al. 2011; Peall et al. 2015; Brüggemann et al. 2014). Entre ellos destacan los síntomas psiquiátricos, especialmente depresión, trastorno obsesivo-compulsivo y ansiedad. Se ha descrito también la repercusión con trastornos del sueño (Van Hove et al. 2006; López-Laso et al. 2011). En el estudio sistemático que realizó nuestro grupo incluyendo 7 adultos y 7 niños con la enfermedad se encontró que seis de los adultos y tres niños presentaban puntajes de cociente intelectual (CI) límite o discapacidad intelectual leve (López-Laso et al. 2011).

Diagnóstico clínico, bioquímico y genético

Hace ya unas décadas, el diagnóstico de la enfermedad de Segawa se fundamentaba en la respuesta terapéutica a L-Dopa en un paciente con una distonía primaria compatible. Cuando la respuesta era satisfactoria se alcanzaba el diagnóstico clínico, considerado entonces suficiente para realizar el seguimiento del paciente sin plantearse cuestiones como el diagnóstico diferencial con otras entidades o la heredabilidad de esta entidad.

La aproximación diagnóstica se puede realizar a través de diferentes niveles de evaluación:

- *Primer nivel, diagnóstico clínico:*

Mediante una detallada historia clínica incluyendo antecedentes familiares de 3 generaciones y antecedentes personales, junto a una minuciosa exploración física se puede determinar el fenotipo clínico.

- *Segundo nivel, neuroimagen*

El objetivo es diferenciar los trastornos primarios y sintomáticos. Ante un fenotipo distónico, SRHI o PE deben plantearse pruebas de imagen que incluya el cerebro y/o la médula espinal.

- *Tercer nivel, diagnóstico bioquímico:*

En este nivel se puede plantear la determinación de NT y pterinas en LCR (prueba invasiva que requiere sedación en el niño y un laboratorio experto). Una prueba útil sería la sobrecarga de fenilalanina por ser inocua, rápida, económica y sensible (*Hyland et al.1997*). En desuso actualmente por su complejidad puede determinarse la actividad enzimática en cultivo de fibroblastos obtenidos a partir de una biopsia de piel.

- *Cuarto nivel, diagnóstico molecular:*

Cuando el fenotipo clínico, las pruebas previas o el ensayo terapéutico nos dirigen a la sospecha de AD-GTPCHD debe completarse el estudio genético mediante secuenciación y si ésta es negativa completar con *Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)*.

El objetivo actualmente es el diagnóstico molecular aunque no se alcanza en todos los casos. En los casos con alta sospecha clínica o antecedentes familiares positivos, pueden obviarse pruebas intermedias y realizar directamente el estudio molecular. Existe una gran heterogeneidad alélica y, hasta la fecha, se han identificado 270 mutaciones diferentes que causan AD-GTPCHD en el gen *GCHI* (HGMD Professional 2020.4). Como alternativa en casos en que no se llega a obtener confirmación genética, se plantea el diagnóstico bioquímico mediante pruebas bioquímicas en LCR o sobrecarga de fenilalanina.

Dada la gran variabilidad fenotípica asociada a algunas mutaciones y el gran número de variantes patogénicas en *GCHI* asociadas a la enfermedad, la correlación fenotipo-genotipo no está actualmente establecida. No hay publicaciones acerca de esta correlación, salvo Wu-Chou *et al.* (Chou *et al.* 2010) que identificaron una gran delección heterocigótica de los exones 1-3 en 3 familias en una población de DSD taiwanesa, aparentemente con mayor penetrancia y asociada a una distonía multifocal en varones adultos.

Tratamiento. Evolución a largo plazo

Los pacientes con AD-GTPCHD responden en su mayoría a dosis no elevadas de L-Dopa, habitualmente desde las primeras semanas de tratamiento y con una respuesta que suele ser excelente y mantenida en el tiempo. Se recomienda iniciar el tratamiento con una dosis de L-Dopa de 1mg/Kg/día distribuida tres veces al día, junto a un fármaco inhibidor de la descarboxilación periférica como carbidopa (1:4) o benserazida, para titular la dosis de manera lenta y progresiva hasta la desaparición de los síntomas. En la guía clínica de consenso para el diagnóstico y tratamiento de las deficiencias de BH4 se recomendaba una dosis objetivo para la enfermedad de Segawa de 3-7 mg/kg/día, a diferencia de otras deficiencias de BH4 que requieren dosis más elevadas (Opladen *et al.* 2020). Este sencillo tratamiento sustitutivo es eficaz en la mayoría de pacientes pero se describen casos cuya respuesta no es del todo satisfactoria. Hay síntomas motores no respondedores a L-Dopa o al menos más refractarios que requieren dosis más altas como el calambre del escribiente. Exceptuando estos síntomas distónicos que puede ser más resistentes, la

ausencia de respuesta a dosis altas debe hacer considerar otros diagnósticos alternativos. Ocasionalmente se ha descrito el uso de agonistas dopaminérgicos y fármacos anticolinérgicos como el trihexifenidilo (*Jarman et al. 1997; López-Laso et al. 2012*). Se han empleado fármacos para el manejo sintomático de los hallazgos no motores, de modo que se han utilizado inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (ISRS) para los cuadros ansiosos-depresivos o melatonina para el insomnio (*Van Hove et al 2006*). Pocas publicaciones contienen información explícita sobre las respuestas al tratamiento a largo plazo y los síntomas que no responden a L-Dopa/inhibidor DC (*Trender-Gerhard et al. 2009; Tadic et al. 2012; Hwang et al. 2001*).

Investigación de marcadores biológicos periféricos

Existen escasas publicaciones acerca de biomarcadores útiles. *Leuzzi et al.* en 2002 describieron prolactinemia elevada en un paciente con una distonía mioclónica asociada a una mutación en *GCHI* (*Leuzzi et al. 2002*) mientras que *Furukawa et al.* la encontraron normal en 5 sujetos afectados de AD-GTPCHD (*Furukawa et al. 2003*). Posteriormente *Leuzzi et al.* analizaron las pterinas en orina en 11 pacientes con AD-GTPCHD y las compararon con 90 controles encontrando que la NP se encontraba significativamente reducida en los sujetos con mutación en el gen *GCHI* menores de 15 años, y tanto la NP como la BP en los mayores de 15 años (*Leuzzi et al. 2012*).

3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

El grupo de investigación CIBERER (Ciber Rare Diseases) que coordina el Dr. López-Laso en el Hospital Universitario Reina Sofía ha publicado varios artículos acerca de la AD-GTPCHD. Se realizó una aproximación a la enfermedad profundizándose en distintos aspectos clínicos y genéticos: la detección de una posible mutación fundadora del gen *GCHI* en la provincia de Córdoba (España) y a través de ello la descripción clínica de una amplia serie de pacientes (López-Laso *et al.* 2009), la descripción de un nuevo fenotipo clínico asociado a la enfermedad previamente no descrito, conocido como síndrome rígido-hipocinético infantil (López-Laso *et al.* 2007), el estudio sistemático de síntomas no motores (López-Laso *et al.* 2011), experiencias en complicaciones terapéuticas (López-Laso *et al.* 2012) e investigación en pruebas de laboratorio (López-Laso *et al.* 2006).

Dicha experiencia en la enfermedad de Segawa impulsa al estudio de las características epidemiológicas, clínicas y genéticas de AD-GTPCHD en nuestro ámbito. Nuestro grupo de investigación se ha comprometido a elevar el índice de sospecha de AD-GTPCHD de los profesionales, especialmente los dedicados a los trastornos del movimiento, y desarrollar el conocimiento del panorama genético en nuestra región y en todo el país. Es fundamental profundizar en el conocimiento de la historia natural de la enfermedad desde el punto de vista clínico y de sus causas genéticas ya que esto permitirá optimizar el reconocimiento de la enfermedad en sus formas atípicas, perfeccionar los instrumentos diagnósticos, ahondar en la sintomatología no respondedora a las terapias conocidas y reconocer necesidades no satisfechas de los pacientes que puedan evidenciar la conveniencia de investigar acerca de nuevos tratamientos.

La hipótesis que se plantea en este trabajo de investigación es que debido al efecto fundador previamente demostrado en Córdoba (López-Laso *et al.* 2009), probablemente haya más individuos afectados por la mutación fundadora en esta provincia o en regiones cercanas y es posible que la prevalencia de la enfermedad sea superior en nuestro país a otras regiones. Sería muy interesante, por tanto, realizar una aproximación a la realidad epidemiológica de la enfermedad en nuestra región y en nuestro país con la colaboración

de neuropediatras y neurólogos de los principales hospitales del Sistema Nacional de Salud. Esta iniciativa puede servir para incrementar el índice de sospecha ante esta enfermedad en nuestro medio, lo que podría generar nuevos diagnósticos. Es posible que de esta manera se reúna una serie de casos excepcional y que a través de ello podamos mejorar la caracterización fenotípica y genotípica de la enfermedad. Por otro lado, dado que el Hospital Universitario Reina Sofía es un observatorio privilegiado para el estudio de la AD-GTPCHD es posible que se puedan realizar estudios bioquímicos de marcadores biológicos en una serie de pacientes, como las pterinas en sangre periférica y orina, utilizados para el diagnóstico de otros errores congénitos del metabolismo de la tetrahydrobiopterina aunque previamente no empleados para el estudio de esta enfermedad. Ello podría ser de utilidad para el diagnóstico bioquímico de la enfermedad, ya que es conocido que la rentabilidad del diagnóstico molecular no es del 100% en los pacientes con AD-GTPCHD, y de esa forma convertirse en una herramienta sencilla y no invasiva, a diferencia de la punción lumbar, para confirmar desde el punto de vista bioquímico sospechas clínicas que no pueden ser confirmadas con los estudios genéticos disponibles actualmente.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo principal

- Realizar una aproximación a la epidemiología genética de la enfermedad de Segawa autosómica dominante en España, conocer si la mutación fundadora está presente en otras regiones geográficas aparte de en Córdoba y aproximarnos a una estimación de la prevalencia de la enfermedad en España. A través de ello, describir de manera sistemática las características clínicas y genéticas de una serie de casos con diagnóstico genético de la enfermedad de Segawa.

4.2. Objetivos secundarios

- Conocer las otras mutaciones causantes de la enfermedad en España, y si se encuentran mutaciones previamente no descritas en la literatura. Analizar *in silico* la repercusión de las variantes genéticas en la estructura y la función de la proteína GTPCH-1.
- Analizar una posible correlación fenotipo-genotipo en los pacientes con diagnóstico molecular, que permitirá una mejora del conocimiento y caracterización de la enfermedad incluyendo el análisis de fenotipos motores atípicos, la respuesta al tratamiento y la presencia de síntomas no motores.
- Estudiar la relación de la enfermedad con la enfermedad de Parkinson, investigando qué familias afectadas por la enfermedad tienen antecedentes de la enfermedad de Parkinson, y si los afectados por esa enfermedad fueron estudiados para descartar la enfermedad de Segawa.
- Evaluar la determinación de pterinas en orina y en sangre seca en pacientes con enfermedad de Segawa como posible biomarcador periférico para el diagnóstico bioquímico de la enfermedad.
- Analizar la prolactina sérica como posible biomarcador de seguimiento de los

pacientes con enfermedad de Segawa.

- Participar en el registro internacional de pacientes con enfermedades de los neurotransmisores (iNTD), entre las que se encuentra la distonía dopa-sensible, para avanzar en el conocimiento y coordinación en el manejo de dichas enfermedades.

5. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Métodos y diseño experimental

Con el objetivo principal de realizar una descripción clínica y genética de manera sistemática de una serie de casos, se realizó un estudio observacional transversal y retrospectivo en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba entre los años 2010 y 2020. La información de los sujetos con AD-GTPCHD se recopiló mediante una encuesta enviada a varias sociedades científicas a nivel nacional: Sociedad Española de Neurología Pediátrica (SENEP), Asociación Española de Errores Congénitos del Metabolismo (AECOM) y Sociedad Española de Neurología (SEN). La propuesta de participación en el trabajo se dirigió a los especialistas españoles, tanto neuropediatras como neurólogos, involucrados en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con trastornos del movimiento.

De este modo, participaron en el estudio las siguientes Unidades y Departamentos:

- Unidad de Neurología Pediátrica, Unidad de Gestión Clínica de Pediatría, Hospital Universitario Reina Sofía, IMIBIC y CIBERER, Córdoba, España.
- Unidad de Neurometabolismo y Laboratorio de Metabolismo Sináptico, Servicio de Neurología, Institut Pediàtric de Recerca, Hospital Sant Joan de Déu y MetabERN, 08950, Barcelona, Cataluña, España.
- Instituto de Investigaciones Biomédicas (INIBIC), Hospital Clínico universitario, A Coruña.
- Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Departamento de Bioquímica Clínica, Barcelona, España.
- Unidad de Neurología Pediátrica, Unidad de Gestión Clínica de Pediatría, Hospital Regional Universitario de Málaga, España.
- Unidad de Neurología Pediátrica, Unidad de Gestión Clínica de Pediatría, Hospital Universitario Torrecárdenas, Almería, España.

- Servicio de Neurología. Hospital Clínico Universitario de Valladolid, España.
- Servicio de Pediatría, Hospital General de Elda, Alicante, España.
- Servicio de Pediatría, Hospital Infanta Leonor, Madrid, España.
- Servicio de Neurología. Hospital Universitario de Donostia. Instituto de Salud Biodonostia, San Sebastián, España.
- Unidad de Neurología Pediátrica, Servicio de Pediatría, Hospital Niño Jesús y CIBERER, Madrid, España.
- Servicio de Neurología. Hospital Clínic de Barcelona, España. Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) (CB06 / 05/0018-ISCI) ERN-NRD.
- Servicio de Neurología. Hospital Universitario de Cruces, Bilbao, España.
- Servicio de Neurología y Grupo de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas. Campus Universitario Vall D'Hebron.
- Unidad de Trastornos del Movimiento, Servicio de Neurología y Neurofisiología Clínica, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío / CSIC / Universidad de Sevilla, Sevilla, España. CIBERNED, España
- Servicio de Neuropatología, Hospital Universitario Germans Triás i Pujol, Badalona, Barcelona, España.

5.2. Métodos de evaluación clínica

Se registraron las siguientes variables:

- Género: variable cualitativa nominal dicotómica: Hombre vs Mujer.
- Edad actual: variable cuantitativa continua, expresada en años.
- Antecedentes familiares de EP: variable cualitativa nominal dicotómica: Sí vs No.

- Antecedentes familiares de AD-GTPCHD: variable cualitativa nominal dicotómica: Sí vs No. Además, se recogieron los árboles genealógicos incluyendo 3 generaciones de los sujetos incluidos en estudio.
- Penetrancia: variable cualitativa nominal dicotómica: Sintomático vs Asintomático. Se consideró sintomático si el sujeto presentaba síntomas y signos de distonía o parkinsonismo u otros signos o síntomas sugestivos de AD-GTPCHD. Asintomático fue considerado aquel sujeto que no presentaba síntomas y signos sugestivos de AD-GTPCHD.
- Edad de inicio de los síntomas: variable cuantitativa continua, expresada en años.
- Edad de diagnóstico molecular: variable cuantitativa continua, expresada en años.
- Latencia diagnóstica: variable cuantitativa continua, expresada en años. Se alcanza de manera indirecta con la diferencia entre la edad de inicio de los síntomas y la edad de diagnóstico molecular.
- Fenotipo clínico: variable cualitativa nominal. La mayoría de los pacientes fueron evaluados sistemáticamente en visitas de seguimiento rutinarias para clasificarlos según este esquema. Se establecieron seis categorías que se describen en la tabla 5 cuyas definiciones se fundamentan en el consenso publicado por Albanese (*Albanese et al. 2013*):

Tabla 5. Categorías de la variable fenotipo clínico en los sujetos con la enfermedad de Segawa.

- D: trastorno del movimiento caracterizado por contracciones musculares sostenidas o intermitentes que provocan movimientos o posturas anormales, a menudo repetitivos, o ambos.
- P: se definió por la presencia de bradicinesia o hipocinesia asociada a uno o más de los siguientes síntomas: rigidez muscular o temblor de reposo a 4-6 Hz o inestabilidad postural no causados por disfunción visual, vestibular, cerebelosa o propioceptiva primarias.
- DP: sujetos que combinan ambos trastornos del movimiento.

- EP: de acuerdo con los criterios de diagnóstico de la Sociedad Internacional de Trastornos del Movimiento y enfermedad de Parkinson (<i>Postuma et al. 2015</i>)
- SRHI: paciente de edad pediátrica con hipo/acinesia asociada a rigidez, sin evidencia de distonía o espasticidad.
- PE: espasticidad bilateral de las extremidades inferiores, hiperreflexia y respuestas plantares extensoras.

D = Distonía; DP = Distonía y parkinsonismo; EP = Enfermedad de Parkinson; P = Parkinsonismo; PE = Paraparesia espástica; SRHI = Síndrome rígido hipocinético infantil

- Descripción de síntomas motores: para describir cada paciente se evaluó la siguiente serie de variables cualitativas nominales dicotómicas (sí vs no):

Tabla 6. Variables síntomas motores y no motores en los casos con la enfermedad de Segawa.

Síntomas motores	Síntomas no motores
Dificultades de la marcha	
Fluctuaciones diurnas	
Distonía focal de miembros inferiores	Disforia
Distonía focal de miembros superiores	Trastornos del sueño
Distonía focal craneocervical	Cociente intelectual límite/Discapacidad intelectual leve
Distonía axial	Demencia
Hemidistonía	
Distonía multifocal	
Distonía generalizada	
Hiperreflexia	

<p>Aquinesia</p> <p>Temblor, que se subdividió en de reposo vs postural/de acción</p> <p>Rigidez de miembros</p> <p>Parkinsonismo</p> <p>Paraplejia espástica</p> <p>Dificultades en el equilibrio</p> <p>Disartria</p> <p>Disfonía</p> <p>Disfagia</p>	
---	--

5.3. Métodos de las pruebas diagnósticas bioquímicas y de imagen

Las variables recogidas en relación a las pruebas diagnósticas bioquímicas y de imagen fueron:

- Determinación de NT y pterinas en LCR: variable cualitativa nominal dicotómica: normal vs patológica. Se recopiló 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y ácido homovanílico (HVA), NP y BP en LCR por HPLC con detección electroquímica y de fluorescencia.
- Actividad enzimática en cultivo de fibroblastos: Según se describe en *López-Laso et al. 2012*.
- Sobrecarga de fenilalanina: Realizado según se expone en *López-Laso et al. 2006*.
- Pterinas en sangre seca y orina: Variable cuantitativa. Se realizó análisis de pterinas en sangre seca y orina de acuerdo con los procedimientos previamente publicados (*Ormazabal et al. 2005*). Las pterinas se oxidaron con dióxido de manganeso y se analizaron por HPLC acoplada a la detección de fluorescencia. La NP y la BP en orina

fueron los metabolitos cuantificados y las concentraciones se refirieron a los valores de creatinina. Se expresaron en “nM” y ajustados a Creatinina en “mmol/molCr”. Para el análisis de pterinas en sangre seca, la extracción se realizó como se informa en Blau *et al.* 2001. La NP se extrajo en HCL y se cuantificó mediante el mismo procedimiento. Las concentraciones de NP y BP se corrigieron mediante los valores de hemoglobina. Se expresaron en “nM” y ajustados a Creatinina en “mmol/grHb”.

- Prolactina: Las determinaciones de prolactina se realizaron mediante quimioluminiscencia en un autoanalizador ADVIA Centaur® XPT de Siemens Healthcare Diagnostics® (Karlsruhe, Alemania). Para ello se emplearon los calibradores y reactivos propios de dicha casa comercial. Al igual que el resto de parámetros bioquímicos que se realizan en el hospital, dicha hormona está sujeta a un control de calidad interno (CCI) diario de Unity Interlaboratory QCNet de Bio-Rad® (Hercules, California, Estados Unidos) y un control de calidad externo (CCE) mensual de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC). Se obtuvieron muestras de sangre después de un ayuno nocturno y de 2,5 a 5 horas después de despertar (el aumento de prolactina relacionado con el sueño no disminuye por completo hasta 1 ó 2 horas, pero su nivel es relativamente estable después) (Frantz. 1979). Los sujetos control para el estudio de pterinas en sangre seca y orina se reclutaron en el Laboratorio de Bioquímica del Hospital Sant Joan de Deu de Barcelona.
- Pruebas de imagen: Variable nominal dicotómica: normal vs patológica. Se recogió la descripción de las pruebas realizadas en los pacientes, registrando resultados de Resonancia magnética y DaTSCAN, técnica de utilizar para la detección de pérdida de neuronas dopaminérgicas a nivel estriatal.

5.4. Métodos de diagnóstico molecular

- Método de análisis molecular: Variable cualitativa nominal dicotómica, estableciéndose dos categorías: Sanger o *Next-Generation-Sequencing* (NGS)
- Variante genética: El método empleado para la extracción de DNA de la sangre

periférica de los pacientes se adecuó a técnicas estándar. Cada uno de los seis exones del gen *GCHI* fue amplificado por PCR. Estos procedimientos se realizaron en diferentes centros hospitalarios involucrados en el estudio previamente descritos.

Estudio del efecto fundador de la mutación p.Q89*

Para las familias A y B se realizó un estudio de haplotipos microsatélite descrito en López-Laso *et al.* 2009. Posteriormente se amplió el estudio incluyendo a la familia D como parte del trabajo de esta tesis. Se seleccionaron 6 marcadores de microsatélites polimórficos:

D14S747 (-0,67 millones de pb aguas arriba de *GCHI*, acceso de GenBank: G09068), D14S281 (-0,16 millones de pb aguas arriba de *GCHI*, acceso de GenBank: Z24282), D14S991 (-0,03 millones de pb aguas arriba de *GCHI*, acceso a GenBank: Z52565), D14S1057 (extremo 30 de *GCHI*, acceso a GenBank: Z51601), D14S1190 (acceso GenBank G11364) y D14S1260 (acceso GenBank G06469) ubicados dentro del gen *GCHI*.

Se realizó amplificación y análisis de manera estandarizada mediante reacciones de PCR multiplex. Como se publicó previamente, ambas reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante el uso de Multiplex PCR MasterMix (Qiagen, Mannheim, Alemania) en un volumen final de 15 μ l, que contenía 100 ng de ADN, 10 pmol de cada cebador (ThermoElectron, Mannheim, Alemania). Un programa estándar de 30 ciclos incluía, después de la desnaturalización inicial a 95° C, un paso de desnaturalización a 95° C durante 30 segundos, procesado a 60° C para MP8 y a 56° C para MP4 durante 1 minuto y extensión a 72° C durante 1 minuto. Los resultados de las reacciones de PCR se analizaron utilizando el software Gene-Scan del equipo AbiPrism 3100 (Applied Biosystems). Se mezclaron dos microlitros de cada producto de reacción de PCR con 1 lL de GeneScan-500 ROX Size Standard (Applied Biosystems, Cheshire, Reino Unido) y 10 l de formamida desionizada, desnaturalizada, y se aplicaron 10 l de la mezcla a un generador GeneScan de 384 pocillos.

Técnicas de aislamiento de RNA y cDNA

El aislamiento del RNA fue llevado a cabo después de tomar 2,5 ml de sangre en un tubo de PAXgene Blood RNA (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland) para el uso de PAXgene Blood RNA Kit 50, v2 (PreAnalytiX). El TRI-Reagent (MRC, Cincinnati, USA) fue usado para aislar el RNA de la sangre de acuerdo al protocolo del fabricante.

Se utilizó un µg de ARN total para la transcripción inversa mediante Ready-to-go™ You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Una reacción "sin RT", utilizando agua en lugar de RT, sirvió como control para la exclusión de la contaminación del ADN genómico.

Análisis de la retención del intrón 5

Para analizar la presencia del intrón 5 que contiene ARNm de *GCHI*, se diseñaron dos conjuntos de pares de cebadores diferentes (tabla 7). En primer lugar, se utilizaron GCH1ex4/5U y GCH1ex5U en combinación con GCH1intr5L en reacciones de PCR estándar para amplificar el extremo 5' del intrón 5, y GCH1intr5U en combinación con GCH1ex6L1 o GCH1ex6L, para amplificar el extremo 3' del intrón 5.

Tabla 7. Cebadores para el estudio de la retención del intrón 5 en las variantes intrónicas de los sujetos con la enfermedad de Segawa.

primer nombre	Primera secuencia 5' --> 5'	posición en NG_008647.1
GCH1ex4/5U	AAG ACT ACA AGT TCA GGA GCG	60.715 - 60.726 and 61.973 - 61.983
GCH1ex5U	TGT AGC AAT CAC GGA AGC CT	62.001 - 62.021
GCH1int5L1	TCA GTT GTG TGG CAT CAC CT	62.144 - 62.163
GCH1int5L2	GCT CAG GGA TGG AAA TCT ACA	62.172 - 62.193
GCH1int5U	CTT GGT AAC TGT GAG CTG AGA	63.580 - 63.600

GCH1ex6L1	CAA CAT TGT GCT GGT CAC AGT	63.728 - 63.748
GCH1ex6L2	TCA GGA ACT CTT CCC GAG TCT	63.771 - 63.791

5.5. Métodos en relación al tratamiento

Las variables recogidas en relación al tratamiento fueron:

- Dosis L-Dopa: variable cualitativa ordinal, estableciéndose tres categorías posibles: dosis baja (≤ 150 mg/día o ≤ 1 mg/kg/día), media (151-350 mg/día o 1-5 mg/kg/día) y alta (> 350 mg/kg/día o > 5 mg/kg/día). Se registraron los datos de manera cuantitativa utilizándose como variable cualitativa para el análisis estadístico.
- Inhibidor de la decarboxilasa periférico asociado a L-Dopa: variable cualitativa, estableciéndose dos categorías: carbidopa o benserazida.
- Respuesta a L-Dopa: variable cualitativa ordinal. Se establecieron categorías según la respuesta al tratamiento percibida por el neurólogo o neuropediatra que completó el cuestionario: Excelente: percibida como resolución completa de signos y síntomas; Satisfactoria: resolución de la mayoría de los signos y síntomas; Subóptima: resolución $< 50\%$ de los signos y síntomas; Deficiente: mejoría clínicamente no significativa o ausencia de respuesta.
- Síntomas no respondedores: descripción de sintomatología que no mejoró tras la instauración de L-Dopa/inhibidor DC a dosis que se consideraron máximas para el médico.
- Efectos adversos: descripción de síntomas considerados efecto adverso según la definición de la OMS: “reacción nociva y no deseada que se presenta tras la administración de un medicamento, a dosis utilizadas habitualmente en la especie humana, para prevenir, diagnosticar o tratar una enfermedad, o para modificar cualquier función biológica”. Esta definición implica una relación de causalidad entre la administración del medicamento y la aparición de la reacción.
- Duración del tratamiento: variable cuantitativa continua, expresada en años.

- Necesidad de otros fármacos: enumeración de los fármacos dirigidos a la remisión de los síntomas relacionados con la enfermedad diferentes a L-Dopa/inhibidor DC empleados por los sujetos del estudio.

En el apartado Anexos, se adjunta la plantilla de recogida de datos.

5.6. Reunión de pacientes y profesionales

Se organizó una reunión para personas afectas y familiares de la enfermedad celebrándose el 2 de febrero de 2019 en el Hospital Universitario Reina Sofía, con el aval del CIBERER y el IMIBIC. También se recibió el apoyo de la asociación Deneu, que aglutina pacientes con ECM de los NT. Para la difusión de la reunión, se contactó con las familias a través de la asociación de pacientes y de los médicos responsables de los afectados por la enfermedad. Estuvo enfocada como una actividad formativa, divulgativa y como punto de encuentro de pacientes y de este modo intercambio de experiencias. De manera paralela, aprovechando la presencia de los sujetos asintentes se facilitó la inclusión en el registro internacional de iNTD. Tras la finalización de la reunión informativa para los asistentes, se tomaron muestras para la investigación de posibles herramientas diagnósticas y de seguimiento de la enfermedad. Se adjunta en el apartado Anexos la noticia difundida por el CIBERER, como la primera reunión en España para personas afectas de la enfermedad de Segawa.

5.7. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (DE) o mediana (rango intercuartílico) para las variables cuantitativas, mientras que las cualitativas se informaron como frecuencias absolutas y relativas. La distribución normal de datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La homogeneidad de las varianzas se estimó mediante la prueba de Levene. Las comparaciones de medias entre grupos en el caso de variables continuas con distribución normal se realizaron con la prueba t de Student para muestras no pareadas, mientras que la prueba U de Mann-Whitney se utilizó para las variables con distribución no normal. Las variables categóricas se evaluaron mediante la prueba de la χ^2 o la prueba exacta de Fisher.

Todas las pruebas fueron de dos colas y se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05. Los datos se analizaron con el "Paquete estadístico para las ciencias sociales" (SPSS para Windows, versión 22.0.0 2010, SPSS Inc, Chicago, IL, EE. UU.).

5.8. Aspectos éticos

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los estándares éticos del comité responsable de experimentación humana (institucional y nacional) y con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2013. El proyecto fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Reina Sofía (Interna código: 1171-N-19). Los procedimientos siguieron la Declaración de Helsinki de 1975 revisada en 2013. Se adjunta en el apartado Anexos la autorización del estudio por el comité de ética.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización epidemiológica

Tras la recogida de datos, se incluyeron en el estudio un total de 80 sujetos, pertenecientes a 24 familias. Todos los pacientes tenían un diagnóstico molecular de AD-GTPCHD con variantes en heterocigosis en el gen *GCH-1*. De los 80 casos, 27 pacientes habían sido previamente descritos en varias publicaciones:

- Seis casos de la familia A y 17 casos de la familia B (*López-Laso et al. 2009*)
- Dos casos de la familia F (*Moreno et al. 2016*)
- Dos casos de la familia I (*Teva-Galán et al. 2011*)

Los 53 restantes fueron descritos por primera vez. En la figura 3 se muestran todos los casos, incluyendo información relacionada con el fenotipo clínico y la variante causante de la enfermedad en las 24 familias.

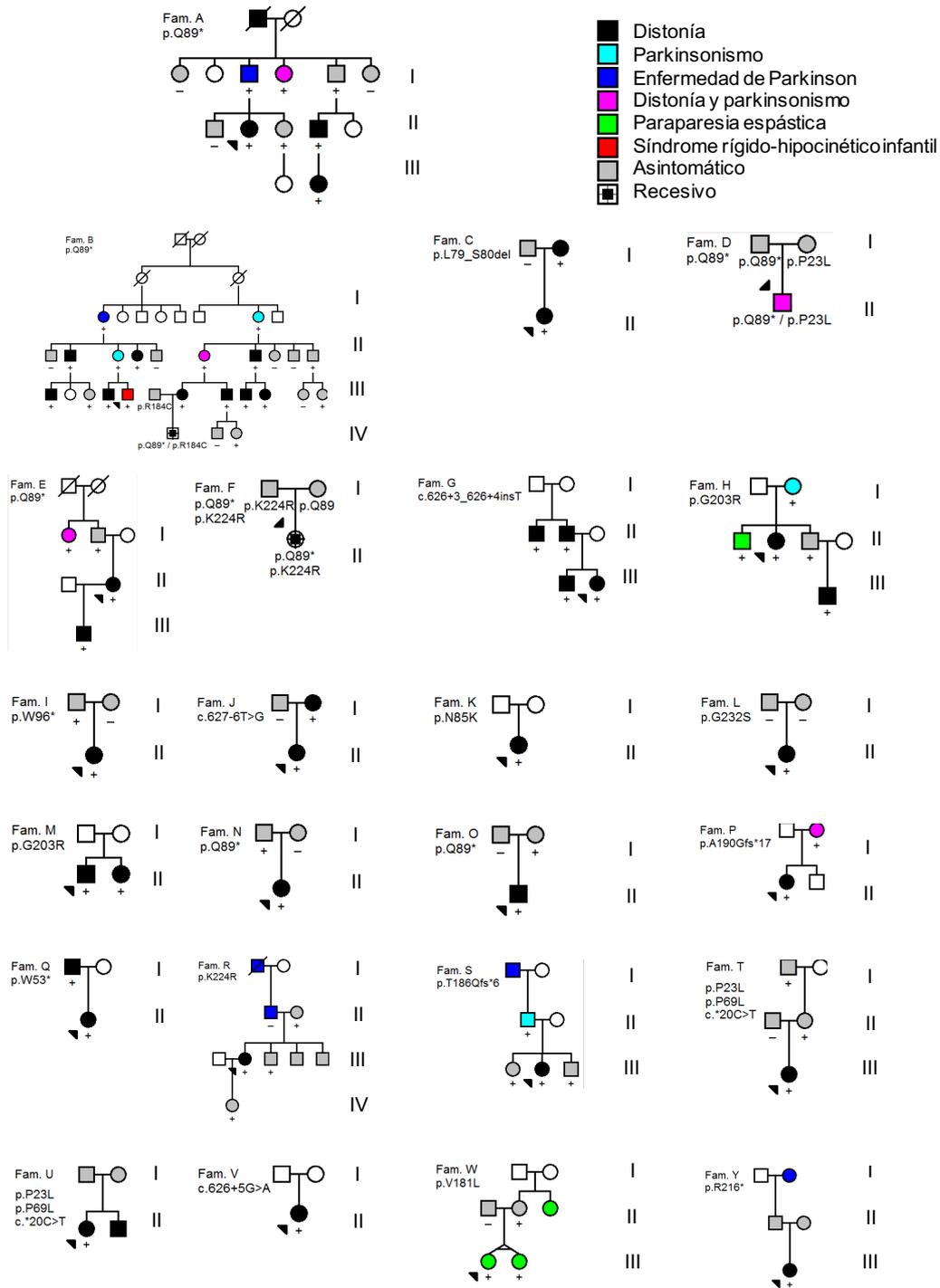


Figura 3. Árboles genealógicos con fenotipo y genética de los sujetos con la enfermedad de Segawa.

Género. Penetrancia

La distribución global de sujetos por género fue 49 mujeres y 31 hombres. Del total de 80 casos, presentaron sintomatología 56 sujetos y 24 permanecieron asintomáticos hasta la finalización del estudio, lo que representa una penetrancia del 70%. Todos los casos asintomáticos fueron detectados a raíz de estudios de segregación familiar. De las 49 mujeres, 36 fueron sintomáticas y 13 asintomáticas, lo que supone una penetrancia en mujeres del 73,4%. De los 31 hombres se detectaron 20 casos sintomáticos y 11 casos asintomáticos, lo que significa 64,5% de sujetos que desarrollaron sintomatología compatible con la enfermedad. El desarrollo de sintomatología fue significativamente más frecuente en mujeres ($p < 0.016$) (Tabla 8).

Tabla 8. Descripción estadística de la penetrancia por género en los sujetos con la enfermedad de Segawa.

sexo		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
	Hombre	19	33,9	33,9	0.016
	Mujer	37	66,1	66,1	
	Total	56	100	100	

6.2. Caracterización clínica

Edad de inicio de sintomatología

La mediana de edad de inicio de síntomas fue de 9 años (RIC 4.5-21). Nueve casos (16%) debutaron antes de los 3 años de edad. La presentación en < 10 años ocurrió en el 55,4% de casos, siendo el grupo más frecuente de manera estadísticamente significativa ($p < 0.001$) (Tabla 9).

Tabla 9. Descripción estadística de la edad de inicio de sintomatología por grupos etarios de los casos con la enfermedad de Segawa.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	0-10 años	31	55,4	58,5	<0.001
	10-20 años	8	14,3	15,1	
	>20 años	14	25	26,4	
	Total	53	94,6	100	
Perdidos		3	5,4		
Total		56	100		

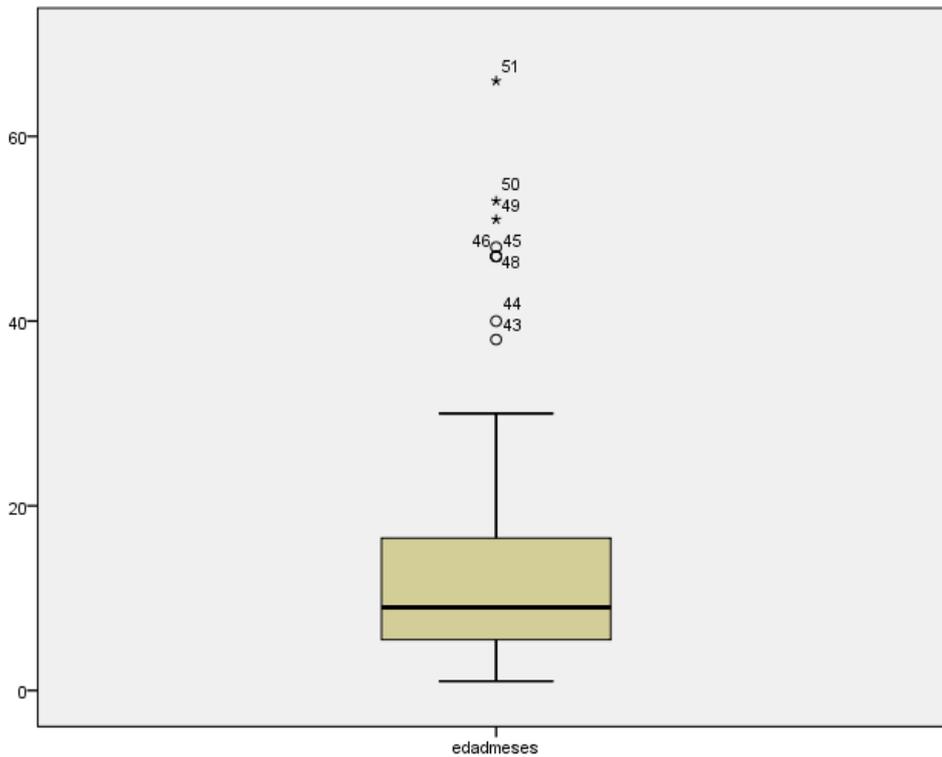


Figura 4a. Diagrama de caja de la distribución por edades de los casos con la enfermedad de Segawa.

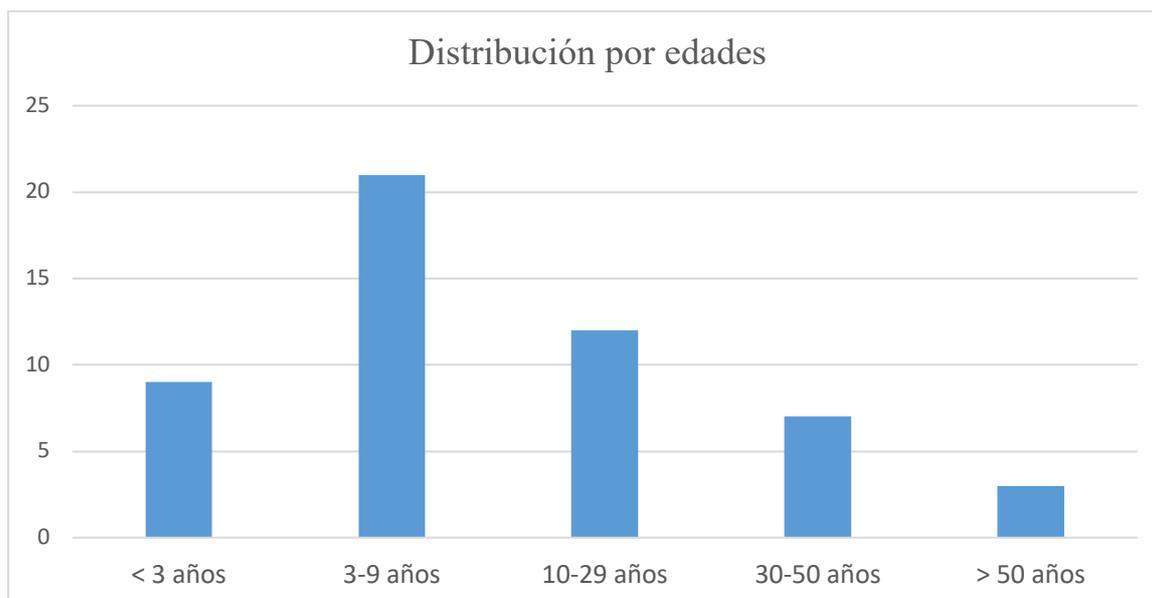


Figura 4b. Diagrama de barras de la distribución por edades de los casos con la enfermedad de Segawa.

Se muestra la media de la edad de inicio de cada fenotipo clínico en la tabla 10.

Tabla 10. Descripción estadística de la edad de inicio por fenotipos de los casos con la enfermedad de Segawa.

Edad de inicio					
	N	Media± DS	Mediana (RIQ)	Mínimo	Máximo
D	40	12,27±12,66	8 (4,25-14)	1	51
P	4	30,4±24,6	34 (5-51,75)	0,6	53
EP	2	56,5±13,43	56	47	66
DP	5	19±16,35	15 (7,5-32,5)	6	47
SRHI	1	0	-	-	-
PE	4	1,3±0,8	1,3 (0,6-2)	0,6	2
Total	56	14,71±16,57	-	-	66

D = Distonía; DP = Distonía y parkinsonismo; EP = Enfermedad de Parkinson; P = Parkinsonismo; PE = Paraparesia espástica; SRHI = Síndrome rígido hipocinético infantil

Latencia diagnóstica

La mediana en años de latencia diagnóstica, es decir, el tiempo que pasó entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico molecular, fue de 5 años (RIC 0-16). Para este cálculo se descartaron los casos familiares para evitar un sesgo de selección. Puesto que en esta enfermedad pueden darse casos de diagnóstico clínico sin confirmación genética (p.ej. casos de diagnóstico clínico y tratamiento antes de que se hubiera descrito el gen causante de la enfermedad), se analizó también la latencia de tratamiento resultando semejante a la latencia diagnóstica.

Dado que se incluyeron casos diagnosticados hace más de 30 años, para evitar un sesgo de dicha latencia relacionado con la inclusión de casos con diagnóstico clínico previos al conocimiento del diagnóstico molecular, se examinó la latencia observada diferenciando tres periodos:

- Antes del 2000 (previo a era de diagnóstico molecular)
- 2000- 2010 (instauración progresiva del diagnóstico molecular)
- Después de 2010 (era del diagnóstico molecular)

Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.001$) en la latencia diagnóstica entre los pacientes diagnosticados antes del año 2000 (cuya mediana de latencia diagnóstica fue de 20 años, RIC 13.2-33.5), frente a los casos entre el 2001 y 2010 (mediana 2 años, RIC 0-4.5) y después de 2010 (< 1 año, RIC 0-3.5) (Tabla 11).

Tabla 11. Descripción estadística de la latencia diagnóstica por periodos de los casos con la enfermedad de Segawa.

Periodos	N	Media	Desviación estándar	Mediana (RIC)	Mínimo	Máximo
< 2000	10	23,4	13,866	20 (13.25-33.5)	6	52
2000-2010	10	2,8	3,49	2 (0-4.5)	0	9
>2010	5	1,4	2,191	0 (0-3.5)	0	5

Inicio de síntomas	Periodos	Sig.	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
<2000	2000-2010	,000	12,07	29,13
	>2010	,000	11,56	32,44
2000-2010	<2000	,000	-29,13	-12,07
	>2010	,784	-9,04	11,84

	Periodos	Percentiles						
		5	10	25	50	75	90	95
Latencia diagnóstica (años)	Antes del 2000	0,9	2	6	17	31	41,9	51,1
	2000-2010	0	0	0	1	3	9	.
	Desde 2011	0	0	0	0	1	.	.

Se analizó la latencia diagnóstica en función de las manifestaciones clínicas de debút, encontrando que los casos sin distonía presentaban una latencia de 19 ± 17.7 años. En la tabla 12 se describe la latencia diagnóstica según el fenotipo clínico.

