

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DAS PARAPARESIAS
ESPÁSTICAS HEREDITÁRIAS DE INÍCIO INFANTIL NO BRASIL**

GABRIELA MARCHISIO GIORDANI

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DAS PARAPARESIAS
ESPÁSTICAS HEREDITÁRIAS DE INÍCIO INFANTIL NO BRASIL**

GABRIELA MARCHISIO GIORDANI

Orientador: Prof. Dr. Jonas Alex Morales Saute

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção de Mestre em Medicina: Ciências
Médicas, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Programa de Pós- Graduação em
Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, 2021

*“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”
Marie Curie*

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Izaura e Luiz Moacir, pelo amor, educação e apoio durante toda a minha caminhada.

Ao meu marido, Marco Antônio, pelo amor, apoio incondicional, e ajuda em tudo que lhe era possível nesta jornada.

Ao meu orientador, Prof.º Dr. Jonas Alex Morales Saute, por estar sempre presente mesmo antes de iniciar o mestrado e por todos os ensinamentos que me trouxe nesse período.

Aos membros da banca examinadora, que tão gentilmente aceitaram participar.

Aos pacientes, que são o maior sentido da realização deste trabalho.

Um agradecimento especial:

- Aos colaboradores dos outros centros, em especial Fabricio Diniz e Marcondes França Jr.;
- À Helena Fussiger, pela amizade e por toda a colaboração durante a construção deste trabalho.
- À Samanta Brighente, pela parceria e por ter enfrentado o mestrado comigo.
- Ao Grupo de pesquisa em Genética Neuromuscular, o NeMuG, pelos valiosos conhecimentos compartilhados e contribuições.

RESUMO

As paraparesias espásticas hereditárias (PEH) são um grupo de doenças genéticas caracterizado por espasticidade e fraqueza muscular nos membros inferiores. As PEH são classificadas clinicamente em formas puras, em que são descritos apenas os achados piramidais; e complexas, em que esses achados são acompanhados de disfunções de outros sistemas neurológicos ou sistêmicos. A idade de início e a progressão desse grupo de doenças é variável. O presente estudo teve como objetivo caracterizar os dados clínicos e moleculares de um grande coorte de indivíduos com PEHs de início na infância. Foi realizada uma coorte histórica multicêntrica com a participação de cinco centros do Brasil, na qual dados dos casos index e familiares afetados com PHE de início na infância (início <12 anos) foram revisados de 2011 a 2020. Cento e sete indivíduos (84 famílias) com suspeita de PHE de início na infância, sendo 72 (52 famílias) com diagnóstico genético resolvido e 6 (5 famílias) com variantes candidatas em genes relacionados a PHE. O subtipo de início na infância mais comum foi SPG4, 11/52 (21,1%) famílias com diagnóstico genético resolvido; seguido por SPG3A, 8/52 famílias (15,4%). Variantes patogênicas missense no *SPAST* foram encontradas em 54,5% dos casos index, favorecendo a associação desse tipo de variante ao SPG4 de início na infância. As curvas de sobrevivência para desfechos maiores e progressões da Escala de Avaliação de Paraplegia Espástica em corte transversal confirmaram a deterioração neurológica lenta em SPG4 e SPG3A. As características complicadoras mais comuns e vinte variantes não descritas anteriormente em genes relacionados a PEH também foram relatadas. Esses resultados são fundamentais para compreender a epidemiologia molecular e clínica da PEH de início na infância, o que pode ajudar no diagnóstico diferencial, cuidado do paciente e orientar futuros ensaios colaborativos para essas doenças raras negligenciadas.

Palavras-chave: paraplegia espástica hereditária; infância; genótipo-fenótipo; progressão da doença; SPG4; SPG3A.

ABSTRACT

Hereditary spastic paraparesis (PEH) is a group of genetic diseases characterized by spasticity and muscle weakness in the lower limbs. PEH are clinically classified into pure forms, in which only pyramidal findings are described; and complex, in which these findings are accompanied by dysfunction of other neurological or systemic systems. The age of onset and the progression of this group of diseases is variable. The present study aimed to characterize clinical and molecular data of a large cohort of subjects with childhood-onset hereditary spastic paraplegias (HSPs). A multicenter historical cohort was performed at five centers in Brazil, in which probands and affected relatives' data from consecutive families with childhood-onset HSP (onset <12 years-old) were reviewed from 2011 to 2020. One hundred and seven individuals (84 families) with suspicion of childhood-onset HSP, being 72 (52 families) with solved genetic diagnosis and 6 (5 families) with candidate variants in HSP-related genes were evaluated. The most common childhood-onset subtype was SPG4, 11/52 (21.1%) families with solved genetic diagnosis; followed by SPG3A, 8/52 families (15.4%). Missense pathogenic variants in *SPAST* were found in 54.5% of probands, favoring the association of this type of variant to childhood-onset SPG4. Survival curves to major handicap and cross-sectional Spastic Paraplegia Rating Scale progressions confirmed the slow neurological deterioration in SPG4 and SPG3A. Most common complicating features and twenty variants not previously described in HSP-related genes were also reported. These results are fundamental to understand the molecular and clinical epidemiology of childhood-onset HSP, which might help on differential diagnosis, patient care and guiding future collaborative trials for these rare neglected diseases.

Keywords: hereditary spastic paraplegia; childhood; genotype-phenotype; disease progression; SPG4; SPG3A

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de seleção dos estudos para elaboração do projeto.

Figura 2 - Marco conceitual.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação genética de acordo com a forma clínica das PEH

Tabela 2 – Principais estudos que avaliaram PEH de início infantil

Tabela 1 - tabela complementar.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC: Centers of Disease Control and Prevention

CTX: Xantomatose Cerebrotendínea

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HSP: *Hereditary Spastic Paraplegia*

PEH: Paraparesias Espásticas Hereditárias

PEH-AD: Paraparesia Espástica Hereditária Autossômica Dominante

PEH-AR: Paraparesia Espástica Hereditária Autossômica Recessiva

PEH-C: Paraparesias Espásticas Hereditárias Complicadas

PEH-NC: Paraparesias Espásticas Hereditárias nas Formas não Complicadas

RMN: ressonância magnética nuclear

SPG: *Spastic Paraplegia*

SPOAN - Paraparesia Espástica com Atrofia Óptica e Neuropatia

SPRS: *Spastic Paraplegia Rating Scale*

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

UNICEF: United Nations International Children's Emergency Fund

UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

HSCSP: Hospital Santa Casa de São Paulo

USP SP: Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Aspectos clínicos e genéticos	15
2.2 Epidemiologia	17
2.3 Fisiopatologia	17
2.4 Achados neuropatológicos e de neuroimagem	19
2.5 Diagnóstico	21
2.6 Diagnóstico Diferencial	22
2.7 Tratamento	22
2.8 Início Precoce das PEH	23
2.8.1 Idade de início	23
2.8.2 Diagnósticos mais frequentes de PEH na população infantil	24
2.8.3 Modificadores genéticos relacionados a fenótipo infantil	26
2.8.4 Avaliação da gravidade e evolução	26

2.8.5 Manifestações clínicas adicionais	26
2.8.6 Achados de neuroimagem	27
3. MARCO CONCEITUAL	29
4. JUSTIFICATIVA	30
5. OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo Geral	32
5.2 Objetivos Específico	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
7. ARTIGO	37
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	59
10. ANEXOS/APÊNDICES	60

1. INTRODUÇÃO

As paraparesias espásticas hereditárias (PEH) são um grupo heterogêneo de doenças genéticas caracterizado pela presença de progressiva hipertonia espástica e fraqueza muscular de predomínio nos membros inferiores decorrente da degeneração da porção distal dos axônios do trato corticoespinhal (Depienne *et al*, 2007). Além da grande heterogeneidade clínica, há também uma grande heterogeneidade genética com pelo menos 80 *loci* descritos como associados às PEH (Depienne *et al*, 2007; Schüle *et al*, 2016).

As PEH são usualmente classificadas clinicamente em formas não complicadas ou puras (PEH-NC), nas quais são descritos apenas os achados piramidais (alterações na sensibilidade vibratória e bexiga neurogênica também podem estar presentes); e em formas complexas (PEH-C), nas quais os achados piramidais estão acompanhados de disfunção de outros sistemas neurológicos ou sistêmicos (Ex: ataxia, disfunção cognitiva, amiotrofia, alterações cutâneas, entre outros) (Harding, 1983). Apesar de as PEH serem condições raras, recentes estudos populacionais sugerem que sua prevalência seja similar àquelas de outras condições neurológicas mais estudadas na literatura, como as ataxias hereditárias e a esclerose lateral amiotrófica (Ruano *et al*, 2014).