Tabla 12. Descripción estadística de la latencia diagnóstica según el fenotipo clínico de los casos con la enfermedad de Segawa.

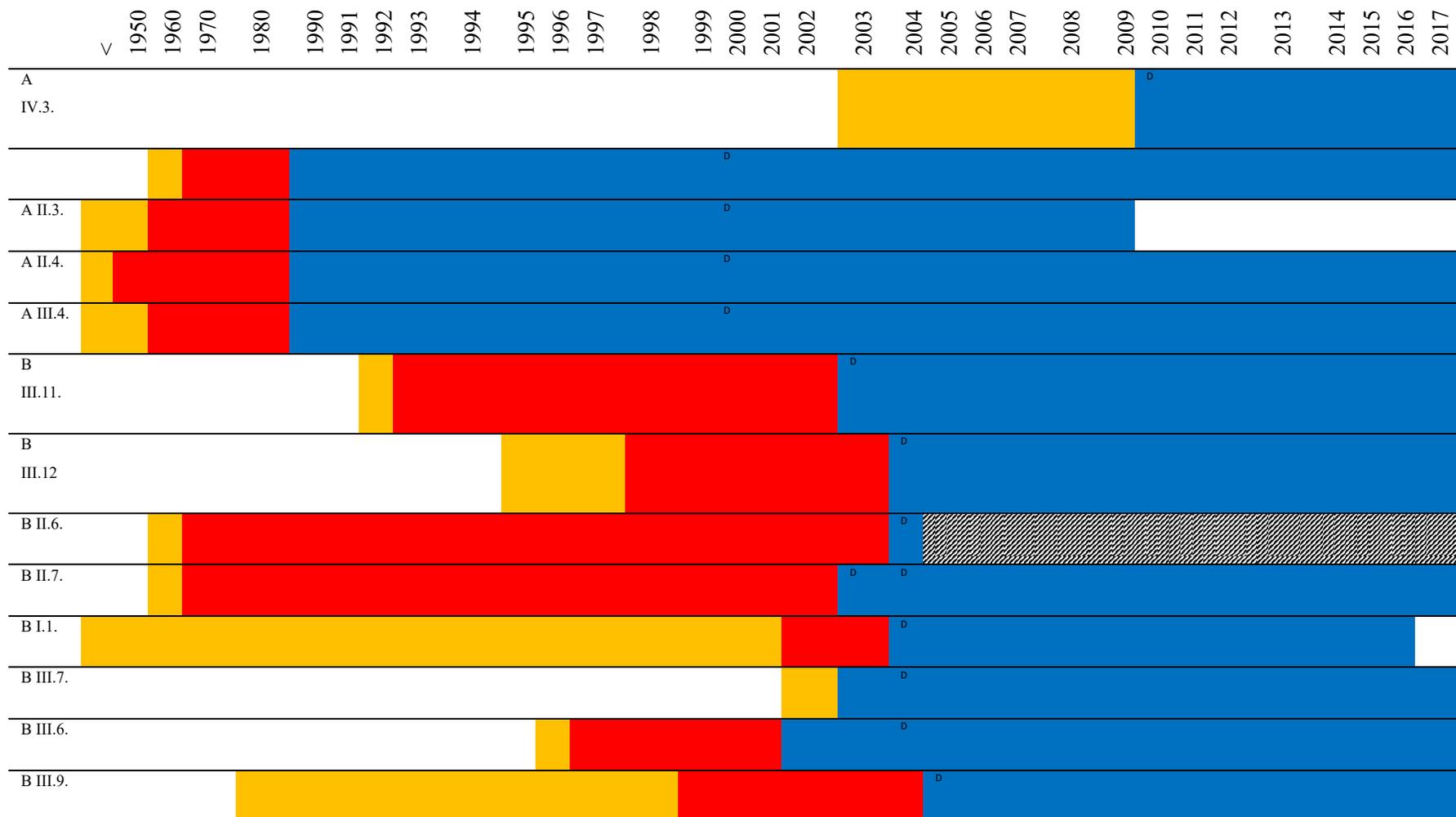
		Válido		Perdidos	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje
Latencia diagnóstica (años)	D	40	100%	0	0%
	P	3	75%	1	25%
	EP	2	100%	0	0%
	DP	5	100%	0	0%
	SRHI	1	100%	0	0%
	PE	2	50,0%	2	50,0%

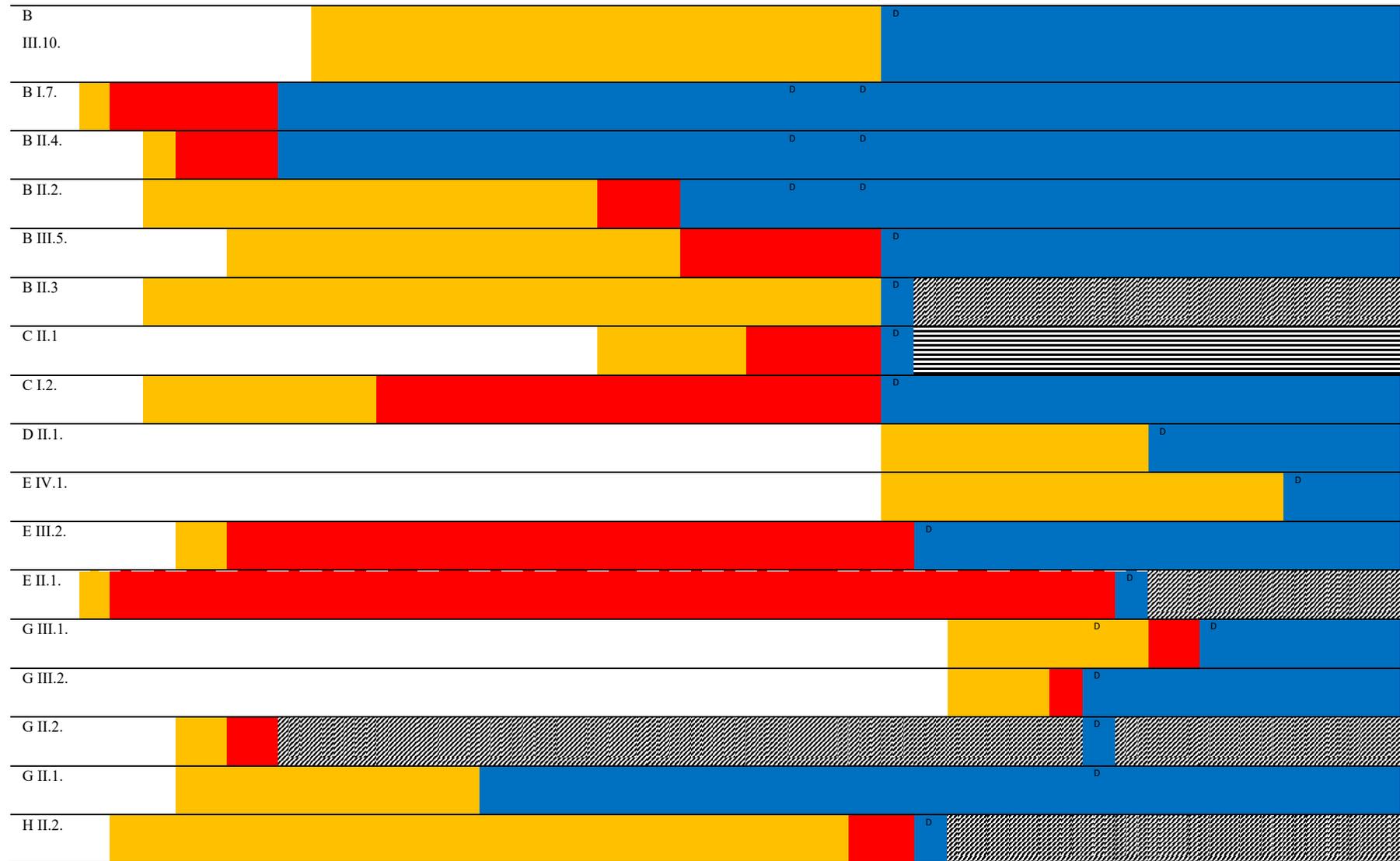
	N	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
D	40	8,17	9,553	4,89	11,45	0	33
P	3	16,67	28,868	-55,04	88,38	0	50
EP	2	13,50	16,263	-132,62	159,62	2	25
DP	5	24,2	23,669	-5,19	53,59	0	52
SRHI	1	0	.	.	.	0	0
PE	2	38	0	38	38	38	38
Total	53	11,08	14,104	7,19	14,96	0	52

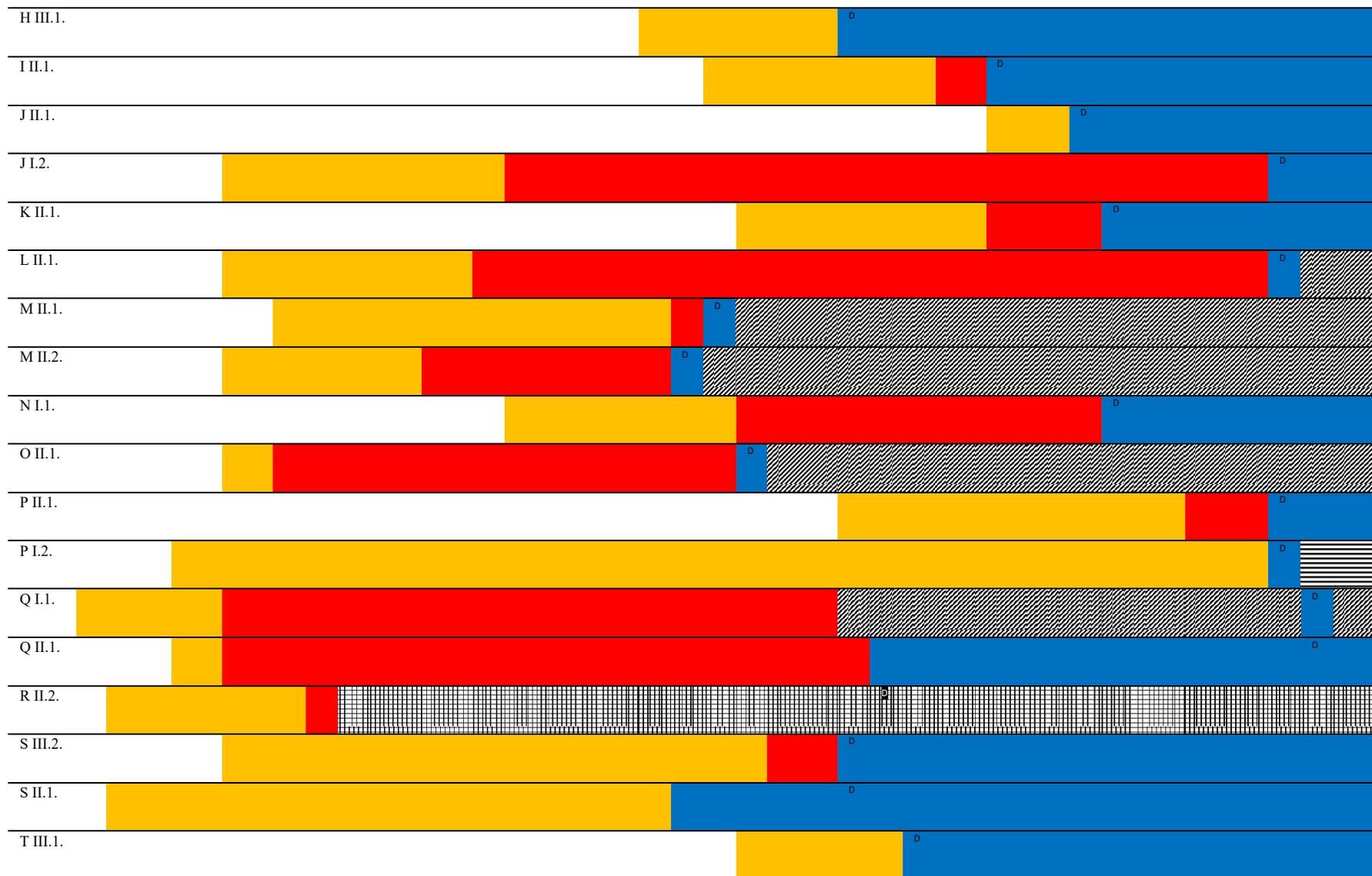
	Clasificación	Percentiles						
		5	10	25	50	75	90	95
Latencia Diagnostica (años)	D	0	0	0	4	16	22	32,2
	P	0	0	0	0	.	.	.
	EP	2	2	2	13,5	.	.	.
	DP	0	0	0	28	46,5	.	.

D = Distonía; DP = Distonía y parkinsonismo; EP = Enfermedad de Parkinson; P = Parkinsonismo; PE = Paraparesia espástica; SRHI = Síndrome rígido hipocinético infantil

A continuación, se muestran de manera ilustrativa las siguientes variables de cada sujeto sintomático: año de nacimiento, año de inicio de síntomas, año de diagnóstico molecular, de inicio de tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC y su respuesta (Figura 5):







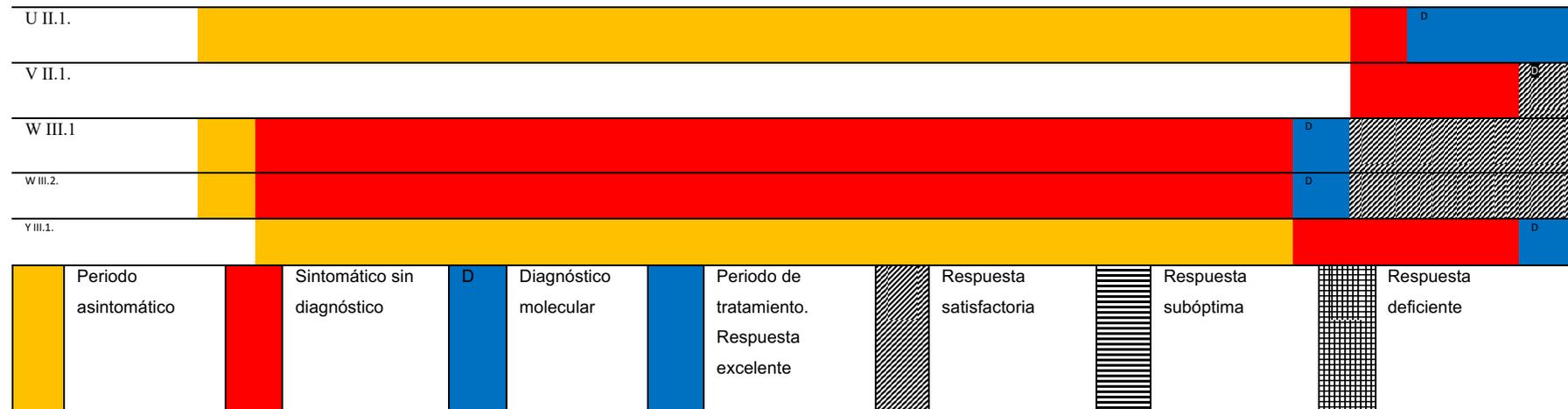


Figura 5. Ilustración de edad de inicio, latencia diagnóstica y tratamiento de los casos con la enfermedad de Segawa.

Síntomas motores. Fluctuaciones diurnas

La distribución de los fenotipos clínicos en la serie fue: D (40 casos), DP (5), P (4), PE (4), EP (2), SRHI (1).

Del total de 56 pacientes sintomáticos, los síntomas y/o signos motores por orden de frecuencia: distonía de miembros inferiores (38/56, 67,8%, $p= 0.008$) y fluctuaciones diurnas (38/56, 67,8%, $p= 0.008$). Otras manifestaciones clínicas motoras fueron: temblor (20/56, 35,7%) siendo el temblor postural o de acción (16/56, 28,5%) más frecuente que el temblor de reposo (4/56, 7,1%) con una $p = 0.007$; rigidez de miembros (14/56, 25%), distonía de miembros superiores (13/56, 23,2%), aquinesia/bradicinesia (13/56, 23,2%), distonía craneocervical (11/56, 19,6%), hiperreflexia (11/56, 19,6%), parkinsonismo (11/56, 19,6%), disfonía (3/56, 5,3%), disartria (1/56, 1,7%), disfagia (1/56, 1,7%). En el estudio estadístico para analizar la frecuencia de los síntomas se aplicó prueba Chi-cuadrado (Tabla 13):

Tabla 13. Descripción estadística de frecuencia de síntomas de los casos con la enfermedad de Segawa.

Fluctuaciones		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	18	32,1	32,1	0.008
	Sí	38	67,9	67,9	
	Total	56	100	100	

Distonía miembros inferiores		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	18	32,1	32,1	0.008
	Sí	38	67,9	67,9	
	Total	56	100	100	

Distonía miembros superiores		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	43	76,8	76,8	0.001
	Sí	13	23,2	23,2	
	Total	56	100	100	

Distonía craneal		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	45	80,4	80,4	<0.001
	Sí	11	19,6	19,6	
	Total	56	100	100	

Temblor		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	36	64,3	64,3	0.033
	Sí	20	35,7	35,7	
	Total	56	100	100	

Tipo de temblor		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	Postural/accion	16	28,6	80	0.007
	Reposo	4	7,1	20	
Perdidos	Sistema	36	64,3		
Total		56	100		

Hiperreflexia		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	45	80,4	80,4	<0.001
	Sí	11	19,6	19,6	
	Total	56	100	100	

Aquinesia		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	43	76,8	76,8	<0.001
	Sí	13	23,2	23,2	
	Total	56	100	100	

Rigidez		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	42	75	75	<0.001
	Sí	14	25	25	
	Total	56	100	100	

Parkinsonismo		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	45	80,4	80,4	<0.001
	Sí	11	19,6	19,6	
	Total	56	100	100	

Disforia		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	49	87,5	87,5	<0.001
	Sí	7	12,5	12,5	
	Total	56	100	100	

Insomnio		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	53	94,6	94,6	<0.001
	Sí	3	5,4	5,4	
	Total	56	100	100	

Disartria		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	55	98,2	98,2	<0.001
	Sí	1	1,8	1,8	
	Total	56	100	100	

Disfonía		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	53	94,6	94,6	<0.001
	Sí	3	5,4	5,4	
	Total	56	100	100	

Disfagia		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	55	98,2	98,2	<0.001
	Sí	1	1,8	1,8	
	Total	56	100	100	

Cociente intelectual límite		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	P Chi-cuadrado
Válido	No	47	83,9	83,9	<0.001
	Sí	9	16,1	16,1	
	Total	56	100	100	

Se realizó estudio estadístico para analizar la frecuencia de los síntomas por grupo de edad al debut clínico. Se observaron diferencias según la edad de inicio de síntomas (Tabla 14):

- Fluctuaciones diurnas: Hay diferencias entre los que debutaron < 10 años (84%) y los > 20 años (43%).
- Distonía de miembros inferiores: Hay diferencias entre < 10 años (87%) y los > 20 años (36%).
- Tipo de temblor: Hay diferencias entre < 10 años y los > 20 años. En los < 10 años es más frecuente el temblor postural y en los mayores de 20 años el de reposo.
- Hiperreflexia: Es más frecuente en los <10 años (26%) frente a los mayores de 20 años que no la presentan.

Tabla 14. Descripción estadística de la sintomatología según la edad de inicio de los casos con la enfermedad de Segawa.

			Grupo edad			P
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Sexo	Hombre	Recuento	11	3	5	0.994
		% dentro de grupo edad	35,5%	37,5%	35,7%	
	Mujer	Recuento	20	5	9	
		% dentro de grupo edad	64,5%	62,5%	64,3%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	

			Grupo edad			p
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Fluctuación	No	Recuento	5	2	8	0.018
		% dentro de grupo edad	16,1%	25%	57,1%	
	Sí	Recuento	26	6	6	
		% dentro de grupo edad	83,9%	75%	42,9%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	
						0-10 vs 10-20: p=0.617
						0-10 vs >20 p=0.011
						10-20 vs >20 p=0.204

			Grupo edad			p	
			0-10 años	10-20 años	>20 años		
Distonía de miembros inferiores	No	Recuento	4	2	9	0.002	0-10 vs 10-20: p=0.583
		% dentro de grupo edad	12,9%	25%	64,3%		
	Sí	Recuento	27	6	5		0-10 vs >20 p=0.001
		% dentro de grupo edad	87,1%	75%	35,7%		
Total		Recuento	31	8	14		10-20 vs >20 p=0.183
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%		

			Grupo edad			p
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Distonía de miembros superiores	No	Recuento	23	4	13	0.07
		% dentro de grupo edad	74,2%	50%	92,9%	
	Sí	Recuento	8	4	1	
		% dentro de grupo edad	25,8%	50%	7,1%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	

			Grupo edad			P
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Distonía craneal	No	Recuento	26	5	11	0.412
		% dentro de grupo edad	83,9%	62,5%	78,6%	
	Sí	Recuento	5	3	3	
		% dentro de grupo edad	16,1%	37,5%	21,4%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	

			Grupo edad			p
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Temblor	No	Recuento	20	5	8	0.894
		% dentro de grupo edad	64,5%	62,5%	57,1%	
	Sí	Recuento	11	3	6	
		% dentro de grupo edad	35,5%	37,5%	42,9%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	

			Grupo edad			p	
			0-10 años	10-20 años	>20 años		
Tipo de temblor	Postural/acción	Recuento	11	2	3	0.04	0-10 vs 10-20: p=0.214
		% dentro de grupo edad	100%	66,7%	50%		
	Reposo	Recuento	0	1	3		0-10 vs >20 p=0.029
		% dentro de grupo edad	0%	33,3%	50%		
Total		Recuento	11	3	6	10-20 vs >20 p= 1	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%		

			Grupo edad			p	
			0-10 años	10-20 años	>20 años		
Hiperreflexia	No	Recuento	23	7	14	0.03	0-10 vs 10-20: p=0.653
		% dentro de grupo edad	74,2%	87,5%	100%		
	Sí	Recuento	8	1	0		0-10 vs >20 p=0.044
		% dentro de grupo edad	25,8%	12,5%	0%		
Total		Recuento	31	8	14	10-20 vs >20 p=0.364	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%		

			Grupo edad			p
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Aquinesia	No	Recuento	26	5	9	0.240
		% dentro de grupo edad	83,9%	62,5%	64,3%	
	Sí	Recuento	5	3	5	
		% dentro de grupo edad	16,1%	37,5%	35,7%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	

			Grupo edad			p
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Rigidez	No	Recuento	23	7	9	0.490
		% dentro de grupo edad	74,2%	87,5%	64,3%	
	Sí	Recuento	8	1	5	
		% dentro de grupo edad	25,8%	12,5%	35,7%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	

			Grupo edad			p
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Parkinsonismo	No	Recuento	26	6	11	0.815
		% dentro de grupo edad	83,9%	75%	78,6%	
	Sí	Recuento	5	2	3	
		% dentro de grupo edad	16,1%	25%	21,4%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	

			Grupo edad			p
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Disforia	No	Recuento	26	8	12	0.481
		% dentro de grupo edad	83,9%	100%	85,7%	
	Sí	Recuento	5	0	2	
		% dentro de grupo edad	16,1%	0%	14,3%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	

			Grupo edad			p
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Insomnio	No	Recuento	29	8	13	0.6
		% dentro de grupo edad	93,5%	100%	92,9%	
	Sí	Recuento	2	0	1	
		% dentro de grupo edad	6,5%	0%	7,1%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	

			Grupo edad			p
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Disartria	No	Recuento	31	7	14	0.143
		% dentro de grupo edad	100%	87,5%	100%	
	Sí	Recuento	0	1	0	
		% dentro de grupo edad	0%	12,5%	0%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	

			Grupo edad			p
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Disfonía	No	Recuento	30	7	13	0.576
		% dentro de grupo edad	96,8%	87,5%	92,9%	
	Sí	Recuento	1	1	1	
		% dentro de grupo edad	3,2%	12,5%	7,1%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	

			Grupo edad			p
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Disfagia	No	Recuento	30	8	14	0.581
		% dentro de grupo edad	96,8%	100%	100%	
	Sí	Recuento	1	0	0	
		% dentro de grupo edad	3,2%	0%	0%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100,%	

			Grupo edad			p
			0-10 años	10-20 años	>20 años	
Cociente intelectual límite	No	Recuento	26	5	13	0.211
		% dentro de grupo edad	83,9%	62,5%	92,9%	
	Sí	Recuento	5	3	1	
		% dentro de grupo edad	16,1%	37,5%	7,1%	
Total		Recuento	31	8	14	
		% dentro de grupo edad	100%	100%	100%	

Se realizó un estudio estadístico para la frecuencia de los síntomas en función del género. Se observó que según el género (Tabla 15): La rigidez se presentó más frecuentemente en varones. La disforia fue más frecuente en mujeres aunque no de manera significativa ($p < 0,082$).

Tabla 15. Descripción estadística de la sintomatología según el género de los casos con la enfermedad de Segawa.

Distribución de edad y sexo			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Grupo de edad	0-10 años	Recuento	11	20	0.994
		% dentro de sexo	57,9%	58,8%	
	10- 20 años	Recuento	3	5	
		% dentro de sexo	15,8%	14,7%	
	>20 años	Recuento	5	9	
		% dentro de sexo	26,3%	26,5%	

			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Fluctuación	No	Recuento	7	11	0.589
		% dentro de sexo	36,8%	29,7%	
	Sí	Recuento	12	26	
		% dentro de sexo	63,2%	70,3%	

			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Distonía miembros inferiores	No	Recuento	6	12	0.948
		% dentro de sexo	31,6%	32,4%	
	Sí	Recuento	13	25	
		% dentro de sexo	68,4%	67,6%	

			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Distonía miembros superiores	No	Recuento	14	29	0.694
		% dentro de sexo	73,7%	78,4%	
	Sí	Recuento	5	8	
		% dentro de sexo	26,3%	21,6%	

			Sexo		Total
			Hombre	Mujer	
Distonía craneal	No	Recuento	14	31	0.368
		% dentro de sexo	73,7%	83,8%	
	Sí	Recuento	5	6	
		% dentro de sexo	26,3%	16,2%	

			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Temblor	No	Recuento	10	26	0,492
		% dentro de sexo	52,6%	70,3%	
	Sí	Recuento	9	11	
		% dentro de sexo	47,4%	29,7%	

			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Tipo temblor	Postural/accion	Recuento	8	8	0.369
		% dentro de sexo	88,9%	72,7%	
	Reposo	Recuento	1	3	
		% dentro de sexo	11,1%	27,3%	

			Sexo		Total
			Hombre	Mujer	
Hiperreflexia	No	Recuento	16	29	0.603
		% dentro de sexo	84,2%	78,4%	
	Sí	Recuento	3	8	
		% dentro de sexo	15,8%	21,6%	

			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Aquinesia	No	Recuento	13	30	0.288
		% dentro de sexo	68,4%	81,1%	
	Sí	Recuento	6	7	
		% dentro de sexo	31,6%	18,9%	

			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Rigidez	No	Recuento	11	31	0.034
		% dentro de sexo	57,9%	83,8%	
	Sí	Recuento	8	6	
		% dentro de sexo	42,1%	16,2%	

			Sexo		P
			Hombre	Mujer	
Parkinsonismo	No	Recuento	13	32	0.107
		% dentro de sexo	68,4%	86,5%	
	Sí	Recuento	6	5	
		% dentro de sexo	31,6%	13,5%	

			Sexo		P
			Hombre	Mujer	
Disforia	No	Recuento	19	30	0.082
		% dentro de sexo	100%	81,1%	
	Sí	Recuento	0	7	
		% dentro de sexo	0%	18,9%	

			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Insomnio	No	Recuento	19	34	0.544
		% dentro de sexo	100%	91,9%	
	Sí	Recuento	0	3	
		% dentro de sexo	0%	8,1%	

			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Disartria	No	Recuento	18	37	0.339
		% dentro de sexo	94,7%	100%	
	Sí	Recuento	1	0	
		% dentro de sexo	5,3%	0%	

			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Disfonía	No	Recuento	18	35	1
		% dentro de sexo	94,7%	94,6%	
	Sí	Recuento	1	2	
		% dentro de sexo	5,3%	5,4%	

			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Disfagia	No	Recuento	18	37	0.339
		% dentro de sexo	94,7%	100%	
	Sí	Recuento	1	0	
		% dentro de sexo	5,3%	0%	

			Sexo		p
			Hombre	Mujer	
Cociente intelectual límite	No	Recuento	15	32	0.47
		% dentro de sexo	78,9%	86,5%	
	Sí	Recuento	4	5	
		% dentro de sexo	21,1%	13,5%	

En la tabla 16 se muestra una descripción detallada de los síntomas incluyendo la información de la exploración antes y después del tratamiento en los casos.

Tabla 16. Descripción detallada de síntomas y signos de los casos con la enfermedad de Segawa.

		Síntomas antes del tratamiento	Hallazgos clínicos a la exploración
AII.2	D	Trastorno de la marcha	Pretratamiento: Pie equino izquierdo; Post-tratamiento: reflejos hiperactivos, dificultades leves en la marcha en tándem
AII.4	D	Dificultad para la marcha de puntas que progresa a dificultad para la marcha, falta de equilibrio y caídas. Rigidez progresiva de piernas. Durante la adolescencia movimientos faciales involuntarios, temblor	Pre-tratamiento: hiperreflexia en miembros inferiores. Rigidez generalizada más severa en miembros inferiores. Rostro enmascarado Posturas distónicas de cuatro miembros. Temblor de mano de acción bilateral. Incapaz de caminar sin ayuda. Hiperlordosis lumbar. Post-tratamiento: eversión leve del pie izquierdo; hiperreflexia leve

		<p>bilateral de manos y asistencia necesaria para caminar durante la tarde.</p>	
AI.3	EP	<p>Temblor de reposo asimétrico</p>	<p>Temblor de reposo asimétrico, bradicinesia y rigidez</p>
AI.4	DP	<p>Trastorno de la marcha, falta de equilibrio y caídas. Cambios en la expresión facial y disartria. Necesidad de dos personas para caminar.</p>	<p>Hipomimia facial. Bradicinesia simétrica bilateral y rigidez con afectación cervical intensa. Temblor de acción en manos moderado bilateral. Distonía axial y de miembros inferiores. Incapaz para la marcha autónoma. Marcha de puntas.</p>
AII.2	D	<p>Marcha de puntas que progresa a dificultades para la marcha, falta de equilibrios y caídas. Rigidez progresiva de miembros inferiores y deformidad de pies; durante la adolescencia movimientos faciales involuntarios, temblor de manos bilateral y necesidad de silla de ruedas a lo largo del día. Fluctuaciones diurnas. Rigidez generalizada si insomnio</p>	<p>Reflejos hiperexcitables en miembros inferiores. Dedo estriatal. Distonía generalizada severa con afectación facial incluso blefaroespasmos. Rigidez generalizada en rueda dentada. Temblor de manos de acción bilateral. Incapaz para caminar sin ayuda a lo largo del día. Hiperlordosis lumbar.</p>

BIII.9	D	Marcha de puntas que progresa a dificultades de la marcha; tendencia a la eversión del pie; equilibrio pobre; temblor de miembros y voz; fluctuación diurna; disfagia	Distonía mayor en miembros inferiores y mayor en lado derecho y bradicinesia; falta de equilibrio; temblor de miembros y voz; hiperlordosis lumbar; hiperreflexia Post-tratamiento: leve bradicinesia en la prueba dedo-dedo, hiperreflexia
BIII.10	D	Eversión del pie	Eversión del pie izquierdo; hiperreflexia Post-tratamiento: hiperreflexia
BII.6	DP	Rigidez y dolor en gemelos al caminar y temblor de miembros y voz por las noches	Distonía de miembros inferiores; temblor postural de mano derecha y voz; hipofonía y leve bradicinesia
BII.7	D	Rigidez progresiva de miembros, dificultad para la marcha; dolor en gemelos tras ejercicio y por las noches; dolor cervical; temblor de miembros y voz	Temblor postural de miembros y voz Post-tratamiento: lentitud para la maniobra dedo-dedo
BI.1	EP	Lentitud y temblor en reposo de miembros superiores	Bradicinesia; rigidez y temblor de reposo
BIII.5	SRHI	Retraso en los hitos motores; lentitud motora y babeo	Rigidez de miembros; bradicinesia; hipomimia facial; babeo; hiperreflexia; dedo estriatal

BIII.4	D	Marcha de puntas que progresa a dificultades en la marcha; pérdida de equilibrio; fluctuaciones diurnas; escoliosis; temblor de manos	Normal
BIII.7	D	Dificultad para caminar, problemas de equilibrio y coordinación; fluctuación diurna; escoliosis	Distonía axial y de miembros superiores; escoliosis
BIII.8	D	Laterocollis leve	Leve laterocollis y elevación de hombro izquierdo; temblor postural de cabeza y miembros superiores
BI.7	P	Temblor de manos	Temblor de reposo mayor en miembros inferiores; bradicinesia leve
BII.4	D	Dificultad para caminar inicialmente, fluctuaciones diurnas; pérdida de la marcha antes de los 20 años; temblor de miembros	Normal
BII.2	D	Retrocollis	Retrocollis
BIII.1	D	Rigidez y dolor de piernas al jugar al fútbol	Torpeza para los movimientos rápidos de pies tras ejercicio

BII.3	P	Rigidez; movimientos involuntarios; trastorno ansioso-depresivo; insomnio	Normal
CII.1	D	Inicialmente laterocollis y escoliosis; temblor de manos, rigidez cervical, fluctuaciones diurnas y finalmente dificultades para la marcha. A los 10 años calambre del escribiente	Laterocollis y elevación de hombro, distonía de mano y pie con leve marcha de puntas; calambre del escribiente
CI.2	D	Temblor de manos	Laterocollis suave y elevación del hombro; temblor de reposo asimétrico de manos
DII.1	DP	Dificultades para caminar, temblor de manos	Distonía y rigidez de miembros; temblor de manos; hiperreflexia
EIII.1	D	Distonía de pie izquierdo con fluctuaciones diurnas	Inversión de pie izquierdo y tendencia a equino
EII.2	D	Dificultades para caminar, temblor de manos; insomnio	Normal
EI.1	DP	Distonía focal; distimia	Parkinsonismo rígido-acinético lateralizado a la izquierda de predominio en miembros inferiores con distonía de pie izquierdo

GIII.1	D	Distonía focal con fluctuaciones diurnas	N/D
GIII.2	D	Distonía focal con fluctuaciones diurnas	N/D
GII.2	D	Distonía de pie	Hemidistonía
GII.1	D	Calambre del escribiente	Calambre del escribiente
HII.2	D	Disfonía espasmódica	Disfonía espasmódica
HIII.1	D	Dificultades para la marcha de puntas, distonía de pie izquierdo	Distonía generalizada, predominio en pie izquierdo
HII.1	PE	Paraparesia espástica	N/D
HI.2	P	N/D	N/D
III.1	D	Distonía pie derecho	Distonía de pie; cociente intelectual límite
JII.1	D	Distonía focal	Distonía focal y segmentaria
JI.2	D	Distonía focal	Distonía de miembros
KII.1	D	Calambre del escribiente y distonía de pie derecho	Hemidistonía
LII.1	D	Trastorno de la marcha que empeora con el nerviosismo; síndrome ansioso	Movimientos atáxico-distónicos asimétricos; postura distónica de pie izquierdo; hiperreflexia
MII.2	D	Distonía de mano y pie	Hemidistonía
MII.1	D	Trastorno de la marcha	Distonía de pie izquierdo
NII.1	D	Trastorno de la marcha	Retrocollis, postura distónica de miembros superiores, genu valgus y trastorno de la marcha

OII.1	D	Pie equino-varo	Temblor de mano derecha con rigidez leve; hemidistonia
PII.1	D	Trastorno de la marcha; distonia oral	Pre-tratamiento: Desviación de la lengua a la derecha, reflejos exaltados. Post-tratamiento: normal
PI.2	DP	Distonia orocervical prolongada asociada a cleboprida; rigidez de miembros inferiores y temblor; distonia de pie derecho al final del día	Bradicinesia e hiperreflexia
QI.1	D	Marcha insegura y distonia de miembros inferiores con fluctuaciones diurnas	Pie equino-varo; reflejos exaltados
QII.1	D	Caídas frecuentes; temblor de manos	Pie equino-varo; reflejos exaltados; base de sustentación amplia
RIII.2	D	Trastorno de la marcha	Hemidistonia izquierda y distonia oral
SIII.2	D	Distonia focal	N/D
SII.1	P	Lentitud motora	Hemiparkinsonismo
TIII.1	D	Distonia focal	N/D
UII.1	D	N/D	Distonia generalizada
VII.1	D	Debilidad de miembros	Movimientos discinéticos
WIII.1	PE	Marcha de puntas; diagnóstico de neurosis durante años	Paraparesia espástica y distonia en miembros inferiores
WIII.2	PE	Marcha de puntas; diagnóstico de neurosis durante años	Paraparesia espástica y distonia en miembros inferiores
WII.3	PE	N/D	N/D

YIII.1	D	Distonía de pie derecho; ansiedad	Distonía de pie derecho
--------	---	-----------------------------------	-------------------------

D = distonía; DP = distonía y parkinsonismo; EP = enfermedad de Parkinson; N/D: no disponible; P = parkinsonismo; PE = paraparesia espástica; SRHI = síndrome hipocinético-rígido infantil.

Síntomas no motores

Del total de 56 pacientes sintomáticos, los síntomas y/o signos no motores por orden de frecuencia fueron: CI límite (9/56); Disforia (7/56); Insomnio (3/56); Demencia (2/56). Se describe la sintomatología no motora en función de los fenotipos clínicos en la Tabla 17.

Tabla 17. Síntomas no motores segregados por fenotipo clínico de los casos con la enfermedad de Segawa.

Fenotipo (casos)	Síntomas no motores (casos)
D (40)	CI límite (7) Disforia (3) Insomnio (2)
P (4)	CI límite (1) Disforia (1) Insomnio (1)
DP (5)	Ci límite (1) Disforia (1)
PE (4)	Disforia (2)
EP (2)	Demencia (2)
SRHI (1)	

D = distonía; DP = distonía y parkinsonismo; EP = enfermedad de Parkinson; P = parkinsonismo; PE = paraparesia espástica; SRHI = síndrome hipocinético-rígido infantil.

En la tabla 18 se detallan las manifestaciones clínicas motoras y no motoras de cada uno de los pacientes del estudio.

Tabla 18. Manifestaciones clínicas motoras y no motoras de los casos con la enfermedad de Segawa.

Sujeto/ Género	Edad de nico (años)	Fluctuaciones diurnas	Dificultades para la marcha	Distonia focal de miembros inferiores/superiores	Distonia craneocervical/axial	Hemidistonia/Multifocal/distonia generalizada	Hiperreflexia	Acinesia/Temblor/Rigidez	Parkinsonismo	Diplejia espástica/Equilibrio pobre	Disforia/Trastornos del sueño	Disartria/Disfonía/Disfagia	Cociente intelectual límite	Diagnóstico clínico
A III.2/F	7	+	+	+/-	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
A II.4/M	5	+	+	+/+	+/+	-/+/+	+	-/P/+	-	-/+	-/-	-/-/-	-	D
A I.3/M	47	-	+	-/-	-/-	-/-/-	-	+/R/+	+	-/-	-/-	-/-/-	-	EP
A I.4/M	18	+	+	+/+	+/+	-/+/-	-	+/P/+	+	-/+	-/-	+/-/-	-	DP
A II.3/F	1	+	+	+/-	+/+	-/-/+	+	-/P/+	-	-/+	-/+	-/-/-	-	D
B III.8/M	1	+	+	+/-	-/+	-/+/-	+	-/P/+	-	-/+	-/-	-/-/+	+	D

B III.9/F	3	-	-	+/-	-/-	-/-/-	+	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
B II.6/F	15	+	+	+/+	-/-	-/+/+	-	+/R/-	+	-/-	-/-	-/+/-	+	DP
B II.7/M	8	+	+	+/+	+/-	-/-/+	-	-/P/+	-	-/+	-/-	-/+/-	+	D
B I.1/F	66	-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	+/R/+	+	-/-	-/-	-/-/-	-	EP
B III.5/M	0	-	-	-/-	-/-	-/-/-	+	+/-/+	+	-/-	-/-	-/-/-	-	SRHI
B III.4/M	1	+	+	+/-	-/+	-/-/-	-	-/P/-	-	-/+	-/-	-/-/-	+	D
B III.7/F	12	+	+	-/+	-/+	-/-/+	-	-/-/-	-	-/+	-/-	-/-/-	+	D
B III.8/M	14	-	-	-/-	+/+	-/-/-	-	-/P/-	/-	-/-	-/-	-/-/-	+	D
B I.7/F	20	-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	+/R/-	+	-/-	-/-	-/-/-	-	P
B II.4/F	7	+	+	+/-	-	-/-/+	-	-/P/-	-	-/-	-/-	-/-/-	+	D
B II.2/M	38	-	-	-	+/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
B III.3/M	14	-	-	+/-	-/-	-/-/-	-	+/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
B II.3/F	48	-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	+/-/+	+	-/-	+/+	-/-/-	+	P

C II.1/F	4	+	+	+/+	+/+	-/-+	-	-/P/-	-	-/+	+/-	-/-/-	-	D
C I.2/F	30	-	-	-/-	+/+	-/-/-	-	-/P/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
D II.1/F	6	+	+	+/+	-/+	-/-+	-	+/P/+	+	-/+	-/-	-/-/-	-	DP
E III.1/M	9	+	+	+/-	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
E II.2/F	9	+	+	+	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/+	-/-/-	-	D
E I.1/F	9	-	+	+/-	-/-	-/-/-	-	+/-/+	+	-/-	+/-	-/-/-	-	DP
G III.1/M	6	+	+	+/-	-/-	-/+/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
G III.2/F	1	+	+	+/-	-/-	-/+/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
G II.2/M	7	+	+	+/-	-/-	+/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
G II.1/M	23	-	-	-/+	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
H II.2/F	47	+	-	-/-	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/+/-	-	D
H III.1/M	5	+	+	+/-	-/+	-/-+	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
H II.1/M	ND	-	+	-/-	-/-	-/-/-	+	-/-/-	-	+/+	-/-	-/-/-	-	PE

HI.2/F	ND	-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	+/-/+	+	-/-	-/-	-/-/-	-	P
II.1/F	7	+	+	+/-	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	+	D
JII.1/F	2	+	+	+/-	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
JI.2/F	12	+	+	+/-	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
KII.1/F	6	+	+	+/+	-/-	+/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
LII.1/F	8	+	+	+/+	-/-	+/-/-	+	-/-/-	-	-/-	+/-	-/-/-	-	D
MII.2/F	11	+	+	+/+	-/-	+/-/-	+	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
MII.1/M	9	+	+	+/-	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
NII.1/F	6	+	+	+/-	-/+	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
OII.1/M	8	+	+	+/+	-/-	+/-/-	-	-P/+	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
PII.1/F	9	+	+	-/-	+/-	-/-/-	-	-P/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
PI.2/F	47	+	+	+/-	+/-	-/+/-	-	+P/+	+	-/-	-/-	-/-/-	-	DP
QI.1/M	40	+	+	+/-	-/-	-/-/-	-	-P/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D

Q II.1/F	2	+	+	+/-	-/-	-/-/-	-	-/P/-	-	-/+	-/-	-/-/-	-	D
R III.2/F	14	+	+	+/-	+/-	+/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
S III.2/F	22	+	+	+/-	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
S II.1/M	53	-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	+/-/+	+	-/-	-/-	-/-/-	-	P
T III.1/F	4	+	+	+/-	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
U II.1/F	51	+	+	+/-	-/+	-/-/+	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
V II.1/F	4	+	-	+/-	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	-/-	-/-/-	-	D
W II.1/F	2	-	+	-/-	-/-	-/-/-	+	-/-/-	-	+/+	+/-	-/-/-	-	PE
W II.2/F	2	-	+	-/-	-/-	-/-/-	+	-/-/-	-	+/+	+/-	-/-/-	-	PE
W I.2/F	ND	-	+	-/-	-/-	-/-/-	+	-/-/-	-	+/+	-/-	-/-/-	-	PE
Y III.1/F	24	+	+	+/-	-/-	-/-/-	-	-/-/-	-	-/-	+/-	-/-/-	-	D

D = distonía; DP = distonía y parkinsonismo; EP = enfermedad de Parkinson; F = femenino; M = masculino; ND = No disponible; P = parkinsonismo; PE = paraparesia espástica; P = temblor postural / de acción; R = temblor en reposo; SRHI = síndrome hipocinético-rígido infantil; + = presente; - = ausente.

Fenotipos clínicos

Fenotipo Distonía

Fue el fenotipo más común, con 40 casos (25 mujeres y 15 varones), con una mediana de edad de inicio de 8 años (RIC 4,25-14). La distonía se localizaba en miembros inferiores (33/40) y menos frecuentemente en miembros superiores y region cervical (12/40) y/o en tronco (11/40). La latencia desde inicio de síntomas a inicio de tratamiento fue de 4,5 años.

Fenotipo Distonía y Parkinsonismo

Se detectaron 5 casos (4 mujeres y un varón). La mediana de edad de inicio fue $19 \pm 16,3$ años. Presentaban por orden de frecuencia: distonía de miembros inferiores (5/5), fluctuaciones diurnas (4), temblor (4, de los cuales 3 postural o de acción y 1 de reposo), bradicinesia (4), rigidez (4), parkinsonismo (3), distonía de miembros superiores (3), distonía craneocervical (2), disartria (1). La latencia diagnóstica en estos casos no fue valorable puesto que fueron casos detectados en el contexto de estudios familiares salvo en un caso en la que la latencia fue menor de un año (diagnóstico realizado en Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba).

Es destacable que un total de 38 pacientes con fenotipo D y DP presentaron fluctuaciones diurnas. No se encontraron casos con fluctuaciones diurnas en pacientes sin distonía. La odds ratio para las fluctuaciones diurnas en los fenotipos con distonía (D y DP) frente a los no-distónicos fue de 17 (IC 95% 4.08-70-76).

Fenotipo Parkinsonismo

Se encontraron 4 casos (3 mujeres y un varón). La edad media de inicio de síntomas fue de $40 \pm 17,78$ años. Presentaron por orden de frecuencia: bradicinesia (4), parkinsonismo (2), rigidez (2) y temblor de reposo (1). No presentaban distonía ni fluctuaciones diurnas. La latencia diagnóstica no fue valorable en estos casos porque fueron casos detectados en el contexto de estudios familiares o no están disponibles.

Fenotipo Paraparesia Espástica

Se describieron 4 casos (todas mujeres). Se reportó información de dos casos, hermanas gemelas, en los otros dos casos no está disponible. La edad de inicio fue de 2 años y cursaron con un trastorno de la marcha que fue empeorando de manera progresiva a lo largo de años. A la exploración se observaba hipertonía piramidal de predominio en miembros inferiores con reflejo cutáneo plantar extensor y una marcha paraparética. La latencia diagnóstica de las hermanas fue de 40 años. La información de los otros dos casos no está disponible.

Fenotipo Enfermedad de Parkinson

Se observaron 2 casos (un varón y una mujer). Ambos casos se iniciaron en edades avanzadas. La descripción más detallada se publicó previamente (*López-Laso, 2009*).

Fenotipo Síndrome rígido-hipocinético infantil

Se describió un caso (varón) que presentó retraso motor desde los 7 meses de vida. A los 17 meses presentaba bradicinesia, rigidez de miembros e hipomimia. No hubo latencia diagnóstica significativa debido a antecedentes familiares de DSD. La descripción más detallada se publicó previamente (*López-Laso et al. 2007*).

Relación con la enfermedad de Parkinson

Dos casos (I-3 de la familia A y I-1 de la familia B) se diagnosticaron de EP. Nueve de las 24 familias tenían miembros con signos clínicos compatibles con EP entre sus antecedentes familiares.

6.3. Pruebas diagnósticas bioquímicas y de imagen

Seis pacientes fueron estudiados con un beta-CIT SPECT Scan. Resultaron normales en cinco casos (I-3 de familia A, I-1 de familia E, II-1 de la familia O y I-1 y II-1 de la familia Q) y fue patológico en un sujeto (I-1 de la familia B, cuyo fenotipo clínico era de EP).

Se recopiló información acerca de la determinación de NT y pterinas en LCR en 4 sujetos siendo patológica en todos ellos (III-2 de la familia F, II-1 de la familia I, II-1 de la familia P y II-1 de la familia V).

Se realizó prueba de sobrecarga de fenilalanina a paciente I-2 de la familia C, cuyo fenotipo era D, resultando alterada. Se realizó determinación de actividad enzimática en fibroblastos a través de biopsia cutánea en paciente CII-1 resultando patológica (24-25% de actividad) cuyo fenotipo era D pero presentaba una respuesta subóptima al tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC (López-Laso *et al.* 2012).

6.4. Caracterización molecular

Se encontraron 19 cambios genéticos diferentes, de los cuales 10 eran cambios descritos previamente como patogénicos y 9 se encontraron por primera vez en pacientes con AD-GTPCHD.

Los estudios de segregación familiar detectaron nuevos casos en 19 de las 24 familias. Se identificaron variantes de novo en dos casos (II-1 de la familia K y II-1 de la familia L). En tres familias, el estudio de segregación aún no se ha completado al término del estudio.

Todos los estudios se realizaron mediante secuenciación del gen *GCHI* salvo un caso que fue detectado a través de *NGS*.

Respecto a las características de las variantes:

- Seis variantes truncantes de la proteína (31,6%) y
- Nueve mutaciones missense (42,1%),
- Tres mutaciones intrónicas en el sitio de empalme del intrón 5 (15,8%) y
- una variante se localizaba en la región no traducida 3 '(UTR) (5,2%).

En las familias T y U se encontraron 3 variantes que se consideraron variantes de significado incierto (VOUS) o probablemente benignas y clínicamente mostraron un fenotipo propio de la forma dominante de la enfermedad. En la familia D, se encontró una paciente con dos variantes, una de ellas probablemente benigna o VOUS y fenotipo propio de la enfermedad de herencia dominante. En la familia B se encontró un

heterocigoto compuesto con hiperfenilalaninemia y fenotipo de la enfermedad de herencia recesiva. La descripción detallada de las variantes genéticas encontradas en los sujetos del estudio se muestra en la tabla 19, distinguiendo las variantes patogénicas o probablemente patogénicas, de significado incierto o probablemente benignas y las asociaciones de los casos heterocigotos compuestos. A continuación, se añade una tabla 20 que amplía la información de las referencias que aluden a cada variante para facilitar su investigación.

Tabla 19. Descripción genética de las variantes causantes en los sujetos con la enfermedad de Segawa.

Tabla 19a. Variantes patogénicas o probablemente patogénicas.

Variantes patogénicas o probablemente patogénicas									
Familia (N)	Fenotipo	Localización en gen	Cambio nucleotídico (NM:000161.3)	Cambio aminoácido (NP_000152.1)	gnomAD MAF	dbSNP build 154	Interpretación ClinVar	Scores de patogenicidad	Referencias
Q (2)	D	Exón 1	c.159G>A	p.W53*	-	rs886041708	Patogénico (1)	CADD: 37; GERP:3,58	Furuya,2006
C(2)	D	Exón 1	c.235_240delCTGAGC	p.L79_S80del	-	-	-	GERP:3,66	López-Laso, 2012
K (1)	D	Exón 1	c.255C>G	P.N85K	-	-	-	CADD:23; REVEL:0,62; GERP:3,69	Novel
A (7), B(18), D(1), E (3), F (1), N(2), O (1),	D, P, EP, SRHI, A	Exón 1	c.265C>T	p.Q89*	-	-	-	CADD: 29,6; REVEL: 0,89; GERP: 3,58	Ochoa, 1992; López-Laso, 2009
I (2)	D, A	Exón 1	c.287G>A	p.W96*	-	-	-	CADD:41; GERP:3,48	Sasaki, 1998

W (3)	PE, A	Exón 4	c.541GZC	p.V181L	-	-		CADD: 35 REVEL: 0,63 GERP: 5,72	Novel
B (1)	A	Exón 5	c.550C>T	p.R184C	-	-		CADD: 29,6 REVEL: 0,89 GERP: 5,26	Hagenah, 2005
S (4)	D, P, A	Exón 5	c.556delA	p.T186Qfs*6	-	-		GERP: 6,17	Novel
P (2)	D, DP	Exón 5	c.568dupG	p.A190Gfs*17	-	-		GERP: 6,17	Novel
H (5), M(2)	D, P, A	Exón 5	c.607G>A	p.G203R	-	rs988395114	Patogénico (2)	CADD: 26,3 REVEL: 0,92 GERP: 5,29	Bradman, 1996
G (4)	D	Intrón 5	c.626+3_626+4insT	-	-	-		GERP: 4,20	Steinberger, 2000
V (1)	D	Intrón 5	C.626+5G>A	-	-	rs1594970015		CADD: 23,8 GERP: 5,93	Steinberger, 2000
J (2)	D	Intrón 5	c.627-6T>G	-	-	-		CADD: 13,49 GERP: 2,9	Naiya,2012
Y (1)	D	Exón 6	c.646C>T	p.R216*	0,000004	rs41298440	Patogénico (2)	CADD: 45 GERP: 5,03	Bradman, 1996
R (5)	D, A	Exón 6	c.671A>G	p.K224R	0,00038	rs41298442	Conflictivo: Prob patog (1),	CADD: 19,5 REVEL: 0,54 GERP: 2,30	Bradman, 1996;

							patogénico (1), VOUS (2)		
L (1)	D	Exón 6	c.694G>A	p.G232S	-	-	-	CADD: 29,7 REVEL: 0,97 GERP: 5,79	Novel

D = Distonía; DP = Distonía y parkinsonismo; EP = Enfermedad de Parkinson; P = Parkinsonismo; PE = Paraparesia espástica; Prob patog = Probablemente patogénico; SRHI = Síndrome rígido hipocinético infantil; VOUS = variante de significado incierto

Tabla 19b. Variantes genéticas en pacientes heterocigotos compuestos.

Variantes patogénicas o probablemente patogénicas en heterocigotos compuestos									
Familia (N)	Fenotipo	Localización en gen	Cambio nucleotídico (NM:000161.3)	Cambio aminoácido (NP_000152.1)	gnomAD MAF	dbSNP build 154	Interpretación ClinVar	Scores de patogenicidad	Referencias
D (1)	DP	Exón 1, alelo 1	Alelo 1: c.68C>T	Alelo 1: p.P23L	0,004	rs41298432	Benigno (5); prob benign (3);VOUS (1)	CADD:8,1 REVEL: 0,61 GERP: 0,20	Asociación novel
		Exón 1, alelo 1	Alelo 2: c.265C>T	Alelo 2: c.Q89*	-	-	-	CADD: 29,6 REVEL: 0,89 GERP: 3,58	

D = Distonía; DP = Distonía y parkinsonismo; Prob benign = Probablemente benigno; VOUS = Variante de significado incierto

Tabla 19c. Variantes probablemente benignas o variantes de significado incierto.

Variantes probablemente benignas o VOUS									
Familia (N)	Fenotipo	Localización en gen	Cambio nucleotídico (NM:000161.3)	Cambio aminoácido (NP_000152.1)	gnomAD MAF	dbSNP build 154	Interpretación ClinVar	Scores de patogenicidad	Referencias
T (3 en cis), U (1)	D, A	Exón 1 y 3'UTR	Alelo 1: c.68C>T	Alelo 1: p.P23L	0,004	rs41298432	Benigno (5); prob benign (3);VOUS (1)	CADD:8,1 REVEL: 0,61 GERP: 0,20	Asociación novel
			Alelo 1: c.206C>T	Alelo 1: p.P69L	0,0004	Rs56127440	Benigno (1), prob benign (2) VOUS (2)	CADD: 23,6 REVEL: 0,82 GERP: 4,58	
			Alelo 1: c.*20C>T	-	0,0004	Rs143111433	Prob benign (2) VOUS (1)	CADD:18,7 GERP: -10,6	

A = Asintomático; D = Distonía; Prob benign = Probablemente benigno; VOUS = Variante de significado incierto

Tabla 20. Referencias bibliográficas de las variantes genéticas de los sujetos con la enfermedad de Segawa.

Cambio nucleotídico (NM_000161.3)	Cambio de aminoácido(NP_000152.1)	Referencias
c.159G>A	p.W53*	Furuya <i>et al.</i> 2006, Leuzzi <i>et al.</i> 2012, Bernal-Pacheco <i>et al.</i> 2013
c.235_240delCTGAGC	p.L79_S80del	López-Laso <i>et al.</i> 2012; Batllori <i>et al.</i> 2017
c.265C>T	p.Q89*	Ochoa <i>et al.</i> 1992; Hoenicka <i>et al.</i> 2001; López-Laso <i>et al.</i> 2009, López-Laso <i>et al.</i> 2011; Molero-Luis <i>et al.</i> 2013; Trujillano <i>et al.</i> 2014; Batllori <i>et al.</i> 2017
c.287G>A	p.W96*	Sasaki <i>et al.</i> 1998; Clot <i>et al.</i> 2009; Galán <i>et al.</i> 2011; Trujillano <i>et al.</i> 2014
c.550C>T	p.R184C	Hagenah <i>et al.</i> 2005; Chenbhanich <i>et al.</i> 2017
c.607G>A	p.G203R	Badmann <i>et al.</i> 1996; Badmann <i>et al.</i> 1998; Ueno <i>et al.</i> 2000; Steinberger <i>et al.</i> 2000; Skrygan <i>et al.</i> 2001; Kong <i>et al.</i> 2001; Trender-Gerhard <i>et al.</i> 2009; Liu <i>et al.</i> 2010; Wu-Chou <i>et al.</i> 2010; Hu <i>et al.</i> 2011; Lee <i>et al.</i> 2013; Eye <i>et al.</i> 2019

c.626+3_626+4insT	-	Steinberger <i>et al.</i> 2000; Hagenah <i>et al.</i> 2005; Ye <i>et al.</i> 2007; Souda <i>et al.</i> 2008; Wu-Chou <i>et al.</i> 2010; Opladen <i>et al.</i> 2010; Herzfeld <i>et al.</i> 2010;
c.626+5G>A	-	Steinberger <i>et al.</i> 2000
c.627-6T>G	-	Naiya <i>et al.</i> 2012
c.646C>T	p.R216*	Bradman <i>et al.</i> 1996; Tassin <i>et al.</i> 2000; Saunders-Pullman <i>et al.</i> 2004; Hagenah <i>et al.</i> 2005; Trender-Gerhard <i>et al.</i> 2009; Clot <i>et al.</i> 2009; Mayahi <i>et al.</i> 2010; Fan <i>et al.</i> 2014; Haskell <i>et al.</i> 2018; Yoshino <i>et al.</i> 2018
c.671A>G	p.K224R	Single Heterozygous: Bradman <i>et al.</i> 1996; Leuzzi <i>et al.</i> 2002; Garavaglia <i>et al.</i> 2004; Xie <i>et al.</i> 2006; Leuzzi <i>et al.</i> 2012; Mencacci <i>et al.</i> 2014; Guella <i>et al.</i> 2015; Montaut <i>et al.</i> 2018; Nedelea <i>et al.</i> 2018; Rudakou <i>et al.</i> 2019; Compound heterozygous: Furukawa <i>et al.</i> 1998 (con <i>Gly108Asp</i>); Camargos <i>et al.</i> 2007 (con <i>Met211Val</i>); Trender-Gerhard <i>et al.</i> 2009 (con <i>c.343+5G>C</i>); Trujillano <i>et al.</i> 2014 (con <i>Q89*</i>)

Cambios genéticos previamente conocidos como patogénicos

La variante más frecuente fue la *p.Q89**, fue descrita por primera vez por Hoenicka (*Hoenicka et al. 2001*). Como posible mutación fundadora fue descrita por nuestro grupo de investigación en 23 pacientes de dos familias en un área habitada por una población de unos 800.000 habitantes (*López-Laso et al. 2009*). Desde entonces, se detectaron 10 casos adicionales (pertenecientes a un total de 5 familias) con esta misma variante en otras áreas geográficas de Andalucía en el sur de España. Posteriormente se amplió el estudio de este efecto fundador que se describirá más adelante.

La variante *p.K224R* se encontró en dos familias aparentemente no relacionadas.

También se detectaron familias con las siguientes variantes previamente conocidas: *p.P23L*, *p.P69L*, *p.L79_S80del*, *p.W96**, *p.R184C*, *p.G203R*, *c.626+5G>A*, *p.R216**.

Aunque inicialmente las variantes missense *p.P23L* y *p.P69L* se habían denominado polimorfismos benignos (*Mencacci et al. 2014*), actualmente se clasifican como variantes de significado incierto. Se encontraron heterocigotos compuestos para estas variantes en dos familias independientes de AD-GTPCHD. Por lo tanto, revisamos la posible implicación de ambas variantes en la estructura de la proteína *in silico*. Mientras que *p.P23L* no afecta la estructura de la proteína ni se conserva evolutivamente, los estudios predicen que *p.P69L* alterará la estructura y función de GTPCH-1 (PolyPhen-2: 0,961) y se conserva en vertebrados (Figura 6). En la figura los asteriscos representan aminoácidos conservados en todas las especies. Los aminoácidos mutados se muestran en azul, los reportados por primera vez están subrayados adicionalmente y todos están marcados con un rectángulo para resaltar su estado de conservación en vertebrados.

De las variantes de regiones codificantes, las tres variantes truncantes fueron: *p.W53X*, *p.T186Qfs*6* y *p.A190Gfs*17*, correspondientes a proteínas truncadas de 52, 192 y 207 aminoácidos, respectivamente.

De las tres variantes missense: *p.N85K* se encuentra dentro de la región proteica necesaria para el mantenimiento de la estructura de decámeros. La predicción de posibles cambios estructurales y funcionales (PolyPhen: 0.086, MutPred: 0.581) indicó una modificación postranscripcional alterada, provocando una ganancia de ubiquitilación y metilación en N85 ($p = 0.05$ para ambos). *p.V181L* se encuentra dentro de una hélice alfa involucrada en la estabilización de la estructura terciaria. Es la segunda variante descrita en el codón 181 (V181I fue descrita en Clot *et al.* 2009), y el análisis de predicción (PolyPhen: 0.143, MutPred: 0.685) mostró una alteración de las interfaces ordenadas y desordenadas ($p = 0.05$ y $p = 0.01$, respectivamente), y de la “coiled coil” ($p = 0,0095$) apuntando a la rotura del decámero funcional de GTPCH-1. Para *p.G232S*, el cambio de aminoácidos afecta el sitio de unión de BH4 de jnb -1, y en el mismo codón, G232V se ha descrito anteriormente como patogénica (Lin *et al.* 2015). El análisis predictivo (PolyPhen: 1,00, MutPred: 0,855) reveló una ganancia del trastorno intrínseco ($p = 0,01$) que indica que *p.G232S* induce cambios importantes en la estructura terciaria del GTPCH-1 y su afinidad por BH4. Mientras que *p.V181* y *p.G232* están altamente conservados en vertebrados, *p.N85* muestra un menor grado de conservación.

Respecto a las variantes de regiones no codificantes, se localizaron dos variantes en las regiones del sitio de *splicing* del intrón 5: *c.626+3_626+4insT* en su extremo 3' y *c.627-6T>G* en su extremo 5'. Ambas podrían contribuir a cambios en el patrón de *splicing* alternativo, por ejemplo mediante la retención del intrón 5. Se probó esta posibilidad para un paciente (Familia J) que portaba la variante *c.627-6T>G* pero no se pudo detectar el intrón 5 que contenía transcripciones de *GCHI*, ni determinar si estos experimentan una desintegración nonsense-mediada de ARNm. La Minor Allele Frequency de la variante *c.*20C>T* (rs143111433) es de 0,002 en la población europea y se ha clasificado como “probablemente benigno”. Se encuentra dentro de la 3'UTR y también dentro de una región del sitio de *splicing* de una non-canonical transcripción de *GCHI*, lo que sugiere que podría alterar la expresión de transcripciones alternativas. Para determinar si *c.*20C>T* modifica un sitio de unión de miARN, se analizó GCH1 3'UTR en

miRTarBase. Como resultado, se identificó que hsa-miR-124-3p se unía al GCH1 3'UTR en tres sitios diferentes. El primero comprende los nucleótidos 3-24 de la 3'UTR y los tres sitios de unión contienen una C conservada en la posición 20. En consecuencia, se puede esperar una menor afinidad de la unión de miARN para *c.*20C>T* (Figura 7a y b).

a

>GCH1 | NM_000161 | 3' UTR

```
1 GC TTCATTCAGTGTGTGTC STTC GTTGCCGATCGTACTGCCAGTAGCATTGTCTGTCTGTCCGGTCTTGTTTGTACATT
81 CCATTTTCAATTGTTACAGATGTGAACTTTATTCCTTGTCTACTAATTATATTTAAAATTATTTCTAGGAAGTCAAATAAA
161 TATAATAAAGGGTTGAGCCCTCTACTTTCTTCTTGCCACCTTTTTGTGGCAATATTAAAGTGAAGTCTAATAGTGTAAAG
241 TACGTGCACAAAACCACTGCCAGATAACCAGAGGGCCTGGGAAGGAGAAGAATTAGTGTATTTTTTCAAATAGTACA
321 GTAATTTGCCTCATAAGCATAGGAGCATTGGGAATGAGAGGGAAGTGTGCCAGTATACTGTTTTTTTTCTCTCCAAT
401 AAAAGTGGTGTAGTGCCGAAAGTGCTAAAAATTTAGTGCGGTATTGCTCTGTGAATTCAAGTTCAACAGACTTCACTTT
481 GGTTCATGTTTATTTAAACCACCAGTGACATTTAAAAATATATTTTTAGCAGTCGTAATGTTAGTCACCAAGGGAAGGTGGT
561 GGAATGTCTATGTTTTTGATTTTACTGTGAGTTAAAAAGGCACATTTCTACCTTCTATTGTTTTTAAATTCAAGAATAGG
641 GAATTAGTTCCTGGTGTGTTTACGAGTGTATTCTCGTGTCAACATACAGGGATTTA GACATTTAACTCTCTGTGCCTTG
721 ATAAGAATATCATTTAGA GTGTAGATACTTTGCCTTT TAAAAAAGCCATTATTTTATGAGACTTAGTACTCACACTGC
801 AAATAACTAGTCAGCTCAGTTTTAACTTTTATAGGTTTATTGAGTTTCTTTGTGTGATCCATGTAGATGCCTCAAAATGT
881 TTCTTCTTCTTTTTTTTTAATCTTATAAGATATTTTTCTAAGTATTTCCAGAAACATTTGAGAGTGCCCATCATTTTC
961 AGGCTGCAGAACCATAGCTTCCACGCACCTGAACGAGCACAGAATGAAGTACGGTGGGAAGACATTATGAGCTGTGTCC
1041 AACGTTTTAACCAAAGCGTATCGTACCAACGATCTGTGAAAATGCACTGGAAGCTTCTGGTCCCGTTTCTTTGTGGTC
1121 TATGTGGTCTTGTCTCATTTGTAAGTCCGATAGATGGTATAGGTATTTAATCCTGGAAGCTGTGCTTATTAATGA
1201 TTATCTTAAATTTCTCCATTGGGGCAGCGTGGCCAAATTAACAACAAAACCGCAACTCCTCCACAGAAACACAA
1281 ACACAGTTATTCATGAAGTTTAGTATTTGGTTGACATAGTGCTCTTCAAATTCATCCATTACCCATAAAGTAATAACT
1361 TTGATGCTTGCTTTAACTTTAGTCCCATCTCTGCCACTTTGATGCTATTTGGGTTATGATGGGGCAAGATGGCAGAGGTA
1441 TTGGTTTTTTTTGTTTTTTCCATTCTCTACTTCTGTTCCTAGCTTTTTTCTTCTGGAGTTTAAAGTACAGTGATGG
1521 TTGGCTTGAGTACCTTTTTAAATCTAGCCCAGTATAAACATTAGCCTGCTTAATATTTAGACATTTATAGGTAGAATTCT
1601 GAGCACTCAACTCATGTTTGGCATTTTAAAGTAAAAACAAGTGTGACTTCGAGGACCAAAGAAATGTGAGCTATACATT
1681 TATCTTTATGAAGTCAATTTATATTCCTTTTTAATGACTCGTTGTTCTAACATTTCTAGAAAGTGTCTTATAAAGGTCTA
```

1761 ATGTATCCACAGGCTGTTGTCTTATTAGTAAATGCAAAGTAATGACTTTGTCTGTTTACTCTAGTCTTTAGTACTTCAA
 1841 AATTACCTTTTCATATCCATGATCTTGAGTCCATTGGGGGATTTTAAAGAATTTGATGTATTTCAATACACTGTTCAA
 1921 ATTAAATTGTTTAAATTTTATGTATGAGTATGTATGTTCCCTGAAGTTGGTCCTATTTAAATTATTAACACTATTGTAACCTT
 2001 GTTCTTGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

b

003-024 TTCATTCA-GTGTGTGTGCCTTG

697-720 GACATTTAACTCTCTGTGCCTTG

739-758 GTGTAGATACTTTTGCCTTT

Figura 7. Secuencia de la 3'UTR de *GCHI*. Secuencia de la 3'UTR de *GCHI*. (a) El color azul indica la posición del SNP rs14311433, el color amarillo indica los sitios de unión de hsa-miR-124-3p. (b) Alineación de los tres sitios de unión de hsa-miR-124-3p encontrados en el *GCHI* 3'UTR. La posición correspondiente al nucleótido que se encuentra en rs14311433 está marcada por un rectángulo

En las siguientes figuras se realiza una representación esquemática de GTPCH-1 (figura 8) y de *GCHI* (figura 9).

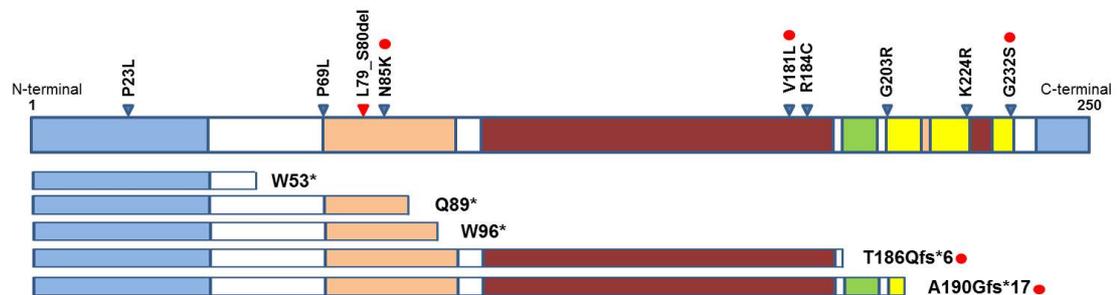


Figura 8. Representación esquemática de GTPCH-1. La proteína de longitud completa se representa arriba. Azul, N-terminal con aminoácidos (aa) 1-42; C-terminal con aa 137-140 (Swick y Kapatos, 2006). Cuatro dominios funcionales son responsables del contacto con el anillo opuesto (naranja), la estabilización de la estructura terciaria (rojo), la unión de GFRP (verde) y la unión de biopterina (amarillo). Triángulos azules, localización de variantes sin sentido. Triángulo rojo, localización de la variante INDEL L79_S80del. Las proteínas truncadas resultantes de variantes sin sentido y cambio de marco (INDEL) se muestran debajo de la proteína de longitud completa. • Nuevas variantes.

<http://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000131979>). La secuencia de proteínas correspondiente a los exones 5 y 6 de las tres isoformas se muestra a continuación.

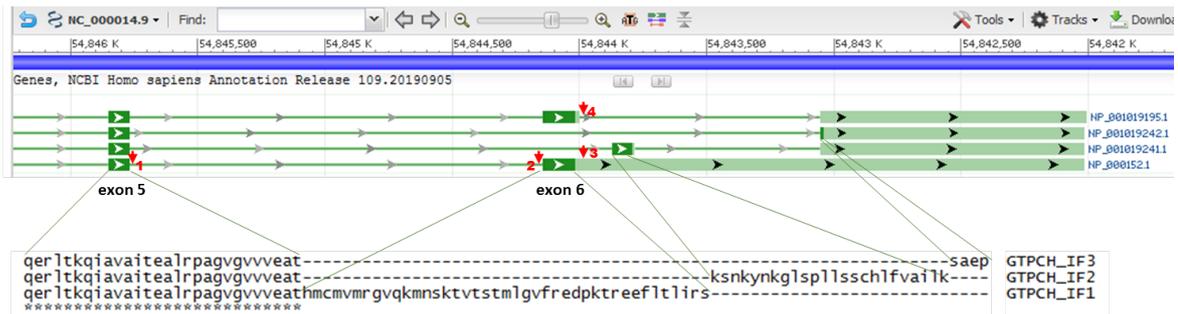


Figura 9. Representación de *GCHI*. Representación esquemática de los exones 5 y 6 de *GCHI* de las tres variantes de transcripción que dan lugar a las tres isoformas de GTPCH (NP_001019195.1 y NP_000152.1 son isoforma 1, IF1). Región codificante de color verde oscuro; verde claro, 3'UTR. Las flechas rojas muestran la ubicación de las tres variantes identificadas en la región no codificante: 1, IVS5 + 3insT; 2, IVS5-6T> G; 3, c. * 20C> T y 4, c. * 16 + 4C> T (ambos rs14311433);

Efecto fundador

La hipótesis de que la variante *p.Q89** tuviera un efecto fundador en nuestra región geográfica junto a un análisis de haplotipos microsatélites se publicó en López-Laso *et al.* 2009. Se realizó estudio de 6 marcadores microsatélites localizados en la región del gen *GCHI* que se muestran en la figura 10:

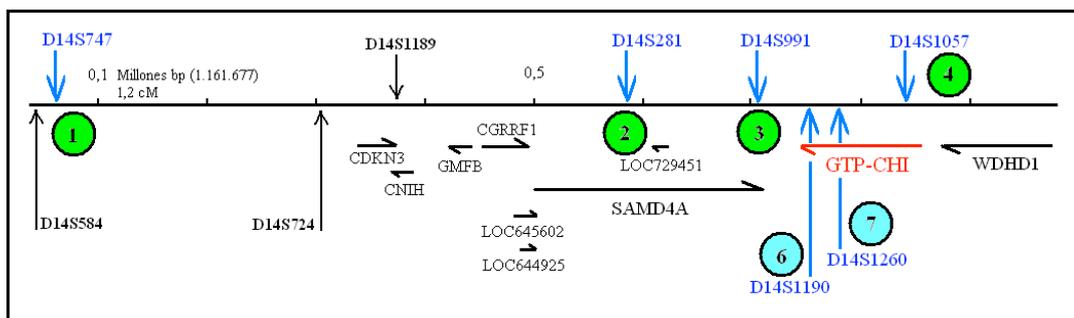


Figura 10. Microsatélites empleados en el estudio del efecto fundador en la región de *GCHI*.

Se encontraron nuevos casos de las familias A y B, previamente conocidas y nuevas familias con esta variante tan frecuente en Andalucía. De ellas, la familia D fue estudiada

mostrando un haplotipo idéntico a las otras familias (Figura 11).

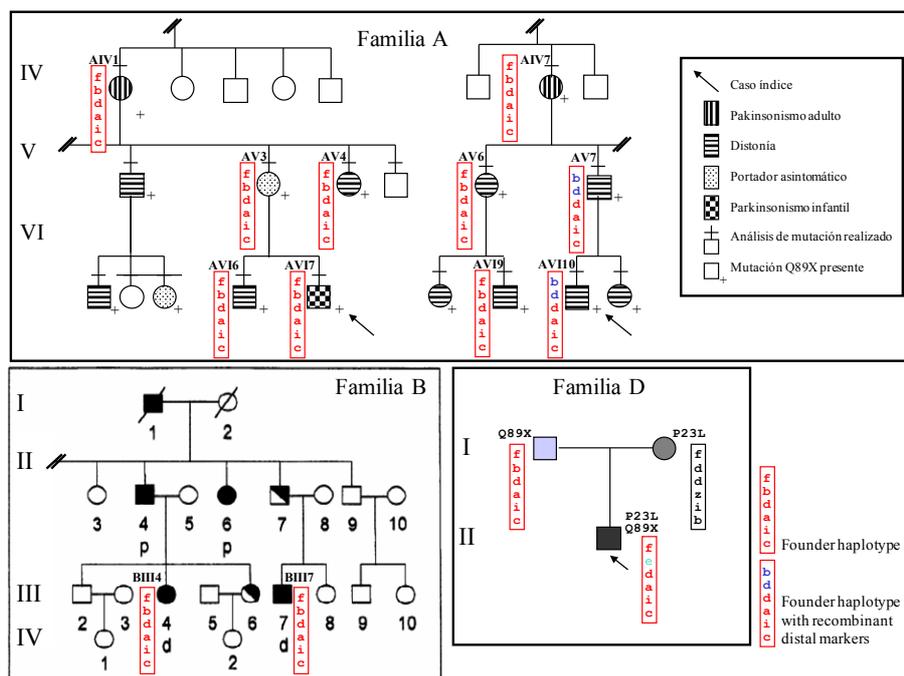


Figura 11. Estudio de haplotipo fundador de familias A, B y D con la enfermedad de Segawa.

Relación fenotipo-genotipo

Se encontraron 33 sujetos con la variante $p.Q89^*$. Esta mutación en *GCHI* causó diferentes fenotipos: distonía, parkinsonismo, SRHI, diversos síntomas no motores y sujetos asintomáticos. La respuesta al tratamiento con de L-Dopa/inhibidor DC también fue heterogénea (se describirá más adelante), por lo que desde el punto de vista estadístico, no se encontraron correlaciones significativas. Se observaron similares resultados en el resto de variantes aunque hay que considerar el bajo tamaño muestral de las mismas.

Se muestra tabla 21, que relaciona edad de inicio, fenotipo clínico, síntomas no motores, antecedentes familiares de EP y los cambios genéticos.

Tabla 21. Relación fenotipo-genotipo y antecedentes de enfermedad de Parkinson en los sujetos con la enfermedad de Segawa.

Sujeto y género	Edad de inicio (años)	Fenotipo clínico	Síntomas no motores	Historia familiar de Parkinson	Cambios genéticos
AIII.2/F	7	D	no	Positivo	<i>p.Q89*</i>
AII.4/M	5	D	no		<i>p.Q89*</i>
AI.3/M	47	EP	no		<i>p.Q89*</i>
AI.4/M	18	DP	no		<i>p.Q89*</i>
AI.5/M	-	A	-		<i>p.Q89*</i>
AII.2/F	1	D	no		<i>p.Q89*</i>
AII.3/F	-	A	-		<i>p.Q89*</i>
BIII.9/M	1	D	CI 60	positivo	<i>p.Q89*</i>
BIII.10/F	3	D	No		<i>p.Q89*</i>
BII.6/F	15	DP	CI 68		<i>p.Q89*</i>
BII.10/M	-	A	No		<i>p.Q89*</i>
BII.7/M	8	D	No		<i>p.Q89*</i>
BIV.3/F	-	A	CI 59		<i>p.Q89*</i>
BI.1/F	66	EP	demencia		<i>p.Q89*</i>
BIII.5/M	9m	SRHI			<i>p.Q89*</i>
BIII.4/M	1	D			<i>p.Q89*</i>
BIII.7/F	12	D			<i>p.Q89*</i>
BIII.8/M	14	D			<i>p.Q89*</i>
BI.7/F	20	P			<i>p.Q89*</i>

BII.4/F	7	D			<i>p.Q89*</i>
BII.2/M	38	D			<i>p.Q89*</i>
BIII.1/M	14	D			<i>p.Q89*</i>
BIII.12/F	-	A			<i>p.Q89*</i>
BII.3/F	48	P	Síndrome ansioso-depresivo		<i>p.Q89*</i>
BIII.3/F	-	A			<i>p.Q89*</i>
BIII.6/M	-	A			<i>p.R184C</i>
CII.1/F	4	D		no	<i>p.L79_S80del</i>
CI.2/F	30	D			<i>p.L79_S80del</i>
DII.1/F	6	DP	Insomnio	Positivo	<i>p.Q89* + p.P23L</i>
DI.2/F	-	A			<i>p.P23L</i>
DI.1/M	-	A			<i>p.Q89*</i>
EIII.1/M	9	D		positivo	<i>p.Q89*</i>
EII.2/F	9	D	Trastorno del sueño		<i>p.Q89*</i>
EI.1/F	9	DP	distimia		<i>p.Q89*</i>
FI.2/F	-	A		no	<i>p.Q89*</i>
FI.1/M	-	A			<i>p.K224R</i>
GIII.1/M	6	D		positivo	<i>c.626+3_626+4insT</i>
GIII.2/F	1	D			<i>c.626+3_626+4insT</i>
GII.2/M	7	D			<i>c.626+3_626+4insT</i>
GII.1/M	23	D			<i>c.626+3_626+4insT</i>

HII.2/F	47	D			<i>p.G203R</i>
HIIL.1/F	5	D			<i>p.G203R</i>
HII.1/M	NA	PE			<i>p.G203R</i>
HII.3	-	A			<i>p.G203R</i>
HI.2/F	NA	P			<i>p.G203R</i>
III.1/F	7	D		no	<i>p.W96X</i>
II.1/M	-	A			<i>p.W96X</i>
JII.1/F	2	D		no	<i>c.627-6T>G</i>
JI.2/F	12	D			<i>c.627-6T>G</i>
KII.1/F	6	D	Ansiedad	no	<i>p.N85K</i>
LII.1/F	8	D	Ansiedad	no	<i>p.G232S</i>
MII.2/F	11	D		no	<i>p.G203R</i>
MII.1/M	9	D	CI bajo		<i>p.G203R</i>
NI.1/M	6	D		no	<i>p.Q89*</i>
NI.1/M	-	A			<i>p.Q89*</i>
OII.1/M	8	D	Ansiedad	Positivo	<i>p.Q89*</i>
OI.2/F	-	A			<i>p.Q89*</i>
PII.1/F	9	D		No	<i>p.A190Gfs*17</i>
PI.2/F	47	DP			<i>p.A190Gfs*17</i>
QI.1/M	40	D		No	<i>p.W53X</i>
QII.1/F	2	D			<i>p.W53X</i>
RIII.2/F	14	D		positivo	<i>p.K224R</i>
RIII.4/F	-	A	-		<i>p.K224R</i>

RIII.3/M	-	A	-		<i>p.K224R</i>
RIV.1/F	-	A	-		<i>p.K224R</i>
RII.2/F	-	A	-		<i>p.K224R</i>
SIII.2/F	22	D		positivo	<i>p.T186Qfs*6</i>
SII.1/M	53	P			<i>p.T186Qfs*6</i>
SIII.1/F	-	A	-		<i>p.T186Qfs*6</i>
SIII.3/M	-	A	-		<i>p.T186Qfs*6</i>
TIII.1/F	4	D		N/D	<i>p.P23L + p.P69L and c.*20C>T</i>
TII.2/F	-	A	-		<i>p.P23L + p.P69L and c.*20C>T</i>
TI.1/M	-	A	-		<i>p.P23L + p.P69L and c.*20C>T</i>
UII.1/F	51	D	-	N/D	<i>p.P23L + p.P69L and c.*20C>T</i>
VII.1/F	4	D	-	No	<i>IVS5+5G>6</i>
WIII.1/F	2	PE	-	no	<i>p.V181L</i>
WIII.2/F	2	PE	-		<i>p.V181L</i>
WII.2/F	-	A	-		<i>p.V181L</i>
WII.3/F	NA	PE	-		<i>p.V181L</i>
YIII.1/F	24	D	Ansiedad	Positivo	<i>p.R216*</i>

CI = Cociente intelectual; D = Disonía; DP = Disonía y parkinsonismo; EP = Enfermedad de Parkinson; F = Femenino; N/D = No disponible; M = Masculino; P = Parkinsonismo; PE = Paraparesia espástica; SRHI = Síndrome hipocinético-rígido infantil.

6.5. Tratamiento

Dosis empleadas y respuesta a tratamiento. Tratamiento a largo plazo

Los datos sobre la respuesta al tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC se recopilaron en 53 de 56 sujetos sintomáticos (95%), que recibieron tratamiento durante $12,4 \pm 8,2$ años (con un RIC 1-37).

Las dosis de L-Dopa/inhibidor DC que fueron empleadas se distribuyeron de la siguiente forma: bajas (16 pacientes), medias (19) o altas (8). No se dispuso de información sobre las dosis en 10 casos. En relación a la respuesta a tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC, fue clasificada por el neurólogo o neuropediatra tratante como excelente en 31 pacientes (58%), satisfactoria en 14 (26%), subóptima en 2 (4%) y deficiente en un caso (2%). En 5 casos, no se clasificó la respuesta a L-Dopa/inhibidor DC. La tabla 22 muestra los datos de respuesta al tratamiento segregada por fenotipos.

Tabla 22. Respuesta a tratamiento segregada por fenotipos clínicos de los casos con la enfermedad de Segawa.

Fenotipo	Respuesta a tratamiento					No tratado
	Excelente	Satisfactoria	Subóptima	Deficiente	N/D	
D	24	8	1	1	3	3
P	2	1	0	0	1	0
DP	2	2	1	0	0	0
PE	0	3	0	0	1	0
EP	2*	0	0	0	0	0
SRHI	1	0	0	0	0	0

D = distonía; DP = distonía y parkinsonismo; EP = enfermedad de Parkinson; N/D: no disponible; P = parkinsonismo; PE = paraparesia espástica; SRHI = síndrome hipocinético-rígido infantil.

* Respuesta inicial excelente, más tarde efectos “wearing off” hasta el fallecimiento

No se encontraron diferencias en la respuesta a los tratamientos con L-Dopa/inhibidor DC según sexo, clasificación clínica, latencia diagnóstica o edad. No se encontró deterioro de la respuesta al tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC a lo largo del tiempo.

Síntomas no respondedores

En cuanto a síntomas no respondedores a L-Dopa/inhibidor DC y que afectaban las actividades de la vida diaria se encontró: las manifestaciones propias de la evolución de la EP en 1 paciente; temblor (5 pacientes) y distonía (distonía de la marcha, 7 casos; calambre del escribiente, 1; hemidistonía con distonía oromandibular, 1). El temblor fue un síntoma no respondedor en 5 de 16 pacientes, excluyendo para este cálculo a 2 pacientes con EP y 2 sujetos con temblor postural que no recibieron tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC. En 7 de los pacientes con fenotipo D se encontraron signos y/o síntomas distónicos sin respuesta a tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC.

Efectos adversos

Uno de los dos pacientes con EP presentó fenómenos de “wearing-off” (aparición de fluctuaciones relacionadas con el acortamiento del efecto de L-Dopa) a los 5 años del inicio del tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC, y 4 pacientes con fenotipo D presentaron discinesias con dosis bajas de L-Dopa/inhibidor DC. Se encontraron alucinaciones visuales y un rash cutáneo asociados a L-Dopa que desaparecieron al cambiar la marca comercial del fármaco.

Otros fármacos empleados

Respecto al inhibidor de la decarboxilasa periférica, todos emplearon carbidopa salvo en

3 casos que emplearon benserazida. Otros fármacos empleados como alternativa terapéutica en los pacientes con distonía no respondedora a L-Dopa/inhibidor DC fueron los siguientes: el paciente CII.1 recibió toxina botulínica y trihexifenidilo para el calambre del escribiente debido a que el tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC estuvo limitado por aparición de discinesias incluso con dosis bajas (López-Laso *et al.* 2012); el paciente RIII.2 recibió toxina botulínica para una distonía cervical refractaria a L-Dopa/inhibidor DC y el paciente QI.1 fue tratado con entacapona por fluctuaciones motoras.