A fisiopatologia das PEH está relacionada a variantes patogênicas que levam à perda ou modificações na função de proteínas importantes para o transporte de macromoléculas e organelas pelos axônios; remodelamento de microtúbulos e citoesqueleto; função mitocondrial; organização e formação do retículo endoplasmático liso e função lisossomal (Salinas *et al*, 2008; Blackstone *et al*, 2011; Chang *et al*, 2014). Os neurônios com axônios mais longos (localizados nos tratos corticoespinhal e fascículos grácil e cuneiforme) serão os mais suscetíveis a estas alterações, sofrendo degeneração axonal (Salinas *et al*, 2008).

A idade de início das PEH é variável, com relatos de início desde o primeiro ano até a oitava década de vida. Entretanto, parece haver uma distribuição bimodal do início dos sintomas, com um primeiro pico na primeira infância e um segundo por volta dos 40 anos, sendo a idade média de início em geral mais tardia nas formas puras do que nas complexas (Schüle *et al*, 2016).

O início precoce foi relacionado com uma tendência de evolução mais lenta dos pacientes, tendo maior tempo desde o começo da doença até a necessidade de uso de dispositivo auxiliar e cadeiras de rodas em comparação com os pacientes de início tardio (Schüle *et al*, 2016).

O estudo da população com início na infância nos ajudará a melhor caracterizar essa população e sua progressão. Esse entendimento pode nos ajudar no tratamento do paciente tendo em vista o planejamento a longo prazo das intervenções necessárias com a possibilidade de elaboração de protocolos clínicos de seguimento individualizados. Além disso, podemos encontrar novas informações sobre variantes genéticas associadas ao início precoce das PEH e sobre os mecanismos relacionados.

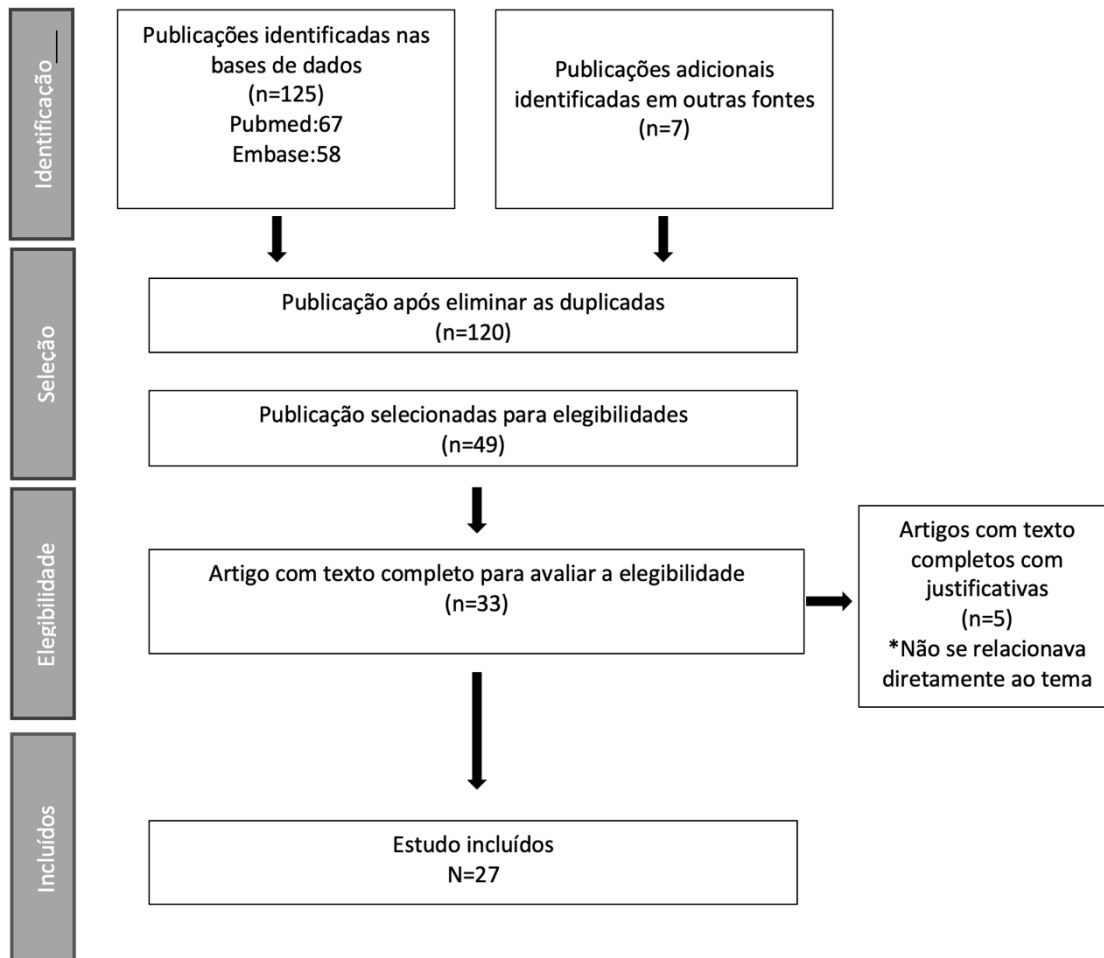
Desta forma, com a presente dissertação buscamos: 1) avaliar a frequência relativa das PEHs de início na infância no Brasil; 2) encontrar novas variantes genéticas relacionadas com o início precoce de doença; e 3) estimar o grau de incapacidade e a história natural com dados transversais nesse grupo de sujeitos. Consideramos que nossos resultados de caracterização clínica e molecular das PEH de início infantil no Brasil poderão ter aplicações futuras no cuidado e atenção mais ampla a saúde dos indivíduos acometidos por estas condições e irão visibilizar esse grupo de doenças raras e negligenciadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Realizamos revisão sistematizada da literatura para a busca de estudos sobre início infantil em pacientes com diagnóstico de PEH. Dos estudos que foram encontrados, muitos eram relatos de casos sobre variantes específicas, avaliavam todas as faixas etárias sem foco nas formas infantis, tinham pequenos tamanhos amostrais ou não realizaram avaliação genética.

Para a busca dos estudos foram consultadas as bases de dados EMBASE e PubMed, no mês de fevereiro de 2021, sem limite de tempo, utilizando-se os descritores de população e desfecho de interesse conforme o acrônimo PECO: (hereditary spastic paraplegia OR hereditary spastic paraplegia OR Hereditary Spastic Paraplegias OR Paraplegia, Hereditary Spastic OR Paraplegias, Hereditary Spastic OR Spastic Paraplegias, Hereditary OR Paraplegia, Spastic, Hereditary OR Autosomal Recessive Hereditary Spastic Paraplegia OR Spastic Paraplegia, Hereditary, Autosomal Recessive OR Hereditary Spastic Paraplegia, Autosomal Recessive OR Spastic Paraplegia, Autosomal Recessive, Hereditary OR Autosomal Recessive Spastic Paraplegia, Hereditary OR Hereditary Autosomal Recessive Spastic Paraplegia OR Hereditary Autosomal Dominant Spastic Paraplegia OR Autosomal Dominant Spastic Paraplegia Hereditary OR Spastic Paraplegia, Hereditary, Autosomal Dominant OR Hereditary, Spastic Paraplegia, Autosomal Dominant OR Spastic Paraplegia, Autosomal Dominant, Hereditary OR SPG4 OR SPG11 OR SPG3A OR SPG5 OR SPG7) AND (Early-onset OR Childhood-onset OR Child OR Children) AND (Epidemiology). Foram encontrados 58 artigos no PubMed e 68 no EMBASE, adicionalmente sete artigos foram incluídos em buscas manuais realizadas nos principais artigos de revisão do tema e entre as referências dos artigos selecionados. No total avaliamos 27 artigos relacionados à questão de pesquisa.

Figura 1 – Percurso da busca realizada para seleção dos textos a serem analisados



Entretanto, antes de detalharmos os aspectos relacionados às questões da pesquisa encontrados na busca sistematizada à literatura, realizaremos uma breve revisão sobre as paraparesias espásticas hereditárias utilizando múltiplas referências originais e de revisões narrativas sobre o tema obtidas tanto através da revisão sistematizada da literatura apresentada acima, quanto por buscas manuais sobre o tema.

As paraparesias espásticas hereditárias são um grupo heterogêneo de doenças genéticas caracterizado pela presença de hipertonia espástica e fraqueza muscular. Apresenta um predomínio nos membros inferiores decorrente da degeneração da porção distal dos axônios do trato córtico-espinhal. Há substancial diversidade clínica e genética, com pelo menos 80 *loci* descritos associados às PEH. Existem formas de herança autossômica dominante, autossômica recessiva, ligadas ao X e mitocondriais (Depienne *et al*, 2007; Schüle *et al*, 2016).

2.1 Aspectos clínicos e genéticos

As PEH são usualmente classificadas clinicamente em formas não complicadas ou puras, nas quais apenas os achados piramidais (fraqueza muscular, hiperreflexia, clônus, espasticidade e presença de sinal de Babinski) são encontrados, porém alterações em sensibilidade vibratória e urgência e/ou incontinência urinária também podem estar presentes; e em formas complicadas, nas quais os achados piramidais estão acompanhados de outras disfunções neurológicas ou de envolvimento sistêmico (Ex: ataxia, crises epiléticas, disfunção cognitiva, amiotrofia, sinais extrapiramidais, neuropatia periférica, surdez, anormalidades visuais, alterações cutâneas, entre outros). Esta é uma classificação clínica proposta pela neurologista Anita Harding em 1983, quando não havia diagnóstico molecular disponível e ainda se mostra útil (Harding, 1983).

A idade de início dos sintomas das PEH é muito variável, podendo ocorrer desde a infância precoce até a oitava década de vida (Murray & Mitsumoto, Bradley, 2013), sendo que alguns estudos demonstram uma maior prevalência de início precoce nas formas dominantes. As PEH-NC com início na adolescência ou na vida adulta costumam apresentar um curso lentamente progressivo; já as formas de início na infância têm quadro clínico usualmente estático (não progressivo) (Fink, 2014). As PEH-C em geral apresentam-se em idades de início mais precoces do que as formas puras e sua evolução apresenta curso mais rápido levando a maior incapacidade e dependência funcional do que as formas puras (Schüle *et al*, 2016).

Idades de início mais tardias e o maior tempo de duração da doença são importantes preditores da gravidade da doença nas formas NC, sendo que estes dois fatores são associados com pontuações maiores na escala clínica de gravidade *Spastic Paraplegia Rating Scale* (SPRS). Ou seja, parece haver uma menor progressão ou um melhor prognóstico nas formas de início precoce da doença. A associação que ocorre nas PEH

entre o início mais precoce de uma mesma condição com um fenótipo mais brando é diametralmente oposta ao que é encontrado em outras doenças neurodegenerativas genéticas, incluindo ataxias espinocerebelares, ataxia de Friedreich e doença de Huntington. Estas doenças apresentam uma progressão mais rápida em casos de início precoce (Schüle et al, 2016; Donis et al, 2016; Saute et al,2015).

A classificação genética das PEH é baseada no modo de herança, *locus* e/ou variante patogênica.

causal. Os *loci* para as PEH são chamados *SPG* (*spastic paraplegia*) (Depienne et al, 2007; Fink, 2014; Novarino et al., 2014) e estes são numerados de acordo com ordem cronológica de suas descrições.

A **Tabela 1** mostra a classificação genética das PEH de acordo com a herança e forma clínica.

Tabela 1 – Classificação genética de acordo com a forma clínica das PEH		
	Não-complicadas	Complicadas
PEH-AD	SPG4, SPG6, SPG7, SPG8, SPG10, SPG12, SPG13, SPG18, SPG19, SPG31, SPG33, SPG37, SPG40, SPG41, SPG42, SPG72, SPG73, SPG80	SPG9A, SPG10, SPG17, SPG29, SPG36, SPG38, SPG80

PEH-AR	SPG3A, SPG5A, SPG7, SPG11, SPG25, SPG28, SPG43, SPG48, SPG58, SPG62, SPG65, SPG71, SPG72, SPG83	SPG5A, SPG7, SPG9B, SPG11, SPG14, SPG15, SPG18, SPG20, SPG21, SPG23, SPG24, SPG26, SPG27, SPG28, SPG30, SPG32, SPG35, SPG39, SPG43, SPG44, SPG45, SPG46, SPG47, SPG48, SPG49, SPG50, SPG51, SPG52, SPG53, SPG54, SPG55, SPG56, SPG57, SPG58, SPG59, SPG60, SPG61, SPG2, SPG63, SPG64, SPG65, SPG66, SPG67, SPG68, SPG69, SPG70, SPG74, SPG75, SPG76, SPG77, SPG78, SPG79, SPG81, SPG82, GAD1, SPOAN
PEH ligadacao X	SPG16, SPG34	SPG1, SPG2, SPG16, SPG22

Legenda da tabela 1: PEH-AD – paraparesia espástica hereditária autossômica dominante; PEH-AR - paraparesia espástica hereditária autossômica recessiva

2.2 Epidemiologia

A prevalência mínima das PEH foi estimada em recente metanálise em 4,4:100.000 habitantes entre Europeus, japoneses e em países do norte da África (Ruano et al, 2014). Dois estudos de base populacional, um realizado em Portugal e outro na Finlândia mostraram prevalências um pouco maiores do que nos demais estudos entre 4,1 e 7,4:100.000 habitantes, com prevalência geral levemente superior à das ataxias hereditárias (6,5:100.000 habitantes), condições mais conhecidas e estudadas na literatura científica e em nosso país. A forma mais frequente de PEH é a SPG4, de herança autossômica dominante, que representa entre 37-46% dos casos com herança dominante na Europa (Finsterer et al, 2012; Ruano et al, 2014) e pode ser encontrada em até 10-15% dos casos isolados com apresentação pura (Depiène et al, 2007). Em estudo colaborativo brasileiro mutações no *SPAST/SPG4* foram responsáveis por 35% dos casos de PEH-NC (França Jr., et al, 2014) e em estudo gaúcho, pelo nosso grupo de pesquisa, a SPG4 foi

responsável por 60% dos casos de PEH com herança claramente autossômica dominante (Burguez et al, 2017).

A prevalência relativa de SPG4 no estudo realizado no Rio Grande do Sul (RS) foi similar à de uma grande coorte alemã recentemente publicada que avaliou 222 casos índices consecutivos com PEH com herança autossômica dominante e que encontrou SPG4 em 61% destes indivíduos (Schüle et al., 2016). Cabe ressaltar que os critérios para definição do padrão de herança foram os mesmos entre estes dois estudos (Schüle et al., 2016, Burguez et al, 2017).

Nas PEH de herança autossômica recessiva (PEH-AR), a SPG11 é descrita como a forma mais frequente variando entre 15-21% (Ruano et al., 2016) e sendo responsável por 26,3% dos casos de PEH-AR atendidos no RS (Burguez et al., 2017). A SPG7 e SPG5 foram diagnosticadas em 10,5% e 5,2% das famílias com PEH-AR no RS (Burguez et al., 2017).

2.3 Fisiopatologia

Os mecanismos celulares que acarretam a degeneração axonal do trato córtico-espinhal são provavelmente tão diversos e complexos como a própria genética molecular das PEH. Os principais estudos sugerem que defeitos em diferentes componentes celulares levam à disfunção no transporte de macromoléculas e organelas pelo axônio; à alterações no remodelamento de microtúbulos e citoesqueleto; à alteração na função mitocondrial e desenvolvimento do axônio; à alterações no tráfego entre o retículo endoplasmático e complexo de Golgi, na organização e formação do retículo endoplasmático liso e na função lisossomal, nos mecanismos de controle de qualidade proteica celular, e no metabolismo de purinas e lipídios (Salinas et al, 2008; Blackstone et al, 2011; Chang et al, 2014). Os axônios mais longos parecem ser mais suscetíveis a alterações no tráfego de membrana e transporte axonal podendo acarretar em um desenvolvimento, manutenção e crescimento axonal anormal e eventualmente à neurodegeneração (Salinas et al, 2008).