A continuación, se presenta tabla 23 en la que se muestra edad de inicio, fenotipo clínico, dosis de L-Dopa/inhibidor DC, respuesta a tratamiento, duración de tratamiento, síntomas no respondedores y efectos adversos al tratamiento.

Tabla 23. Datos relacionados con el fenotipo y el tratamiento en los casos con la enfermedad de Segawa.

Sujeto/ Género	Fenotipo	Edad de inicio	Dosis(L-dopa mg/d)/Respuesta/Duración de tratamiento	Síntomas no respondedores/Efectos adversos
AIII.2/F	D	7	100/Exc/8	Dificultad leve para marcha en tándem /No
AII.4/M	D	5	125/Exc/29	Leve eversión del pie, bradicinesia/discinesias con el aumento de dosis
AI.3/M	EP	47	300/Exc/29	No disponible
AI.4/M	D	1	300/Exc/19	No/No
AII.2/F	DP	18	150/Exc/19	No/Discinesias con el aumento de dosis
BIII.9/M	D	1	300/Exc/14	Leve temblor postural de manos
BIII.10/F	D	3	125/Exc/15	No/No
BII.6/F	DP	15	300/Sat/13	Temblor de voz/No

BII.7/M	D	8	300/Exc/14	Temblor postura leve de manos, marcha insegura/No
BI.1/F	EP	66	400/Entacapona y rasagilina/Exc/14, fallecida a los 83	No durante 5 años, después “wearing off” hasta el fallecimiento, con 300mg de L-Dopa y 1 mg de rasagilina
BIII.5/M	SRHI	0	133/Exc/15	Dificultad para la marcha ocasional/No
BIII.4/M	D	1	184/Exc/15	No/No
BIII.7/F	D	12	150/Exc/13	No/No
BIII.8/M	D	14	No	-/-
BI.7/F	P	20	200/Exc/ND	No/No
BII.4/F	D	7	375/Exc/19	No/No
BII.2/M	D	38	400/Exc/18	No/No
CII.1/F	D	4	62,5/Trihexifenidilo y toxina botulínica/Subópt/13	Calambre del escribiente/Discinesias con aumento de dosis
CI.2/F	D	30	No	-/-
DII.1/F	DP	6	200/Exc/6	No/No
EIII.1/M	D	9	150/Exc/3	No/No
EII.2/F	D	9	200/Exc/7	Marcha insegura/no
EI.1/F	DP	9	300/Sat/7	Leve inversión del pie/No
GIII.1/M	D	6	2,1mg/k/d/Exc/5	No/No
GIII.2/F	D	1	7mg/k/d/Exc/10	No/No
GII.2/M	D	7	400/Sat/29	No/No
GII.1/M	D	23	300/Exc/23	No/No
HII.2/F	D	47	200/Sat/11	No/Rash cutáneo
HIII.1/M	D	5	100/Exc/14	No/No

HII.1/M	PE	ND	ND	ND
HI.2/F	P	ND	ND	ND
II.1/F	D	7	300/Exc/10	No/No
JII.1/F	D	2	10mg/k/d/Exc/7	No/No
JI.2/F	D	12	100/Exc/3	No/No
KII.2/F	D	6	150/Exc/7	No/Alucinaciones visuales
LII-1/F	D	8	100/Sat/3	No/No
MII.2/F	D	11	300/Sat/18	No/No
MII.1/M	D	9	125/Sat/17	No/No
NI.1/F	D	6	300/Exc/7	No/No
OII.1/M	D	8	150/Sat/16	Rigidez de miembros y temblor leve de manos/Discinesias y ansiedad
PII.1/F	D	9	2,2mg/k/d/Exc/3	No/Boca seca
PI.2/F	DP	47	125/Subópt/1	Temblor y rigidez/No
QI.1/F	D	40	300/Entacapona/Sat/37	Fluctuaciones motoras/No
QII.1/F	D	2	500/Exc/16	No/No
RII.2/F	D	14	ND/Toxina/Deficiente/ND	Hemidistonía y distonía oromandibular/ND
SIII.2/F	D	22	ND	ND
SII.1/M	P	53	ND/Exc/ND	ND
TIII.1/F	D	4	ND	ND
UII.1/F	D	51	ND	ND
VII.1/F	D	4	6mg/k/d/Sat/1	No/No
WIII.1/F	PE	2	ND/Sat/7	ND
WII.2/F	PE	2	ND/Sat/7	ND
WII.3/F	PE	ND	ND/sat/7	ND
YIII.1/F	D	24	100/Exc/1	No/no

D = Disonía; DP = Disonía y parkinsonismo; EP = Enfermedad de Parkinson; Exc = Excelente; F = Femenino; N/D = No disponible; M = Masculino; P = Parkinsonismo; PE = Paraparesia espástica; Sat = Satisfactoria; Subópt = Subóptima; SRHI = Síndrome hipocinético-rígido infantil

6.6. Investigación en herramientas diagnósticas y de seguimiento

Prolactina sérica

Se realizó determinación sérica de prolactinemia en 14 sujetos en diferentes situaciones clínicas (Tabla 24).

Tabla 24. Determinación de prolactina sérica en sujetos con AD-GTPCHD.

N. Paciente	Edad (años)	Situación actual	Prolactina sérica (mcg/l) Referencia 2,8-29,2 mcg/L.
BIII.11	28	Tratado	6,4
BII.7	55	Tratado	5,5
BIII.7	17	Tratado	8,3
BIII.6	23	Tratado	4,7
BII.3	56	Tratado	3,3
BIII.8	37	Asintomático	4,9
CII.1	21	Tratado	11,9
CI.2	56	Paucisintomático No tratado	3,6
DII.1	13	Tratado	5,4
DI.2	48	Asintomático	6,3
DI.1	52	Asintomático	5
NI.1	59	Asintomático	6

PI.2	48	Tratado	6,4
OII.1	38	Tratado	13,9

Pterinas en sangre seca y orina

En la tabla 25 se presentan los resultados de la determinación de pterinas en sangre seca de los sujetos con AD-GTPCHD. En la tabla 26 se presentan los resultados de la determinación de pterinas en orina de los sujetos con AD-GTPCHD.

Tabla 25. Determinación de pterinas en sangre seca en sujetos con AD-GTPCHD.

	Edad (años)	Hb(g/L)	NP nM	BP nM	NP mcmol/gHb	BP mcmol/gHb
EII.2	45	4,3	9,37	1,5	2179	349
PII.1	48	4,6	7,2	1,2	1565	261
DI.2	48	3	6,58	0,14	2193	47
DI.1	52	4,5	7,04	0,7	1564	156
CI.2	56	4,5	7,5	0	1667	0
BIII.5	17	3,4	8,03	0	1667	0
BIII.4	23	6,4	7,02	0,17	1097	27
BII.3	56	3,5	7,2	0	2057	0
BIII.9	28	5,1	7,2	0,19	1412	47
BII.7	56	3,6	7,56	0,26	2100	72
NI.1	49	6	7,32	0,23	1220	38
EIII.1	12	4,4	7,55	0,35	1716	80
BIII.6	38	6,5	7,56	0,57	1163	88
OII.1	40	5,8	7,43	0,37	1281	64

DII.1	13	4,8	7,59	0	1581	0
CII.1	22	5,4	7,8	0,75	1444	139

BP = Biopterina; Hb = Hemoglobina; NP = Neopterina

Tabla 26. Determinación de pterinas en orina en sujetos con AD-GTPCHD.

N. paciente	Edad (años)	Creatinina (mcM)	Neopterina (nM)	Biopterina (nM)	Neopterina (mmol/molCr)	Biopterina (mmol/molCr)
DII.1	13	5738	1077	2425	0,19	0,42
OII.1	40	8240	1874	3490	0,23	0,42
CII.1	22	12405	2284	5454	0,18	0,44
PII.1	15	5050	1680	1475	0,33	0,29
DI.2	48	4494	3298	2673	0,73	0,59
DI.1	52	29520	4739	7018	0,16	0,24
CI.2	56	4608	1183	2312	0,26	0,50
BIII.12	22	12518	2758	4161	0,22	0,33
PII.1	48	7458	1988	3080	0,27	0,41
BIII.6	38	6311	1771	2806	0,28	0,44
BIII.5	17	13931	3076	6104	0,22	0,44
BIII.4	23	9297	1688	2561	0,18	0,28
BII.7	56	3683	1054	1413	0,29	0,38
BIII.9	28	7535	1566	2126	0,21	0,28
BII.3	56	7617	1625	2277	0,21	0,30

Los resultados de la determinación de pterinas en orina de los sujetos control fueron los siguientes: NP = $1,015 \pm 0,86$ y BP = $1,26 \pm 0,93$ con una mediana de edad de $10,5 \pm 9$ años.

Se observó una correlación negativa entre la edad de los controles y las concentraciones urinarias de NP y BP ($r = -0,362$, $P = 0,002$ para NP y $r = -0,331$; $p = 0,004$ para BP) por lo que se planteó que los valores de referencia se estratificaran en 2 grupos: sujetos menores 10 años y sujetos entre 10 y 58 años. Este segundo grupo de sujetos entre 10 y 58 años, con un tamaño muestral de 42 individuos, se utilizó para la comparación de datos entre pacientes y controles. Los valores de referencia para el grupo 2 expresados como rango (SD) y promedio fueron de 0.40-2.45 (0.41) 0.90 mmol/mol creat para la NP y 0.41-2.66 (0.62) 1.19 mmol/mol creat para la BP.

Hubo una correlación muy significativa entre los valores de NP urinaria y BP ($r = 0,610$, $p < 0,001$) como se muestra en la Figura 12.

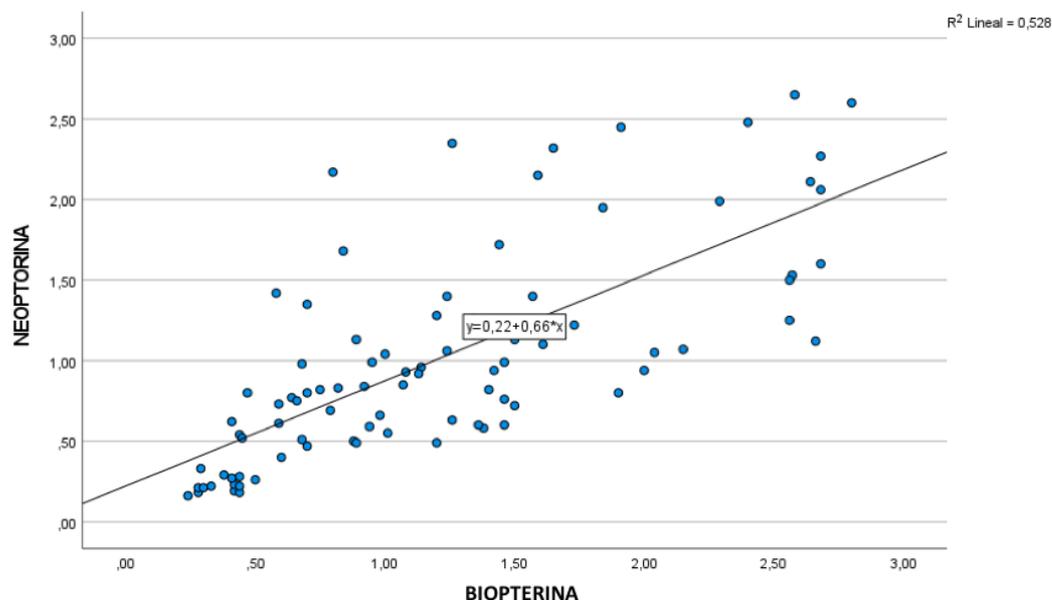


Figura 12. Correlación neopterina y biopterina en orina en los sujetos con AD-GTPCHD.

Cuando se comparan los controles con la cohorte de sujetos con AD-GTPCHD, los casos presentaron valores significativamente más bajos para la excreción de NP y BP (prueba t de Student; $p < 0,0001$).

En las figuras 13 y 14 se ilustra la comparación de NP y BP en sujetos con AD-GTPCHD y controles.

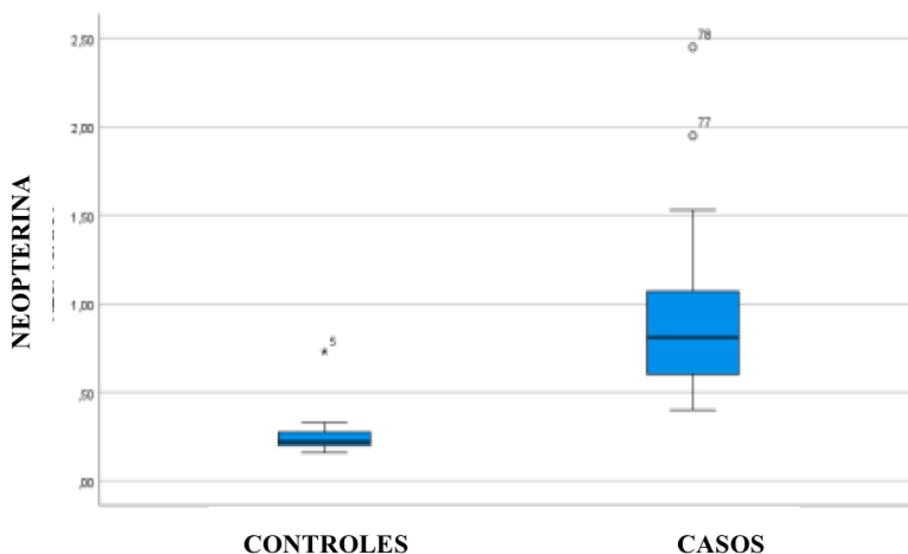


Figura 13. Neopterin en orina en sujetos con AD-GTPCHD y controles.

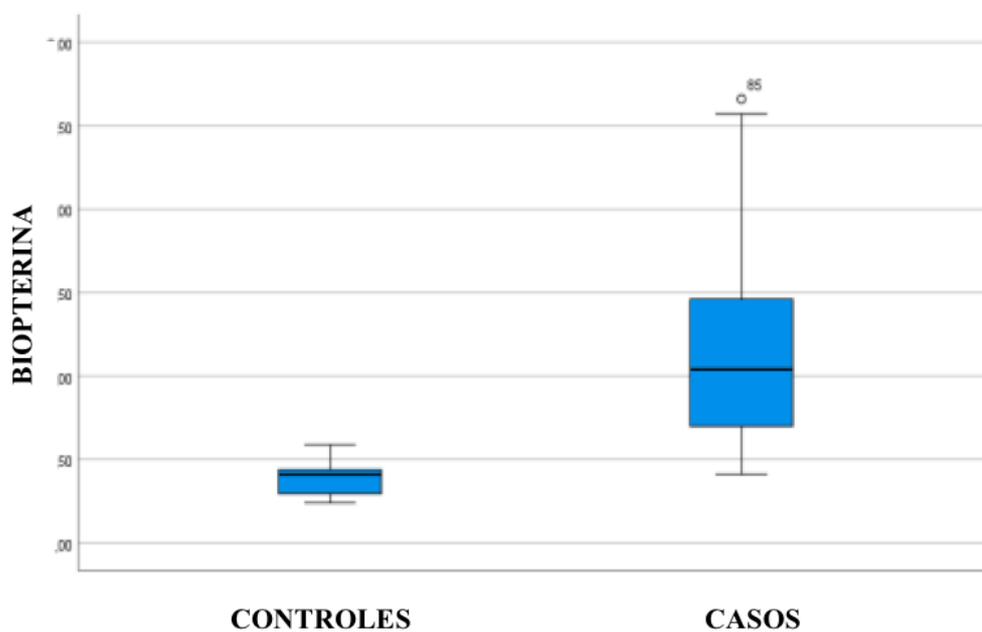


Figura 14. Biopterina en orina en sujetos con AD-GTPCHD y controles.

En comparación con los valores de referencia, 14 de los 15 pacientes (93,3%) presentaron baja excreción de NP mientras que solo 7 de 15 (46,6%) mostraron baja excreción de BP, aunque la mayoría de los resultados se acercaron al límite inferior del intervalo de referencia. El caso que no mostró la excreción disminuida de NP tiene el diagnóstico de

AD-GTPCHD asociado a cambio heterocigótico p.*P23L* en *GCHI*.

Con respecto a las pterinas en sangre seca, los datos fueron controvertidos, ya que mientras que los valores de NP fueron de normales a moderadamente altos en los sujetos con AD-GTPCHD en comparación con los controles, la concentración de BP fue extremadamente baja, incluso indetectable en algunos casos. El significado de este hallazgo es difícil de entender, aunque pudo haber problemas preanalíticos (la estabilidad podría verse comprometida, ya que la muestra en sangre seca de los controles se recogió y analizó en el Hospital Sant Joan de Deu de Barcelona, mientras que las muestras en sangre seca de los pacientes se recogieron en el Hospital Reina Sofía de Córdoba y se enviaron al laboratorio de análisis de Barcelona).

7. DISCUSIÓN

Este estudio pretende mejorar la comprensión de la historia natural, epidemiología, correlación fenotipo-genotipo y pronóstico de la enfermedad, realizando la descripción de la mayor serie de casos con AD-GTPCHD publicada hasta la fecha en nuestro conocimiento. El efecto fundador de *p.Q89** en nuestra región (*López-Laso et al. 2009*) y, en consecuencia, el elevado número de pacientes ha convertido al Hospital Universitario Reina Sofía en un observatorio privilegiado de la enfermedad. Este hecho sugiere que la prevalencia en España sea mayor que en otras regiones. Nuestro compromiso está dirigido a realizar una aproximación epidemiológica en nuestro país con la colaboración de neuropediatras y neurólogos de los principales hospitales del Sistema Nacional de Salud, para profundizar en el conocimiento fenotípico de la enfermedad y dibujar el panorama genético a nivel nacional. El conocimiento detallado del fenotipo clínico de AD-GTPCHD es esencial porque a menudo la clínica es leve o presenta fenotipos atípicos, a diferencia de otros metabolismos relacionados con BH4. El retraso diagnóstico puede potencialmente conducir a una evolución tórpida y grave provocando pérdida de la deambulación o fenotipos que se asemejan a una parálisis cerebral distónica, espástica o parkinsonismo. Esta iniciativa por tanto puede servir para incrementar el índice de sospecha ante esta enfermedad tratable en nuestro medio, lo que podría generar nuevos diagnósticos.

Aunque en el presente estudio únicamente se incluyeron casos con diagnóstico molecular, es conveniente revisar las diferencias entre diagnóstico clínico y molecular. Clásicamente se ha empleado el término DSD como sinónimo de enfermedad de Segawa sin embargo los progresos en el conocimiento de la enfermedad han clarificado que dicha asociación no era del todo adecuada. Con frecuencia la respuesta clínica a L-Dopa en la DSD es espectacular, de modo que el profesional tiene el riesgo de ver en cierta manera finalizada su labor por la mejoría clínica del paciente. Sin embargo, el diagnóstico clínico no es equiparable en todos los casos al diagnóstico molecular ya que son varias las causas genéticas de una DSD (*Wijemanne et al. 2015*). La principal causa de DSD de inicio temprano se debe a variantes heterocigotas en *GCHI* representando el 85% aproximadamente de los pacientes con DSD (*Hagenah et al. 2005; Clot et al. 2009*). En el 15% restante de pacientes con DSD deben buscarse otras alternativas diagnósticas,

entre las que se encuentran entidades potencialmente más graves como la deficiencia de GTPCH-1 de herencia autosómica recesiva. Este diagnóstico diferencial incluye un amplio abanico de distonías primarias o distonías secundarias (Tabla 1). En últimos años, gracias a la *NGS*, está creciendo el número de genes asociados a distonías primarias, como el descrito recientemente *DNAJC12* en pacientes con parkinsonismo asociado (*Straniero et al. 2017*). Por otra parte, el diagnóstico molecular permite además realizar un adecuado asesoramiento genético al completar el estudio en progenitores y familiares, como ocurrió en 19 de las 24 familias de la serie. Es reseñable que en la familia B del estudio se detectó un caso de la forma recesiva de la enfermedad (paciente IV-1) a raíz de la detección de hiperfenilalaninemia en el cribado metabólico neonatal. La forma recesiva de la enfermedad puede cursar de manera grave con encefalopatía, trastornos del movimiento y epilepsia si no se trata de manera adecuada. Ambos progenitores eran portadores asintomáticos, uno de ellos con diagnóstico conocido, de una mutación heterocigota en el gen *GCHI*.

7.1. Caracterización epidemiológica

Se describieron 80 individuos con variantes genéticas en *GCHI* causantes de AD-GTPCHD en una población de 47 millones de habitantes en España lo que supone un número de casos muy elevado si consideramos la prevalencia previamente publicada para la enfermedad (*Nygaard et al. 1991*). A este hecho pudo contribuir el efecto fundador en Andalucía con 33 sujetos pertenecientes a 7 familias, sin embargo cabe destacar que se reseñan un total de 24 familias con la enfermedad, lo que además reduce el riesgo de homogeneidad de la muestra por factores intrafamiliares.

Género. Penetrancia

Varios estudios de familias amplias con AD-GTPCHD han encontrado una penetrancia reducida, de 27 a 53%, siendo la penetrancia marcadamente más baja en los hombres (*Kim et al. 2015; Wijemanne et al. 2015*). *Hu et al.* describieron 4 familias en las que detectaron 18 sujetos asintomáticos a partir los 5 casos, asemejándose su penetrancia a la

de otras publicaciones (Hu et al. 2011). Wijemanne et al. presentaron un estudio que incluía una revisión de la literatura y una serie de casos. Observaron que la enfermedad se expresó 2,5 a 4 veces más entre las mujeres que entre los hombres, incluso con una proporción mujer:hombre mayor (25:3) en su serie. Propuso además que en los hombres el inicio de la enfermedad tendía a ser más tardío y el fenotipo más leve (Wijemanne et al. 2015; Kim et al. 2015). El motivo por el que la enfermedad se expresa de manera más frecuente en mujeres no está claro sin embargo hay autores que postulan diferencias genéticamente determinadas en las neuronas dopaminérgicas (Kurian et al. 2011). Por otra parte, otros autores defienden que la expresión de *GCHI* en cerebelo humano en personas sanas no varía entre hombres y mujeres, es decir, no respalda que haya diferencias de la expresión génica dependientes del género (Wider et al. 2009). En la serie descrita en el presente estudio, el predominio femenino en la penetrancia segregada por género se correspondió con las publicaciones previas resultando una penetrancia de 73% en mujeres frente a 65% en hombres. Sin embargo, el porcentaje de penetrancia fue significativamente más elevado pero no es valorable por las características del estudio. Debe entenderse que se trata de estudio descriptivo de casos donde los únicos sujetos asintomáticos incluidos en el estudio eran familiares de casos sintomáticos.

Estimación de prevalencia

Tradicionalmente, la prevalencia de la enfermedad de Segawa se ha estimado en 0,5 por millón de habitantes (Nygaard et al. 1991). Según esta prevalencia el número de casos esperables en la población española que se aproxima a 47 millones de habitantes sería de 24 casos. Sin embargo, en el estudio se recogieron 80 casos en la población española. Esto sugiere que existe una subestimación de la prevalencia de la enfermedad, probablemente debida a una elevada tasa de casos no diagnosticados (Tadic et al. 2012). Además muchas publicaciones no clasifican adecuadamente la enfermedad en DSD, síndrome o enfermedad de Segawa (Furukawa et al. 2019). La prevalencia global de las deficiencias de BH4 es desconocida y varía entre países (Opladen et al. 2020). Un reciente estudio en Serbia, cuya población está entorno a los 7 millones de habitantes, describió una prevalencia estimada de 2,96 por millón (Dobricic et al. 2017). Aunque metodológicamente no es adecuado para medir prevalencia, encontró 21 pacientes

sintomáticos con mutaciones en *GCHI*, de un total de 47 estudiados con DSD. Dobricic *et al.* postularon que si se extrapolara el número de portadores de mutaciones detectados en su muestra a la población serbia, supondría que la frecuencia de DSD en su población sería considerablemente más alta de lo esperado y sugería que la prevalencia de la enfermedad de Segawa debía revisarse también en otras poblaciones. Considerando que el diseño de estudio descriptivo de una serie de casos presentado no puede estimar la prevalencia real, parece evidente que el número de casos encontrado en la serie del presente estudio demuestra que la prevalencia real es superior a las publicadas previamente (Nygaard *et al.* 1991).

Entre las causas de la subestimación de prevalencia se describen varios factores:

- 1) Gravedad clínica variable: en ocasiones la expresión clínica de la enfermedad es leve y los pacientes eluden buscar asesoramiento médico (Bianca & Bianca. 2006).
- 2) Retraso diagnóstico: se han descrito casos de AD-GTPCHD que padecen errores diagnósticos a lo largo de muchos años especialmente cuando presentan fenotipos atípicos (Wijemanne *et al.* 2015). En la serie presentada se describieron fenotipos catalogados durante años de parálisis cerebral tipo PE. Las pacientes III-1 y III-2 de la familia W, iniciaron sintomatología a los 2 años de edad con caídas frecuentes y progresivamente desarrollaron una PE y no fueron diagnosticadas correctamente hasta los 40 años de edad. Otro caso (II-1 de la familia L) con un trastorno de la marcha desde los 20 años de edad fue catalogado de trastorno conversivo y tratado con medicación ansiolítica durante 8 años hasta que se alcanzó el diagnóstico de AD-GTPCHD mejorando tras la instauración de L-Dopa hasta la desaparición de los síntomas.
- 3) Formación y conocimiento de los profesionales sanitarios: la escasez de conocimiento y formación acerca de muchas enfermedades raras es una situación desafortunadamente común que padecen los enfermos y sus familiares.

7.2. Caracterización clínica

Edad de inicio

La edad de inicio de síntomas de la serie presentada (9 años, RIC 4.5-21) fue similar a la de otras publicaciones (Trender-Gerhard *et al.* 2009). Trender-Gerhard *et al.*

describieron una serie de 34 sujetos con AD-GTPCHD con una edad media de inicio de 8,5 años, de los cuales el 85% eran menores de 15 años. Es destacable que en la serie de casos del presente estudio la presentación clínica temprana en menores de 3 años fue mayor que en la mayoría de las series publicadas previamente (*Tadic et al. 2012*, *Hübschmann et al. 2021*). Esto sugiere que las presentaciones precoces de la enfermedad no son excepcionales, aunque hay que considerar que la mayoría de profesionales participantes en el estudio eran neuropediatras familiarizados con enfermedades raras y en general con mayor disponibilidad de test diagnósticos que permiten un diagnóstico precoz. Analizando la edad de inicio de síntomas por fenotipos clínicos: La edad de inicio del fenotipo D en la serie fue de 8 años, similar a otras series (*Trender-Gerhard et al. 2009*). La edad media de presentación de la enfermedad en el fenotipo P fue de $40 \pm 17,78$ años, similar al estudio de *Yoshino et al. (Yoshino et al. 2018)*. La edad de inicio en los casos de PE fue de 2 años (únicamente se dispone de los datos de 2 de los 4 pacientes). No se dispone en la literatura de series amplias que incluyan fenotipos de PE para establecer un rango de edad de presentación. Únicamente se describen casos esporádicos, como el de *Fan et al.* cuya edad de inicio fue de 6 años (*Fan et al. 2014*). La edad de inicio en el fenotipo EP en los casos de la serie fue de 47 y 66 años, acordes a la literatura (*Yoshino et al. 2018*). *Mencacci et al.* analizaron portadores de mutaciones en *GCHI* en pacientes con EP y encontraron que la edad media de inicio fue $46,7 \pm 13,8$ años (rango 6-98; datos disponibles para 1194 casos), sin embargo es destacable que el 35,4% se presentaron antes de los 40 años de edad (*Mencacci et al. 2014*). El único caso de la serie con el fenotipo SRHI debutó antes del año de vida, descrito previamente (*López-Laso et al. 2011*).

Latencia diagnóstica

En el presente estudio se observó que la latencia diagnóstica, es decir, el tiempo que transcurre desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico molecular, ha mejorado claramente en la última década, resultando una mediana de 5 años. Este hallazgo contrasta con la demora en otras publicaciones: *Tadic et al.* realizaron un estudio mediante una búsqueda bibliográfica de publicaciones en la que se describían 352 casos junto a un estudio piloto cuya latencia diagnóstica fue de 15,5 años. Encontraron retrasos promedio

en el diagnóstico de 13,5 años e incluso un retraso más prolongado en el diagnóstico después de la disponibilidad de las pruebas genéticas (*Tadic et al. 2012*). Recientemente, *Kim et al.* publicaron una latencia de 5,6 años en una pequeña serie de 12 pacientes y una latencia diagnóstica de 14,6 años en una revisión bibliográfica analizando 137 casos (*Kim et al. 2021*). *Yu et al.* defendían que el diagnóstico de DSD es a menudo dificultoso por sus características clínicas muy variables, desde distonía focal a generalizada, parkinsonismo o únicamente signos sutiles y que, como resultado de esto, son comunes los diagnósticos erróneos y el retraso en el tratamiento (*Yu et al. 2013*). Una publicación reciente derivada del registro iNTD describió 275 sujetos con ECM de los NT monoamínicos, de ellos 36 con AD-GTPCHD, encontrando que la latencia diagnóstica global se redujo en los últimos años y fue de 60 meses (1-245 meses) en los casos de AD-GTPCHD, posiblemente debido a la avances diagnósticos y la mayor concienciación de los profesionales (*Hübschmann et al. 2021*).

La menor latencia diagnóstica del presente estudio además fue disminuyendo a lo largo de las décadas de manera que en los pacientes diagnosticados antes del año 2000 fue de 20 años y la latencia media después del año 2010 fue menor de un año. El cálculo está influido por el hecho de que se evaluó la demora hasta el diagnóstico molecular y el gen fue descrito más tarde (gen localizado en 14q22.1-q22.2 por *Ichinose et al. 1994*). Una de las razones que justifican la menor latencia respecto a la literatura es que un 25% de familias del estudio (6 de 24 familias) fueron diagnosticadas en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba en el que existe un elevado índice de sospecha diagnóstica debido al efecto fundador y a la experiencia forjada en estos años. Además de la mayor concienciación e implicación de los profesionales en las enfermedades raras, también es mayor la disponibilidad de herramientas de diagnóstico genético de NGS, lo que facilita el diagnóstico.

No puede establecerse un latencia diagnóstica segregada por fenotipos dado el bajo número de casos por fenotipo. Además este cálculo está limitado por un elevado número de casos familiares, lo que obviamente reduce el tiempo diagnóstico y fueron por tanto excluidos del cálculo. Sin embargo, del estudio se desprende que los fenotipos atípicos tienen una mayor latencia diagnóstica. La latencia diagnóstica en la serie de los casos sin distonía, que se podrían calificar de casos con “fenotipos atípicos”, se eleva de

manera significativa. Así dos casos de PE tuvieron una demora de 38 años para alcanzar el diagnóstico de AD-GTPCHD. Es conocido que existe una mayor tasa de errores diagnósticos en los casos con fenotipos atípicos. Las posturas anormales de uno o ambos pies, o patrones de la marcha alterados debido a una distonía de miembros inferiores fluctuante pueden confundirse con trastornos ortopédicos y por tanto tardar en ser valorados como tales trastornos del movimiento por un neurólogo o neuropediatra (*Hahn et al. 2001*).

Síntomas motores. Fluctuaciones diurnas

El síntoma más frecuente de la AD-GTPCHD encontrado en la serie fue la distonía de miembros inferiores, en el 67,8% de casos y esto se corresponde a la descripción del fenotipo clásico de la enfermedad que suele iniciarse con una distonía de carácter focal, postural, que empeora a lo largo del día localizado en extremidades inferiores, unilateral más que bilateral, que causa un trastorno de la marcha o una postura anormal del pie con equinovaro o equinovalgo asimétrico, con preferencia por el lado izquierdo y con tendencia a desequilibrio. La distonía progresa a otras extremidades y al tronco, que se ven afectados en la adolescencia tardía. Esta progresión disminuye en la 3ª década de la vida y se detiene a partir de los 30 años de edad. La evolución del paciente no tratado puede llevarle a la pérdida de la deambulación y dependencia de la silla de ruedas (*Segawa, 2011; López-Laso et al. 2009*). Respecto a la distribución de la distonía, puede presentarse en otras localizaciones diferentes a los miembros inferiores. En serie del presente estudio, hasta un 23,2% presentaron distonía en miembros superiores, en la mayoría de casos asociados a la de miembros inferiores. También se localizó a nivel craneocervical como un laterocollis, tortícolis, retrocollis intermitente o a nivel oromandibular, a nivel axial con escoliosis e hiperlordosis lumbar, como ocurre en la literatura (*Segawa. 2011*). Respecto al carácter de la distonía hay estudios que analizan diferencias entre distonías posturales o de acción, encontrando diferencias detectables por potenciales evocados somatosensoriales (*Kimura et al. 2015*). Segawa clasificó la distonía postural como un trastorno inhibitorio o hipokinético, mientras que la distonía de acción la consideraba un trastorno excitador o hiperkinético (*Segawa. 2011*).

Las fluctuaciones diurnas, caracterizadas por el empeoramiento de la sintomatología a lo largo del día y la mejoría con el descanso o sueño, son una característica común de los pacientes con ECM de los NT y deficiencias de BH4 (Opladen *et al.* 2020), aunque no están presentes de forma universal. En la serie, las fluctuaciones diurnas ocurrieron en la mayoría de los casos con fenómenos distónicos (67,8%), por contra, fue significativo que no se presentaron en pacientes sin distonía, de modo que la odds ratio para las fluctuaciones diurnas en fenotipos D en comparación con otros fenotipos no distónicos fue de 17 (IC 95% 4.08-70.76). La ausencia de fluctuación en los fenotipos no distónicos no siempre tiene lugar en la literatura. Fan *et al.* publicaron un caso de una paciente que inició un trastorno de la marcha con una marcha de puntas a los 6 años de edad con variación de síntomas a lo largo del día. Catalogada inicialmente de parálisis cerebral y más tarde de PE hereditaria, recibió múltiples intervenciones ortopédicas. Fue diagnosticada de PE debida a mutación en *GCHI* a través de un estudio NGS. Este caso con fenotipo PE muestra que la fluctuación diurna no es exclusiva de los fenotipos distónicos (Fan *et al.* 2014). Esto indica que las fluctuaciones son evidentes por tanto para fenotipos que se desarrollan en edades más tempranas, no así en edad adulta. Segawa describió que “la fluctuación diurna disminuye su grado junto con la disminución de la progresión de la distonía y se vuelve inaparente clínicamente en la tercera década. Aquellos pacientes que comienzan en la edad adulta desarrollan inicialmente temblor en la mano sin distonía ni fluctuación diurna”(Segawa *et al.* 2003), como se encontró en el presente estudio. En la serie, los pacientes con fenotipos no distónicos no presentaron fluctuaciones diurnas y, de ellos 5 de 8 pacientes se presentaron en la edad adulta. Por tanto, este trabajo apoya la idea de que, en la AD-GTPCHD, las fluctuaciones diurnas disminuyen con la edad y suelen estar ausentes en los casos de inicio en la edad adulta coincidiendo con lo previamente descrito por Segawa (Segawa *et al.* 2003). El Dr Masaya Segawa propuso una explicación a esta variación a lo largo del día relacionándola con la enzima TH. Esta enzima tiene una elevada actividad en la primera infancia en las terminales de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales que se proyectan a los receptores D1 en el estrioso, las vías directas del estriado y las vías directas del núcleo estriado y subtalámico y a los receptores D4 del tracto tuberoinfundibular. Sin embargo, su actividad disminuye de manera significativa y estacionaria a partir de los 20 años de

edad. La alteración en GTPCH-1 condiciona un déficit parcial de BH4 y éste afecta a la función enzimática de la TH (Segawa. 2011).

En la serie, se encontró el temblor como signo más frecuente, predominantemente postural, y menos frecuentemente de reposo en fenotipo de inicio tardío como P o EP, hallazgos que se corresponden con la literatura (Segawa et al. 2011, López-Laso et al. 2009). El temblor se caracteriza por ser postural de miembros superiores de alta frecuencia 8-10 Hz, generalmente asimétrico, que aparece durante la segunda década, afectando los cuatro miembros y los músculos del cuello a lo largo de los años.

Otros síntomas y signos descritos en la serie se encontraron con una frecuencia de < 25% entre los que destacaron la rigidez de miembros, aquinesia/bradicinesia y el parkinsonismo. El fenotipo P en la serie se caracterizó por rigidez, expresión facial reducida, movimientos lentos y finos de los dedos y bradicinesia (tabla 17), similares a los propios de la EP, sin embargo esto no generó dudas diagnósticas porque en la mayoría de casos se diagnosticaron en estudios de extensión familiar. Individuos con fenotipo distónico de inicio infantil no diagnosticado también desarrollaron síntomas parkinsonianos a partir de tercera década de la vida como describe la literatura (Segawa. 2003). En ausencia de distonía, se presentó en sujetos por encima de los 20 años de edad salvo en el caso previamente publicado con el fenotipo SRHI (López-Laso et al. 2007). Para el Dr. Segawa la rigidez generalizada con temblor postural sin distonía ni fluctuaciones es la norma en las personas mayores (Segawa. 2003).

Otros hallazgos motores encontrados en la serie fueron disfonía, disartria y disfagia, que siendo menos usuales, pueden ser fluctuantes a lo largo del día, siendo más evidente al fin de éste y por tanto ser claves para la sospecha diagnóstica. Otras posibles manifestaciones que se describen en la literatura pero que no se observaron en el estudio son: distonía inducida por ejercicio, distonía paroxística, distonía recidivante y remitente, hipotonía, retraso motor y del lenguaje e incluso deceleración del crecimiento (Dale et al. 2010; Segawa et al. 2003). Respecto al crecimiento, Lin et al. comunicaron un paciente con déficit de GH y DSD debido a una mutación en el gen *GCHI*, que mejoró su talla tras ser tratado con L-Dopa (Lin et al. 2015). También Mencacci describió fatiga, hiposmia, trastorno vesicales, urgencia urinaria y estreñimiento (Mencacci et al. 2014). Kong et al. describieron un caso con hipotonía generalizada y debilidad proximal como

presentación de DSD (*Kong et al. 2001*). *Chaila et al.* describieron cuatro hermanas con DSD, de las cuales 2 presentaron ataxia cerebelosa (*Chaila et al. 2006*).

Síntomas no motores

Al igual que se describe en la literatura (*Peall et al. 2015*), los síntomas no motores que destacaron en el presente estudio fueron principalmente trastornos de ansiedad, depresión, CI límite y desórdenes del sueño. Estos hallazgos fueron detectados mediante evaluaciones clínicas rutinarias salvo los publicados previamente por *López-Laso et al.* en 2011. Realizaron un estudio psicológico sistemático de 14 pacientes afectados de AD-GTPCHD en el que se encontró que las alteraciones del sueño y los síntomas psiquiátricos como disforia, ansiedad y depresión (*López-Laso et al. 2011*). Estos resultados son similares a la literatura. *Peall et al.* realizaron un metaanálisis dirigido a la presencia de síntomas no motores en distonías primarias genéticamente definidas, encontrando los síntomas más comunes la ansiedad, la depresión y el trastorno obsesivo-compulsivo, discapacidad cognitiva global o afectación en áreas específicas y, específicamente en DSD, alteraciones del sueño (*Peall et al. 2015*). *Brüggemann et al.* realizaron un estudio sistemático a través de cuestionarios para analizar la presencia de síntomas no motores y evaluaciones de calidad de vida en 33 pacientes con AD-GTPCHD. Dichos pacientes pertenecían a 13 familias lo que reduce el riesgo de factores intrafamiliares. Encontraron que la calidad de vida estaba alterada de manera significativa por la enfermedad, pero no se debía a estos síntomas no motores (*Brüggemann et al. 2014*).

Respecto a los trastornos del sueño, se han descrito insomnio de mantenimiento e incluso pesadillas (*Paus et al. 2011*). *Van Hove et al.* relacionaron los despertares con trastornos del movimiento hiperkinéticos (*Van Hove et al. 2006*). Cabe reseñar que uno de los casos pediátricos del presente estudio, en su seguimiento, manifestaba problemas de sueño ocasionales que mejoraron con el ajuste de L-Dopa/inhibidor DC.

Respecto al CI, en el estudio se observó afectación cognitiva en 9 de 14 pacientes pertenecientes a las familias B y C en una evaluación sistemática del CI y los síntomas neuropsiquiátricos (*López-Laso et al. 2011*). Anteriormente, se había descrito la afectación cognitiva leve en AD-GTPCHD (*Trender-Gerhard, 2009*). *Nagata et al.*

describieron un caso con discapacidad intelectual y parkinsonismo de inicio precoz (Nagata *et al.* 2007). Es posible que esta afectación cognitiva pueda reflejar una vulnerabilidad de las redes neuronales dopaminérgicas y serotoninérgicas implicadas en funciones corticales superiores (López-Laso *et al.* 2011).

Como limitación del presente estudio, los síntomas no motores de los pacientes salvo los publicados previamente fueron evaluados sólo en caso de que se detectaran síntomas en las visitas de seguimiento clínico. Las evaluaciones de CI y las evaluaciones de síntomas no motores deberían considerarse en pacientes con AD-GTPCHD de manera rutinaria mediante una búsqueda activa.

Fenotipos clínicos

En el presente estudio se observó una considerable heterogeneidad clínica, diferenciando 6 grupos fenotípicos bien definidos, de manera similar a lo publicado en la literatura (Segawa. 2008, Trender-Gerhard *et al.* 2009, Wijemanne *et al.* 2015). Es destacable que esta heterogeneidad clínica ocurrió incluso a nivel interindividual e intrafamiliar. Así, en la familia H, se encontraron dos pacientes con fenotipo clásico D, un paciente con PE, un paciente con fenotipo P y otro individuo asintomático hasta la finalización del estudio, todos ellos con un diagnóstico genético común confirmado debido a la mutación *p.G203R*. Esta variabilidad fenotípica está descrita previamente (Tachi *et al.* 2011, Wijemanne *et al.* 2015). La causa de esta heterogeneidad clínica se desconoce aunque existen algunas teorías: Robinson *et al.* indicaron que la variabilidad fenotípica intrafamiliar y de respuesta a L-Dopa podía deberse a varios factores como la existencia de genes modificadores de la enfermedad no conocidos que afectarían a la transmisión dopaminérgica (Robinson *et al.* 1999). Además de factores genéticos potencialmente involucrados, es posible que haya otros factores epigenéticos o ambientales. Por otra parte, Tachi *et al.* describieron unos trillizos monocigóticos en una familia con AD-GTPCHD que comenzaron con clínica distónica homogénea entre los 9 y 10 años de edad. Sin embargo, encontraron fenotipos diferentes en casos de la misma familia, lo que sugería que otros factores, además de los genéticos, debían contribuir al fenotipo de DSD (Tachi *et al.* 2011).