A paraparesia espástica hereditária do tipo 4 (SPG4) é a forma mais frequente de PEH, conforme já abordamos. Por isso, detalharemos mais sua fisiopatologia. A SPG4 é causada por mutações em heterozigose no gene *SPAST*, o qual codifica a proteína espastina, uma ATPase que corta microtúbulos. A espastina faz parte da família das ATPases Associadas a diversas Atividades celulares (AAA), um grupo de proteínas que dividem um domínio ATPase com funções celulares diversas (Ex: tráfego de membrana, motilidade

intracelular, biogênese de organelas, envelhecimento proteico e proteólise) (Salinas et al., 2008; Blackstone et al., 2011; Chang et al., 2014; Fink, 2014). O principal mecanismo relacionado a SPG4 é a haploinsuficiência, ou seja, as variantes patogênicas levariam a perda de função da proteína codificada por um dos alelos do gene e esta perda de 50% da função não seria tolerada levando a neurodegeneração. Também há evidências de que a proteína mutada pode interagir com a proteína selvagem e assim interferir na sua função. Estas alterações irão acarretar em prejuízo do transporte axonal, levando a morte (*dying back*) do axônio (Denton et al., 2016).

A segunda forma mais comum na nossa casuística é a SPG3A. Ela é causada por uma variante patogênica em *ATLI*, é o segundo tipo mais comum de PEH autossômica dominante (AD), sendo responsável por aproximadamente 10%-15% de todas as PEH-AD. Diversos artigos sugerem que a SPG3A seria a principal causa de PEH-AD com início precoce e que quase nunca foi relatada com início após os 20 anos de idade (Hedera et al, 2021; de Bot et al, 2010). Entretanto, estudos mais recentes e com tamanhos amostrais maiores sugerem que a SPG4 seja a forma infantil mais frequente, seguida de perto pela SPG3A (Schüle et al, 2016). A SPG3A é causada por variantes patogênicas em heterozigose no gene *ATLI*, o qual codifica a proteína atastina-1. A atastina-1 é membro de uma superfamília de GTPases relacionadas à dinamina, e estudos destacaram o papel crucial da família Atlastina na formação da rede do retículo endoplasmático (Blackstone et al, 2011). Outro mecanismo de ação é a sinalização das proteínas morfogenéticas ósseas que tem um papel crucial em processos do desenvolvimento como organogênese, padronização dorsoventral, diferenciação celular e remodelação de tecidos (Blackstone et al, 2011).

Outras duas formas que iremos destacar são a SPG11 e a SPG46. A SPG11 é causada por variantes patogênicas bi-alélicas no gene *SPG11* que codifica a proteína espatacsina. A grande maioria das variantes patogênicas no *SPG11* são do tipo *frameshift* ou *nonsense*, levando ao truncamento e degradação da proteína formada, sugerindo que o mecanismo associado a esta doença seja a perda de função da espatacsina. Embora a função exata da espatacsina permaneça desconhecida, descobertas recentes indicam que ela pode impactar a função autofágica do lisossomo (Pozner et al, 2020). Já a SPG46 é causada por variantes patogênicas bi-alélicas no gene no gene *GBA2* que codifica a enzima glicocerebrosidase tipo 2, uma glicosilceramidase não-lisossomal que atua no metabolismo de glicosfingolípídios (Murala et al, 2021).

2.4 Achados neuropatológicos e de neuroimagem

Estudos *post mortem* em pacientes com PEH encontram comumente degeneração dos axônios dos tratos córtico-espinhais laterais com máximo acometimento na porção torácica das extremidades distais da medula espinhal e relativamente pouca degeneração na porção cervical da medula espinhal. A degeneração axonal nas fibras do fascículo grácil é também encontrada, sendo mais significativa na porção cervical da medula espinhal. A desmielinização dessas fibras está correlacionada com o grau de degeneração do axônio (Murala et al, 2021; Fink et al, 2013).

A degeneração axonal na medula espinhal causa atrofia nos segmentos cervical e torácico. Em poucos casos, a degeneração do trato córtico-espinhal se estende rostralmente para a cápsula interna, pedúnculos cerebrais, ponte e medula e já foi descrito quantidade reduzida de células de Betz (Murala et al, 2021; Fink et al, 2013).

O padrão de degeneração seria devido a morfologia dos neurônios espinhais, caracterizado por neurônios mais longos (que podem chegar a mais de 1m de comprimento). Possivelmente esta morfologia levaria a uma maior dependência do tráfego de membranas, transporte associado a microtúbulos e organização do citoesqueleto, e da função mitocondrial (Salinas et al, 2008).

Além desses achados, há estudos mostrando que as disfunções das PEH não são somente restritas ao sistema piramidal. Através da utilização da tractografia por difusão (DTI) por ressonância magnética nuclear (RMN) em 11 pacientes com SPG4 e 23 controles, um estudo demonstrou extensa redução na fração de anisotropia (FA) nos tratos córtico-espinhais, giro do cíngulo e esplênio do corpo caloso (Rezende et al., 2014).

Como via de regra o achado mais comum na neuroimagem dos pacientes com PEH é a redução volumétrica da medula espinhal. Essa alteração, entretanto, nem sempre é evidente nas análises visuais e, mesmo que seja, essa característica não é exclusiva das PEHs e pode ser encontrada, por exemplo, em doenças adquiridas do neurônio motor. A RNM de encéfalo parece ser mais relevante do que a de medula espinhal como indicativo do subtipo de PEH quando forem encontrados achados qualitativos específicos (da Graça et al, 2019).

Um sinal característico de alguns subtipos de PEH na RNM é o “sinal das orelhas do

lince", que foi descrito em relatos de casos de paraplegia espástica hereditária com corpo caloso fino, principalmente associada a mutações nos genes *SPG11* e *ZFYVE26*. Estes genes são responsáveis pelo tráfego de membrana e organelas e causam a SPG11 e SPG15. Quando este sinal está presente, existe uma grande probabilidade de que sejam encontradas variantes patogênicas em genes associados as PEH, particularmente os subtipos SPG11 ou SPG15, mesmo quando não há recorrência história familiar. Sendo que a avaliação visual de imagens ponderadas em T2-FLAIR teve sensibilidade e especificidade para esses 2 subtipos de PEH de até 94 e 97%, respectivamente (Pascual et al, 2019). O corpo caloso fino também é outro achado específico de alguns subtipos de PEH, como a SPG11 e a SPG15. Em estudo realizado pelo nosso grupo, 50% dos casos com suspeita de PEH que apresentavam corpo caloso afilado chegaram a um diagnóstico molecular, todos eles com diagnóstico de SPG11 (Burguez et al, 2017). Entretanto, alguns raros relatos de caso mais recentes demonstraram a presença de corpo caloso fino em outros subtipos de PEH, inclusive na SPG4 e SPG3A, formas conhecidas como por serem não-complicadas, indicando que a especificidade do achado parece ser menor do que inicialmente considerado (da Graça et al,2019). A descrição do sinal da orelha de linco é mais recente e geralmente está presente em conjunto com o afilamento de corpo caloso. Dessa forma é provável que estudos futuros mostrem especificidades similares entre esses dois achados de imagem para o diagnóstico do subtipo específico de PEH. De qualquer modo, como o diagnóstico final do subtipo de PEH será genético, os achados qualitativos de RMN devem ser considerados apenas como pistas para orientar na escolha dos exames mais apropriados para esta confirmação. Entretanto, tais achados também podem ser importantes no entendimento de vias fisiopatológicas comuns a alguns tipos de PEH. No caso das PEH com corpo caloso afilado como um sinal proeminente, como é o caso da SPG11 e SPG15 e de uma forma mais rara a SPG48, as proteínas envolvidas nestas condições interagem umas com as outras em um complexo de proteínas que parece ser fundamental no processo de reciclagem de autolisossomos e na formação de novos lisossomos (Chang et al, 2014)

2.5 Diagnóstico

As PEH são uma designação para síndromes neurológicas caracterizadas por fraqueza e espasticidade bilaterais dos membros inferiores como manifestações predominantes e

em que o fator causal é uma variante patogênica genética. Em alguns casos outros sintomas podem estar associados. A grande maioria dos indivíduos apresenta comprometimento da marcha devido à fraqueza e a espasticidade dos membros inferiores. A urgência urinária é comum na PEH e, ocasionalmente, pode ser a característica inicial do quadro. Os sintomas podem ser notados pela primeira vez em qualquer idade, desde a primeira infância até a senescência (Fink, 2013). É importante avaliar a história familiar, neurodesenvolvimento e forma de apresentação, pois estes pontos ajudam a dar pistas sobre o diagnóstico.

A apresentação clínica será geralmente de um quadro de hipertonía lenta e progressiva nos membros inferiores, levando a um padrão anormal ou instabilidade de marcha, em que o grau de hipertonía será desproporcional ao grau de paresia, este último quase sempre mais leve, e em que estarão presentes outros achados piramidais como hiperreflexia e sinal de Babinski bilateral (Murale et al, 2021). Também pode haver disfunção da sensibilidade vibratória nos membros inferiores. No caso de início na infância o sintoma mais precoce parece ser a marcha digitigrada e como já mencionado o quadro pode ser relativamente não progressivo.

Nos casos de PEH-C pode haver diversas síndromes devido a combinação de outros sinais e sintomas neurológicos ou sistêmicos. Pode haver prejuízo cognitivo, neuropatia periférica, ataxia, alteração de neuroimagem ou outras alterações que serão abordadas ao longo do texto (Fink, 2013).

Exames com RNM de encéfalo e exames eletroneurofisiológicos (potencial evocado motor, eletroneuromiografia) podem dar pistas diagnósticas, porém as alterações encontradas em sua maioria são inespecíficas para diferenciar os subtipos de PEH, com exceção dos sinais da orelha de lince. Relembrando o sinal de orelha de lince e corpo caloso afilado abordados na seção anterior.

O diagnóstico confirmatório se dará através do teste genético específico que buscará a detecção de variantes patogênicas nos genes associados as PEH, podendo ser realizado através de sequenciamento de genes únicos, de painéis de sequenciamento de nova geração que abrangem os subtipos mais prevalentes. No estudo realizado no nosso centro com painel de sequenciamento o rendimento foi de 48,3% para um diagnóstico molecular definitivo, nos pacientes autossômicos dominantes foi de 60% e nos autossômicos recessivos 47,4% (Burguez et al, 2017).

2.6 Diagnóstico Diferencial

Diversas patologias entram no rol de diagnósticos diferenciais de PEH. Sendo entre elas doenças adquiridas, metabólicas e outras doenças degenerativas (Murale et al, 2021). No caso do paciente pediátrico é importante ressaltar a paralisia cerebral diplegica.

A PEH na infância tende a não ser progressiva, como consequência os pacientes podem ser erroneamente diagnosticados com paralisia cerebral. O diagnóstico diferencial pode ser realizado através da ausência de fatores de risco perinatais para lesões cerebrais e imagem cerebral normal ou achados específicos de algum subtipo de PEH como sinal de orelha de linco. Recorrência familiar e consanguinidade parental também poderão sugerir etiologia genética nas formas infantis de PEH. Outras características associadas que podem acompanhar a PEH-C, como parkinsonismo, distonia, ataxia, ptose, sinais da coluna posterior, oftalmoplegia, amiotrofia e um corpo caloso delgado, podem alertar o médico a considerar um diagnóstico de PEH (Person et al, 2019).

A American Academy of Neurology tem como recomendação que testes metabólicos e genéticos sejam considerados em crianças com paraplegia espástica se não há registro clínico ou alteração em neuroimagem suficientes para estabelecer um diagnóstico específico, ou se houver outras características atípicas adicionais em sua história ou exame clínico (Ashwal et al, 2004). Portanto, o diagnóstico de HSP deve ser considerado em crianças com paraplegia espástica cujos mecanismos patogênicos permanecem obscuros após investigação laboratorial. (Ortega et al, 2019).

2.7 Tratamento

No momento, não há terapias modificadoras do curso das PEH. O tratamento é sintomático e baseado em uma abordagem multidisciplinar para lidar com os sintomas de câibras, espasticidade, espasmos, deformidades entre outros (Murala et al, 2021).

Os tratamentos sintomáticos estabelecidos em sua maioria são voltados para melhora da espasticidade e da marcha. Sendo as órteses, antiespasmódicos, baclofeno intratecal e toxina botulínica os com melhor comprovação de eficácia, geralmente associados com fisioterapia. Há estudos iniciais com pequeno número de pacientes mostrando benefício funcional nos usos de estimulação elétrica funcional e estimulação espinal transcutânea por corrente contínua (Shribman et al, 2019).

Muito se pesquisa sobre a marcha e espasticidade, porém outros sintomas podem ser

tão incapacitantes quanto. A incontinência urinária, em que em muitos casos não é tratada, pode se beneficiar da aplicação de toxina botulínica ou de medicamentos via oral (Shribman et al, 2019).

Há tratamentos específicos para doenças genéticas que podem apresentar fenótipo similar ao de PEH, como a xantomatose cerebrotendínea, deficiência de vitamina E, abetalipoproteinemia e acidúria glutárica (Murray & Mitsumoto, Bradley, 2013). Na SPG5 estudos mostram que a combinação de atorvastatina e ácido chenodeoxicólico podem ser benéficos no fenótipo bioquímico da doença, porém são necessários estudos mais longos para confirmar se o efeito bioquímico apresenta repercussão clínica (Shribman et al, 2019). Outra terapia em desenvolvimento para a SPG5 é o uso do RNA mensageiro do *CYP7B1*. Em modelo transgênico de camundongos transgênico knockout para o *Cyp7b1* a injeção sistêmica do RNAm tanto do *CYP7B1* humano quanto do camundongo foi capaz de degradar os oxisteróis tóxicos no fígado e no soro dentro de dois dias do tratamento, sendo que o efeito parece persistir por pelo menos 5 dias. A administração repetida do RNAm do *CYP7B1* foi segura por pelo menos 17 dias e levou a redução dos oxisteróis tóxicos também em algumas regiões cerebrais dos camundongos, sendo uma perspectiva terapêutica que deverá ser avaliada em futuros estudos em seres humanos (Hauser et al, 2019).

2.8 Início Precoce das PEH

Nesta seção abordaremos os artigos encontrados na revisão sistematizada da literatura relacionados à questão de pesquisa sobre o início precoce da PEH. No total avaliamos 27 artigos relacionados à questão de pesquisa, entretanto a maioria dos estudos eram relatos de casos sobre mutações específicas com início na infância ou grandes coorte de pacientes nos quais a faixa etária pediátrica fazia parte de uma análise com todos os pacientes com PEH independentemente da idade.

Apenas seis estudos abordavam a faixa etária pediátrica como um todo, independente do subtipo, porém dois não tinham o diagnóstico molecular e todos apresentavam um número limitado e inferior aos que serão apresentados na presente dissertação.

2.8.1 Idade de início:

No estudo com maior tamanho amostral (avaliou 608 pacientes), realizado na Alemanha, foi visto uma distribuição bimodal para a idade de início das PEH, com um primeiro pico na primeira infância (<5 anos em 11%) e um segundo pico por volta dos 40 anos (Schüle et al, 2016). Há um consenso na literatura sobre a grande variabilidade da idade de início podendo variar da primeira infância até a terceira idade.

A idade de início dos sintomas pode ser bastante heterogênea, mesmo para um determinado tipo genético de PEH. Alguns diagnósticos podem ter uma idade de início em média mais jovem (por exemplo, início na infância em SPG3A) do que em outros. Porém há uma sobreposição significativa entre a faixa de idades em quais sintomas começam sendo que só pela idade do início dos sintomas não é possível prever o diagnóstico (Fink ,2013).

Nos estudos com a população pediátrica não há um consenso sobre a idade de corte utilizada para definir a população. Na maioria dos estudos não há informação sobre este aspecto nos métodos, tendo que ser inferida pela idade do paciente mais velho da série. No estudo de Kamate e colaboradores o paciente que iniciou mais velho tinha 3 anos, enquanto no estudo de Polymeris e colaboradores o paciente o início mais tardio foi de 15,7 anos.

A própria definição de infância é muito variável na literatura. O *Centers of Disease Control and Prevention* considera crianças menores de 12 anos (<https://www.cdc.gov/>). A UNICEF tem como ponto de corte 10 anos (<https://www.unicef.org/>). Na nossa casuística vamos utilizar o ponto de corte de menores de 12 anos.

2.8.2 Diagnósticos mais frequentes de PEH na população infantil

As descrições iniciais das formas infantis de PEH, sugerem que a SPG3A seria a mais frequente, inclusive preconizando realizar investigação focada neste gene inicialmente nos casos de PEH-NC em pacientes com menos de dez anos (Depienne et al, 2007; de Bot, 2010; Battini et al, 2011). Entretanto, como já destacamos anteriormente, na coorte alemã que avaliou 608 pacientes com PEH, a SPG4 foi o diagnóstico mais frequente, independentemente da faixa etária, sendo duas vezes mais frequente do que a SPG3A na faixa etária abaixo dos 10 anos (Schüle et al, 2016). Neste estudo a SPG3A foi a segunda

forma mais comum de PEH de início infantil. Outro dado interessante do estudo, foi que quase todos os subtipos podem apresentar grande variabilidade de início dos sintomas, sendo a exceção a SPG7 em que não foram identificados casos de início infantil (Shule et al, 2016). Interessante que já em 2013 um estudo português que avaliou 89 famílias portuguesas com PEH-AD mostrou que mesmo em pacientes com doença de início precoce, a probabilidade de encontrar uma variantes patogênicas no SPG4 foi maior do que para SPG3A (Loureiro et al, 2013).