En el presente estudio, el fenotipo D fue el más frecuente y su presentación se correspondió con la presentación clásica de la enfermedad (*Segawa et al. 1976*). En general, se trataba de pacientes en edad pediátrica con un desarrollo motor temprano normal que a los 8 años como mediana de edad de inicio presentaban una distonía focal de miembros inferiores. Las principales manifestaciones iniciales fueron dificultades para la marcha, eversión del pie y pie equinovaro o equinovalgo unilateral o bilateral, con fluctuaciones diurnas como corresponde a la literatura (*Segawa et al. 2003*). En los pacientes no tratados inicialmente la distonía progresó agravándose a lo largo de los años pudiendo causar pérdida de la marcha como en los pacientes II-4 y III-4 de la familia A. Varios pacientes desarrollaron rigidez, bradicinesia y temblor postural asimétrico en los años posteriores, que se corresponden con el fenotipo DP. La fluctuación diurna se atenuó con la edad así como la progresión de la distonía como está descrito en la literatura (*Segawa et al. 2003*). En el presente estudio no se describieron casos de distonía-mioclónica. Este infrecuente fenotipo tiene su origen más frecuente es una alteración en el gen *SGCE* pero también puede estar causado por mutaciones en *GCH1*, *ANO3* y *TITF1* (*Balint & Bathia. 2015*). La distonía de la AD-GTPCHD está incluida en las distonías genéticas combinadas y su diagnóstico diferencial, revisado en la introducción del trabajo, ha sido actualizado en la literatura de manera constante (*Balint et al. 2015*, *Wijemnanne et al. 2015*). El avance de la secuenciación masiva ha permitido ampliar el conocimiento en las causas genéticas de la DSD. *Balint et al.* revisaron las novedades en causas genéticas de las distonías diferenciando las formas aisladas y combinadas: *ANO3*, *GNAL* y *CIZ1* se han relacionado con distonías aisladas. En el estudio de las distonías combinadas, debido al avance de la *NGS*, deben incluirse en el diagnóstico diferencial varios genes de interés: el gen *ATPIA3*, que causa un amplio espectro fenotípico que va desde el fenotipo DP de inicio rápido hasta la hemiplejía alternante de la infancia, el gen *SLC63* relacionado con el síndrome de deficiencia del transportador de dopamina y *PARKIN*, *PINK1* y *DJ-1* relacionados con el parkinsonismo de inicio juvenil y *PRKRA* y *TAF*.

El fenotipo P representó el 7% de la serie y se inició en la edad adulta, en ausencia de distonía y fluctuaciones diurnas, lo que requiere evaluaciones dirigidas al diagnóstico diferencial con formas precoces de EP. Tanto este fenotipo como el fenotipo EP será discutido más adelante cuando se revise la relación entre AD-GTPCHD y EP.

El fenotipo PE fue encontrado en 4 pacientes de la serie, de los cuales se dispone de información detallada de dos de ellos. Al tratarse de un fenotipo atípico, la elevada demora diagnóstica es similar a otros casos descritos en de la literatura (*Cheyette et al. 2008*). *Cheyette et al.* describieron un niño de 2 años con diagnóstico inicial de parálisis cerebral con una exploración de hipertonia en miembros inferiores y clínica inicialmente fluctuante que se diagnosticó de AD-GTPCHD años más tarde. En el estudio de extensión familiar se encontró un primo con 27 años dependiente de silla de ruedas con una respuesta espectacular.

En este trabajo se incluyó el caso con fenotipo SRHI, descrito previamente por *López-Laso et al. (López-Laso et al. 2007)*. Otros fenotipos excepcionales descritos que no fueron encontrados en el presente estudio: *Kong et al.* describieron un caso con hipotonía generalizada y debilidad proximal como presentación de DSD (*Kong et al. 2001*); *Chaila et al.* describieron cuatro hermanas con DSD, de las cuales 2 presentaron ataxia cerebelosa (*Chaila et al. 2006*); *Leuzzi et al.* en 2002 reportaron un paciente con un retraso motor y mioclonías que respondió a L-Dopa (*Leuzzi et al. 2002*).

Relación con la Enfermedad de Parkinson

La vinculación de *GCHI* y EP ha tomado mayor relevancia en la literatura en la última década. En el presente estudio se encontró que el 37% de familias con mutaciones en el gen *GCHI* tenían algún miembro con un diagnóstico de EP. Esta información fue recogida por los médicos responsables que cumplimentaron los cuestionarios, sin poder realizarse un estudio de manera sistemática de muchos de estos pacientes. Este resultado concuerda con los de *Hagenah et al.*, que comunicaron que un 34,7% pacientes de su serie de AD-GTPCHD tenían antecedentes familiares positivos para la EP (*Hagenah et al. 2005*). *Hahn et al.* describieron una gran familia con personas afectas de trastornos psiquiátricos y varios familiares con EP debido a una mutación en el gen *GCHI*, que fue detectada gracias a un caso de una distonía focal de un pie de uno de los familiares (*Hahn et al. 2001*).

Es conocido que la sintomatología parkinsoniana puede ser presentarse en ambas entidades. Por una parte, en la historia natural de la AD-GTPCHD un porcentaje

significativo de pacientes con DSD en etapas avanzadas de la vida pueden desarrollar síntomas parkinsonianos. Se han descrito individuos con parkinsonismo en ausencia de distonía, síntomas similares a los de la EP de inicio precoz con mutaciones de *GCHI* (Lewthwaite *et al.* 2015; Mencacci *et al.* 2014). En el presente estudio se encontró en el presente estudio un 16% de pacientes con sintomatología parkinsoniana (incluyendo los fenotipos P y DP) de manera similar a estudios previos como el de Nygaard *et al.*, que en su serie de AD-GTPCHD mostraban que el 14% de individuos mayores de 40 años tenían parkinsonismo (Nygaard. 1993).

Por otra parte, los pacientes con EP de inicio temprano a menudo pueden presentar distonía asociada. El papel de *GCHI* en el desarrollo de la EP clásica ha sido estudiado de manera intensa en los últimos años. Nalls *et al.* publicaron recientemente que las variantes en el gen *GCHI* podrían mantener un papel acumulativo en el riesgo de desarrollar EP, estableciendo varios loci de riesgo para el desarrollo de la EP (Nalls *et al.* 2019). Además, en grandes cohortes de EP, se ha detectado un pequeño porcentaje de portadores de *GCHI* mediante NGS (Mencacci *et al.* 2014). De este modo, parece evidente que existe un solapamiento fenotípico entre ambas entidades.

Debido a esta superposición fenotípica con pacientes con EP clásico neurodegenerativo de inicio precoz y pacientes con AD-GTPCHD, la categorización de los síndromes con un fenotipo que asocie distonía y parkinsonismo de inicio temprano pueden plantear un desafío diagnóstico. Clínicamente, puede ser difícil diferenciar en un paciente joven con parkinsonismo si presenta un cuadro de EP neurodegenerativo precoz o si el fenotipo es parte del espectro clínico de AD-GTPCHD cuya evolución es más favorable. Segawa sugería que, en los pacientes con parkinsonismo debido a *GCHI*, la rigidez a nivel de miembros y del esternocleidomastoideo se mostraban en localización ipsilateral mientras que en los casos de EP de inicio precoz la afectación era contralateral (Segawa *et al.* 2003). Yoshino *et al.* publicaron recientemente que los pacientes con EP con mutaciones en *GCHI* tenían síntomas diferentes a los observados en el EP típico (Yoshino *et al.* 2018), porque la edad de inicio suele ser más joven y el patrón clínico se acompaña con mayor frecuencia de distonía. De este modo, un fenotipado preciso puede proporcionar información sobre el pronóstico, aunque de manera más evidente son los estudios de imagen del transportador de dopamina la herramienta más útil en el

diagnóstico diferencial (*Lewthwaite et al. 2015*). Los pacientes con un cuadro de parkinsonismo de inicio precoz, con o sin distonía asociada, deben ser candidatos a un estudio de imagen del transportador de dopamina. A priori, lo esperable sería que si se trata de una EP de inicio precoz se produzca una degeneración de las neuronas nigroestriatales y se altere la imagen, esperando por tanto una evolución tórpida a lo largo de los años. Sin embargo, la normalidad en el estudio haría pensar inicialmente que puede ser un caso de AD-GTPCHD de inicio más tardío que lo habitual y evolución favorable a lo largo del tiempo. En la serie de casos del estudio se encontraron dos casos con EP, en los que se realizó estudio de imagen resultando patológico en el caso I-1 de la familia B y normal en el caso I-3 de la familia A. Además es conocido que el SPECT es normal en el 4-15% de pacientes con EP (*De Rosa et al. 2014*). Estos resultados plantean que las pruebas de imagen no son concluyentes. En este sentido, no sólo pacientes con EP pueden tener una imagen normal, sino que hay estudios que presentan pacientes portadores de mutaciones en *GCHI* con imagen alterada (*Mencacci et al. 2014*). *Mencacci et al.* defendían que variantes raras de *GCHI* deben considerarse como un factor de riesgo para la EP ya que encontró portadores de variantes patogénicas de *GCHI* con un diagnóstico clínico de EP definido en familias con DSD, con pruebas de imagen alteradas con denervación dopaminérgica estriatal (*Mencacci et al. 2014*). Sugería incluso que la AD-GTPCHD predispone a la pérdida de células nigroestriatales en algunos casos. Esto está en consonancia con informes previos de parkinsonismo de inicio en adultos en portadores de una mutación *GCHI* con estudios de imágenes del transportador de dopamina anormales de otros estudios (*Lewthwaite et al. 2015*).

De cualquier modo, ante este solapamiento fenotípico parece recomendable realizar una evaluación genética a pacientes con parkinsonismo puro de inicio precoz, especialmente si asocian distonía como aconsejan otros autores (*Sun et al. 2014*). Así, también se optimizará la asociación fenotipo-genotipo y se aportará una mejor información pronóstica.

7.3. Pruebas diagnósticas bioquímicas y de imagen

En el presente estudio se realizó un diagnóstico clínico y posteriormente de manera directa un diagnóstico molecular en la mayoría de casos, incluyendo los casos índice cuya clínica fue de DSD y en todos los casos familiares.

Se precisaron realizar pruebas bioquímicas y de imagen en un limitado número de pacientes. Se indicaron estudios de imagen de beta-CIT SPECT scan a los pacientes con síntomas parkinsonianos con o sin distonía o un fenotipo de EP, resultando únicamente uno patológico (I-1 de la familia B, con fenotipo de EP). En el presente estudio, se recogió únicamente información de la determinación de NT y pterinas en LCR en 4 pacientes lo que muestra que la secuencia diagnóstica habitual en los casos de AD-GTPCHD es la realización de estudio molecular tras la sospecha diagnóstica. Las indicaciones de realización de una sobrecarga de fenilalanina fue para confirmación diagnóstica por refractariedad al tratamiento en la paciente CII.1 y en los pacientes incluidos en la publicación de López-Laso en 2006 en el contexto del estudio de investigación de los valores de referencia pediátricos para esta prueba (*López-Laso et al. 2006*).

Es conocido que hasta el 87% de los casos de AD-GTPCHD se han asociado con mutaciones heterocigotas en *GCHI* detectadas mediante análisis completos del gen *GCHI* (*Hagenah et al. 2005*). Esto supone un porcentaje de individuos con un fenotipo compatible sin confirmación genética. Aunque la serie expuesta sólo incluyó casos con confirmación genética, en las situaciones en las que el estudio genético no logra detectar la variante causante de la enfermedad, es recomendable la determinación de NT y pterinas en LCR como procedimientos más fiables (*Molero-Luis et al, 2013*). La utilidad de SPECT y PET es limitada pero puede ser útil para el diagnóstico diferencial entre DSD y EP de inicio precoz. Estos resultados sugieren por tanto que estas pruebas puede ser de interés en los casos con fenotipo atípico o aparente respuesta inadecuada al tratamiento o genética negativa lo que debe hacer replantear el diagnóstico.

Actualmente se está desarrollando la ecografía transcraneal, que puede resultar una técnica sencilla, barata y accesible como complemento en el estudio diferencial entre EP y DSD con parkinsonismo (*Chahine et al. 2011*). No se recogió su realización en ninguno de los pacientes de este trabajo. Se estima que la sustancia negra muestra un

patrón hiperecogénico en aproximadamente el 90% de los pacientes con EP que se asocia con una reducción significativa de la captación de 18F-dopa en el cuerpo estriado. Recientemente, se ha descrito hiperecogenicidad de sustancia negra en portadores sintomáticos y asintomáticos de mutaciones de *PARKIN* (Shafieesabet et al. 2017). En la revisión bibliográfica realizada no se encontraron datos publicados sobre ecografía transcraneal en pacientes con AD-GTPCHD (Hanegah et al. 2006).

7.4. Caracterización molecular

En el presente estudio se encontraron varios hallazgos relevantes a nivel molecular. Se detectaron cinco cambios genéticos noveles, descritos por primera vez en la enfermedad de Segawa, un total de siete cambios descritos solo en la cohorte y cinco nuevas familias con la mutación fundadora *p.Q89** en Andalucía. En la bases de datos genética *Human Gene Mutation Database* se describen más de 270 variantes reportadas en el gen *GCHI* como causantes de AD-GTPCHD (HGMD Professional 2020.4). La descripción de variantes noveles en una enfermedad ultra-rara con gran heterogeneidad alélica tiene relevancia, entre otros motivos, para discernir la patogenicidad de cada variante. Así, el trabajo permitió aportar conocimiento en variantes como *p.P23L* cuya patogenicidad no estaba clarificada.

El método de diagnóstico molecular empleado en los sujetos del presente estudio fue la secuenciación del gen *GCHI* salvo en un caso, que se diagnosticó a partir de un estudio de *NGS*. Este hecho resulta aparentemente sorprendente en el contexto actual en el que nos encontramos, en el que un gran número de enfermedades raras se detectan mediante el abordaje de estudios de *NGS* y no por el reconocimiento fenotípico. En AD-GTPCHD se explica por presentar un fenotipo clásico reconocible y un elevado número de casos familiares. Para Segawa, alcanzar un diagnóstico no parece complejo si la presentación clínica es típica de DSD (Segawa et al. 2008). El análisis genético inicial debe ser una prueba de secuenciación del gen *GCHI* porque los cambios genéticos más frecuentes son las mutaciones y deleciones heterocigóticas (Lee et al. 2013). Sin embargo, se debe completar con la realización de un estudio de *MLPA* si la secuenciación no detecta variantes patogénicas, ya que se informaron casos con deleciones completas de *GCHI*

como causantes de la enfermedad (Steinberger et al. 2007). Los hallazgos del estudio, deleciones y mutaciones fundamentalmente, apoyan la idea de iniciar el estudio molecular ante la sospecha clínica a través de la secuenciación del gen como primer escalón diagnóstico y si resulta negativo completar el análisis genético mediante un *MLPA* (Steinberger et al. 2007). Cabe señalar que existen causas de pruebas genéticas negativas como DSD por otro déficit enzimático como la deficiencia de TH y mutaciones intrónicas (Furukawa et al. 2000; Souza et al. 2008).

Casi un tercio de las 19 variantes identificadas fueron mutaciones nonsense o frame-shift, es decir, se consideraron variantes truncantes de la proteína GTPCH-1. Tres fueron las variantes noveles missense *p. N85K*, *p. V181L* y una variante de novo *p. G232S*. Como proteína funcional, GTPCH-1 se compone de 10 monómeros idénticos que forman un homodecamero (Swick et al. 2006), que interactúa con su proteína reguladora, GFRP, y luego es regulada por dos moléculas efectoras, BH4 y fenilalanina (Maita et al. 2004). Dado que el extremo C-terminal de GTPCH-1 está implicado en la formación de decámeros, es muy probable que todas las variantes truncantes sean patogénicas (Nykamp et al. 2017; Karbassi et al. 2016). Además, *p. N85K* y *p. V181L*, que se encuentran en regiones necesarias para el mantenimiento del decámero, y *p. G232S*, que se encuentra en el sitio de unión de BH4, interfieren significativamente con la función normal de GTPCH-1.

Además, el 15,8% de todas las variantes fueron mutaciones de sitios de empalme que potencialmente alteraron un *splicing* alternativo de *GCHI*. Aunque su ubicación sugirió una posible retención de intrones, solo se pudo amplificar la transcripción principal de *GCHI*. Dado que la expresión de transcripciones alternativas es a menudo específica de tejido, en estudios futuros deben analizarse fuentes adicionales, incluidos músculo y cerebro. La variante 3'UTR *c. *20C>T* puede tener dos efectos reguladores diferentes a través de la alteración de la unión de miARN y la eficiencia del *splicing* alternativo del exón 6. Si uno de estos efectos juega un papel en el desarrollo de AD-GTPCHD, debe abordarse en el futuro.

Cuatro variantes diferentes se encontraron en casos descritos como heterocigotos compuestos, de los cuales cuatro pacientes (familias T y U) eran portadores de tres variantes *P23L*, *P69L* y *c. *20C>T* en dos familias aparentemente no relacionadas y un

caso (II.1 de la familia D) era portador de *p.P23L* y *p.Q89**. Estas combinaciones no se han comunicado previamente. Se consideraron AD-GTPCHD y no formas recesivas de la enfermedad debido a la revisión de la patogenicidad de *p.P23L* y *p.P69L*.

La variante *p.P23L* fue descrita previamente como un cambio patogénico en el año 2000 por Steinberger (*Steinberger et al. 2000*). Posteriormente, se describió en combinación con otro cambio no conocido en un paciente sintomático (*Regula et al. 2007*). Sin embargo, Clot *et al.* estudiaron la variante *p.P23L* y la encontraron en 1/174 cromosomas de controles y observaron que el residuo de Prolina en la posición 23 no se encuentra bien conservado en otras especies (*Clot et al. 2009*). Esto les llevó a considerarlo un polimorfismo. El último informe en la base de datos genética, se clasifica como variante con significado incierto (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/161247/>). En las familias del presente estudio, se encontró esta mutación missense en combinación con otras variantes, lo que sugiere que puede tener influencia en la actividad de GTPCH que favorece o estimula el desarrollo de síntomas en el estado del heterocigoto compuesto. Además, Clot *et al.* observaron un efecto deletéreo sobre *p.P69L* (*Clot et al. 2009*), que es la variante que se encontró acompañando a *p.P23L* en las familias T y U.

El cambio genético *p.K224R* se había descrito con diferentes fenotipos: en tres familias asociadas con parálisis cerebral atetoide (*Bandmann et al. 1998*), como distonía mioclónica (*Leuzzi et al. 2002*) y como distonía de la marcha con rigidez y bradicinesia de inicio en la edad adulta (*Garavaglia, 2004*). En la serie del presente estudio, se observó en dos familias, F y R, en los que había un caso con fenotipo D y el resto asintomáticos, a pesar de que la literatura previamente relacionaba esta mutación con fenotipos más graves (*Leuzzi et al. 2012*).

Efecto fundador

El cambio *p.Q89** en el exón 1 de *GCHI* es una mutación de citosina a timina en la posición 265 que provoca un codón de parada prematuro TAA. Esto provoca la formación de una proteína truncada por la pérdida de 177 aminoácidos en el extremo C-terminal. En 2009 se publicó el trabajo acerca del posible efecto fundador de la variante *p.Q89**

describiendo una serie de 23 casos pertenecientes a dos familias aparentemente no emparentadas portadoras de esta mutación. El efecto fundador se planteó con el estudio de haplotipos microsatélites en el que se observó un haplotipo común en las dos familias y la ausencia de este haplotipo en 100 sujetos controles. Este hallazgo indicó las dos familias comparten los mismos ancestros. Se destacó además que las poblaciones en las que vivía la familia 2 del estudio fue fundada en el siglo XVIII por inmigrantes procedentes de otras regiones de Europa, incluidos Alemania, Italia, Francia y Suiza (López-Laso *et al.* 2009). En el presente trabajo este efecto fundador pudo refrendarse mediante la identificación de un total de 33 portadores de *p.Q89** perteneciente a 7 familias, todas de la misma área geográfica. El estudio de haplotipos microsatélites en una tercera familia (Familia D) además de las familias A y B previamente publicadas también confirmó este efecto fundador.

Relación fenotipo-genotipo

Se encontraron 33 sujetos con mutación *p.Q89**. La misma mutación en *GCHI* causó un amplio espectro fenotípico, que incluyó los fenotipos D, P, DP, EP y SRHI, síntomas no motores y sujetos asintomáticos. La respuesta al tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC también fue heterogénea. En la revisión de la literatura no se encontraron publicaciones que permitan establecer una relación de fenotipo y genotipo en AD-GTPCHD. Wu-Chou *et al.* (Chou *et al.* 2010) identificaron una gran deleción heterocigótica de los exones 1-3 en 3 familias en una población de DSD taiwanesa. La deleción pareció tener mayor penetrancia y se asoció con distonía multifocal y aparición en varones en la edad adulta. Sin embargo, no se han encontrado otras publicaciones que establezcan una correlación precisa fenotipo-genotipo. Una conclusión similar se obtuvo en la revisión de la literatura para las guías clínicas de las deficiencias de la BH4 (Opladen *et al.* 2020). Zirn *et al.* defendían que la causa del desarrollo de la enfermedad es la reducción de GTPCH-1 por deleciones y mutaciones puntuales y no encontraba correlación genotipo-fenotipo en su experiencia (Zirn *et al.* 2008). No parece posible sacar conclusiones con evidencia debido a la heterogeneidad en las correlaciones fenotipo-genotipo en las familias del presente estudio y en las familias publicadas en la literatura.

7.5. Tratamientos

Dosis empleadas y respuesta al tratamiento. Tratamiento a largo plazo

Respecto a las dosis empleadas, en el presente estudio, la mayoría de los pacientes fueron tratados con dosis bajas o medias de L-Dopa/inhibidor DC (se dispuso de información de la dosis empleada de 43 pacientes y el 80,1% recibieron dosis <350 mg/día o <5mg/kg/día). Con similares resultados, Trender-Gerhard *et al.* describieron que 27 pacientes (79%) de una serie de 34 casos de AD-GTPCHD recibieron tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC con dosis bajas en todos los casos, menos de 600 mg/día e incluso algunos de ellos con <100 mg/día salvo en un paciente (Trender-Gerhard *et al.* 2009). Cheyette presentó un caso de AD-GTPCHD que clínicamente simulaba una parálisis cerebral tipo PE con una drástica respuesta a dosis de L-Dopa de 4-5 mg/kg/día, y defendía que el ensayo terapéutico durante un mes parece suficiente para descartar el diagnóstico (Cheyette *et al.* 2008). Aunque generalmente el control de síntomas en la enfermedad requiere dosis bajas, Segawa realizó la “recomendación de realizar un ensayo terapéutico ante el paciente con DSD con L-Dopa/inhibidor DC durante de al menos 3 meses de tratamiento titulando la dosis progresivamente de 1 mg/kg hasta 20 mg/kg como un período de tiempo y dosis razonables” (Segawa *et al.* 2003). En la AD-GTPCHD no es esperable precisar dosis tan elevadas.

Respecto a la respuesta a tratamiento, en el presente estudio, de 48 pacientes de los que se dispone información el 93% de ellos mostraron una respuesta excelente o satisfactoria, lo que se corresponde con lo descrito tradicionalmente. Los pacientes con AD-GTPCHD mostraban una excelente respuesta inmediata y sostenida a bajas dosis de L-Dopa/inhibidor DC independientemente de la demora diagnóstica y sin efectos adversos significativos (Segawa, 2003). Así lo refrendan publicaciones como la de Trender-Gerhard *et al.* en la que observaron una respuesta inmediata incluso en los casos con discapacidad grave de larga evolución, considerándose inmediata como una respuesta excelente a los 2-3 meses de iniciado el tratamiento (Trender-Gerhard *et al.* 2009).

Respecto al tratamiento a largo plazo, hay escasos estudios que permitan extraer conclusiones firmes. Entre ellos, destaca Trender-Gerhard *et al.*, en su serie de 34

pacientes, en la que describían un tratamiento medio de 11 años con L-Dopa/inhibidor DC y a pesar de mostrar una respuesta excelente en la mayoría de los casos describían seis pacientes que a largo del tiempo necesitaban ajuste de dosis y aparecían síntomas no respondedores (*Trender-Gerhard et al. 2009*). En el presente estudio, el tiempo de tratamiento medio con L-Dopa fue de 12.4 ± 8.2 años con un rango de 1-37 años, el mayor descrito en la literatura en nuestro conocimiento. No se recogió ajustes de dosis en el estudio por el carácter retrospectivo del estudio y dada la heterogeneidad de los sujetos recogidos. De este modo, pacientes cuyo síntomas comenzaron en etapas tempranas precisaron ajustes de dosis ante el desarrollo de la enfermedad y el crecimiento propio de la edad y, como es conocido, a partir de la tercera década de la vida la distonía se estabilizó. Con las limitaciones de un estudio retrospectivo, no se observó deterioro en la respuesta a la terapia con L-Dopa/inhibidor de DC incluso en pacientes que fueron tratados por más de 30 años. Esto es notable porque la descripción de una serie de pacientes con AD-GTPCHD con una larga duración de tratamiento puede mejorar el conocimiento a largo plazo de la enfermedad y así ofrecer un pronóstico certero a las familias.

Síntomas no respondedores

En el presente estudio se recogieron síntomas no respondedores en un 20% de los pacientes tratados, frecuencia ligeramente inferior a otras publicaciones probablemente por el carácter retrospectivo del estudio. *Tadic et al.* publicaron un estudio en el que describían “signos motores residuales” en el 28% según su revisión sistemática y hasta en el 39% en su experiencia clínica en pacientes tratados. *Kim et al.* realizaron un estudio acerca de la presencia de signos motores residuales en pacientes con AD-GTPCHD tratados en una serie de 12 pacientes junto a una exhaustiva revisión bibliográfica. De entre sus pacientes, encontraron 2 pacientes que presentaban “síntomas motores residuales” e incluso 4 pacientes fueron sometidos a cirugía ortopédica. Su búsqueda bibliográfica que abarcó la experiencia de 137 casos con AD-GTPCHD planteaba síntomas motores residuales en el 39% de casos (*Kim et al. 2021*).

Estos signos motores residuales en la literatura abarcan tanto síntomas distónicos

como parkinsonianos. Segawa describió que en casos de distonía de acción y casos de inicio en la edad adulta, la L-Dopa no siempre muestra efectos completos (Segawa. 2008). Entre los síntomas no respondedores del presente estudio destacaron el temblor y la distonía con diversas distribuciones (distonía de la marcha, calambre del escribiente y hemidistonía con distonía oromandibular). El temblor, no respondió a la L-Dopa en un 31% de casos, lo que puede sugerir un síntoma de más difícil control que la distonía (31 vs 19%). En el análisis estadístico de la serie, no se encontraron diferencias en la respuesta a los tratamientos con L-Dopa/inhibidor DC según el sexo, clasificación fenotípica, latencia diagnóstica o edad, siendo conscientes de las limitaciones debido al bajo número de casos total de no respondedores. Esto se encuentra en contraposición a lo observado por Kim *et al.* en cuyo estudio la latencia diagnóstica de pacientes sin síntomas motores residuales era de 12 años y llegaba a 21,2 años en los pacientes que presentaban síntomas motores residuales transmitiendo por tanto la idea de que la demora diagnóstica podía influir en los síntomas no respondedores (Kim *et al.* 2021). Es destacable en este sentido considerar que los retrasos diagnósticos en ocasiones condicionan contracturas o procedimientos quirúrgicos innecesarios (Tadic *et al.* 2012).

Efectos adversos

Las discinesias son los principales efectos adversos que pueden aparecer con el tratamiento de L-Dopa/inhibidor DC como ocurrió en la serie de casos (en un total de cuatro pacientes). En el presente estudio, el ajuste de dosis fue generalmente suficiente para el control de este efecto adverso salvo en la paciente II.1 de la familia C, en la que las discinesias limitaron el tratamiento con L-Dopa y por ello precisó toxina botulínica para el manejo de su calambre del escribiente (López-Laso *et al.* 2012). La aparición de discinesias precoces, dolorosas e intensas deben hacer considerar el diagnóstico diferencial con pacientes con mutaciones en el gen *PARKIN* (López-Laso *et al.* 2009). Otros efectos adversos que se encontraron en nuestra serie fueron: movimientos coreicos leves junto a las discinesias en la paciente II.1 de la familia C, rash cutáneo con L-Dopa/inhibidor DC marca Sinemet que no apareció en otras formulaciones y alteraciones visuales que también desaparecieron al cambiar la marca, lo que sugiere que en la mayoría de ocasiones no son efectos adversos limitantes, salvo en los que las discinesias limiten

el incremento de la dosis de L-Dopa. En el estudio de Trender-Gerhard, los efectos secundarios que aparecieron al inicio de tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC fueron corea leve-moderada (n = 8), náuseas (n = 6), cefalea (n = 2), fatiga (n = 1) y empeoramiento temporal de la distonía o temblor postural (n = 4) y cambios de humor graves inducidos por la L-Dopa (Trender-Gerhard *et al.* 2009). No se encontraron efectos adversos a largo plazo de la L-Dopa/inhibidor DC salvo las discinesias en el caso II.1 de la familia C. Por tanto, a diferencia de lo que ocurre en la EP, no son esperables efectos adversos a lo largo de los años.

Otros fármacos empleados

En la serie de casos, se utilizaron fármacos diferentes a L-Dopa/inhibidor DC para el manejo de los síntomas motores en dos posibles escenarios: síntomas refractarios a L-Dopa/inhibidor DC como el calambre del escribiente y limitación de dosis de L-Dopa/inhibidor DC por efectos adversos como discinesias. En estas situaciones se emplearon toxina botulínica y anticolinérgicos como el trihexifenidilo para el control de distonías focales refractarias. También se emplearon entacapona, de la familia de los inhibidores de la catecol-o-metiltransferasa, y rasagilina, del grupo de los inhibidor de la monoamino-oxidasa, en pacientes con fenotipo EP y para un paciente con fenotipo D con fluctuaciones diurnas a pesar del tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC. Trender-Gerhard empleó cabergolina en cuatro pacientes pero sólo en un caso le resultó útil a largo plazo y ropinirol como agonista dopaminérgico en un caso grave (Trender-Gerhard *et al.* 2009). Respecto al manejo farmacológico para síntomas no motores, fue llamativo que una de las pacientes de la serie (II.1 de la familia D) presentaba alteraciones del sueño de manera paralela a síntomas motores residuales cuando la dosis de L-Dopa/inhibidor DC era insuficiente, de manera que incrementándose la dosis, mejoraban tanto los síntomas motores como las alteraciones del sueño sin precisar otros tratamientos. Van Hove *et al.* comunicaron que los pacientes con morbilidad psiquiátrica respondían de manera adecuada a ISRS y a otros fármacos dirigidos a mejorar la neurotransmisión serotoninérgica. También describieron que los trastornos del sueño podían relacionarse en ocasiones con movimientos anormales durante el sueño y que los pacientes afectados se beneficiaban del tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC, como ocurre en los trastornos

del sueño que presentan otros pacientes con enfermedades que implican síntomas extrapiramidales (*Van Hove et al. 2006*). Otros tratamientos no farmacológicos se han empleado en la enfermedad. Tormenti *et al.* describieron un caso pediátrico que precisó la realización de una estimulación cerebral profunda a nivel del núcleo subtalámico bilateral para control de la distonía (*Tormenti et al. 2011*).

7.6. Investigación en herramientas de diagnóstico y seguimiento

Prolactina sérica

Es conocido que la dopamina inhibe la secreción de prolactina. La determinación de prolactina en sangre se ha utilizado en el diagnóstico de diferentes trastornos por deficiencia de dopamina. Esta prueba es de fácil acceso pero carece de especificidad (*Frantz. 1979*).

Hay 2 artículos que informaron sobre los resultados de la prolactina en sujetos afectados de AD-GTPCHD: *Leuzzi et al.* identificaron un aumento moderado de la concentración de prolactina en sangre en un paciente con AD-GTPCHD con un fenotipo atípico consistente en retraso del desarrollo motor y del habla y mioclonías prominentes con distonía leve (*Leuzzi et al. 2002*). *Furukawa et al.* informaron de que los niveles de prolactina sérica en 3 pacientes con DSD sintomáticos no tratados y 2 portadores asintomáticos con la misma mutación en *GCHI* fueron normales (*Furukawa et al. 2003*). En el presente estudio, se analizó la prolactina sérica en 14 sujetos AD-GTPCHD con diversas situaciones clínicas: en portadores asintomáticos de la mutación *GCHI* (4 sujetos sin tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC), en pacientes tratados con L-Dopa/inhibidor DC (9 sujetos con respuesta variable, de los cuales 5 tuvieron excelente respuesta, 2 satisfactoria y 2 parcial) y en un paciente paucisintomático que no recibía tratamiento con L-Dopa/inhibidor DC. Los resultados de la prolactina en sangre fueron normales en todos ellos. Por tanto, la conclusión fue que la determinación de prolactina en sangre tiene baja sensibilidad como biomarcador de la deficiencia de dopamina en individuos con AD-GTPCHD.

Pterinas en sangre seca y orina

La NP y BP son catabolitos derivados de la cascada metabólica de la síntesis de BH4. La hipótesis consistió en evaluar si estos catabolitos estaban alterados en los pacientes con AD-GTPCHD. No hay evidencias al respecto tras revisar la literatura (*Opladen et al. 2020*). Dos publicaciones evaluaron la excreción urinaria de pterinas en pacientes con AD-GTPCHD. *Ye et al.* analizaron la NP urinaria en 4 casos encontrándose alterada en 2 de ellos (*Ye, 2013*). *Leuzzi et al.* analizaron la determinación de pterinas en orina de 11 casos de AD-GTPCHD y de 90 controles (*Leuzzi et al. 2012*). Las concentraciones de NP y BP en orina se agruparon de manera diferente en controles menores y mayores de 15 años (en el presente estudio se discriminó menores y mayores de 10 años). Los valores de referencia en ambos trabajos también fueron similares, aunque ligeramente superiores en nuestro estudio. Se observó que la NP urinaria se redujo casi universalmente en todos los pacientes salvo en uno (paciente asintomática portadora de *p.P23L*, cuya patogenicidad tras el análisis de patogenicidad de la variante está en duda), mientras que la BP no lo hizo, de acuerdo con las observaciones previas (*Leuzzi et al. 2012*). Se desconoce la razón que justifica estos resultados. Sin embargo, el factor limitante para evaluar los resultados de la NP en orina más importante es que la NP aumenta rápidamente si existen condiciones concomitantes que potencialmente conducen a la activación de la respuesta inmune mediada por células T (*Hoffmann et al. 1998*). Procesos comunes como infecciones virales o enfermedades autoinmunes aumentarán los valores de NP (*Molero et al. 2020*) y dado que los pacientes con AD-GTPCHD tienen un alelo normal, pueden incrementar las concentraciones de NP, enmascarando un posible defecto parcial. Por otro lado, el mismo problema puede ocurrir en sujetos control. En el estudio se descartó la presencia de enfermedad crónica y aguda y tratamientos farmacológicos, pero no se pudo descartar definitivamente la presencia de procesos inflamatorios subclínicos que pudieran incrementar los valores de NP en algunos controles. La gravedad clínica no se relacionó con la excreción de NP, ya que el 93% de los pacientes con AD-GTPCHD mostraron una baja excreción de NP, pero la gravedad clínica varió desde casos adultos paucisintomáticos hasta un fenotipo SRHI todos con buena respuesta a L-Dopa. El análisis de pterinas en sangre seca merece una mayor investigación en condiciones preanalíticas estrictamente estandarizadas.

Entre las limitaciones del estudio hay que reseñar:

- La información clínica de la mayoría de los casos se obtuvo mediante cuestionarios cumplimentados de forma retrospectiva.
- La información sobre los antecedentes familiares de EP se obtuvo mediante la anamnesis obtenida de los pacientes o de sus familiares. Esto no permitió distinguir de manera detallada la EP neurodegenerativa del cuadro de parkinsonismo asociado a la enfermedad de Segawa, con el consecuente riesgo de sobreestimar los casos de EP
- La información sobre los síntomas no motores se obtuvo mediante evaluaciones clínicas de rutina, salvo en una serie de pacientes a los que se realizaron evaluaciones sistemáticas de estos síntomas (*López-Laso et al. 2011*). La enfermedad de Segawa se caracteriza por el trastorno motor por lo que existe el riesgo de soslayar síntomas no motores tales como los trastornos del sueño si no se realiza una búsqueda activa de ellos.
- La investigación sobre prolactina, pterinas en sangre seca y orina fue compleja debido a la heterogeneidad en las condiciones preanalíticas de los pacientes y controles.

8. CONCLUSIONES

1. Si se considera la prevalencia publicada previamente de 0,5 casos por millón de habitantes (Nygaard et al. 1991), se encontró un elevado número de sujetos con la enfermedad de Segawa en España lo que sugiere que se trata de una enfermedad infradiagnosticada. Entre los motivos de este infradiagnóstico muy probablemente esté la heterogeneidad clínica de la enfermedad corroborada en el estudio y el desconocimiento de los profesionales, que dificulta la sospecha diagnóstica.
2. Una de las claves diagnósticas para la enfermedad de Segawa es la fluctuación diurna de la distonía con empeoramiento progresivo y mejoría tras descanso o sueño, sin embargo en el presente estudio se observó que las fluctuaciones diurnas dependen de la edad y el fenotipo clínico. Son propias del patrón típico distónico en la infancia y no son comunes en fenotipos no distónicos de aparición más tardía.
3. Respecto al tratamiento, el estudio sugiere que no hay deterioro en la respuesta al tratamiento a largo plazo y, aunque clásicamente la enfermedad se ha definido por una respuesta terapéutica inmediata y sostenida, esto no debe considerarse patognomónico ya que un porcentaje considerable de los pacientes tenían síntomas que no respondían a la L-Dopa y que afectaban la vida diaria.
4. Se trata de una enfermedad con gran heterogeneidad alélica. Esto fue corroborado en el estudio por la identificación de 7 variantes exclusivamente descritas en la cohorte, 5 de ellas variantes noveles de *GCHI* causantes de la enfermedad de Segawa. La gran heterogeneidad clínica y alélica actualmente dificulta establecer una adecuada correlación genotipo-fenotipo.
5. El estudio respalda la hipótesis de un efecto fundador de *p.Q89** en Córdoba tras detectarse que esta región geográfica presenta la prevalencia más alta conocida hasta ahora de esta enfermedad. Además se ha demostrado su extensión a otras regiones próximas de Andalucía con la descripción de un total de 33 sujetos pertenecientes a 7 familias y el estudio de haplotipos satélite.
6. Respecto al estudio de posibles biomarcadores de la enfermedad se encontró que la prolactina no parece resultar útil para el seguimiento de los enfermos. Sin embargo,

se observó que la determinación de neopterina urinaria puede ser un biomarcador periférico prometedor que contribuya a mejorar el diagnóstico de los pacientes con la enfermedad de Segawa.

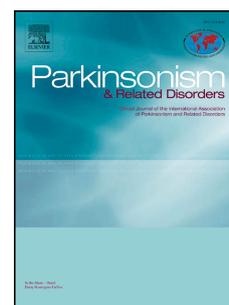
ANEXOS

Anexo 1. Artículo científico publicado en *Parkinsonism & Related Disorders*

Journal Pre-proof

Genetic landscape of Segawa disease in Spain. Long-term treatment outcomes

Joaquín A. Fernández-Ramos, María José De la Torre-Aguilar, Beatriz Quintans, Juan Luis Pérez-Navero, Katrin Beyer, Eduardo López-Laso, Spanish Segawa Disease Research group



PII: S1353-8020(21)00418-1

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2021.11.014>

Reference: PRD 4922

To appear in: *Parkinsonism and Related Disorders*

Received Date: 22 June 2021

Revised Date: 10 November 2021

Accepted Date: 12 November 2021

Please cite this article as: Fernández-Ramos JoaquínA, De la Torre-Aguilar MaríJosé, Quintans B, Pérez-Navero JL, Beyer K, López-Laso E, Spanish Segawa Disease Research group, Ochoa Sepúlveda JJ, Serrano Cárdenas J, Sobrido Gómez MJ, Mora MD, Moreno-Medinilla E, Ramos J, Llorente M, Teva MD, Castaño-de la Mota C, Martínez-Ruiz J, González Gutierrez-Solana L, Martín MJ, Gómez-Esteban JC, Hernandez-Vara J, García Cazorla Á, Artuch R, Adames A, Mir P, Genetic landscape of Segawa disease in Spain. Long-term treatment outcomes, *Parkinsonism and Related Disorders* (2021), doi: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2021.11.014>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2021 Published by Elsevier Ltd.

Original article:

TITLE:

Genetic landscape of Segawa disease in Spain. Long-term treatment outcomes.

AUTHORS:

Joaquín A. Fernández-Ramos ^a, María José De la Torre-Aguilar ^a, Beatriz Quintans^b, Juan Luis Pérez-Navero ^a, Katrin Beyer^{*c}, Eduardo López-Laso^{*a}, Spanish Segawa Disease Research group.

^a Department of Paediatrics, University Hospital Reina Sofía, University of Córdoba, Spain

Joaquín A Fernández-Ramos, Paediatric Neurology Unit, Department of Paediatrics, University Hospital Reina Sofía, IMIBIC and CIBERER, Av. Menendez Pidal s/n, Córdoba, Spain (JAFR) jafdezramos@gmail.com

María José De la Torre-Aguilar, Department of Paediatrics, University Hospital Reina Sofía, Av. Menendez Pidal s/n, Córdoba, Spain (MJTA) delatorremj4@gmail.com

Juan Luis Pérez-Navero, Department of Paediatrics, University Hospital Reina Sofía, Av. Menendez Pidal s/n, Córdoba, Spain (JLPN) pereznaverojuan@gmail.com

Eduardo López-Laso*, Paediatric Neurology Unit, Department of Paediatrics, University Hospital Reina Sofía, IMIBIC and CIBERER, Av. Menendez Pidal s/n, Córdoba, Spain (ELL) eduardo.lopez.sspa@juntadeandalucia.es

^b Beatriz Quintans PhD. Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Spain. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER-U711), Santiago de Compostela, Spain. beaquintans@gmail.com

^c Katrin Beyer*. Department of Pathology, Research Institute Germans Trías i Pujol, Carretera de Canyetes s/n, Badalona, Barcelona, Spain (KB) katrinbeyer@hotmail.com

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author and reprint requests:

Eduardo López-Laso

Paediatric Neurology Unit, Department of Paediatrics, University Hospital Reina Sofía
 Av. Menéndez Pidal s/n,
 14004 Córdoba
 Spain

Phone: 00 34 957011908 Fax: 00 34 957010017

Email: elolaso@gmail.com

Running title: Approach to Segawa disease in Spain

Word count text excl. summary, acknowledgements, references, legends: 3323 words.

Number of figures and tables: 2 figures, 2 tables.

Supplementary data: 4 figures, 3 tables.

Appendix

The Spanish Segawa Disease Study Group collaborators are as follows:

J.J. Ochoa Sepúlveda and J. Serrano Cárdenas, University Hospital Reina Sofía, Cordoba, Spain; M.J. Sobrido Gómez, University Clinic Hospital of Santiago, Santiago de Compostela, Spain; M.D. Mora, E. Moreno-Medinilla, Regional Hospital, Malaga, Spain; J. Ramos, Torrecardenas Hospital, Almería, Spain; M. Llorente, University Hospital Valladolid, Spain; M.D. Teva, Elda Hospital, Alicante, Spain; C. Castaño-de la Mota, Infanta Leonor Hospital, Madrid, Spain; J. Martínez-Ruiz, University Hospital Donostia, Donostia, Spain; L. González Gutierrez-Solana, Niño Jesus Hospital, Madrid, Spain; M.J. Martín, Clinic Hospital, Barcelona, Spain; J.C. Gómez-Esteban, Cruces Hospital, Bilbao, Spain; J. Hernandez-Vara, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain; Á. García Cazorla and R. Artuch, Sant Joan de Déu Hospital, Barcelona, Spain; A. Adarmes and P. Mir, Virgen del Rocio University Hospital, Sevilla, Spain.