Nos trabalhos encontrados com foco na população pediátrica podemos destacar o estudo realizado na Itália por Schiavoni e colaboradores que avaliou 47 pacientes (17 com diagnóstico molecular) e que mostrou que SPG3A (4 pacientes) foi a forma mais frequente seguida pela SPG4 (3 pacientes). Entretanto, outro estudo italiano, que avaliou 14 pacientes com PEH infantil, mostrou que a SPG4 foi a mais comum, sendo que nenhum paciente com SPG3A foi encontrado (Battini et al, 2011). No trabalho de Koul e colaboradores realizado em Omã, 74 casos de 31 famílias com PEH de início infantil foram caracterizados, 91% destes com consanguinidade relatada, entretanto o estudo não realizou diagnóstico molecular, não sendo possível estabelecer os subtipos mais frequentes. Na Grécia, um estudo com 15 pacientes com formas infantis de PEH-NC demonstrou que o diagnóstico mais comum foi de SPG4 seguido por SPG3A (Polymeris et al, 2016). Por fim, em trabalho realizado na Índia, as SPG54 e SPG35 foram os subtipos mais comuns de PEH de início infantil em 11 famílias avaliadas que apresentavam elevada frequência de consanguinidade (Kamate et al,2019).

A **Tabela 2** apresenta um resumo dos principais achados dos estudos que avaliaram as PEH de início infantil.

Tabela 2 – Principais estudos que avaliaram PEH de início infantil

Ano	Autor	País	N	PEH-NC	Sexo Masculino	Recor-rência	Consan-guinidade	Exame genético	Percentual de diagnósticos confirmados	Diagnóstico mais comuns	Idade de corte
1991	Appleton et al	Canadá	23	34,7%	83,3%	82%	0%	Não	-	-	Sem informação (início mais tardio: 13 anos)
2011	Battini et al	Itália	14	100%	-	7%	-	Sim	28,5%	SPG4	-
2013	Koul et al	Omã	74	19%	56,8%	98%	91%	Sim	-	-	Menores de 15
2016	Kumar et al	Índia	9	23%	-	22,2%	66,6%	Sim	44,4%	-	-

2016	Polymeris et al	Grécia	15	100%	80%	33,3%	0%	Sim	71,4%	SPG4	-
2017	Ortega et al	Brasil	35	34,2%	51,4%	37,1%	17,1%	Não	-	-	Sem informação (início mais tardio: 10 anos)
2019	Kamate et al	Índia	17	-	29,4%	27,2%	72%*	Sim	64,7%	SPG54 e SPG35	Sem informação (início mais tardio: 3 anos)
2020	Schiavoni et al	Itália	47	44,6%		8%	2%	Sim	36,1%	SPG3A	Sem informação (início mais tardio: 6 anos)

NC, não-complicada; PEH, paraparesia espástica hereditária;

2.8.3 Modificadores genéticos relacionados a fenótipo infantil

Alguns estudos buscaram variantes específicas ou modificadores que levariam a um início mais precoce das PEH. Até o momento a principal associação é com a presença de variantes patogênicas do tipo *missense* tanto no gene *SPAST* quanto no *ATLI* (Shoukier et al, 2008; Parodi et al, 2018; Hedera, 2020). Esta associação está bem melhor definida para a SPG4, como demonstrada em grande coorte francesa que avaliou 842 pacientes com diagnóstico molecular de SPG4. Indivíduos com variantes patogênicas do tipo *missense* tiveram idade de início em média 10 anos antes de pacientes com variantes associadas a perda de função da proteína, sendo que os sintomas clínicos da maioria dos sujeitos com SPG4 devido a variantes do tipo *missense* iniciaram sintomas antes da segunda década de vida, enquanto os sujeitos com variantes truncadas de agruparam em inícios em entre a segunda e a sexta décadas de vida (Parodi et al, 2018). Este mesmo estudo, apoiado em dados anteriores mostrou que o polimorfismo intragênico no *SPAST* p.(Ser44Leu) foi associado com idade de início mais precoce, com média de 11 anos de idade nos casos com o polimorfismo nos 11 casos com o polimorfismo, em comparação com média de início de 29,3 anos para os 547 casos sem o polimorfismo (Parodi et al, 2018).

2.8.4 Avaliação da gravidade e evolução

A principal forma de a avaliação da gravidade e evolução das PEH se dá com o uso de escalas clínicas validadas para a doença e baseadas no exame neurológico. A principal escala é a *Spastic Paraplegia Rating Scale* (SPRS) que varia de 0 a 52, em uma crescente de severidade (Servalheire, 2016). Nenhum dos artigos encontrados que avaliou a população pediátrica com PEH utilizou a SPRS, a qual carece de validação para esta população. A maioria dos estudos diferenciava a gravidade e evolução pela necessidade ou não de muletas ou de cadeira de rodas, no que podemos considerar como estágio de

gravidade clínica.

Dois artigos usaram classificações baseadas em 4 subtipos. O primeiro teve como norte a espasticidade, a capacidade de andar sem ajuda e o uso de cadeira de rodas (Polymeris et al,2016). Já o estudo de Battini e colaboradores diferenciou-se da classificação acima por adicionar a capacidade de andar nos calcanhares como parâmetro de gravidade. Entretanto, tais formas de classificação de gravidade são heterogêneas entre os diferentes grupos e carecem de validação.

2.8.5 Manifestações clínicas adicionais

As PEHs podem apresentar com diversas complicações associadas ao quadro piramidal. No estudo de Schüle e colaboradores a avaliação da frequência destas sinas e sintomas foi realizada para 608 sujeitos com PEH e foi destacado em quais subtipos cada uma destas alterações eram mais comuns, porém não houve estratificação por idade, não sendo possível avaliar os sintomas dos pacientes que tiveram seu início na infância. Nesta coorte os sintomas mais comuns foram alterações sensoriais, ataxia, neuropatia periférica, disartria, sendo as outras alterações ocorreram em uma frequência menor do que 13% (Schüle et al, 2016).

Em estudo realizado no Brasil com população pediátrica com suspeita de PEH, sem confirmação do diagnóstico molecular, 23 pacientes (65,8%) com diagnóstico clínico de PEH-C foram avaliados, sendo descrito que os sinais e sintomas associados mais comuns foram déficit intelectual (20 pacientes), sinais extrapiramidais, epilepsia e ataxia. Outras alterações ocorreram em um pequeno número de pacientes (Ortega et al, 2019). No estudo de Schiavoni e colaboradores a deficiência intelectual foi o achado clínico mais comum nas PEH-C (54%), seguido por neuropatia periférica e epilepsia.

O artigo de Koul e colaboradores que avaliou 74 pacientes com suspeita de PEH de início na infância, sem confirmação do diagnóstico genético, as seguintes alterações foram as mais frequentemente encontradas: alteração na MRI, déficit cognitivo, disartria e epilepsia. Entretanto, destacamos a grande frequência de consanguinidade (91%) nesta população, podendo sugerir que haja diagnósticos mais raros e específicos da população de Omã, o que limita a validade externa desses achados. Com o mesmo viés da endogamia o estudo de Kamate e colaboradores relatou que transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, disartria, atrofia ótica e catarata foram os sinais complicadores do fenótipo mais frequentes.

2.8.6 Achados de neuroimagem

As alterações de neuroimagem foram avaliadas em alguns artigos na faixa etária pediátrica. Sendo as mais comuns: lesões inespecíficas da substância branca, alterações no corpo caloso e no cerebelo e atraso na mielinização (Koul et al, 2013; Ortega et al, 2019; Schiavoni et al, 2020).

Em estudo realizado na Itália com 46 pacientes foi visto alteração na RNM encefálica em 13 pacientes. Destes 5 pacientes tinham diagnóstico molecular confirmado (Schiavoni et al, 2020). No estudo brasileiro de Ortega e colaboradores todos os pacientes realizaram neuroimagem, sendo que 37% destes apresentaram alterações na RNM encefálica que incluiu lesões inespecíficas de substância branca, atrofia cerebelar, corpo caloso fino e/ou "sinal da orelha do lince. Neste estudo as RNM encefálica foram normais em todos os pacientes classificados como PEH-NC, já nos casos com PEH-C, apenas 43,4% tinham imagem normais(Ortega et al, 2019).

Na coorte realizada em Omã todos os pacientes realizaram RNM encefálica, sendo o exame alterado em 24,3%. Os achados mais encontrados foram alterações não específicas da substância branca, agenésia ou corpo caloso fino e redução do volume cerebelar (Koul et al, 2013).

A RNM de encéfalo é de grande valia para o diagnóstico diferencial das PEH. Muitas alterações são inespecíficas, mas em conjunto com a clínica podem nos ajudar a um diagnóstico podendo guiar testes genéticos e sua interpretação.

3. MARCO CONCEITUAL

As PEH apresentam distribuição de início dos sintomas bimodal, sendo o segundo pico de início na primeira infância. Entretanto, apesar de ser frequente o início infantil, poucos estudos caracterizaram os aspectos clínicos e genéticos das PEH nesta faixa etária. Essa população negligenciada precisa ser melhor estudada para que possamos compreender suas características clínicas e evolução. Já foi demonstrado que há tipos de mutações e modificadores moleculares que parecem levar a um início mais precoce das formas puras de PEH, sendo que um estudo com um grande número de pacientes pode nos dar subsídios adicionais para a melhor compreensão dessas condições e da correlação entre os genótipos e fenótipos encontrados na população brasileira.

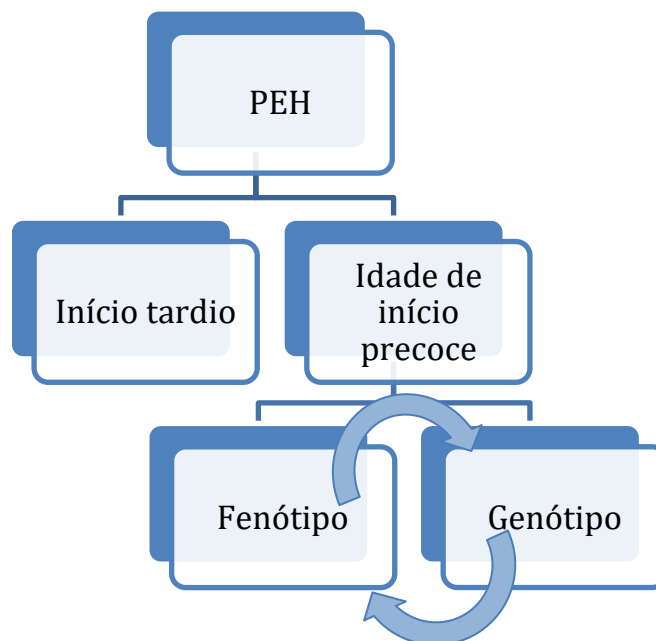


Figura 2: Marco conceitual esquemático. Fonte: Elaborado pela autora (2021)

4. JUSTIFICATIVA

As paraparesias espásticas hereditárias são um grupo de doenças neurodegenerativas negligenciadas em que poucos estudos caracterizaram suas formas de início infantil. Os estudos realizados até o momento avaliaram um número pequeno de pacientes, focaram em um subtipo específico, ou ainda não realizaram diagnóstico genético das formas avaliadas, entretanto os resultados disponíveis sugerem que a evolução clínica e os subtipos podem diferir do que conhecemos para as formas adultas de PEH.

O ambulatório de Neurogenética do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre acompanha atualmente 106 famílias (166 indivíduos) com diagnóstico clínico de PEH. Destes pacientes 77 (44 famílias) têm diagnóstico molecular. Conforme os critérios de elegibilidade que serão descritos no artigo da presente dissertação, 33 pacientes de 24 famílias entraram na casuística de início infantil. Para o presente estudo também contamos com a colaboração do grupo de Neurogenética da UNICAMP, que usando os mesmos critérios incluiu 46 pacientes de 38 famílias. Ambas as instituições incluíram em suas casuísticas pacientes com suspeita de PEH com e sem diagnóstico molecular confirmado. Adicionalmente, foram incluídos pacientes provenientes da UNIFESP, USP-SP e Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, contribuindo com 11 (8 famílias), 10 (8 famílias) e 7 (7 famílias) pacientes, respectivamente, porém para estes três centros, apenas pacientes com diagnóstico molecular confirmado de PEH foram incluídos.

Nosso objetivo será o de relatar os aspectos clínicos e moleculares detalhados de pacientes com PEH de início infantil, reunindo a casuística de cinco centros brasileiros, um deles no Sul do Brasil e quatro no Sudeste. Esta será a maior casuística já relatada até o momento na literatura focada na população infantil, será o primeiro relato desta população que avaliará diferentes regiões do Brasil, complementando os resultados do único estudo brasileiro encontrado, em que foram caracterizados os achados de 35 pacientes com suspeita de PEH de início infantil, mas sem diagnóstico molecular. Não há outros estudos na América Latina com essa população, sendo a grande maioria das séries europeias e com tamanhos amostrais inferiores ao do presente trabalho.

Consideramos que o presente estudo, por ter maior tamanho amostral, poderá apresentar dados mais completos e com menores vieses de seleção sobre os achados clínicos, moleculares e de progressão de doença, bem como sobre correlações entre genótipo e fenótipo nesta população. Além disso, ao conhecermos a população de PEH de início infantil no Brasil poderemos iniciar linhas de pesquisa para caracterizações

adicionais do curso clínico e de modificadores moleculares bem como de biomarcadores das formas mais frequentes e com isso avançar o conhecimento, abrindo caminho para futuros estudos que possam avaliar terapias específicas para essas condições. Também ressaltamos que de imediato nossos dados poderão dar informações importantes para a investigação genética, para prognóstico e aconselhamento genético, e que podem orientar sobre os principais sinais e sintomas para que os mesmos possam ser monitorados e eventualmente tratados sintomaticamente.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Realizar caracterização clínica e molecular das PEH de início infantil no Brasil

5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência relativa dos subtipos de PEH mais frequentes em nossa população pediátrica;
- Avaliar os sintomas complicadores das PEH mais comuns em nossa população pediátrica e em cada um dos principais subtipos identificados;
- Estimar a incapacidade e o curso clínico de modo transversal dos pacientes com início na infância, através da evolução da SPRS em comparação com a duração de doença e de parâmetros clínicos como duração de doença na necessidade de andador/bengala ou cadeira de rodas;
- Realizar comparação descritiva entre os dados epidemiológicos e evolução das formas mais frequentes que forem identificadas nos pacientes com início na infância.
- Avaliar as variantes patogênicas mais frequentes em nossa casuística de pacientes pediátricos e correlacionar o tipo com o fenótipo;
- Descrever variantes patogênicas que ainda não tenham sido relatadas na literatura e que possam ser mais frequentes na população brasileira.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ashwal S, Russman BS, Blasco PA, Miller G, Sandler A, Shevell M et al. Practice parameter: diagnostic assessment of the child with cerebral palsy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2004 Mar;62(6):851-63.
2. Battini R, Fogli A, Borghetti D, Michelucci A, Perazza S, Baldinotti F, Conidi ME, Ferreri MI, Simi P, Cioni G. Clinical and genetic findings in a series of Italian children with pure hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol*. 2011 Jan;18(1):150-7.
3. Blackstone C, O'Kane CJ, Reid E. Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12:31-42.
4. Burguez D, Polese-Bonatto M, Scudeiro LAJ, Björkhem I, Schöls L, et al. Clinical and molecular characterization of hereditary spastic paraplegias: A next-generation sequencing panel approach. *J Neurol Sci*. 2017; 15: 8-25.
5. Chang J, Lee S, Blackstone C. Spastic paraplegia proteins spastizin and spatacsin mediate autophagic lysosome reformation. *J Clin Invest*. 2014;124:5249-62.
6. de Bot ST, van de Warrenburg BP, Kremer HP, Willemsen MA. Child neurology: hereditary spastic paraplegia in children. *Neurology*. 2010 Nov 9;75(19):e75-9.
7. da Graça FF, de Rezende TJR, Vasconcellos LFR, Pedroso JL, Barsottini OGP, França MC Jr. Neuroimaging in Hereditary Spastic Paraplegias: Current Use and Future Perspectives. *Front Neurol*. 2019; Jan 16;9:1117.
8. Denton KR, Xu C, Shah H, Li XJ. Modeling Axonal Defects in Hereditary Spastic Paraparesia with Human Pluripotent Stem Cells. *Front Biol*. 2016; 11: 339–354.
9. Depienne C, Fedirko E, Forlani S, et al. Exon deletions of SPG4 are a frequent cause of hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet*. 2007 Apr;44(4):281–4.
10. Depienne C, Stevanin G, Brice A, Durr A. Hereditary spastic paraplegias: an update. *Curr Opin Neurol*. 2007 Dec;20(6):674–80.
11. Donis KC, Saute JA, Krum-Santos AC, Furtado GV, Mattos EP, Saraiva-Pereira ML, Torman VL, Jardim LB. Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease starting before adolescence. *Neurogenetics*. 2016 Apr;17(2):107-13.
12. Fink JK. Hereditary Spastic Paraplegia Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong C-T, et al., editors. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
13. Fink JK. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2013 Sep;126(3):307–28.