	Affiliation	e-mail
Joaquín A. Fernández-Ramos	Paediatric Neurology Unit, Department of Paediatrics, University Hospital Reina Sofía, IMIBIC and CIBERER, Córdoba, Spain	jafdezramos@gmail.com

Phd; MD María José De la Torre-Aguilar	Paediatric Research and Metabolism Unit, Reina Sofia University Hospital, Maimónides Institute for Biomedical Research of Córdoba (IMIBIC), University of Córdoba, 14010 Córdoba, Spain	delatorremj4@gmail.com
Juan Luis Pérez-Navero	Paediatric Research Unit. Department of Paediatrics at Reina Sofia University Hospital. Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC) at Cordoba University, CIBERER, Spain. Ave. Menendez Pidal s/n. PC: 14004, Cordoba, Spain.	juanpereznavero@hotmail.com
José Serrano Cárdenas	Department of Paediatrics, University Hospital Reina Sofía, Córdoba, Spain	jose.serrano-car@hotmail.com
María-Jesús Sobrido	Biomedical Research Institute (INIBIC), Hospital Clínico universitario, A coruña	ssobrido@gmail.com
Ángels García-Cazorla	Neurometabolic Unit and Synaptic Metabolism Lab, Neurology Department, Institut Pediàtric de Recerca, Hospital Sant Joan de Déu, and MetabERN, 08950, Barcelona, Catalonia, Spain	agarcia@sjdhospitalbarcelona.org
Rafael Artuch Iriberrí	Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Clinical Biochemistry, Department, Barcelona, Spain.	Rartuch@sjdhospitalbarcelona.org
Juan José Ochoa Sepúlveda	Department of Neurology, University Hospital Reina Sofía,	ochoasepulveda@gmail.com

	IMIBIC and CIBERER, Córdoba, Spain	
María Dolores Mora Ramírez	Paediatric Neurology Unit, Department of Paediatrics, University Regional Hospital of Málaga, Spain	mdmoraramirez@yahoo.es
Esther Moreno-Medinilla	Paediatric Neurology Unit, Department of Paediatrics, University Regional Hospital of Málaga, Spain	esthermoreno84@hotmail.com
Julio Ramos Lizana	Paediatric Neurology Unit, Department of Paediatrics, University Torrecárdenas Hospital, Almería, Spain	jramoslizana@telefonica.net
Javier Marco Llorente	Department of Neurology. University Clinic Hospital of Valladolid, Spain	javmarcoll@gmail.com
María Dolores Teva Galán	Department of Paediatrics, General Hospital General of Elda, Alicante, Spain	lolateva@gmail.com
Cristina Castaño de la Mota	Department of Paediatrics, Infanta Leonor Hospital, Madrid, Spain	ccastano993@yahoo.es
Javier Martínez-Ruiz	Department of Neurology. Donostia University Hospital. Biodonostia Health Institute, San Sebastián, Spain	JAVIER.RUIZMARTINEZ@osakidetza.eus

Luis González Gutierrez- Solana	Paediatric Neurology Unit, Department of Paediatrics, Niño Jesús Hospital and CIBERER, Madrid, Spain	lggutierrezsolana@salud.madrid.org
María José Martí	Department of Neurology. Hospital Clinic of Barcelona, Spain CIBERNED (CB06/05/0018-ISCI) ERN-NRD	MJMARTI@clinic.cat
Juan Carlos Gómez- Esteban	Department of Neurology. University Hospital of Cruces, Bilbao, Spain	juancarlos.gomezesteban@osakidetza.eus
Jorge Hernandez- Vara	Neurology Department and Neurodegenerative Diseases Research Group. Vall D'Hebron University Campus Passeig Vall D Hebron 119-129 08035. Barcelona. Spain	hernandezvarajorge76@gmail.com
Astrid Adames	Movement Disorders Unit, Department of Neurology and Clinical Neurophysiology, Institute of Biomedicine of Seville, Virgen del Rocío University Hospital/CSIC/University of Seville, Seville, Spain. Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Spain.	adames-ibis@us.es
Pablo Mir	Movement Disorders Unit, Department of Neurology and Clinical Neurophysiology, Institute of Biomedicine of Seville, Virgen del Rocío University Hospital/CSIC/University of Seville, Seville, Spain. Center for	pmir@us.es

	Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Spain.	
Katrin Beyer*	Department of Neuropathology, University Hospital Germans Triás i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain	katrinbeyer@hotmail.com
Eduardo López-Laso*	Paediatric Neurology Unit, Department of Paediatrics, University Hospital Reina Sofía, IMIBIC and CIBERER, Córdoba, Spain	eduardo.lopez.sspa@juntadeandalucia.es

Compliance with Ethical Guidelines

Authors' contributions: J.A. Fernández-Ramos, E. López-Laso, K. Beyer and B. Quintans designed the study and wrote the initial draft of the manuscript. All authors examined patients and/or collected data. All authors revised the manuscript and approved the submission.

No sources of funding have been specified, nor are there any conflicts of interest for the study.

Ethics approval and informed consent: All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committees on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2013. The project was approved by the ethical committee at University Hospital Reina Sofía (Internal code: 1171-N-19). Procedures followed the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2013.

ABSTRACT

Introduction

In 2009, we described a possible founder effect of autosomal dominant Segawa disease in Córdoba (Spain) due to mutation *c.265C>T* (*p. Q89**) in the *GCH1* gene. We present a retrospective multicentre study aimed at improving our knowledge of Segawa disease in Spain and providing a detailed phenotypic-genotypic description of patients.

Methods

Clinical-genetic information were obtained from standardized questionnaires that were completed by the neurologists attending children and/or adults from 16 Spanish hospitals.

Results

Eighty subjects belonging to 24 pedigrees had heterozygous mutations in *GCH1*. Seven genetic variants have been described only in our cohort of patients, 5 of which are novel mutations. Five families not previously described with *p. Q89** were detected in Andalusia due to a possible founder effect. The median latency to diagnosis was 5 years (IQR 0-16). The most frequent signs and/or symptoms were lower limb dystonia (38/56, 67.8%, $p=0.008$) and diurnal fluctuations (38/56, 67.8%, $p=0.008$). Diurnal fluctuations were not present in the phenotypes other than dystonia. Fifty-three of 56 symptomatic patients were treated with a levodopa/decarboxylase inhibitor for (mean \pm SD) 12.4 \pm 8.12 years, with 81% at doses lower than 350 mg/day (≤ 5 mg/kg/d in children). Eleven of 53 (20%) patients had non-responsive symptoms that affected daily life activities. Dyskinesias (4 subjects) were the most prominent adverse effects.

Conclusion

This study identifies 5 novel mutations and supports the hypothesis of a founder effect of *p. Q89** in Andalusia. New insights are provided for the phenotypes and long-term treatment responses, which may improve early recognition and therapeutic management.

KEY WORDS

Dopa-responsive dystonia, autosomal dominant Segawa disease, *GCH1*, GTPCH, autosomal dominant GTPCH deficiency, Dystonia, Parkinsonism, Parkinson's disease, Levodopa, Dyskinesias, Founder mutation, Dopamine

KEY POINTS:

- Five genetic changes were found for the first time in Segawa disease.
- Seven genetic changes were described only in our cohort.
- Five novel families with the founder mutation *p. Q89** were found in Andalusia.
- Diurnal fluctuations characterized dystonia but not the other phenotypes.
- Twenty percent of patients had levodopa non-responsive symptoms that affected daily life.

INTRODUCTION

Autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase (GTPCH) deficiency (AD-GTPCHD) or autosomal dominant Segawa disease is the most common cause of dopa-responsive dystonia (DRD) [1] and a rare genetic dystonia that was first described in 1976 [2](OMIM # 128230). Heterozygous subjects with *GCH1* mutations/deletions may develop the disease due to tetrahydrobiopterin (BH4) deficiency, which leads to decreased dopamine and serotonin biosynthesis. The response to levodopa/decarboxylase (L-Dopa/DC) inhibitor treatment is excellent and sustained in most cases [3], although long-term follow-up studies are limited [4–6].

Segawa disease has an estimated prevalence of 0.5 per million [4]. The disease typically presents during the first decade of life with lower limb dystonia with diurnal fluctuations and can progress to multifocal or generalized dystonia and parkinsonism. In the second decade, upper limb dystonia and tremor are common, and in adulthood, parkinsonism predominates.

In the literature, the average latency to diagnosis is 13 years [7]. This is important because AD-GTPCHD is an eminently treatable condition. To date, 270 different AD-GTPCHD-causing mutations have been identified in the *GCH1* gene (HGMD Professional 2020.4).

Few publications contain explicit information about the long-term treatment responses and L-Dopa/DC inhibitor nonresponsive symptoms [6,7].

In 2009, we described a possible founder effect of Segawa syndrome in Córdoba (Andalusia, southern Spain) due to the *c.265C>T* (*p. Q89**) in the *GCH1* gene [9], which affected 23 individuals from two pedigrees in an area of 800,000 inhabitants. Since then, we have been committed to increasing the level of awareness of AD-GTPCHD and the knowledge of its genetic landscape in our region and throughout the country. The objectives of this study were to describe the clinical features and genetic changes of 80 individuals belonging to 24 families with AD-GTPCHD from Spain.

METHODS

This is a cross-sectional and retrospective multicentre study led by the host institution (e.g., Hospital Reina Sofía in Córdoba) between 2010 and 2020 in Spain. Clinical and genetic information was obtained from standardized questionnaires that were completed by neurologists attending children and/or adults from 16 Spanish health care centres. The inclusion criteria were an AD-GTPCHD-compatible molecular diagnosis due to *GCH1* variants, as confirmed by Sanger sequencing. The compound heterozygous cases of families B and F were not included because they exhibited molecularly and clinically recessive patterns. However, the index case in family D was recruited because she presented a dominant pattern.

Patients

We assessed the age of onset, symptoms at presentation and before treatment initiation, time at diagnosis, and response to treatment with an L-Dopa/DC inhibitor, including nonresponsive symptoms, duration of treatment, adverse effects, other treatments, and long-term outcome.

To assess penetrance, a subject was considered to be symptomatic if he or she had symptoms and signs of dystonia or parkinsonism or other signs or symptoms suggestive of AD-GTPCHD. Patients were classified according to the following definitions [10]:

- Dystonia (D): a movement disorder characterized by sustained or intermittent muscle contractions causing abnormal, often repetitive, movements, postures, or both [10].
- Parkinsonism (P) was defined by the presence of bradykinesia or hypokinesia associated with rigidity (akinetic rigid syndrome) or resting tremor.
- Dystonia/parkinsonism (DP): subjects combining both movement disorders.
- Parkinson's disease (PD): according to Movement Disorder Society diagnostic criteria for PD [11].
- Infantile hypokinetic rigid syndrome (IHRS): infants with akinesia associated with rigidity, without evidence of dystonia or spasticity.
- Spastic paraparesis (SP): bilateral lower extremity spasticity, hyperreflexia and extensor plantar responses.

Most of the patients were systematically assessed in routine follow-up visits for this classification scheme.

The doses of an L-Dopa/DC inhibitor were classified as low (≤ 150 mg/day or ≤ 1 mg/kg/d), medium (151-350 mg/d or 1-5 mg/kg/d), and high (> 350 mg/kg/d or > 5 mg/kg/d). The responses to treatment were perceived by the neurologist who completed the questionnaire and were classified as excellent (perceived as complete resolution of signs and symptoms), satisfactory (resolution of most signs and symptoms), suboptimal (resolution of $< 50\%$ of signs and symptoms), poor (clinically nonsignificant improvement) or an absence of response.

Molecular studies.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using standard techniques. All *GCH1* exons, including splice regions, were amplified by PCR and analysed by Sanger sequencing or NGS and for individuals carrying the founder p.89X* variant, additional SNPs were analysed [9]. The functional consequences of the identified variants were assessed using the VarSome tool (<https://varsome.com>) [12], which combines multiple information sources. All variants were searched using Mastermind Pro (<https://www.genomenon.com/mastermind>). Variant classification followed the recommendations of the American College of Medical Genetics (ACMG) [13].

Additionally, intron 5 retention was tested in the cDNA that was obtained from one of the patients by using specific primers. A detailed description is given in Table 1 and in the supplementary material (Suppl. Table 1 and Suppl. Table 2).

Statistical analyses

The data are expressed as the means \pm standard deviation (SD) or median (interquartile range) for quantitative variables, while the qualitative variables are reported as absolute and relative frequencies. Normal data distributions were assessed by the Shapiro-Wilk test. Homogeneity of variances was estimated using Levene's test. Comparisons of means between groups in the case of continuous variables with normal distributions were carried out with the Student's t-test for unpaired samples, while the Mann-Whitney U-test was used for the variables with nonnormal distributions. Categorical variables were assessed using the χ^2 or Fisher exact test.

All tests were two-tailed, and a P-value less than 0.05 was considered to be statistically significant. Data were analysed with the "Statistical Package for the Social Sciences" (SPSS for Windows, release 22.0.0 2010, SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

All procedures were conducted in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2013. The project was approved by the ethical committee at University Hospital Reina Sofía (Internal code: 1171-N-19).

RESULTS

Eighty subjects (49 female and 31 male) belonging to 24 pedigrees were included in the study (Fig. 1). Twenty-six cases have been updated since earlier reports [9,14–17].

Clinical findings:

Fifty-six AD-GTPCHD individuals (70%) were identified as symptomatic, with a higher penetrance observed in women (symptomatic female:male ratio 2:1). Figure 1 and table 2 show the pedigrees together with the clinical information and genetic changes of each subject.

The median age of disease onset was 9 years (IQR 4.5-21), and 9 cases (16%) presented before age 3 years. The median latency to diagnosis was 5 years (IQR 0-16). A significant difference ($p < 0.001$) in the latency to diagnosis time was observed among patients diagnosed before 2000 (median 20 years, IQR 13.2-33.5); between 2001 and 2010 (median 2 years, IQR 0-4.5) and after 2010 (<1 year, IQR 0-3.5). The latency to diagnosis time in patients without dystonia or diurnal fluctuations were 19 ± 17.7 years. Figure 2 shows the subject's year of birth, age at onset of symptoms, age at molecular diagnosis, duration of treatment with an L-Dopa/DC inhibitor and its response.

The most frequent signs and/or symptoms before treatment with an L-Dopa/DC inhibitor were lower limb dystonia (38/56) and diurnal fluctuations (38/56). Postural/action type tremor was more frequent (16/56, 28.5%, $p=0.029$) than resting tremor (4/56).

The most common phenotype was D (40/56), its median age of disease onset was 8 years (IQR 4,23-14). Dystonia was localized in the lower limbs (33/40), upper limbs and/or cervical region (12), and/or the trunk (11). Its median latency to treatment was 4,5 years. The median age of disease onset of the DP phenotype (5/56) was $19 \pm 16,3$ years. Most of the D and DP patients exhibited diurnal fluctuations (38/45). The odds ratio for diurnal fluctuations in D compared to other phenotypes was 17 (IC 95% 4.08-70.76). Diurnal fluctuations were not present in patients without dystonia. The median age of disease onset of P phenotype (4/56) was $40 \pm 17,78$ years. Two cases with PD and one case with an IHRS were described previously [9,15]. The median age of disease onset of the SP phenotype (4/56) was 2 years (information not available for 2 cases). Both patients were diagnosed at 40 years of age.

Six patients were studied with a beta-CIT SPECT scan. The results were normal in four of them (I-3 of family A, I-1 of E, II-1 of O and I-1 and II-1 of Q) and were pathological in one (I-1 of family B). Nine of 24 (37.5%) AD-GTPCHD families had members with a diagnosis of PD according to the patient's and/or family member/s statements. However, we did not have access to the genetic *GCH1* status or DaT-SCAN results in most of these cases.

Nonmotor symptoms consisted of dysphoria (7), insomnia (3), borderline intelligence quotient (IQ) (9) and dementia (2 patients with PD) (Table 2, Suppl. Table 3). All patients who presented nonmotor symptoms were receiving levodopa treatment but one (B III.8 borderline IQ). In one case, insomnia improved with increasing L-Dopa/DC inhibitor doses.

Treatment and long-term outcomes.

The updated data on the L-dopa/DC inhibitor responses were collected from 53 of 56 (95%) symptomatic subjects receiving treatment for 12.4 ± 8.2 years (range 1-37) (Table 2).

The L-Dopa/DC inhibitor doses were low (16 patients), medium (19) or high (8) (information on doses was not available for 10 cases). The response to the L-Dopa/DC inhibitor treatment was classified by the attending neurologist as excellent in 31 patients (58%), satisfactory in 14 (26%), suboptimal in 2 (4%), and poor in one (2%). In 5 cases, the response to L-Dopa/DC inhibitors was not classified. Patients with levodopa non-responsive dystonia who received other additional therapy were: patient CII.1 received botulinum toxin and trihexyphenidyl for writer's cramp and persistent treatment limiting dyskinesias even with low doses of levodopa [14], patient RIII.2 received botulinum toxin for cervical dystonia and patient QI.1 who was treated with entacapone due to motor fluctuations.

Eleven patients treated with L-Dopa/DC inhibitors had nonresponsive symptoms that affected daily life activities, including PD (1); tremor (5); and dystonia (e.g., gait dystonia, 7; writer's cramp, 1; and hemidystonia with oromandibular dystonia, 1). Tremor was levodopa non-responsive in 5 out of 16

patients. We have excluded for this calculation 2 patients with PD and 2 subjects with postural tremor who did not receive L-Dopa/DC inhibitor treatment. Non-responsive dystonic signs/symptoms were found in 7 out of 35 patients with phenotype D treated with L-Dopa/DC inhibitors. We did not find differences in the response to L-Dopa/DC inhibitor treatments according to sex, clinical classification, diagnostic latency or age. Regarding deterioration of the response to the L-Dopa/DC inhibitor treatment and adverse effects, one of the two PD patients presented wearing-off phenomena 5 years after initiation of the L-Dopa/DC inhibitor treatment, and 4 patients with D presented dyskinesias with low L-Dopa/DC inhibitor doses, in addition to nonresponsive symptoms in 2 of them.

Molecular studies

A detailed description of all genetic changes is shown in Table 1. Nineteen different genetic changes were found, and seven were described only in our series: six protein-truncating variants (31.6%), eight missense variants (42.1%), three intronic splice region variants (15.8%), one in-frame deletion and one 3'UTR change (5.2%, each).

Pathogenic and likely pathogenic variants:

The most frequent mutation in our population was *c.265C>T* (*p. Q89**) (36 of 78 alleles), a possible founder mutation in Córdoba [9]. Since then, 10 additional individuals carrying the same variant and the associated SNPs [9] have been detected in five families living in Córdoba and in nearby geographic areas of Andalusia. All additionally identified variants are summarized in Table 1.

Five *GCH1* variants causing AD-GTPCHD, which are all located at conserved positions in the coding region, had not been previously described (Table 1, Suppl. Fig. 1). Two of them were truncated, and three missense variants affected highly conserved amino acids. Functional GTPCH is composed of 10 identical monomers. The truncated variants bear shorter proteins that interfere with the formation of a functional decamer. Additionally, the three missense variants were found in codons located in domains that are necessary for decamer structure maintenance (*N85K*), tertiary structure stabilization (*V181 L*), or BH4 binding (*G232S*) (Suppl. Fig. 2).

We also identified two splice site variants in intron 5, *IVS5+3insT* and *IVS5-6T>G*, which could cause changes in alternative splicing (e.g., intron 5 retention). We tested this possibility for an *IVS5-6T>G* carrier, but neither intron 5 containing *GCH1* transcripts nor nonsense-mediated mRNA decay could be detected. *GCH1* alternative splicing affects mainly exon 6 and results in 4 alternative transcripts (Suppl. Fig. 3). Whether *IVS5+3insT* and *IVS5-6T>G* affect the splicing of these transcripts needs to be further studied.

The variant identified at *c. *20C>T*, also described as *c. *16+4C>T*, is located within a splice-site region of a noncanonical *GCH1* transcript (Suppl. Fig. 3), which suggests that it could alter the splicing patterns and miRNA recognition sites. *GCH1* 3'UTR analysis with miRTarBase

(<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php>) revealed 15 miRNAs targeting this region, among which hsa-miR-124-3p has three binding sites (Suppl. Fig. 4a). Since all contain a conserved C at position 20 (Suppl. Fig. 4b), the change to a T in *c. *20C>T* diminished miRNA binding affinity, which reduced posttranscriptional *GCH1* inhibition. If present on a mutated allele, overproduction of GTPCH with structural changes may lead to impaired decamer formation.

DISCUSSION

We found 80 individuals with heterozygous *GCH1* mutations in a population of 47 million inhabitants in Spain. Traditionally, the prevalence of Segawa disease has been estimated at 0.5 per million [8]; nevertheless, a recent Serbian study described an estimated prevalence of 2.96 per million [18]. The precision of the prevalence estimations is probably very low, and epidemiological studies for this disease are lacking. Although we are aware that through our study, we cannot estimate the real prevalence, our results point to a figure similar to that of the Serbian study [18]. Moreover, we suspect an underestimation of the real prevalence due to incomplete reporting and probably underdiagnosis.

Clinical findings:

In our series, the frequency of early onset symptoms (<2 years) was significantly higher than that previously published [8]. Although we consider that this can reflect an increased awareness for early presentations of the disease because most of the clinicians participating in the study were pediatric neurologist, we would like to highlight that early presentations of the disease are not rare. The latency from symptom onset to diagnosis has clearly improved in the last decade, which is probably due to the increased awareness of the condition and availability of genetic diagnostic tools. However, Tadic *et al.* [7] found average diagnosis delays of 13.5 years and a longer delay in diagnosis after the availability of genetic testing.

Phenotype D was the most frequent prior to treatment initiation. Gait difficulties, foot eversion and unilateral or bilateral pes equinovarus or equinovalgus were the main initial manifestations. Diurnal fluctuations of motor symptoms, a diagnostic AD-GTPCHD hallmark, was absent in patients without dystonia. Patients without dystonia and without diurnal fluctuations had a longer latency to diagnosis. Diurnal fluctuations are a common characteristic of patients with inborn errors of neurotransmitter metabolism and BH4 deficiencies [8], although they are not universally present. In AD-GTPCHD diurnal fluctuations diminish with age and are usually absent in adult onset cases [3]. In our series, all patients with non-dystonia phenotypes did not present diurnal fluctuations, and in 5 out of 8, presentation was in adulthood.

Sleep disturbances and psychiatric symptoms such as dysphoria, anxiety and depression were detected by routine clinical evaluations with low frequencies.

Cognitive impairment has been occasionally described in AD-GTPCHD [6]. As previously described [19], we found cognitive impairment in 9 of 14 patients belonging to families B and C in a systematic evaluation of IQ and neuropsychiatric symptoms. This may reflect a vulnerability of dopaminergic and serotonergic neuronal networks involved in higher cortical functions [19]. Patients from other pedigrees were referred for psychiatric examination or neuropsychological testing in case that symptoms were detected in clinical follow-up visits. Due to these findings, we consider that IQ assessments and evaluations of nonmotor symptoms should be considered in AD-GTPCHD patients.

Individuals with *GCH1* mutations and parkinsonism in the absence of dystonia, as well as cases with PD-like symptoms, have been described [20,21]. We found that 37% of our families with *GCH1* mutations had members with a diagnosis of PD according to the patient's and/or family member/s statements; however, we were not able to study them systematically. Furthermore, in large PD cohorts, a small percentage of *GCH1* carriers have been detected by next-generation sequencing [21]. Clinically, it may be difficult to differentiate whether a *GCH1* mutation carrier with parkinsonism presents neurodegenerative PD or if the phenotype is part of the clinical spectrum of AD-GTPCHD. Dopamine transporter imaging studies are a differential diagnostic tool [20]. However, Mencacci et al. found rare *GCH1* variants associated with an increased risk for Parkinson's disease, and suggested that AD-GTPCHD predisposes to nigrostriatal cell loss. This is in line with previous reports of adult-onset parkinsonism in *GCH1* mutation carriers with abnormal dopamine transporter imaging studies [20,21].

Treatment and long-term outcomes:

Most of our patients were treated with low or medium L-Dopa/DC inhibitor doses and showed an excellent or satisfactory response. However, 20% of patients had nonresponsive symptoms that affected the activities of daily life. Adverse effects of long-term L-Dopa/DC inhibitors are rare; the most prominent are dyskinesias, which may be a limiting side effect [14]. We did not observe a worse response to the L-Dopa/DC inhibitor or worse clinical outcome due to a longer diagnostic delay. There was no deterioration in the L-Dopa/DC inhibitor therapy response even in patients who were treated for longer than 30 years, except in one of the two patients with PD. This is remarkable because series of AD-GTPCHD patients with a long treatment durations are scarce [5,6] and confirms a good long-term outcome.

Molecular studies

The initially described possible founder effect of the *p. Q89** variant [9] could be confirmed by the identification of 36 *p. Q89** carriers (42%) belonged to 7 families. Additionally, we describe 19 different genetic changes, 5 of which were novel pathogenic or likely pathogenic variants. In accordance with previous studies where up to 87% of autosomal dominant Segawa syndrome cases have been

associated with heterozygous mutations in *GCH1* detected with comprehensive *GCH1* studies [22], our findings underline the importance of genetic testing.

Almost one-third of the 19 identified variants were nonsense and frameshift mutations bearing truncated forms of GTPCH. Three were the novel missense variants *p. N85K*, *p. V181 L* and *de novo* variant *p. G232S*. As a functional protein, GTPCH is composed of 10 identical monomers forming a homodecamer [23], which interacts with its regulatory protein, GFRP, and is then regulated by two effector molecules, BH₄ and phenylalanine [24]. Since the GTPCH C-terminus is involved in decamer formation, all truncated variants are very likely to be pathogenic [25,26]. Additionally, *p. N85K* and *p. V181 L*, which are located in regions necessary for the maintenance of the decamer, and *p. G232S*, which is located in the BH₄-binding site, interfere significantly with the normal function of GTPCH.

Additionally, 15.8% of all variants were splice-site mutations that potentially altered alternative *GCH1* splicing. Although their location suggested possible intron retention, we were only able to amplify the major *GCH1* transcript. Since the expression of alternative transcripts is often tissue specific, additional sources, including muscle and brain, should be analysed in future studies. The 3'UTR variant *c. *20C>T* may have two different regulatory effects through alteration of miRNA binding and the efficiency of alternative exon 6 splicing. If one of these effects plays a role in the development of AD-GTPCHD, it must be addressed in the future.

Our study has some limitations; the clinical information from most of the cases was obtained retrospectively. Additionally, information about family members with PD diagnoses was obtained without *GCH1* studies. Information regarding nonmotor symptoms was obtained by routine clinical evaluations, as systematic evaluations of these symptoms were not performed in some of the patients.

In conclusion, this collaborative national network study identifies five novel *GCH1* mutations that cause autosomal dominant Segawa syndrome and supports the hypothesis of a founder effect of *p. Q89** in Andalusia. New insights are brought into the phenotypes, clinical characteristics associated with a longer delay in diagnosis and long-term treatment responses, which may improve early recognition and therapeutic management.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to all patients and families for their cooperation and contributions.

References

- [1] C. Klein, Genetics in dystonia, *Park. Relat. Disord.* 20 (2014) S137–S142. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70033-6](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70033-6).
- [2] M. Segawa, A. Hosaka, F. Miyagawa, Y. Nomura, H. Imai, Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation., *Adv. Neurol.* 14 (1976) 215–233. <https://doi.org/10.1007/978-3->

- 7091-9146-0_17.
- [3] M. Segawa, Y. Nomura, N. Nishiyama, Autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency (Segawa disease), in: *Ann. Neurol.*, John Wiley and Sons Inc., 2003. <https://doi.org/10.1002/ana.10630>.
- [4] T.G. Nygaard, C.D. Marsden, S. Fahn, Dopa-responsive dystonia: Long-term treatment response and prognosis, *Neurology*. 41 (1991) 174–181. https://doi.org/10.1212/wnl.41.2_part_1.174.
- [5] W.J. Hwang, D.B. Calne, J.K.C. Tsui, R. De La Fuente-Fernández, The long-term response to levodopa in dopa-responsive dystonia, *Park. Relat. Disord.* 8 (2001) 1–5. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(00\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(00)00084-5).
- [6] I. Trender-Gerhard, M.G. Sweeney, P. Schwingenschuh, P. Mir, M.J. Edwards, A. Gerhard, J.M. Polke, M.G. Hanna, M.B. Davis, N.W. Wood, K.P. Bhatia, Autosomal-dominant GTPCH1-deficient DRD: Clinical characteristics and long-term outcome of 34 patients, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 80 (2009) 839–845. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.155861>.
- [7] V. Tadic, M. Kasten, N. Brüggemann, S. Stiller, J. Hagenah, C. Klein, Dopa-responsive dystonia revisited: Diagnostic delay, residual signs, and nonmotor signs, *Arch. Neurol.* 69 (2012) 1558–1562. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2012.574>.
- [8] T. Opladen, E. López-Laso, E. Cortès-SaladelaFont, T.S. Pearson, H.S. Sivri, Y. Yildiz, B. Assmann, M.A. Kurian, V. Leuzzi, S. Heales, S. Pope, F. Porta, A. García-Cazorla, T. Honzík, R. Pons, L. Regal, H. Goetz, R. Artuch, G.F. Hoffmann, G. Horvath, B. Thöny, S. Scholl-Bürgi, A. Burlina, M.M. Verbeek, M. Mastrangelo, J. Friedman, T. Wassenberg, K. Jeltsch, J. Kulhánek, O. Kuseyri Hübschmann, Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies, *Orphanet J. Rare Dis.* 15 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01379-8>.
- [9] E. López-Laso, J.J. Ochoa-Sepúlveda, J.J. Ochoa-Amor, E. Bescansa-Heredero, R. Camino-León, F.J. Gascón-Jiménez, M.E. Mateos-González, J.L. Pérez-Navero, J.I. Lao-Villadóniga, A. Ormazabal, R. Artuch, K. Beyer, Segawa syndrome due to mutation Q89X in the GCH1 gene: A possible founder effect in Córdoba (southern Spain), *J. Neurol.* 256 (2009) 1816–1824. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-5198-z>.
- [10] Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, Delong MR, Fahn S, Fung VS, Hallett M, Jankovic J, Jinnah HA, Klein C, Lang AE, Mink JW, Teller JK. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord.* 2013 Jun 15;28(7):863-73. doi: 10.1002/mds.25475. Epub 2013 May 6. PMID: 23649720; PMCID: PMC3729880
- [11] Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015 Oct;30(12):1591-601
- [12] C. Kopanos, V. Tsiolkas, A. Kouris, C.E. Chapple, M. Albarca Aguilera, R. Meyer, A. Massouras, VarSome: the human genomic variant search engine, *Bioinformatics*. 35 (2019) 1978–1980. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>.

- [13] S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W.W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H.L. Rehm, 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, *Genet. Med.* 17 (2015) 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- [14] E. López-Laso, K. Beyer, T. Opladen, R. Artuch, R. Saunders-Pullman, Dyskinesias as a limiting factor in the treatment of segawa disease, *Pediatr. Neurol.* 46 (2012) 404–406. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2012.03.003>.
- [15] E. López-Laso, R. Camino, M.E. Mateos, J.L. Pérez-Navero, J.J. Ochoa, J.I. Lao-Villadóniga, A. Ormazabal, R. Artuch, Dopa-responsive infantile hypokinetic rigid syndrome due to dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 deficiency, *J. Neurol. Sci.* 256 (2007) 90–93. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.02.007>.
- [16] M.D. Teva Galán, V. Esteban Cantó, N. Picó Alfonso, J. Jover Cerdá, Distonía hereditaria sensible a L-dopa secundaria a déficit de GTP ciclohidrolasa 1, *An. Pediatr.* 75 (2011) 55–57. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2011.01.027>.
- [17] E.E. Moreno-Medinilla, M.D. Mora-Ramírez, R. Calvo-Medina, J. Martínez-Antón, Autosomal recessive GTPCH 1 deficiency: The importance of the analysis of neurotransmitters in cerebrospinal fluid, *Rev. Neurol.* 62 (2016) 502–506. <https://doi.org/10.33588/rn.6211.2015419>.
- [18] V. Dobričić, A. Tomić, V. Branković, N. Kresojević, M. Janković, A. Westenberger, V.M. Rašić, C. Klein, I. Novaković, M. Svetel, V.S. Kostić, GCH1 mutations are common in Serbian patients with dystonia-parkinsonism: Challenging previously reported prevalence rates of DOPA-responsive dystonia, *Park. Relat. Disord.* 45 (2017) 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.09.017>.
- [19] E. López-Laso, A. Sánchez-Raya, J.A. Moriana, E. Martínez-Gual, R. Camino-León, M.E. Mateos-González, J.L. Pérez-Navero, J.J. Ochoa-Sepúlveda, A. Ormazabal, T. Opladen, C. Klein, J.I. Lao-Villadóniga, K. Beyer, R. Artuch, Neuropsychiatric symptoms and intelligence quotient in autosomal dominant Segawa disease, *J. Neurol.* 258 (2011) 2155–2162. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-6079-9>.
- [20] A.J. Lewthwaite, T.D. Lambert, E.B. Rolfe, S. Olgati, M. Quadri, E.J. Simons, K.E. Morrison, V. Bonifati, D.J. Nicholl, Novel GCH1 variant in Dopa-responsive dystonia and Parkinson's disease, *Park. Relat. Disord.* 21 (2015) 394–397. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.01.004>.
- [21] N.E. Mencacci, I.U. Isaias, M.M. Reich, C. Ganos, V. Plagnol, J.M. Polke, J. Bras, J. Hersheson, M. Stamelou, A.M. Pittman, A.J. Noyce, K.Y. Mok, T. Opladen, E. Kunstmann, S. Hodecker, A. Münchau, J. Volkmann, S. Samnick, K. Sidle, T. Nanji, M.G. Sweeney, H. Houlden, A. Batla, A.L. Zecchinelli, G. Pezzoli, G. Marotta, A. Lees, P. Alegria, P. Krack, F. Cormier-Dequaire, S. Lesage, A. Brice, P. Heutink, T. Gasser, S.J. Lubbe, H.R. Morris, P. Taba, S. Koks, E. Majounie, J.R. Gibbs, A. Singleton, J. Hardy, S. Klebe, K.P. Bhatia, N.W. Wood, Parkinson's disease in GTP cyclohydrolase 1 mutation carriers, *Brain.* 137 (2014)

2480–2492. <https://doi.org/10.1093/brain/awu179>.

- [22] J. Hagenah, R. Saunders-Pullman, K. Hedrich, K. Kabakci, K. Habermann, K. Wieggers, K. Mohrmann, T. Lohnau, D. Raymond, P. Vieregge, T. Nygaard, L.J. Ozelius, S.B. Bressman, C. Klein, High mutation rate in dopa-responsive dystonia: Detection with comprehensive GCHI screening, *Neurology*. 64 (2005) 908–911. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000152839.50258.A2>.
- [23] L. Swick, G. Kapatoss, A yeast 2-hybrid analysis of human GTP cyclohydrolase I protein interactions, *J. Neurochem*. 97 (2006) 1447–1455. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03836.x>.
- [24] N. Maita, K. Hatakeyama, K. Okada, T. Hakoshima, Structural basis of biopterin-induced inhibition of GTP cyclohydrolase I by GFRP, its feedback regulatory protein, *J. Biol. Chem*. 279 (2004) 51534–51540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409440200>.
- [25] K. Nykamp, M. Anderson, M. Powers, J. Garcia, B. Herrera, Y.Y. Ho, Y. Kobayashi, N. Patil, J. Thusberg, M. Westbrook, S. Topper, Sherloc: A comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria, *Genet. Med*. 19 (2017) 1105–1117. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.37>.
- [26] I. Karbassi, G.A. Maston, A. Love, C. Divincenzo, C.D. Braastad, C.D. Elzinga, A.R. Bright, D. Previte, K. Zhang, C.M. Rowland, M. Mccarthy, J.L. Lapierre, F. Dubois, K.A. Medeiros, S.D. Batish, J. Jones, K. Liaquat, C.A. Hoffman, M. Jaremko, Z. Wang, W. Sun, A. Buller-Burckle, C.M. Strom, S.B. Keiles, J.J. Higgins, A Standardized DNA Variant Scoring System for Pathogenicity Assessments in Mendelian Disorders, *Hum. Mutat*. 37 (2016) 127–134. <https://doi.org/10.1002/humu.22918>.

Tables and figures

Table 1. Details of genetic changes

Table 2. Clinical manifestations at presentation and details of the treatment response

Figure 1. Pedigrees of families

Figure 2. Onset of symptoms, extension of symptoms before diagnosis and duration of treatment

Supplementary data:

Supplementary Table 1. References of genetic changes

Supplementary Table 2. Material and methods

Supplementary Table 3. Response to treatment and nonmotor symptoms according to phenotypes

Supplementary Figure 1. Sequence alignment

Supplementary Figure 2. Schematic representation of GTPCH

Supplementary Figure 3. Schematic representation of *GCH1*

Supplementary Figure 4a and 4b. Sequences

Subject/ Gender/ Current age	Clinical diagnosis	Age of onset (years)	Diurnal Fluctuations	Gait difficulties	Focal dystonia of lower / upper limbs	Cranocervical/ axial dystonia	Hemidystonia/Multifocal/ generalised dystonia	Hyperactive reflexes	Akinesia/Tremor/rigidity	Parkinsonism	Spastic diplegia/poor balance	Dysphoria/Sleep disturbance	Dysarthria/dysphonia/dysphagia	Border-line IQ	Doses/Response/duration of treatment	Adverse effects of levodopa treatment	Non-responsive symptoms or signs/ treatment	
A III.2/F/16	D	7	+	+	+/-	-/-	-/-	-	-/-	-	-/-	-/-	-/-	-	100/Exc/8	Mild difficulty in tandem gait / No		
A II.4/M/53	D	5	+	+	+/+	+/+	+/+	+	-/P/+	-	-/+	-/-	-/-	-	125/Exc/29	Mild foot eversion, bradykinesia in toe-tapping test/ increased dose caused dyskinesias		
A	PD	47	-	+	-/-	-/-	-/-	-	+/R/+	+	-/-	-/-	-/-	-	300/Exc/29	NA		
I.3/M/Death																		
A I.4/M/89	DP	18	+	+	+/+	+/+	+/+	-	+/P/+	+	-/+	-/-	+/-	-	300/Exc/19	No/No		
A II.2/F/63	D	1	+	+	+/-	+/+	+/+	+	-/P/+	-	-/+	-/-	-/-	-	150/Exc/19	No/Increased dose caused dyskinesias		
B III.9/M/27	D	1	+	+	+/-	-/+	-/+	+	-/P/+	-	-/+	-/-	-/+	+	300/Exc/14	Mild postural tremor of hands; mild bradykinesia in foot-tapping test/No		
B III.10/F/24	D	3	-	-	+/-	-/-	-/-	+	-/-	-	-/-	-/-	-/-	-	125/Exc/15	No/No		
B II.6/F/57	DP	15	+	+	+/+	+/+	+/+	-	+/R/-	+	-/-	-/+	-/+	+	300/Sat/13	Voice tremor/No		
B II.7/M/55	D	8	+	+	+/+	+/-	+/-	-	-/P/+	-	-/+	-/-	-/+	+	300/Exc/14	Slight postural tremor of hands, unsafe gait, bradykinesia in toe-tapping test/No		
B I.1/F/Death	PD	66	-	-	-/-	-/-	-/-	-	+/R/+	+	-/-	-/-	-/-	-	400/Entacapone and rasagiline/Exc/14, deceased at 83	No during 5 years. Afterwards, "wearing off" until her death, on 300 mg levodopa combined and 1 mg of rasagiline. No dyskinesia		
B III.5/M/17	HRS	0	-	-	-/-	-/-	-/-	+	+/-/+	+	-/-	-/-	-/-	-	133/Exc/15	Occasionally gait difficulties/No		

B III.4/M/23	D	1	+	+	+/-	-/+	-/-	-	-P/-	-	-/+	-/-	+	184/Exc/15	No/No
B III.7/F/32	D	12	+	+	-/+	-/+	-/+	-	-/-	-	-/+	-/-	+	150/Exc/13	No/No
B III.8/M/28	D	14	-	-	-/-	+/+	-/-	-	-P/-	/-	-/-	-/-	+	No treatment	-/-
B I.7/F/80	P	20	-	-	-/-	-/-	-/-	+	+R/-	+	-/-	-/-	-	200/Exc/NA	No/No
B II.4/F/53	D	7	+	+	+/-	-	-/+	-	-P/-	-	-/-	-/-	+	375/Exc/19	No/No
B II.2/M/59	D	38	-	-	-	+/-	-/+	-	-/-	-	-/-	-/-	-	400/Exc/18	No/No
B III.1/M/33	D	14	-	-	+/-	-/-	-/-	-	-/-	-	-/-	-/-	-	No treatment	-/-
B II.3/F/56	P	48	-	-	-/-	-/-	-/-	+	+/-+	+	-/-	+/-	+	300/Sat/8	No/No
C II.1/F/21	D	4	+	+	+/+	+/+	-/+	-	-P/-	-	-/+	-/-	-	62.5/Tryhexyp henidyl and botulinum toxin/Subopt/1 3	Writer's cramp/increased dose caused dyskinesias
C I.2/F/56	D	30	-	-	-/-	+/+	-/-	-	-P/-	-	-/-	-/-	-	No treatment	-/-
D II.1/F/13	DP	6	+	+	+/+	-/+	-/+	+	+P/+	+	-/+	-/-	-	200/Exc/6	No/No
E III.1/M/13	D	9	+	+	+/-	-/-	-/+	-	-/-	-	-/-	-/-	-	150/Exc/3	No/No
E II.2/F/45	D	9	+	+	-/-	-/-	-/+	-	-/-	-	-/-	-/-	-	200/Exc/7	Unsafe gait/No
E I.1/F/69	DP	9	-	+	+/-	-/-	-/+	+	+/-+	+	-/-	-/-	-	300/Sat/7	Mild foot inversion/No
G III.1/M/12	D	6	+	+	+/-	-/-	-/+	-	-/-	-	-/-	-/-	-	2,1mg/k/d/Exc /5	No/No
G III.2/F/12	D	1	+	+	+/-	-/-	-/+	-	-/-	-	-/-	-/-	-	7mg/k/d/Exc/1 0	No/No
G II.2/M/42	D	7	+	+	+/-	-/-	+/-	-	-/-	-	-/-	-/-	-	400/Sat/29	No/No
G II.1/M/47	D	23	-	-	-/+	-/-	-/+	-	-/-	-	-/-	-/-	-	300/Exc/23	No/No
H II.2/F/62	D	47	+	-	-/-	-/-	-/+	-	-/-	-	-/-	-/+	-	200/Sat/11	No/Rash with levodopa-carbidopa
H III.1/M/20	D	5	+	+	+/-	-/+	-/+	-	-/-	-	-/-	-/-	-	100/Exc/14	No/No
H II.1/M/NA	SP	NA	-	+	-/-	-/-	-/+	-	-/-	-	+/-	-/-	-	NA/NA/NA	NA/NA
H I.2/F/NA	P	NA	-	-	-/-	-/-	-/+	+	+/-+	+	-/-	-/-	-	NA/NA/NA	NA/NA
I II.1/F/18	D	7	+	+	+/-	-/-	-/+	-	-/-	-	-/-	-/-	+	300/Exc/10	No/No
J II.1/F/11	D	2	+	+	+/-	-/-	-/+	-	-/-	-	-/-	-/-	-	10mg/k/d/Exc/ 7	No/No

J I.2/F/37	D	12	+	+	+/-	-/-	-	-/-	-	-/-	-	100/Exc/3	No/No
K II.1/F/17	D	6	+	+	+/-	+/-	-	-/-	-	-/-	-	150/Exc/7	No/Visual allucinations, improved with brand change
L II.1/F/32	D	8	+	+	+/-	+/-	+	-/-	-	+/-	-	100/Sat/3	No/No
M II.2/F/34	D	11	+	+	+/-	+/-	+	-/-	-	-/-	-	300/Sat/18	No/No
M II.1/M/29	D	9	+	+	+/-	-/-	-	-/-	-	-/-	-	125/Sat/17	No/No
N II.1/F/23	D	6	+	+	+/-	-/-	-	-/-	-	-/-	-	300/Exc/7	No/No
O II.1/M/39	D	8	+	+	+/-	+/-	-	-P/+	-	-/-	-	150/Sat/16	Legs rigidity and hands postural tremor/Dyskinesias and anxiety
P II.1/F/15	D	9	+	+	+/-	-/-	-	-P/-	-	-/-	-	2,2mg/k/d/Exc/3	No/Dry mouth
P I.2/F/48	DP	47	+	+	+/-	-/+	-	+P/+	+	-/-	-	125/Subopt/1	Tremor and legs rigidity/No
Q I.1/M/46	D	40	+	+	+/-	-/-	-	-P/-	-	-/-	-	300/Entacapone e/Sat/37	Motor fluctuations/No
Q II.1/F/71	D	2	+	+	+/-	-/-	-	-P/-	-	-/+	-	500/Exc/16	No/No
R III.2/F/66	D	14	+	+	+/-	+/-	-	-/-	-	-/-	-	NA/Botulinum toxin/Poor/NA	Hemidystonia and oromandibular dystonia/NA
S III.2/F/38	D	22	+	+	+/-	-/-	-	-/-	-	-/-	-	NA/NA/NA	NA/NA
S II.1/M/67	P	53	-	-	-/-	-/-	-	+/-+	+	-/-	-	NA/Exc/NA	NA/NA
T III.1/F/17	D	4	+	+	+/-	-/-	-	-/-	-	-/-	-	NA/NA/NA	NA/NA
U II.1/F/58	D	51	+	+	+/-	-/+	-	-/-	-	-/-	-	NA/NA/NA	NA/NA
V II.1/F/10	D	4	+	-	+/-	-/-	-	-/-	-	-/-	-	6mg/K/d/Sat/1	No/No
W III.1/F/48	SP	2	-	+	-/-	-/-	+	-/-	-	+/-	-	NA/Sat/7	NA/NA
W III.2/F/48	SP	2	-	+	-/-	-/-	+	-/-	-	+/-	-	NA/Sat/7	NA/NA
W II.3/F/NA	SP	NA	-	+	-/-	-/-	+	-/-	-	-/-	-	NA/Sat/7	NA/NA
Y III.1/F/33	D	24	+	+	+/-	-/-	-	-/-	-	+/-	-	100/Exc/1	No/No

D= dystonia; DP= dystonia and parkinsonism; Exc = Excellent; F= female; HRS= infantile hypokinetic-rigid syndrome; M= male; NA= Not available; P= parkinsonism; PD= Parkinson's disease; P= Postural/Action tremor; R = Rest tremor; Sat = Satisfactory; SP= spastic paraparesis; Subopt = Suboptimal.

Table 2. Clinical manifestations at presentation and details of the treatment response

Pathogenic and likely pathogenic variants (single heterozygous)

Family (N)	Clinical Features	Location in gene	Nucleotide change (NM_000161.3)	Aminoacid change (NP_000152.1)	gnomAD MAF	dbSNP build 154	ClinVar Interpretation (number of Path (1))	Pathogenicity and conservation scores	ACMG criteria	References
Fam. Q (2)	D	Exon 1	c.159G>A	p.W53*	--	rs886041708	Path (1)	CADD: 37; REVEL: N.A.; GERP: 3.58	Path: PVS1, PM2, PP3, PP5	Furuya 2006 (8)
Fam. C (2)	D	Exon 1	c.235_240delCTGAGC	p.L79_S80del	--	--	--	CADD: N.A.; REVEL: N.A.; GERP: 3.66	LPath: PM1, PM2, PM4, PP3	P.S. (# previously reported in Lopez-Laso 2012)
Fam. K (1)	D	Exon 1	c.255C>G	p.N85K	--	--	--	CADD: 23; REVEL: 0.62; GERP: 3.69	LPath: PM1, PM2, PP3, PP4	P.S.
Fam. A (7)										
Fam. B (18)										
Fam. D (1)										
Fam. E (3)	D, DP, P, PD, IHRS, A	Exon 1	c.265C>T	p.Q89*	--	--	--	CADD: 29.6; REVEL: 0.89; GERP: 3.58	Path: PM1, PM2, PM5, PP2, PP3	P.S. (# some patients previously reported in Ochoa, 1992)
Fam. F (1)										
Fam. N (2)										
Fam. O (1)										
Fam. I (2)	D, A	Exon 1	c.287G>A	p.W96*	--	rs1482120639	--	CADD: 41; REVEL: N.A.; GERP: 3.48	Path: PVS1, PM2, PP3	Sasaki 1998
Fam. W (3)	SP, A	Exon 4	c.541G>C	p.Y181L	--	--	--	CADD: 35; REVEL: 0.63; GERP: 5.72	Path: PVS1, PM1, PM2, PP2, PP3	P.S. \$1
Fam. B (1)	A	Exon 5	c.550C>T	p.R184C	--	--	--	CADD: 29.6; REVEL: 0.89; GERP: 5.26	LPath: PM1, PM2, PM5, PP2, PP3	Hagenah 2005
Fam. S (4)	D, P, A	Exon 5	c.556delA	p.T186Qfs*6	--	--	--	CADD: N.A.; REVEL: N.A.; GERP: 6.17	Path: PVS1, PM2, PP3	P.S.
Fam. P (2)	D, DP	Exon 5	c.568dupG	p.A190Gfs*17	--	--	--	CADD: N.A.; REVEL: N.A.; GERP: 6.17	Path: PVS1, PM2, PP3	P.S.
Fam. H (5)										
Fam. M (2)	D, P, A	Exon 5	c.607G>A	p.G203R	--	rs988951114	Path (2)	CADD: 26.3; REVEL: 0.92; GERP: 5.29	Path: PM1, PM2, PP2, PP3, PP5	Bradman 1996
Fam. G (4)	D	Intron 5	c.626+3_626+4insT	--	--	--	--	CADD: N.A.; REVEL: N.A.; GERP: 4.20		Steinberger 2000
Fam. V (1)	D	Intron 5	c.626+5G>A	--	--	rs1594970015	--	CADD: 23.8; REVEL: N.A.; GERP: 5.03		Steinberger 2000
Fam. J (2)	D	Intron 5	c.627-6T>G	--	--	--	--	CADD: 13.49; REVEL: N.A.; GERP: 6.00		Nahya 2012
Fam. Y (1)	D	Exon 6	c.646C>T	p.R216*	0.000004	rs41298440	Path (2)	CADD: 45; REVEL: N.A.; GERP: 5.03	Path: PVS1, PM2, PP3, PP5	Bradman 1996
Fam. R (5)	D, A	Exon 6	c.671A>G	p.K224R	0.00038	rs41298442	Conflicting: LPath (1); Path (1); VUS (2)	CADD: 19.5; REVEL: 0.54; GERP: 2.30	LPath: PM2, PP1, PP2, PP5	Single Heterozygous: Bradman 1996; Compound heterozygous in Supplementary table 1
Fam. L (1)~	D	Exon 6	c.694G>A	p.G232S	--	--	--	CADD: 29.7; REVEL: 0.97; GERP: 5.70	LPath: PS2, PM2, PP2, PP3	P.S. \$2

Pathogenic and likely pathogenic variants (compound heterozygous)

Fam. D (1)	DP	Allele 1: Exon 1 Allele 2: Exon 1	Allele 1: c.68C>T Allele 2: c.265C>T	Allele 1: p.P23L Allele 2: c.Q89*	0.004	rs41298432	Conflicting: P, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3	CADD: 8.1; REVEL: 0.61; GERP: 0.70 CADD: 29.6; REVEL: 0.89; GERP: 3.58	VUS: PM2, PP2, BP4 Path: PM1, PM2, PM5, PP2, PP3	P.S.
------------	----	--------------------------------------	---	--------------------------------------	-------	------------	---	---	---	------

VUS variants o likely benign

Fam. T (3) (cis); Fam. U (1)	D, A	Exon 1 and 3'UTR	Allele 1: c.68C>T Allele 1: c.206C>T Allele 1: c.*20C>T	Allele 1: p.P23L Allele 1: p.P69L --	0.004 0.0004 0.0004	rs41298432 rs56127440 rs143111433	Conflicting: B (5); LB (3); VUS (1) Conflicting: B (1); LB (3); VUS (2) Conflicting: LB (2); VUS (1)	CADD: 8.1; REVEL: 0.61; GERP: 0.20 CADD: 23.5; REVEL: 0.82; GERP: 4.59 CADD: 18.7; REVEL: N.A.; GERP: 10.6	VUS: PM2, PP2, BP4 VUS: PM2, PP2, PP3 VUS: PM2, BP4	P.S.
------------------------------	------	------------------	---	--	---------------------------	---	--	--	---	------

N, number of individuals; D, dystonia; P, parkinsonism; PD, Parkinson disease; HRS, Infantile hypokinetic-rigid syndrome; SP, spastic paraplegia; A, asymptomatic; -, absent; N.A., not available; Path, pathogenic; LPath, likely pathogenic; VUS, variant of unknown significance; LB, likely benign; B, benign; P.S., present study; &, similar variant (c.159delG; p.W53*); #, de novo; \$1, in the same codon, it was reported p.V181I (Clot 2009); \$2, in the same codon, it was reported p.G232V (Lin 2014)

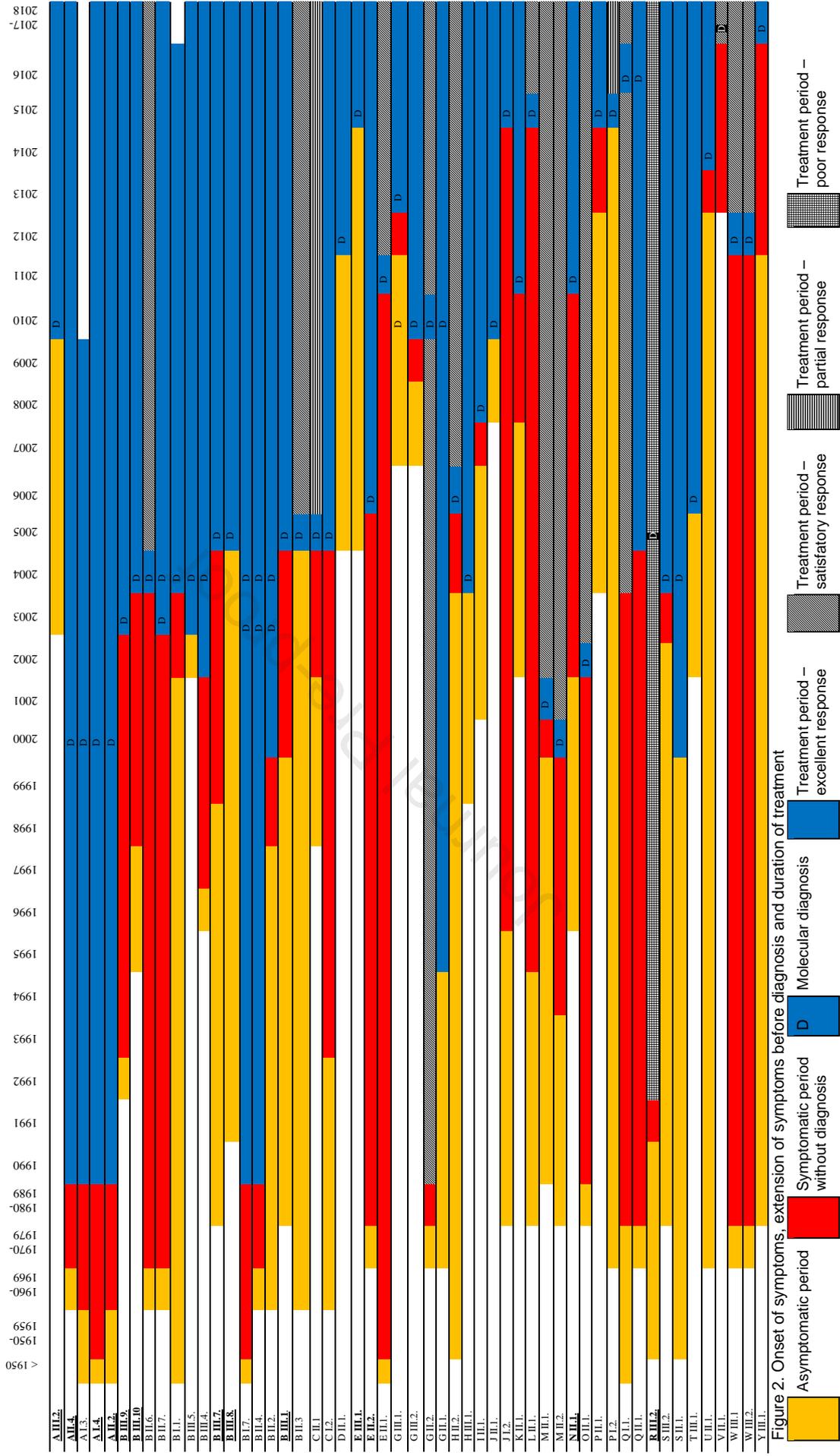


Figure 2. Onset of symptoms, extension of symptoms before diagnosis and duration of treatment



Journal Pre-proof

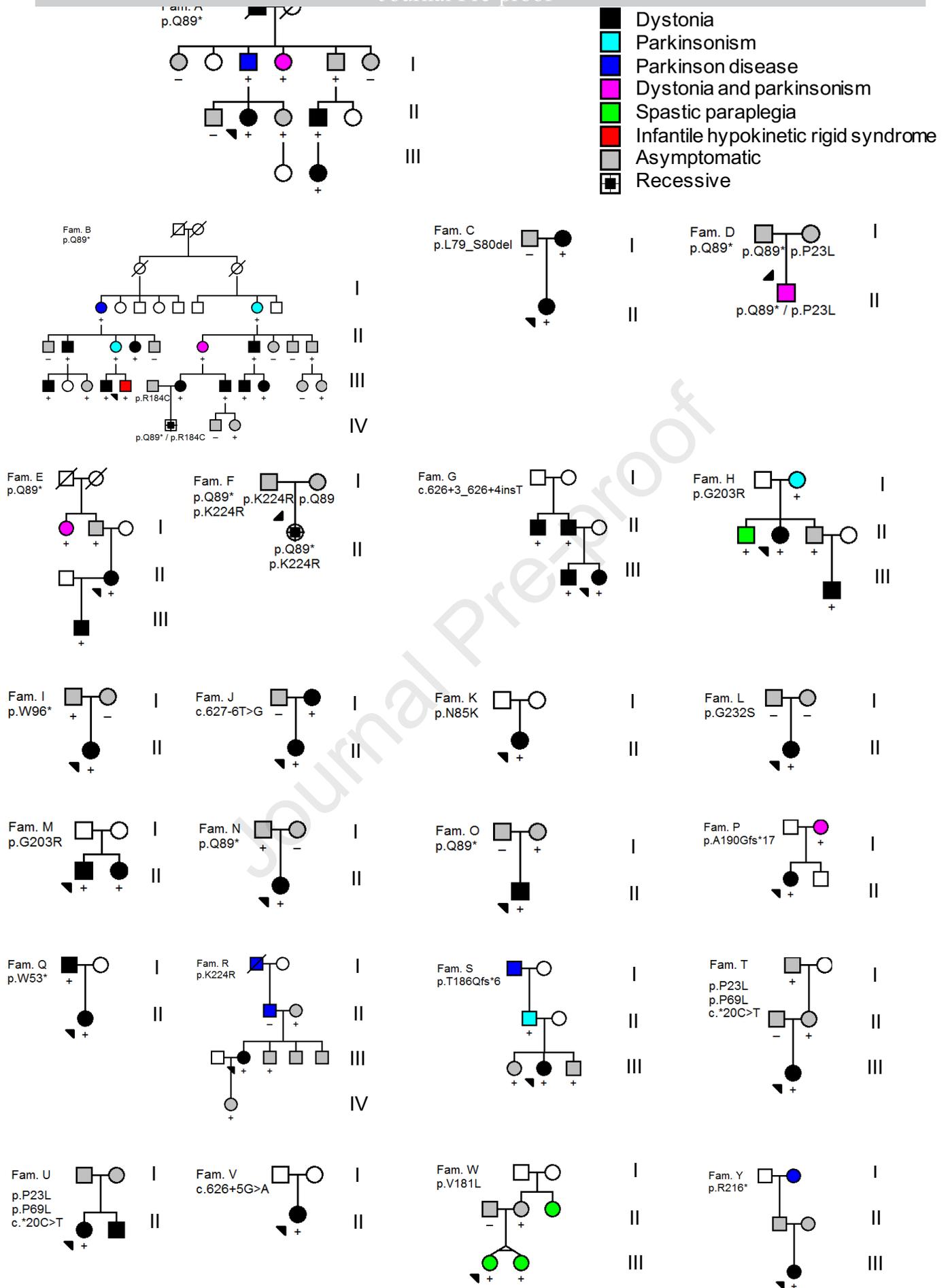


Figure 1. Pedigree of families. Two recessive cases are included.

KEY POINTS:

- Five genetic changes were found for the first time in Segawa disease.
- Seven genetic changes were described only in our cohort.
- Five novel families with the founder mutation *p. Q89** were found in Andalusia.
- Diurnal fluctuations characterized dystonia but not the other phenotypes.
- Twenty percent of patients had levodopa non-responsive symptoms that affected daily life.

Journal Pre-proof

Date: Nov 12, 2021
To: "Eduardo López-Laso" elolaso@gmail.com
From: "" support@elsevier.com
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: PARKRELDIS-D-21-00562R3
Title: Genetic landscape of Segawa disease in Spain. Long-term treatment outcomes.
Parkinsonism and Related Disorders

Dear M.D., Ph.D. López-Laso,

Thank you for your patience with our peer-review process, and more importantly for your open-mindedness and constructive reception of the critiques raised our editors and/or our reviewers.

We are pleased to inform you that your paper "Genetic landscape of Segawa disease in Spain. Long-term treatment outcomes." has now been accepted for publication in Parkinsonism and Related Disorders. Congratulations!

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

Thank you, once again, for submitting your work to our journal. And we look forward to receiving your next excellent paper here at Parkinsonism and Related Disorders!

With kind regards,

Andreas Puschmann, M.D., Ph.D.
Associate Editor
Parkinsonism and Related Disorders

#AU_PARKRELDIS#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/parkreldis/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Anexo 2. Artículo científico en preparación

Fernández-Ramos JA, López-Laso E, Artuch-Iriberry R.

Pterin analysis in urine for the diagnosis of dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase deficiency.

Introduction

Autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase deficiency (AD-GTPCH) is the most common cause of dopa-responsive dystonia (OMIM # 128230) (Klein, 2014). Heterozygous subjects with *GCHI* mutations develop the disease due to tetrahydrobiopterin (BH₄) deficiency, which leads to decreased dopamine and serotonin biosynthesis. The disease usually presents during the first decade of life with lower limbs dystonia, but it can also debut in adulthood with axial and/or upper limb dystonia together with parkinsonism. Atypical phenotypes have been described, such as spastic paraparesis (SP), infantile hypokinetic rigid syndrome (IHRS) and Parkinson's disease (PD). It has been recognized that average latency to diagnosis is 13 years (Tadic, 2012). This is important because AD-GTPCH is a treatable condition. One of the explanations of this latency to diagnosis is the lack of biochemical markers, beyond the analysis of CSF pterins and monoamines in few specialized laboratories. Besides, Sanger sequencing only detects *GCHI* sequence alterations in 50-60% of well selected patients (Hagenah 2005, Kim 2015, Segawa and Nomura 2014; Sounders-Pullmann et al. 2005). The hallmark of the disease is a partial decrease of both neopterin and biopterin in CSF leading to a moderate reduction in monoamines values in most cases (Opladen, 2020).

Thus, in a diagnostic point of view there is lack of evidence of the feasibility of peripheral biomarker analysis in easily accessible samples (urine and blood). In a recent consensus guideline, it was established that either pterin analysis in urine or dried blood spots (DBS) lacked of strong evidence about feasibility (Opladen, 2020). Pterins in urine are generally considered normal in AD-GTPCH patients. There are only 2 articles describing the evaluation of pterins in urine in short series of AD-GTPCH patients: (Leuzzi, 2012; Ye,

2013). In the study of Leuzzi and co-workers, they showed that neopterin in urine can be a good surrogate biomarker for BH₄ deficiency.

For pterin analysis in DBS from patients with AD-GTPCH, no reports were identified in the guidelines (*Opladen, 2020*). Thus, one of the conclusions stated in the consensus guidelines were that it was not possible to make a recommendation about pterin analysis on urine or DBS because of the lack of evidence.

With this background, our aim was to report data regarding pterin analysis in urine and DBS in a Spanish cohort of patients with GTPCH-AD together with clinical and molecular data.

Material and methods

Subjects: We recruited a cohort of 15 patients harbouring mutations at *CGHI* gene (clinical, biochemical and molecular data are stated in Table 1). Biochemical data were compared with a group of healthy controls recruited in HSJD (n=72, age range 2-58 years for urine). Exclusion criteria were the presence of acute or chronic diseases and pharmacological treatments at the moment of the sample collection.

Methods: Urinary and DBS pterin analyses were done according to previously reported procedures (*Ormazabal, 2005*). Briefly, pterins were oxidized with manganese dioxide and analysed by HPLC coupled to fluorescence detection. Neopterin and biopterin were the metabolites quantified and concentrations were referred to creatinine values. For DBS pterin analysis, extraction was done as reported in Blau *et al.* Briefly, neopterin was extracted in HCL and quantified by the same procedure. Neopterin and biopterin concentrations were corrected by haemoglobin values.

Molecular studies. Genomic DNA was extracted from peripheral blood using standard techniques. All GCH1 exons, including splice regions, were amplified by PCR and analysed by Sanger sequencing or NGS, as previously reported (esto es lo que temenos en la version que mandamus:

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using standard techniques. All *GCHI* exons, including splice regions, were amplified by PCR and analysed by Sanger sequencing or NGS. The functional consequences of the identified variants were assessed using the VarSome tool (<https://varsome.com>), which combines multiple information sources. All variants were searched using Mastermind Pro (<https://www.genomenon.com/mastermind>). Variant classification followed the recommendations of the American College of Medical Genetics (ACMG).

Statistical analysis: To search for correlation between the age of controls and urinary neopterin and biopterin concentrations, Pearson test was applied. For data comparison between patients and controls, student-T test was applied. Data were analysed with the “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS for Windows, release 22.0.0 2010, SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

All procedures were conducted in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2013. The project was approved by the ethical committee at University Hospital Reina Sofía (Internal code: 1171-N-19) and written informed consent was provided by legal guardians of all pediatric patients and by the adult patients.

Table 1. Clinical, biochemical and molecular data.

Patient (age/years)	Clinical severity Age at onset	Neopterin (mmol/mol creat)	Biopterin (mmol/mol creat)	CGH1 mutation
1 (13)		0.19	0.42	
2 (40)		0.23	0.42	
3 (22)		0.18	0.44	
4 (15)		0.33	0.29	
5 (48)		0.73	0.59	
6 (52)		0.16	0.24	

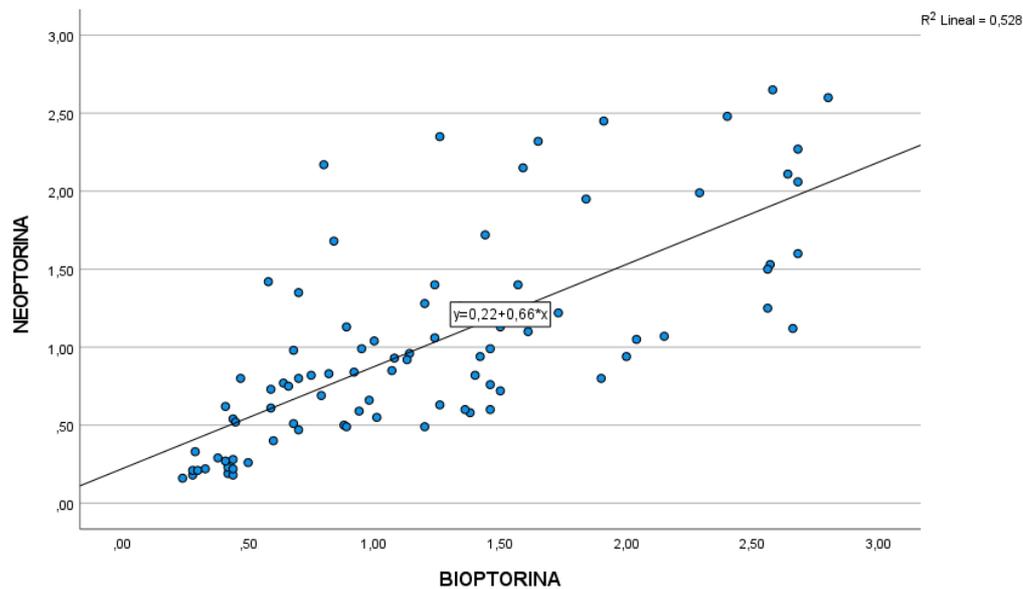
7 (56)		0.26	0.50	
8 (22)		0.22	0.33	
9 (48)		0.27	0.41	
10 (38)		0.28	0.44	
11 (17)		0.22	0.44	
12 (23)		0.18	0.28	
13 (56)		0.29	0.38	
14 (28)		0.21	0.28	
15 (56)		0.21	0.30	
Ref.Values (n=42) (10-58 y)		0.40-2.45 (0.41) 0.90	0.41-2.66 (0.62) 1.19	

Ref values are expressed (SD) and average.

Results

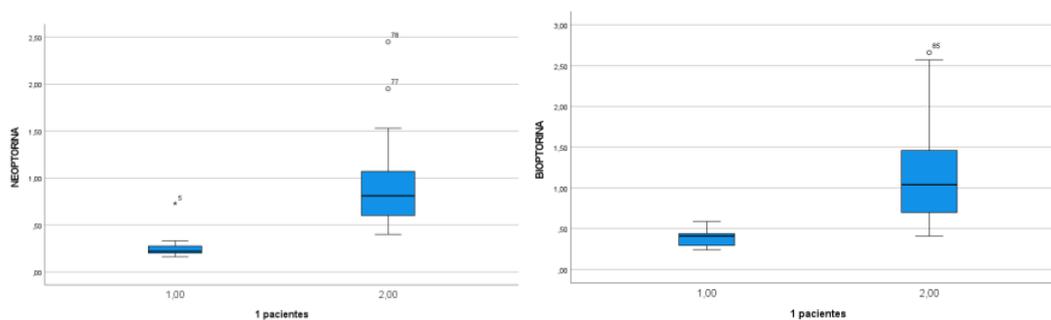
Since there was a negative correlation between the age of controls and urinary neopterin and biopterin concentrations ($r=-0.362$, $P=0.002$ for neopterin and $r=-0.331$; $p=0.004$ for biopterin), reference values were stratified in 2 groups (younger than 10 years and from 10-58 years). This latter group ($n=42$) was used for data comparison between patients and controls and reference values are stated in table 1. There was a highly significant correlation between urinary neopterin and biopterin values ($r=0.610$, $p<0.001$) (figure 1).

Figure 1.



When we compared controls with the cohort of patients, they presented significantly lower values for both neopterin and biopterin excretion (Student-t-test; $p < 0.0001$). In figure 2, a box plot representation of neopterin and biopterin in patients and controls is depicted. When compared with our reference values, 14 out of the 15 patients (93.3%) presented low neopterin excretion while only 7 out of 15 (46.6%) displayed low biopterin excretion, although most results were close to the lower limit of the reference interval.

Figure 2A and B.



Regarding pterins in DBS, data were controversial, since while neopterin values were normal to moderately high in AD-GTPCH patients when compared with controls, biopterin concentration was extremely low even undetectable in some cases (data not

shown). The meaning of this finding is difficult to understand, although we claim to preanalytical troubles (stability could be compromised, since DBS from controls were collected and analysed in HSJD, while DBS samples from patients were collected in Hospital Reina Sofía (Cordoba) and sent to our laboratory for analysis).

Discussion

In 2009, we described a possible founder effect of Segawa syndrome in Córdoba (Andalusia, southern Spain) due to the c.265C>T (p. Q89*) in the *GCHI* gene (López-Laso, 2009), which affected 23 individuals from two pedigrees in an area of 800,000 inhabitants. Since then, we have been committed to increasing the level of awareness of AD-GTPCHD and in this sense, we took advantage of this cohort to assess peripheral biomarkers (pterin excretion in urine) considering the lack of evidence after reviewing the literature (Opladen, 2020).

Only 2 reports assessed urinary excretion in AD-GTPCH patients. In a study quite similar to our work (Leuzzi, 2012), pterins in urine from 11 AD-GTPCH cases and from 90 controls were analysed. As we have observed, neopterin and biopterin concentrations in urine clustered differently in controls under and over the age of 15 years (10 years in our hands). Reference values in both works are similar as well, although slightly higher in our report. We observed that urinary neopterin was almost universally reduced in almost all patients but 1, while biopterin did not, in agreement with previous observations (Leuzzi, 2012). The explanation of this finding is that GTPCH is the limiting enzyme for the synthesis of BH₄, which is the cofactor of phenylalanine, tyrosine and tryptophan hydroxylases (Blau, 2001). The most important limiting factor however is that neopterin rapidly increase if concomitant conditions potentially leading to T cell-mediated immune response activation are present (Hoffmann, 1998). Common conditions such as viral infections or autoimmune diseases will increase neopterin values (Molero) and since AD-GTPCH patients have a normal allele, they can increment neopterin concentrations, masking a possible partial defect. By the other hand, the same problem can occur in control subjects. In our cohort, we ruled out the presence of chronic and acute disease and pharmacological treatments, but we could not definitively ruled out the presence of subclinical inflammatory processes that could increase neopterin values in some controls.

The other report (Ye, 2013) only in 4 analysed urinary neopterin in 4 cases, being the results anecdotal.

Our main limitation is that our cohort of patients harbours the same mutation, and this could bias the results. However, the clinical severity was not related with the neopterin excretion, since 93% of AD-GTPCH patients displayed low neopterin excretion, but the clinical severity ranged from near asymptomatic adult cases to IHRS (Table 1).

In conclusion, our study confirms the previous observation of urinary neopterin as a promising peripheral biomarker to contribute to improve diagnosis of AD-GTPCH patients, thus increasing the level of evidence of this biomarker. DBS pterin analysis deserves further investigation in strictly standardized preanalytical conditions.

References

Opladen T, López-Laso E, Cortès-Saladelafont E, Pearson TS, Sivri HS, Yildiz Y, Assmann B, Kurian MA, Leuzzi V, Heales S, Pope S, Porta F, García-Cazorla A, Honzík T, Pons R, Regal L, Goetz H, Artuch R, Hoffmann GF, Horvath G, Thöny B, Scholl-Bürgi S, Burlina A, Verbeek MM, Mastrangelo M, Friedman J, Wassenberg T, Jeltsch K, Kulhánek J, Kuseyri Hübschmann O; International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD). Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Orphanet J Rare Dis.* 2020 May 26;15(1):126. doi: 10.1186/s13023-020-01379-8. Erratum in: *Orphanet J Rare Dis.* 2020 Aug 5;15(1):202. PMID: 32456656; PMCID: PMC7251883.

Leuzzi V, Carducci C, Chiarotti F, D'Agnano D, Giannini MT, Antonozzi I, Carducci C. Urinary neopterin and phenylalanine loading test as tools for the biochemical diagnosis of segawa disease. *JIMD Rep.* 2013;7:67-75. doi: 10.1007/8904_2012_144. PMID: 23430498; PMCID: PMC3575044.

Ye J, Yang Y, Yu W, Zou H, Jiang J, Yang R, Sang S, Gu X. Demographics, diagnosis and treatment of 256 patients with tetrahydrobiopterin deficiency in mainland China: results of a retrospective, multicentre study. *J Inherit Metab Dis* 2013 Sep;36(5):893-901. Doi: 10.1007/s10545-012-9550-6.. PMID: 23138986.

López-Laso E, Ochoa-Sepúlveda JJ, Ochoa-Amor JJ, Bescansa-Heredero E, Camino-León R, Gascón-Jiménez FJ, Mateos-González ME, Pérez-Navero JL, Lao-Villadóniga JI, Ormazabal A, Artuch R, Beyer K. Segawa syndrome due to mutation Q89X in the GCH1 gene: a possible founder effect in Córdoba (southern Spain). *J Neurol*. 2009 Nov;256(11):1816-24. doi: 10.1007/s00415-009-5198-z. PMID: 19533203.

Klein C. Genetics in dystonia. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014 Jan;20 Suppl 1:S137-42. doi: 10.1016/S1353-8020(13)70033-6. PMID: 24262166.

Tadic V, Kasten M, Brüggemann N, Stiller S, Hagenah J, Klein C. Dopa-responsive dystonia revisited: diagnostic delay, residual signs, and nonmotor signs. *Arch Neurol*. 2012 Dec;69(12):1558-62. doi: 10.1001/archneurol.2012.574. PMID: 22986512.

Batlloori M, Molero-Luis M, Ormazabal A, Casado M, Sierra C, García-Cazorla A, Kurian M, Pope S, Heales SJ, Artuch R. Analysis of human cerebrospinal fluid monoamines and their cofactors by HPLC. *Nat Protoc*. 2017 Nov;12(11):2359-2375. doi: 10.1038/nprot.2017.103. PMID: 29048424.

Blau N, Thony B, Cotton RGH, Hyland K (2001) Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw Hill, New York, pp 1725–177

Molero-Luis M, Casas-Alba D, Orellana G, Ormazabal A, Sierra C, Oliva C, Valls A, Velasco J, Launes C, Cuadras D, Pérez-Dueñas B, Jordan I, Cambra FJ, Ortigoza-Escobar JD, Muñoz-Almagro C, Garcia-Cazorla A, Armangué T, Artuch R. Cerebrospinal fluid neopterin as a biomarker of neuroinflammatory diseases. *Sci Rep*. 2020 Oct 26;10(1):18291. doi: 10.1038/s41598-020-75500-z. PMID: 33106568; PMCID: PMC7588460.

Anexo 3. Plantilla de recogida de datos

RECOGIDA DE DATOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE SEGAWA

Iniciales: Sexo:

Fecha de cumplimentación del cuestionario:

Nombre del especialista:

Especialidad: Neurología / Neuropediatría / Errores congénitos del Metabolismo. Ámbito público / privado. Nombre del centro: Hospital

Ciudad/Provincia:

Fecha de Nacimiento del paciente: / /

Datos clínicos y de exámenes complementarios:

Antecedentes familiares relevantes (familiares con distonía, enfermedad de Parkinson, parkinsonismo, temblor, piramidalismo... Familiares con diagnóstico de enfermedad de Segawa, de parálisis cerebral, de paraparesia espástica u otros. Texto libre):

Antecedentes personales (embarazo, parto, desarrollo psicomotor: edad de inicio de la marcha, rendimiento académico. Otras enfermedades de interés, medicamentos. Texto libre):

Sintomatología:

- edad de inicio: describa la sintomatología:
- Edad al diagnóstico de distonía sensible a l-dopa:
- Exploración o diagnóstico clínico inicial antes del tratamiento:

Distonía focal, segmentaria, multifocal, hemidistonía, distonía generalizada

Temblor (tipo) postural, de acción, de reposo

Parkinsonismo

Otros (discinesia paroxística, piramidalismo, espasticidad, coreoatetosis)

Describe los signos objetivados en la exploración:

Clasificación clínica al diagnóstico:

1. P = parkinsonismo (bradi o hipocinesia asociada a rigidez o temblor de reposo)
2. D = distonia
 - definitiva (movimientos o posturas característicos presentes de forma consistente)
 - probable (posturas o movimientos sugerentes de distonía con intensidad o consistencia insuficiente para clasificarla como definitiva)
 - posible (contracciones musculares no consideradas anormales, pero remotamente sugestivas de distonia)
3. AP = parkinsonismo de inicio tardío asimétrico con respuesta a dopa sugerente de enfermedad de Parkinson
4. HRS infantil = síndrome rígido-hipocinético sin temblor en primeros 2 años de vida
 - Alteraciones psicológicas, depresión, ansiedad, impulsividad, cambios frecuentes de estado de ánimo, alteraciones del sueño:

Otros :

Diagnóstico de enfermedad de Segawa sustentado en:

1. Clínica + respuesta a l-dopa exclusivamente
2. 1 + Mutación gen GCH1: describir mutación:
3. 1 + LCR específico (pterinas, aminas biógenas). Especificar
4. 1+ Test de sobrecarga de fenilalanina

5. Otras combinaciones de los previos

6. Otros métodos: actividad enzimática GTPCH I

Normalidad de neuroimagen. Si RM alterada especificar

Otros datos de exámenes complementarios que desearía hacer constar

Estado de portador asintomático (diagnosticado por familiar afecto)

Diagnosticado en otro centro (especificar nombre del centro si se conoce)

Tratamiento:

Edad inicio de tratamiento

Respuesta al tratamiento con l-dopa: completa/muy satisfactoria pero incompleta/buena/aceptable (especificar síntomas que persisten a pesar del tratamiento)

Efectos secundarios: (discinesias: movimientos coreicos, otros...):

Dosis de l-dopa/día (en < 18 años especificar mg/kg/día):

Duración del tratamiento (años que lleva en tratamiento):

Necesidad de otros tratamientos: anticolinérgicos, toxina botulínica, fisio, otros:

Anexo 4. Autorización del comité de ética:



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD Y FAMILIAS

Hospital Universitario Reina Sofía

Ángel Serrano Cugat, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Córdoba, Comité constituido a tenor de lo establecido en el Decreto 439/2010, de 14 de diciembre, por el que se regulan los órganos de ética asistencial y de la investigación biomédica de Andalucía (BOJA núm. 251, de 27 de diciembre) del que es Presidenta Inmaculada Concepción Herrera Arroyo

CERTIFICA:

1.- Que en la reunión del Comité de Ética de Investigación de Córdoba celebrada el día 29 de julio de 2019 (Acta nº 292) se ha estudiado y evaluado el siguiente Proyecto de Investigación:

Referencia comité local: 4361

Versión y fecha del protocolo: 1 – 27/05/2019

Versión y fecha HIP: 1 – 27/05/2019

Versión y fecha CI: 1 – 27/05/2019

Título: "ESTUDIO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE SEGAWA. MONITORIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y NUEVAS HERRAMIENTAS BIOQUÍMICAS PARA EL DIAGNÓSTICO".

Código: SEGAWA

Investigador Principal: D. Eduardo López Laso

Dpto./Servicio/UGC: Pediatría, Críticos y Urgencias Pediátricas HURS

al que se le solicitaron las siguientes aclaraciones:

Aclarar el destino de las muestras una vez finalizado el estudio y si en el consentimiento informado de menores, mayores de 12 años, se exige también la firma de los padres o tutores.

y habiéndose subsanado dichas aclaraciones con fecha 02/07/2019 a través de email, los integrantes de dicho Comité acuerdan que el citado estudio respeta los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki de 1964, de la Asociación Médica Mundial, y enmiendas posteriores, y en el Convenio del Consejo de Europa de 1996, relativo a los Derechos Humanos y a la Biomedicina, demostrando sus autores conocer suficientemente los antecedentes y el estado actual del tema que proponen investigar, estando bien definidos sus objetivos, siendo adecuada su metodología y respetándose las prescripciones legales, hacen constar la viabilidad en todos sus términos del proyecto de investigación, estimando que los resultados pueden ser de gran interés.

2.- Que de acuerdo con el artículo 18 de la Ley 40/2015, de 1 de octubre, de Régimen Jurídico del Sector Público, la certificación a la que se refiere el punto anterior se emite con anterioridad a la aprobación del acta correspondiente.

3.- Que a la sesión del Comité del día 29 de julio de 2019 asistieron los siguientes miembros:

PRESIDENTA

Dña. Inmaculada Concepción Herrera Arroyo. Jefa de Servicio de Hematología del HURS.

SECRETARIO

D. Ángel Serrano Cugat. Técnico de Función Administrativa, Licenciado en Derecho, del HURS.

VOCALES:

D. Javier Caballero Villarraso. FEA de Bioquímica Clínica del HURS.

D. Gregorio Jurado Cáliz. Técnico de Función Administrativa del HURS. Licenciado en Derecho.

D. Manuel Jesús Cárdenas Aranzana. FEA Farmacia Hospitalaria del HURS

D. Félix Igea Arisqueta. Médico de Familia Área Sanitaria Norte de Córdoba

Dña. María Pleguezuelo Navarro. FEA de Aparato Digestivo del HURS

Dña. Esther Pacheco Rodríguez. FEA Farmacología HURS

D. Carlos Pérula de Torres. Enfermero del Distrito Sanitario de AP de Córdoba

Dña. M.ª Mercedes Gil Campos. FEA de Pediatría del HURS.

Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14004 Córdoba
Tel. 957 010 000 www.hospitalreinasofia.org

COMITÉ DE ÉTICA DE LA
INVESTIGACIÓN DE CÓRDOBA
CONSEJERÍA DE SALUD
CÓRDOBA



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD Y FAMILIAS

Hospital Universitario Reina Sofía

4.- Que dicho Comité está constituido y actúa de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.

Para que conste y surta efectos para la realización del estudio citado en el punto 1, se expide la presente certificación, en Córdoba, a treinta de julio de dos mil diecinueve.

EL SECRETARIO,

V.º B.º

LA PRESIDENTA,

COMITÉ DE ÉTICA DE LA
INVESTIGACIÓN DE CÓRDOBA
CONSEJERÍA DE SALUD
CÓRDOBA

Fdo.: Ángel Serrano Cugat

Fdo.: Inmaculada Concepción Herrera Arroyo

Anexo 5. Noticia de la I Reunión de pacientes afectados por la enfermedad de Segawa y profesionales

ciberer

isciii

Centro de Investigación Biomédica en Red
Enfermedades Raras

QUIÉNES SOMOS ▾

GRUPOS ▾

PROGRAMAS DE INVESTIGACIÓN ▾

PROGRAMAS TRANSVERSALES ▾

🏠 » Sala de Prensa » Noticias » Las familias de afectados por la enfermedad de Segawa realizan su primera reunión en España

Las familias de afectados por la enfermedad de Segawa realizan su primera reunión en España



Imagen de los asistentes a esta reunión.

CIBERER | martes, 5 de febrero de 2019

El **Hospital Reina Sofía de Córdoba** acogió la primera reunión de familias de afectados por la enfermedad de Segawa el pasado sábado 2 de febrero.

En el encuentro, organizado por los neuropediatras **Eduardo López Laso** y **Joaquín A. Fernández Ramos**, miembros del Grupo Clínico Vinculado al CIBERER en este hospital, se abordó la fisiopatología de la enfermedad de Segawa, un **trastorno neurometabólico raro** caracterizado en sus dos variantes, la **recesiva** y la **dominante**, por manifestaciones clínicas variables, desde la distonía hasta la encefalopatía infantil progresiva o el parkinsonismo en edades más avanzadas.

Además, se presentaron **los ensayos clínicos y proyectos de investigación en marcha** como el estudio de la distribución de los pacientes en España, la participación en el registro internacional de las enfermedades de los neurotransmisores, la *Guía de práctica clínica de los defectos de la BH4*, el nuevo test bioquímico para el diagnóstico de la enfermedad o el análisis del efecto fundador.

La jornada concluyó con la presentación de la **Asociación de Pacientes con Errores Congénitos del Metabolismo de los Neurotransmisores** (Deneu).

Anexo 6. Presentación video-poster en 5th International Symposium on Paediatric Movement Disorders



Barcelona , February 2 - 3, 2017

CHAIRMEN

Nardo **NARDOCCI**
(Milano)

Emilio **FERNANDEZ-ALVAREZ**
(Barcelona)

Russell **DALE**
(Sydney)

Jonathan **MINK**
(Rochester)

ORGANIZING AND SCIENTIFIC COMMITTEE

Birgit **ASSMANN**
(Heidelberg)

Hilla **BEN-PAZI**
(Jerusalem)

Jaume **CAMPISTOL**
(Barcelona)

Bernard **ECHENNE**
(Montpellier)

Paidraic **GRATTAN-SMITH**
(Sydney)

Jean-Pierre **LIN**
(London)

Belen **PEREZ-DUENAS**
(Barcelona)

Angeles **SCHTEINSCHNAIDER**
(Buenos Aires)

Roser **PONS**
(Athènes)

Masaya **SEGAWA**
(Tokyo)

Eduardo **TOLOSA**
(Barcelona)

Teresa **TEMUDO**
(Porto)

Lee **WANG-TSO**
(Taipei)

Michael **WILLEMSSEN**
(Nijmegen)

The Organizing Committee certifies that

JOAQUIN-ALEJANDRO FERNANDEZ-RAMOS

Has presented the following video

"Segawa disease. An approach to the epidemiological situation in Spain",
During the **5th International Symposium on Paediatric Movement Disorders**,
held at the Hospital Sant Joan de Deu in Barcelona, Spain

from February 2nd to 3rd 2017

CHAIRMAN

Nardo Nardocci

Symposium organization : ANT CONGRES - 154 av. de Lodève 34070 MONTPELLIER - France
@ : paedmovdisorders@ant-congres.com.Tel : +33 (0) 4 67 10 92 23

Anexo 7. Ponencia en el ciclo de seminarios intergrupales de IMIBIC



Raúl M. Luque Huertas, como Presidente de la Comisión de Formación del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (FIBICO-IMIBIC),

CERTIFICA

Que, **D. Joaquín Alejandro Fernández Ramos**, con **DNI 44366433P**, ha colaborado como ponente en el Ciclo de Seminarios Intergrupales 2019/2020 del IMIBIC, impartiendo el seminario titulado **“Enfermedad de Segawa como paradigma de enfermedad rara tratable”**, de **1 hora** de duración, celebrado en el Salón de Actos del Edificio IMIBIC el **3 de marzo de 2020**.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Córdoba a 6 de abril de 2020.

Fdo.: D. Raúl Luque Huertas

Presidente de la Comisión de Formación del IMIBIC

BIBLIOGRAFÍA

A

1. Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VS, Hallett M, Jankovic J, Jinnah HA, Klein C, Lang AE, Mink JW, Teller JK. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord.* 2013 Jun 15;28(7):863-73. doi: 10.1002/mds.25475. PMID: 23649720; PMCID: PMC3729880.
2. Avila-Rojas H, Pérez-Neri I. Dopamina para principiantes. *Arch Neurocienc.* 2017;22(1):55-57.

B

3. Blau N, Bonafé L, Thöny B. Tetrahydrobiopterin deficiencies without hyperphenylalaninemia: diagnosis and genetics of dopa-responsive dystonia and sepiapterin reductase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2001 Sep-Oct;74(1-2):172-85. doi: 10.1006/mgme.2001.3213. PMID: 11592814.
4. Bianca S, Bianca M. A new deletion in autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency gene--Segawa disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2006 Feb;113(2):159-62. doi: 10.1007/s00702-005-0308-2. PMID: 15959854.
5. Bandmann O, Valente EM, Holmans P, Surtees RA, Walters JH, Wevers RA, Marsden CD, Wood NW. Dopa-responsive dystonia: a clinical and molecular genetic study. *Ann Neurol.* 1998 Oct;44(4):649-56. doi: 10.1002/ana.410440411. PMID: 9778264.
6. Blau N, Thöny B, Cotton R, Hyland K. Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. En: Scriver C, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Vogelstein

- B, editores. The metabolic and molecular bases of inherited disease (OMMBID). New York: McGraw-Hill; 2001b. p. 1725-1776.
7. Brüggemann N, Stiller S, Tadic V, Kasten M, Münchau A, Graf J, Klein C, Hagenah J. Non-motor phenotype of dopa-responsive dystonia and quality of life assessment. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 Apr;20(4):428-31. doi: 10.1016/j.parkreldis.2013.12.014. PMID: 24444533.
 8. Balint B, Bhatia KP. Isolated and combined dystonia syndromes - an update on new genes and their phenotypes. *Eur J Neurol.* 2015 Apr;22(4):610-7. doi: 10.1111/ene.12650. PMID: 25643588.

C

9. Wu-Chou YH, Yeh TH, Wang CY, Lin JJ, Huang CC, Chang HC, Lai SC, Chen RS, Weng YH, Huang CL, Lu CS. High frequency of multiexonic deletion of the GCH1 gene in a Taiwanese cohort of dopa-response dystonia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2010 Jun 5;153B(4):903-8. doi: 10.1002/ajmg.b.31058. PMID: 20082337.
10. Chaila EC, McCabe DJ, Delanty N, Costello DJ, Murphy RP. Broadening the phenotype of childhood-onset dopa-responsive dystonia. *Arch Neurol.* 2006 Aug;63(8):1185-8. doi: 10.1001/archneur.63.8.1185. PMID: 16908750.
11. Clot F, Grabli D, Cazeneuve C, Roze E, Castelnau P, Chabrol B, Landrieu P, Nguyen K, Ponsot G, Abada M, Doummar D, Damier P, Gil R, Thobois S, Ward AJ, Hutchinson M, Toutain A, Picard F, Camuzat A, Fedirko E, Sâh C, Bouteiller D, LeGuern E, Durr A, Vidailhet M, Brice A; French Dystonia Network. Exhaustive analysis of BH4 and dopamine biosynthesis genes in patients with Dopa-responsive dystonia. *Brain.* 2009 Jul;132(Pt 7):1753-63. doi: 10.1093/brain/awp084. PMID: 19491146.

12. Cheyette BN, Cheyette SN, Cusmano-Ozog K, Enns GM. Dopa-responsive dystonia presenting as delayed and awkward gait. *Pediatr Neurol.* 2008 Apr;38(4):273-5. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2007.12.005. PMID: 18358407.
13. Chahine LM, Stern MB. Diagnostic markers for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 2011 Aug;24(4):309-17. doi: 10.1097/WCO.0b013e3283461723. PMID: 21464716.

D

14. Dobričić V, Tomić A, Branković V, Kresojević N, Janković M, Westenberger A, Rašić VM, Klein C, Novaković I, Svetel M, Kostić VS. GCH1 mutations are common in Serbian patients with dystonia-parkinsonism: Challenging previously reported prevalence rates of DOPA-responsive dystonia. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017 Dec;45:81-84. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.09.017. PMID: 28958832.
15. Dale RC, Melchers A, Fung VS, Grattan-Smith P, Houlden H, Earl J. Familial paroxysmal exercise-induced dystonia: atypical presentation of autosomal dominant GTP-cyclohydrolase 1 deficiency. *Dev Med Child Neurol.* 2010 Jun;52(6):583-6. doi: 10.1111/j.1469-8749.2010.03619.x. PMID: 20187889.
16. De Rosa A, Carducci C, Carducci C, Peluso S, Lieto M, Mazzella A, Saccà F, Brescia Morra V, Pappatà S, Leuzzi V, De Michele G. Screening for dopa-responsive dystonia in patients with Scans Without Evidence of Dopaminergic Deficiency (SWEDD). *J Neurol.* 2014 Nov;261(11):2204-8. doi: 10.1007/s00415-014-7477-6. PMID: 25182701.

F

17. Furukawa Y, Guttman M, Wong H, Farrell SA, Furtado S, Kish SJ. Serum prolactin in symptomatic and asymptomatic dopa-responsive dystonia due to a GCH1 mutation. *Neurology*. 2003 Jul 22;61(2):269-70. doi: 10.1212/01.wnl.0000073983.82532.49. PMID: 12874420.
18. Fan Z, Greenwood R, Felix AC, Shiloh-Malawsky Y, Tennison M, Roche M, Crooks K, Weck K, Wilhelmsen K, Berg J, Evans J. GCH1 heterozygous mutation identified by whole-exome sequencing as a treatable condition in a patient presenting with progressive spastic paraplegia. *J Neurol*. 2014 Mar;261(3):622-4. doi: 10.1007/s00415-014-7265-3. PMID: 24509643; PMCID: PMC4000021.
19. Frantz AG. Rhythms in prolactin secretion. In: Krieger DT, ed. *Endocrine rhythms*. New York, NY: Raven Press, 1979;175–186
20. Furukawa Y, Guttman M, Sparagana SP, Trugman JM, Hyland K, Wyatt P, Lang AE, Rouleau GA, Shimadzu M, Kish SJ. Dopa-responsive dystonia due to a large deletion in the GTP cyclohydrolase I gene. *Ann Neurol*. 2000 Apr;47(4):517-20. PMID: 10762165.
21. Furukawa Y. GTP Cyclohydrolase 1-Deficient Dopa-Responsive Dystonia. 2002 Feb 21 [Updated 2019 Jan 24]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1508/>

G

22. García-Cazorla A, Ormazábal A, Artuch R, Pérez-Dueñas B, López-Casas J, Fernández-Alvarez E, Campistol J. Errores congénitos de los neurotransmisores en Neuropediatría [Inborn errors of neurotransmitters in neuropaediatrics]. *Rev Neurol*. 2005 Jul 16-31;41(2):99-108. Spanish. PMID: 16028189.
23. Garcia-Cazorla A, Saudubray JM. Nuevos conocimientos sobre errores congénitos del metabolismo están dando lugar a nuevos paradigmas en neuropediatría [New insights in inborn errors of metabolism are leading to new paradigms in child neurology]. *Rev Neurol*. 2018 Jun 5;66(s02):S37-S42. Spanish. PMID: 29876911.
24. Garavaglia B, Invernizzi F, Carbone ML, Viscardi V, Saracino F, Ghezzi D, Zeviani M, Zorzi G, Nardocci N. GTP-cyclohydrolase I gene mutations in patients with autosomal dominant and recessive GTP-CH1 deficiency: identification and functional characterization of four novel mutations. *J Inher Metab Dis*. 2004;27(4):455-63. doi: 10.1023/B:BOLI.0000037349.08483.96. PMID: 15303002.

H

25. Hagenah J, Saunders-Pullman R, Hedrich K, Kabakci K, Habermann K, Wiegers K, Mohrmann K, Lohnau T, Raymond D, Vieregge P, Nygaard T, Ozelius LJ, Bressman SB, Klein C. High mutation rate in dopa-responsive dystonia: detection with comprehensive GCHI screening. *Neurology*. 2005 Mar 8;64(5):908-11. doi: 10.1212/01.WNL.0000152839.50258.A2. PMID: 15753436.

26. Hwang WJ, Calne DB, Tsui JK, de la Fuente-Fernández R. The long-term response to levodopa in dopa-responsive dystonia. *Parkinsonism Relat Disord.* 2001 Sep;8(1):1-5. doi: 10.1016/s1353-8020(00)00084-5. PMID: 11472874.
27. Hu FY, Xu YM, Yu LH, Ma MY, He XH, Zhou D. A novel missense mutation in GTP cyclohydrolase I (GCH1) gene causes Dopa-responsive dystonia in Chinese Han population. *Eur J Neurol.* 2011 Feb;18(2):362-364. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03082.x. PMID: 20491893.
28. Hoenicka J, Vidal L, Godoy M, Ochoa JJ, García de Yébenes J. New nonsense mutation in the GTP-cyclohydrolase I gene in L-DOPA responsive dystonia-parkinsonism. *Mov Disord.* 2001 Mar;16(2):364-6. doi: 10.1002/mds.1044. PMID: 11295799.
29. Hahn H, Trant MR, Brownstein MJ, Harper RA, Milstien S, Butler IJ. Neurologic and psychiatric manifestations in a family with a mutation in exon 2 of the guanosine triphosphate-cyclohydrolase gene. *Arch Neurol.* 2001 May;58(5):749-55. doi: 10.1001/archneur.58.5.749. PMID: 11346370.
30. Hyland K, Fryburg JS, Wilson WG, Bebin EM, Arnold LA, Gunasekera RS, Jacobson RD, Rost-Ruffner E, Trugman JM. Oral phenylalanine loading in dopa-responsive dystonia: a possible diagnostic test. *Neurology.* 1997 May;48(5):1290-7. doi: 10.1212/wnl.48.5.1290. PMID: 9153460
31. Kuseyri Hübschmann O, Horvath G, Cortès-Saladelafont E, Yıldız Y, Mastrangelo M, Pons R, Friedman J, Mercimek-Andrews S, Wong SN, Pearson TS, Zafeiriou DI, Kulhánek J, Kurian MA, López-Laso E, Oppebøen M, Kılavuz S, Wassenberg T, Goetz H, Scholl-Bürgi S, Porta F, Honzík T, Santer R, Burlina A, Sivri HS, Leuzzi V, Hoffmann GF, Jeltsch K, Hübschmann D, Garbade SF; iNTD Registry Study Group, García-Cazorla A, Opladen T. Insights into the expanding phenotypic spectrum of inherited disorders of biogenic amines. *Nat Commun.* 2021 Sep 20;12(1):5529. doi: 10.1038/s41467-021-25515-5. PMID: 34545092; PMCID: PMC8452745.

I

32. Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, Seki N, Hori T, Segawa M, Nomura Y, Endo K, Tanaka H, Tsuji S, et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet.* 1994 Nov;8(3):236-42. doi: 10.1038/ng1194-236. PMID: 7874165.

J

33. Jarman PR, Bandmann O, Marsden CD, Wood NW. GTP cyclohydrolase I mutations in patients with dystonia responsive to anticholinergic drugs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997 Sep;63(3):304-8. doi: 10.1136/jnnp.63.3.304. PMID: 9328244; PMCID: PMC2169710.

K

34. Kaufman S. Regulatory properties of pterin dependent hydroxylases: variation on a theme. En: Usdin E, Weiner N, Youdim MBH, editores. *Function and regulation of monoamine enzymes.* New-York: Macmillan; 1981. p. 165.
35. Karbassi I, Maston GA, Love A, DiVincenzo C, Braastad CD, Elzinga CD, Bright AR, Previte D, Zhang K, Rowland CM, McCarthy M, Lapierre JL, Dubois F, Medeiros KA, Batish SD, Jones J, Liaquat K, Hoffman CA, Jaremko M, Wang Z, Sun W, Buller-Burckle A, Strom CM, Keiles SB, Higgins JJ. A Standardized DNA Variant Scoring System for Pathogenicity Assessments in Mendelian Disorders. *Hum Mutat.* 2016 Jan;37(1):127-34. doi: 10.1002/humu.22918. PMID: 26467025; PMCID: PMC4737317.
36. Klein C. Genetics in dystonia. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 Jan;20 Suppl 1:S137-42. doi: 10.1016/S1353-8020(13)70033-6. PMID: 24262166.

37. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, Massouras A. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019 Jun 1;35(11):1978-1980. doi: 10.1093/bioinformatics/bty897. PMID: 30376034; PMCID: PMC6546127.
38. Kim W, Cho JS, Shim YK, Ko YJ, Choi SA, Kim SY, Kim H, Lim BC, Hwang H, Choi J, Kim KJ, Kim MJ, Seong MW, Chae JH. Early-onset autosomal dominant GTP-cyclohydrolase I deficiency: Diagnostic delay and residual motor signs. *Brain Dev*. 2021 Aug;43(7):759-767. doi: 10.1016/j.braindev.2021.02.006. PMID: 33875303.
39. Kim JI, Choi JK, Lee JW, Kim J, Ki CS, Hong JY. A novel missense mutation in GCH1 gene in a Korean family with Segawa disease. *Brain Dev*. 2015 Mar;37(3):359-61. doi: 10.1016/j.braindev.2014.05.008. PMID: 24948553.
40. Kimura K, Nagao Y, Hachimori K, Hayashi M, Nomura Y, Segawa M. Pre-movement gating of somatosensory evoked potentials in Segawa disease. *Brain Dev*. 2016 Jan;38(1):68-75. doi: 10.1016/j.braindev.2015.05.007. PMID: 26071901.
41. Kong CK, Ko CH, Tong SF, Lam CW. Atypical presentation of dopa-responsive dystonia: generalized hypotonia and proximal weakness. *Neurology*. 2001 Sep 25;57(6):1121-4. doi: 10.1212/wnl.57.6.1121. PMID: 11571350.

L

42. Leuzzi V, Carducci C, Carducci C, Cardona F, Artiola C, Antonozzi I. Autosomal dominant GTP-CH deficiency presenting as a dopa-responsive myoclonus-dystonia syndrome. *Neurology*. 2002 Oct 22;59(8):1241-3. doi: 10.1212/wnl.59.8.1241. PMID: 12391354.
43. Leuzzi V, Carducci C, Chiarotti F, D'Agnano D, Giannini MT, Antonozzi I,

- Carducci C. Urinary neopterin and phenylalanine loading test as tools for the biochemical diagnosis of segawa disease. *JIMD Rep.* 2013;7:67-75. doi: 10.1007/8904_2012_144. PMID: 23430498; PMCID: PMC3575044.
44. Lewthwaite AJ, Lambert TD, Rolfe EB, Olgiati S, Quadri M, Simons EJ, Morrison KE, Bonifati V, Nicholl DJ. Novel GCH1 variant in Dopa-responsive dystonia and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2015 Apr;21(4):394-7. doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.01.004. PMID: 25634433; PMCID: PMC4379065.
45. López-Laso E, Ochoa-Sepúlveda JJ, Ochoa-Amor JJ, Bescansa-Heredero E, Camino-León R, Gascón-Jiménez FJ, Mateos-González ME, Pérez-Navero JL, Lao-Villadóniga JI, Ormazabal A, Artuch R, Beyer K. Segawa syndrome due to mutation Q89X in the GCH1 gene: a possible founder effect in Córdoba (southern Spain). *J Neurol.* 2009 Nov;256(11):1816-24. doi: 10.1007/s00415-009-5198-z. PMID: 19533203.
46. López-Laso E, Beyer K, Opladen T, Artuch R, Saunders-Pullman R. Dyskinesias as a limiting factor in the treatment of Segawa disease. *Pediatr Neurol.* 2012 Jun;46(6):404-6. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2012.03.003. PMID: 22633640; PMCID: PMC3361688.
47. López-Laso E, Camino R, Mateos ME, Pérez-Navero JL, Ochoa JJ, Lao-Villadóniga JI, Ormazabal A, Artuch R. Dopa-responsive infantile hypokinetic rigid syndrome due to dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 deficiency. *J Neurol Sci.* 2007 May 15;256(1-2):90-3. doi: 10.1016/j.jns.2007.02.007. PMID: 17368676.
48. López-Laso E, Sánchez-Raya A, Moriana JA, Martínez-Gual E, Camino-León R, Mateos-González ME, Pérez-Navero JL, Ochoa-Sepúlveda JJ, Ormazabal A, Opladen T, Klein C, Lao-Villadóniga JI, Beyer K, Artuch R. Neuropsychiatric symptoms and intelligence quotient in autosomal dominant Segawa disease. *J Neurol.* 2011 Dec;258(12):2155-62. doi: 10.1007/s00415-011-6079-9. PMID: 21556877.

49. López-Laso E, Ormazabal A, Camino R, Gascón FJ, Ochoa JJ, Mateos ME, Muñoz MJ, Pérez-Navero JL, Lao JI, Vilaseca MA, Artuch R. Oral phenylalanine loading test for the diagnosis of dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 deficiency. *Clin Biochem.* 2006 Sep;39(9):893-7. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2006.03.002. PMID: 16624273.
50. Lin Y, Wang DN, Chen WJ, Lin X, Lin MT, Wang N. Growth hormone deficiency in a dopa-responsive dystonia patient with a novel mutation of guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 gene. *J Child Neurol.* 2015 May;30(6):796-9. doi: 10.1177/0883073814538498. PMID: 24939974.
51. Lee JY, Yang HJ, Kim JM, Jeon BS. Novel GCH-1 mutations and unusual long-lasting dyskinesias in Korean families with dopa-responsive dystonia. *Parkinsonism Relat Disord.* 2013 Dec;19(12):1156-9. doi: 10.1016/j.parkreldis.2013.08.003. PMID: 24018121.

M

52. Maita N, Hatakeyama K, Okada K, Hakoshima T. Structural basis of biopterin-induced inhibition of GTP cyclohydrolase I by GFRP, its feedback regulatory protein. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3;279(49):51534-40. doi: 10.1074/jbc.M409440200. PMID: 15448133.
53. Mencacci NE, Isaias IU, Reich MM, Ganos C, Plagnol V, Polke JM, Bras J, Hersheson J, Stamelou M, Pittman AM, Noyce AJ, Mok KY, Opladen T, Kunstmann E, Hodecker S, Münchau A, Volkmann J, Samnick S, Sidle K, Nanji T, Sweeney MG, Houlden H, Batla A, Zecchinelli AL, Pezzoli G, Marotta G, Lees A, Alegria P, Krack P, Cormier-Dequaire F, Lesage S, Brice A, Heutink P, Gasser T, Lubbe SJ, Morris HR, Taba P, Koks S, Majounie E, Raphael Gibbs J, Singleton A, Hardy J, Klebe S, Bhatia KP, Wood NW; International Parkinson's Disease Genomics Consortium and UCL-exomes consortium. Parkinson's disease in GTP cyclohydrolase 1 mutation carriers. *Brain.* 2014 Sep;137(Pt 9):2480-92. doi: 10.1093/brain/awu179. PMID: 24993959; PMCID: PMC4132650.

-
54. Mercimek-Mahmutoglu S, Sidky S, Hyland K, Patel J, Donner EJ, Logan W, Mendoza-Londono R, Moharir M, Raiman J, Schulze A, Siriwardena K, Yoon G, Kyriakopoulou L. Prevalence of inherited neurotransmitter disorders in patients with movement disorders and epilepsy: a retrospective cohort study. *Orphanet J Rare Dis.* 2015 Feb 8;10:12. doi: 10.1186/s13023-015-0234-9. PMID: 25758715; PMCID: PMC4342151.
55. Moreno-Medinilla EE, Mora-Ramirez MD, Calvo-Medina R, Martinez-Anton J. Deficit de GTPCH 1 autosómico recesivo: importancia del análisis de los neurotransmisores en el líquido cefalorraquídeo [Autosomal recessive GTPCH 1 deficiency: the importance of the analysis of neurotransmitters in cerebrospinal fluid]. *Rev Neurol.* 2016 Jun 1;62(11):502-6. Spanish. PMID: 27222084.
56. Molero-Luis M, Fernández-Ureña S, Jordán I, Serrano M, Ormazábal A, Garcia-Cazorla À, Artuch R; Neopterin Working Group. Cerebrospinal fluid neopterin analysis in neuropediatric patients: establishment of a new cut off-value for the identification of inflammatory-immune mediated processes. *PLoS One.* 2013 Dec 18;8(12):e83237. doi: 10.1371/journal.pone.0083237. PMID: 24367586; PMCID: PMC3867431.

N

57. Nygaard TG, Marsden CD, Fahn S. Dopa-responsive dystonia: long-term treatment response and prognosis. *Neurology.* 1991 Feb;41(2 (Pt 1)):174-81. doi: 10.1212/wnl.41.2_part_1.174. PMID: 1899474.
58. Nygaard TG. Dopa-responsive dystonia. Delineation of the clinical syndrome and clues to pathogenesis. *Adv Neurol.* 1993;60:577-85. PMID: 8420194.
59. Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho YY, Kobayashi Y, Patil N, Thusberg J, Westbrook M; Invitae Clinical Genomics Group, Topper S. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification

- criteria. *Genet Med.* 2017 Oct;19(10):1105-1117. doi: 10.1038/gim.2017.37. Erratum in: *Genet Med.* 2020 Jan;22(1):240-242. PMID: 28492532; PMCID: PMC5632818.
60. Nagata E, Kosakai A, Tanaka K, Segawa M, Fujioka H, Shintaku H, Suzuki N. Dopa-responsive dystonia (Segawa disease) -like disease accompanied by mental retardation: a case report. *Mov Disord.* 2007 Jun 15;22(8):1202-3. doi: 10.1002/mds.21517. PMID: 17469209.
61. Nalls MA, Blauwendraat C, Vallerga CL, Heilbron K, Bandres-Ciga S, Chang D, Tan M, Kia DA, Noyce AJ, Xue A, Bras J, Young E, von Coelln R, Simón-Sánchez J, Schulte C, Sharma M, Krohn L, Pihlstrøm L, Siitonen A, Iwaki H, Leonard H, Faghri F, Gibbs JR, Hernandez DG, Scholz SW, Botia JA, Martinez M, Corvol JC, Lesage S, Jankovic J, Shulman LM, Sutherland M, Tienari P, Majamaa K, Toft M, Andreassen OA, Bangale T, Brice A, Yang J, Gan-Or Z, Gasser T, Heutink P, Shulman JM, Wood NW, Hinds DA, Hardy JA, Morris HR, Gratten J, Visscher PM, Graham RR, Singleton AB; 23andMe Research Team; System Genomics of Parkinson's Disease Consortium; International Parkinson's Disease Genomics Consortium. Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* 2019 Dec;18(12):1091-1102. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30320-5. PMID: 31701892; PMCID: PMC8422160.
62. Ng J, Papandreou A, Heales SJ, Kurian MA. Monoamine neurotransmitter disorders--clinical advances and future perspectives. *Nat Rev Neurol.* 2015 Oct;11(10):567-84. doi: 10.1038/nrneurol.2015.172. PMID: 26392380.

O

63. Opladen T, López-Laso E, Cortès-Saladelafont E, Pearson TS, Sivri HS, Yildiz Y, Assmann B, Kurian MA, Leuzzi V, Heales S, Pope S, Porta F, García-Cazorla A, Honzík T, Pons R, Regal L, Goetz H, Artuch R, Hoffmann GF, Horvath G, Thöny B, Scholl-Bürgi S, Burlina A, Verbeek MM, Mastrangelo M, Friedman J,

Wassenberg T, Jeltsch K, Kulhánek J, Kuseyri Hübschmann O; International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD). Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Orphanet J Rare Dis.* 2020 May 26;15(1):126. doi: 10.1186/s13023-020-01379-8. Erratum in: *Orphanet J Rare Dis.* 2020 Aug 5;15(1):202. PMID: 32456656; PMCID: PMC7251883.

64. Ormazabal A, García-Cazorla A, Fernández Y, Fernández-Alvarez E, Campistol J, Artuch R. HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *J Neurosci Methods.* 2005 Mar 15;142(1):153-8. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.08.007. PMID: 15652629.

P

65. Peall KJ, Kuiper A, de Koning TJ, Tijssen MA. Non-motor symptoms in genetically defined dystonia: Homogenous groups require systematic assessment. *Parkinsonism Relat Disord.* 2015 Sep;21(9):1031-40. doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.07.003. PMID: 26210889.
66. Paus S, Gross J, Moll-Müller M, Hentschel F, Spottke A, Wabbels B, Klockgether T, Abele M. Impaired sleep quality and restless legs syndrome in idiopathic focal dystonia: a controlled study. *J Neurol.* 2011 Oct;258(10):1835-40. doi: 10.1007/s00415-011-6029-6. PMID: 21499724.
67. Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015 Oct;30(12):1591-601. doi: 10.1002/mds.26424. PMID: 26474316.

R

68. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
69. Robinson R, McCarthy GT, Bandmann O, Dobbie M, Surtees R, Wood NW. GTP cyclohydrolase deficiency; intrafamilial variation in clinical phenotype, including levodopa responsiveness. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999 Jan;66(1):86-9. doi: 10.1136/jnnp.66.1.86. PMID: 9886460; PMCID: PMC1736164.
70. Regula JU, Thoden U, Meinck HM. Adult-onset dystonia: atypical manifestation of Segawa disease. *Mov Disord*. 2007 Jul 15;22(9):1335-7. doi: 10.1002/mds.21377. PMID: 17516474.

S

71. Sian J, Moussa BH, Riederer P, Gerlach M. Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. In Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, eds. *Basical Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. 6 ed. Philadelphia. New York: Lippincott-Raven; 1998. p. 917-48.
72. Segawa M, Ohmi K, Itoh S, Aoyama M, Hayakawa H. Childhood basal ganglia disease with remarkable response to L-dopa: hereditary basal ganglia disease with marked diurnal fluctuation. *Shinryo (Tokyo)* 1971; 24: 667-672.

73. Segawa M, Hosaka A, Miyagawa F, Nomura Y, Imai H. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Adv Neurol.* 1976;14:215-33. PMID: 945938.
74. Segawa M, Nomura Y, Nishiyama N. Autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency (Segawa disease). *Ann Neurol.* 2003;54 Suppl 6:S32-45. doi: 10.1002/ana.10630. PMID: 12891652.
75. Segawa M. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Brain Dev.* 2000 Sep;22 Suppl 1:S65-80. doi: 10.1016/s0387-7604(00)00148-0. PMID: 10984664.
76. Segawa M, Nomura Y, Yukishita S, Nishiyama N, Yokochi M. Is phenotypic variation of hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation/dopa-responsive dystonia (HPD/DRD) caused by the difference of the locus of mutation on the GTP cyclohydrolase 1 (GCH-1) gene? *Adv Neurol.* 2004;94:217-23. PMID: 14509676.
77. Segawa M. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Brain Dev.* 2011 Mar;33(3):195-201. doi: 10.1016/j.braindev.2010.10.015. PMID: 21094587.
78. Steinberger D, Korinthenberg R, Topka H, Berghäuser M, Wedde R, Müller U. Dopa-responsive dystonia: mutation analysis of GCH1 and analysis of therapeutic doses of L-dopa. German Dystonia Study Group. *Neurology.* 2000 Dec 12;55(11):1735-7. doi: 10.1212/wnl.55.11.1735. PMID: 11113234.
79. Steinberger D, Trübenbach J, Zirn B, Leube B, Wildhardt G, Müller U. Utility of MLPA in deletion analysis of GCH1 in dopa-responsive dystonia. *Neurogenetics.* 2007 Jan;8(1):51-5. doi: 10.1007/s10048-006-0069-6. Erratum in: *Neurogenetics.* 2007 Jan;8(1):69. PMID: 17111153.
80. Swick L, Kapatos G. A yeast 2-hybrid analysis of human GTP cyclohydrolase I protein interactions. *J Neurochem.* 2006 Jun;97(5):1447-55. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03836.x. PMID: 16696853; PMCID: PMC2239266.

81. Souza CP, Valadares ER, Trindade AL, Rocha VL, Oliveira LR, Godard AL. Mutation in intron 5 of GTP cyclohydrolase 1 gene causes dopa-responsive dystonia (Segawa syndrome) in a Brazilian family. *Genet Mol Res.* 2008 Aug 5;7(3):687-94. doi: 10.4238/vol7-3gmr467. PMID: 18752196.
82. Spada M, Ferraris S, Ferrero GB, Sartore M, Lanza C, Perfetto F, de Sanctis L, Dompé C, Blau N, Ponzone A. Monitoring treatment in tetrahydrobiopterin deficiency by serum prolactin. *J Inherit Metab Dis.* 1996;19(2):231-3. doi: 10.1007/BF01799437. PMID: 8739973.
83. Straniero L, Guella I, Cilia R, Parkkinen L, Rimoldi V, Young A, Asselta R, Soldà G, Sossi V, Stoessl AJ, Priori A, Nishioka K, Hattori N, Follett J, Rajput A, Blau N, Pezzoli G, Farrer MJ, Goldwurm S, Rajput AH, Duga S. DNAJC12 and dopa-responsive nonprogressive parkinsonism. *Ann Neurol.* 2017 Oct;82(4):640-646. doi: 10.1002/ana.25048. PMID: 28892570.
84. Sun ZF, Zhang YH, Guo JF, Sun QY, Mei JP, Zhou HL, Guan LP, Tian JY, Hu ZM, Li JD, Xia K, Yan XX, Tang BS. Genetic diagnosis of two dopa-responsive dystonia families by exome sequencing. *PLoS One.* 2014 Sep 2;9(9):e106388. doi: 10.1371/journal.pone.0106388. PMID: 25181484; PMCID: PMC4152247.
85. Sedel F, Fontaine B, Saudubray JM, Lyon-Caen O. Hereditary spastic paraparesis in adults associated with inborn errors of metabolism: a diagnostic approach. *J Inherit Metab Dis.* 2007 Nov; 30(6):855-64. Doi: 10.1007/s10545-007-0745-1. PMID: 17957490
86. Shafieesabet A, Fereshtehnejad SM, Shafieesabet A, Delbari A, Baradaran HR, Postuma RB, Lökk J. Hyperechogenicity of substantia nigra for differential diagnosis of Parkinson's disease: A meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017 Sep;42:1-11. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.06.006. PMID: 28647434.

T

87. Tranchant C, Koob M, Anheim M. Parkinsonian-Pyramidal syndromes: A systematic review. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017 Jun;39:4-16. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.02.025. PMID: 28256436.
88. Trender-Gerhard I, Sweeney MG, Schwingenschuh P, Mir P, Edwards MJ, Gerhard A, Polke JM, Hanna MG, Davis MB, Wood NW, Bhatia KP. Autosomal-dominant GTPCH1-deficient DRD: clinical characteristics and long-term outcome of 34 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009 Aug;80(8):839-45. doi: 10.1136/jnnp.2008.155861. PMID: 19332422.
89. Tadic V, Kasten M, Brüggemann N, Stiller S, Hagenah J, Klein C. Dopa-responsive dystonia revisited: diagnostic delay, residual signs, and nonmotor signs. *Arch Neurol*. 2012 Dec;69(12):1558-62. doi: 10.1001/archneurol.2012.574. PMID: 22986512.
90. Teva Galán MD, Esteban Cantó V, Picó Alfonso N, Jover Cerdá J. Distonía hereditaria sensible a L-dopa secundaria a déficit de GTP ciclohidrolasa 1 [GTP cyclohydrolase 1-deficient dopa-responsive hereditary dystonia]. *An Pediatr (Barc)*. 2011 Jul;75(1):55-7. Spanish. doi: 10.1016/j.anpedi.2011.01.027. PMID: 21429827.
91. Tachi N, Takahashi S, Jo M, Shinoda M. A new mutation of GCH1 in triplets family with dopa-responsive dystonia. *Eur J Neurol*. 2011 Sep;18(9):1191-3. doi: 10.1111/j.1468-1331.2011.03354.x. PMID: 21834904.
92. Tormenti MJ, Tomycz ND, Coffman KA, Kondziolka D, Crammond DJ, Tyler-Kabara EC. Bilateral subthalamic nucleus deep brain stimulation for dopa-responsive dystonia in a 6-year-old child. *J Neurosurg Pediatr*. 2011 Jun;7(6):650-3. doi: 10.3171/2011.3.PEDS10402. Erratum in: *J Neurosurg Pediatr*. 2011 Nov;8(5):536. Crammond, Donald J [added]. PMID: 21631204.

V

93. Van Hove JL, Steyaert J, Matthijs G, Legius E, Theys P, Wevers R, Romstad A, Møller LB, Hedrich K, Goriounov D, Blau N, Klein C, Casaer P. Expanded motor and psychiatric phenotype in autosomal dominant Segawa syndrome due to GTP cyclohydrolase deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006 Jan;77(1):18-23. doi: 10.1136/jnnp.2004.051664. PMID: 16361586; PMCID: PMC2117403.

W

94. Wider C, Melquist S, Hauf M, Solida A, Cobb SA, Kachergus JM, Gass J, Coon KD, Baker M, Cannon A, Stephan DA, Schorderet DF, Ghika J, Burkhard PR, Kapatos G, Hutton M, Farrer MJ, Wszolek ZK, Vingerhoets FJ. Study of a Swiss dopa-responsive dystonia family with a deletion in GCH1: redefining DYT14 as DYT5. *Neurology*. 2008 Apr 15;70(16 Pt 2):1377-83. doi: 10.1212/01.wnl.0000275527.35752.c5. PMID: 17804835; PMCID: PMC2330252.
95. Wassenberg T, Molero-Luis M, Jeltsch K, Hoffmann GF, Assmann B, Blau N, Garcia-Cazorla A, Artuch R, Pons R, Pearson TS, Leuzzi V, Mastrangelo M, Pearl PL, Lee WT, Kurian MA, Heales S, Flint L, Verbeek M, Willemsen M, Opladen T. Consensus guideline for the diagnosis and treatment of aromatic l-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency. *Orphanet J Rare Dis*. 2017 Jan 18;12(1):12. doi: 10.1186/s13023-016-0522-z. PMID: 28100251; PMCID: PMC5241937.
96. Wijemanne S, Jankovic J. Dopa-responsive dystonia-clinical and genetic heterogeneity. *Nat Rev Neurol*. 2015 Jul;11(7):414-24. doi: 10.1038/nrneurol.2015.86. PMID: 26100751.

Y

97. Yoshino H, Nishioka K, Li Y, Oji Y, Oyama G, Hatano T, Machida Y, Shimo Y, Hayashida A, Ikeda A, Mogushi K, Shibagaki Y, Hosaka A, Iwanaga H, Fujitake J, Ohi T, Miyazaki D, Sekijima Y, Oki M, Kusaka H, Fujimoto KI, Ugawa Y, Funayama M, Hattori N. GCH1 mutations in dopa-responsive dystonia and Parkinson's disease. *J Neurol*. 2018 Aug;265(8):1860-1870. doi: 10.1007/s00415-018-8930-8. PMID: 29948246.
98. Ye J, Yang Y, Yu W, Zou H, Jiang J, Yang R, Sang S, Gu X. Demographics, diagnosis and treatment of 256 patients with tetrahydrobiopterin deficiency in mainland China: results of a retrospective, multicentre study. *J Inher Metab Dis* 2013 Sep;36(5):893-901. Doi: 10.1007/s10545-012-9550-6. PMID: 23138986.

Z

99. Zirn B, Steinberger D, Troidl C, Brockmann K, von der Hagen M, Feiner C, Henke L, Müller U. Frequency of GCH1 deletions in Dopa-responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008 Feb;79(2):183-6. doi: 10.1136/jnnp.2007.128413. PMID: 17898029.



TÍTULO DE LA TESIS:
CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA, BIOQUÍMICA Y-MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE SEGAWA

DOCTORANDO/A:
JOAQUÍN ALEJANDRO FERNÁNDEZ RAMOS

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

La enfermedad de Segawa es una rara enfermedad tratable que se incluye dentro de los errores congénitos del metabolismo de los neurotransmisores y las distonías primarias genéticas. Su prevalencia se estima en 0,5 casos por millón de habitantes. En 2009, describimos un posible efecto fundador de la enfermedad de Segawa en Córdoba (España) debido a la mutación *c.265C> T (p.Q89*)* en el gen *GCHI*. La atención a un elevado número de casos en el Hospital Universitario Reina Sofía lo ha convertido en un excepcional observatorio para su investigación. Nos planteamos por ello mejorar nuestro conocimiento de la enfermedad de Segawa en España, proporcionar una descripción fenotípica-genotípica detallada de los pacientes, conocer si la mutación fundadora podía encontrarse en otras regiones geográficas aparte de en Córdoba y aproximarnos a una estimación de la prevalencia de la enfermedad en España. Para ello nos propusimos realizar un estudio multicéntrico nacional con recogida de datos retrospectiva en el que participaron neuropediatras y neurólogos de 16 hospitales del país.

Estos objetivos se desarrollaron en el presente proyecto de tesis doctoral, y consideramos que se han cumplido. Esta investigación ha dado lugar a una serie de trabajos presentados como comunicaciones en congresos nacionales e internacionales y publicados en revista con factor de impacto.

Los objetivos de investigación y las publicaciones con factor de impacto se relacionan a continuación:

1. La descripción sistemática de las características clínicas y genéticas de una amplia serie de casos con diagnóstico genético de AD-GTPCHD, la mayor hasta la fecha, profundización en el conocimiento de la expansión de la mutación fundadora en la población de Andalucía, descripción de variantes en el gen *GCHI* patogénicas previamente no descritas en la literatura a través del estudio mediante predicción *in silico*, análisis de la correlación fenotipo-genotipo, análisis de fenotipos motores atípicos, análisis de la respuesta al tratamiento con levodopa y de la presencia de síntomas no motores, así como el estudio de la relación de la enfermedad de Segawa con la enfermedad de Parkinson.

Fernández-Ramos JA, María José De la Torre-Aguilar MJ, Quintans B, Pérez-Navero JL, Beyer K, López-Laso E, Spanish Segawa Disease Research group. Genetic landscape of Segawa disease in Spain. Long-term treatment outcomes. **Parkinsonism & Related Disorders**, 2021. IF 4, 891(2020) y Cuartil:Q1 Clinical Neurology. H-Index:98

Keller M et al. Assessment of intellectual impairment, health-related quality of life, and behavioral phenotype in patients with neurotransmitter related disorders: Data from the iNTD registry. Entre los autores: **Fernández-Ramos JA**. *J Inher Metab Dis*. 2021;1-14. DOI: 10.1002/jimd.12416

Posición que ocupa la revista en el área Genetics & Heredity: 4ª de Q2

2. Estudio de posibles biomarcadores periféricos como herramientas diagnósticas y de seguimiento para el diagnóstico bioquímico de la enfermedad

Fernández-Ramos JA, López-Laso E, Artuch-Iriberrí R. Pterin analysis in urine for the diagnosis of dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase deficiency. *En preparación*.

Fernández-Ramos JA, López-Laso E, Artuch-Iriberrí R. Serum prolactin for the follow-up in patients with dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase deficiency. *En preparación*.

Batllori M, Molero M, Arrabal L, DelasHeras J, **Fernández-Ramos JA**, et al. Urinary sulphatoxymelatonin as a biomarker of serotonin status in biogenic amine-deficient patients. *Scientific reports*, 2017; 7: 14675. DOI:10.1038/s41598-017-15063-8

Posición que ocupa la revista en la categoría Multidisciplinary Sciences: 12/64 (Q1).

Los trabajos presentados como comunicaciones en congresos y reuniones nacionales e internacionales han sido los siguientes:

1. Ponencia en el seminario titulado "Enfermedad de Segawa como paradigma de enfermedad rara tratable", dentro del Ciclo de Seminarios Intergrupales 2019/2020 del IMIBIC, celebrado en el Salón de Actos del Edificio IMIBIC el 3 de marzo de 2020.
2. Comunicación "Segawa disease. An approach to the epidemiological situation in Spain", Durante el *5th International Symposium on Paediatric Movement Disorders*, celebrado en el Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, España, 2-3 de febrero de 2017.
3. Ponencia "Enfermedad de Segawa como paradigma de enfermedad rara" en la mesa redonda enfermedades raras neuropediátricas en el *Symposium Nacional sobre Avances en Especialidades Pediátricas*, celebrado en Hospital Universitario Reina Sofía los días 26, 27, 28 de octubre de 2016.

4. Ponencia "Trastornos motores como signo/síntoma de expresión en las enfermedades neurometabólicas" en la 16ª Reunión de la Asociación de Neurociencias del Desarrollo, celebrada en Jaén los días 27 y 28 de abril de 2018.

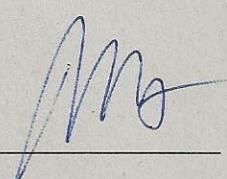
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral y creemos que reúne las condiciones idóneas para su presentación.

Córdoba, 23 de noviembre de 2021

Firma del/de los director/es

Dr. Eduardo López-Laso

Prof. Dr. Juan Luis Pérez-Navero

Fdo.: 

PEREZ NAVERO JUAN
LUIS - 30060508Z

Fdo.: _____

Firmado digitalmente por PEREZ NAVERO JUAN LUIS - 30060508Z
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=IDCES-30060508Z, givenName=JUAN LUIS, sn=PEREZ NAVERO, cn=PEREZ NAVERO JUAN LUIS - 30060508Z
Fecha: 2021.12.01 12:19:40 +01'00'

DNI 05911139 K