14. Finsterer J, Löscher W, Quasthoff S, Wanschitz J, Auer-Grumbach M, Stevanin G. Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance. *J Neurol Sci.* 2012 Jul 15;318(1-2):1-18.
15. França M Jr, Dogini D, D'Abreu A, et al. SPG4-related hereditary spastic paraplegia: frequency and mutation spectrum in Brazil. *Clin Genet.* 2013 Sep 5; 72(3):219-26
16. Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet.* 1983 May 21;1(8334):1151-5.
17. Hauser S, Poenisch M, Schelling Y, Höflinger P, Schuster S, Teegler A, Betten R, Gustafsson JÅ, Hübener-Schmid J, Schlake T, Chevessier-Tünnesen F, Horscroft N, Björkhem I, Schöls L. mRNA as a Novel Treatment Strategy for Hereditary Spastic Paraplegia Type 5. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019 Oct 31;15:359-370.
18. Hedera P. Hereditary Spastic Paraplegia Overview. 2000 Aug 15 [updated 2021 Feb 11]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2021.
19. Hedera P. Spastic Paraplegia 3A. 2010 Sep 21 [Updated 2020 Jun 18]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021.
20. Jonas Alex Morales Saute & Laura Bannach Jardim (Professor) (2015) Machado Joseph disease: clinical and genetic aspects, and current treatment, *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 3:5, 517-535,
21. Kamate M, Detroja M. Clinico-Investigative Profile of Hereditary Spastic Paraplegia in Children. *Ann Indian Acad Neurol.* 2019 Jul-Sep;22(3):341-344.
22. Koul R, Al-Murshedi FM, Al-Azri FM, Mani R, Abdelrahim RA, Koul V, Alfutaisi AM. Clinical Spectrum of Hereditary Spastic Paraplegia in Children: A study of 74 cases. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2013 Aug;13(3):371-9.
23. Liberati A, Altman AG, Tetzlaff J, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *PLoS Med.* 2009 Jul 21;6(7)
24. Loureiro, José Leal; Brandão, Eva; Ruano, Luis; Brandão, Ana F.; Lopes, Ana M.; Thieleke-Matos, Carolina; Miller-Fleming, Leonor; Cruz, Vitor T.; Barbosa, Mafalda; Silveira, Isabel; Stevanin, Giovanni; Pinto-Basto, Jorge; Sequeiros, Jorge; Alonso, Isabel; Coutinho, Paula . Autosomal Dominant Spastic Paraplegias. *JAMA Neurology.* 2013 70(4), 481.

25. Marelli C, Lamari F, Rainteau D, Lafourcade A, Banneau G, Humbert L, Monin ML, Petit E, Debs R, Castelnovo G, Ollagnon E, Lavie J, Pilliod J, Couptry I, Babin PJ, Guissart C, Benyounes I, Ullmann U, Lesca G, Thauvin-Robinet C, Labauge P, Odent S, Ewencyk C, Wolf C, Stevanin G, Hajage D, Durr A, Goizet C, Mochel F. Plasma oxysterols: biomarkers for diagnosis and treatment in spastic paraplegia type 5. *Brain*. 2018 Jan 1;141(1):72-84.
26. Murala, S., Nagarajan, E. & Bollu, P.C. Hereditary spastic paraplegia. *Neurol Sci*. 2021 42, 883–894.
27. Murray & Mitsumoto, In: Bradley. *Neurology in Clinical Practice*, Sixth Edition, Elsevier. 2013.
28. Novarino G, Fenstermaker AG, Zaki MS, et al. Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science*. 2014 Jan 31;343(6170):506–11.
29. Ortega RPM, Rosemberg S. Hereditary spastic paraplegia: a clinical and epidemiological study of a Brazilian pediatric population. *Arq Neuropsiquiatr*. 2019 Jan;77(1):10-18.
30. Pascual B, de Bot ST, Daniels MR, et al. "Ears of the Lynx" MRI Sign Is Associated with SPG11 and SPG15 Hereditary Spastic Paraplegia. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2019;40(1):199-203.
31. Parodi L, Fenu S, Barbier M, Banneau G, Duyckaerts C, Tezenas du Montcel S, Monin ML, Ait Said S, Guegan J, Tallaksen CME, Sablonniere B, Brice A, Stevanin G, Depienne C, Durr A; SPATAX network. Spastic paraplegia due to SPAST mutations is modified by the underlying mutation and sex. *Brain*. 2018 Dec 1;141(12):3331-3342.
32. Pearson TS, Pons R, Ghaoui R, Sue CM. Genetic mimics of cerebral palsy. *Mov Disord*. 2019 May;34(5):625-636.
33. Polymeris, Alexandros A.; Tessa, Alessandra; Anagnostopoulou, Katherine; Rubegni, Anna; Galatolo, Daniele; Dinopoulos, Argirios; Gika, Artemis D.; Youroukos, Sotiris; Skouteli, Eleni; Santorelli, Filippo M.; Pons, Roser (2016). A series of Greek children with pure hereditary spastic paraplegia: clinical features and genetic findings. *Journal of Neurology*, 263(8), 1604–1611.
34. Pozner T, Regensburger M, Engelhorn T, Winkler J, Winner B. Janus-faced spatacsin (SPG11): involvement in neurodevelopment and multisystem neurodegeneration. *Brain*. 2020 Aug 1;143(8):2369-2379.
35. Rezende TJ, de Albuquerque M, Lamas GM, et al. Multimodal MRI-based study in

- patients with SPG4 mutations. *PLoS One*. 2015 Feb 6;10(2):e0117666.
36. Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*. 2014;42(3):174-83
 37. Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol*. 2008 Dec;7(12):1127–38.
 38. Servelhere KR, Faber I, Coan AC, França M Junior. Translation and validation into Brazilian Portuguese of the Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS). *Arq Neuropsiquiatr*. 2016 Jun;74(6):489-94.
 39. Schiavoni S, Spagnoli C, Rizzi S, Salerno GG, Frattini D, Pisani F, Fusco C. Paediatric-onset hereditary spastic paraplegias: a retrospective cohort study. *Dev Med Child Neurol*. 2020 Sep;62(9):1068-1074
 40. Schüle R, Wiethoff S, Martus P, Karle KN, Otto S, Klebe S, Klimpe S, Gallenmüller C, Kurzwelly D, Henkel D, Rimmele F, Stolze H, Kohl Z, Kassubek J, Klockgether T, Vielhaber S, Kamm C, Klopstock T, Bauer P, Züchner S, Liepelt-Scarfone I, Schöls L. Hereditary spastic paraplegia: Clinicogenetic lessons from 608 patients. *Ann Neurol*. 2016 Apr;79(4):646-58.
 41. Shribman, Samuel; Reid, Evan; Crosby, Andrew H; Houlden, Henry; Warner, Thomas T. Hereditary spastic paraplegia: from diagnosis to emerging therapeutic approaches. *The Lancet Neurology*. 2019(12) 10.1016/S1474-4422(19)30235-2

7. ARTIGO

Artigo a ser submetido à revista Scientific Reports

Title page

Clinical and molecular characterization of a large cohort of childhood onset hereditary spastic paraplegias

Running Title: Childhood onset HSP in Brazil

Gabriela Marchisio Giordani^{1,2}, Fabrício Diniz³, Helena Fussiger^{1,2}, Carelis del Valle Gonzalez-Salazar³, Karina Carvalho Donis^{2,4}, Fernando Freua⁵, Roberta Paiva Magalhães Ortega⁶, Orlando Graziani Povoas Barsottini⁷, Sergio Rosemberg^{6,8}, Fernando Kok⁵, José Luiz Pedroso⁷, Marcondes Cavalcante França Junior^{3,5}; Jonas Alex Morales Saute^{1,2,4,6,7*}

1. Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
2. Neurogenetics, Clinical Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.
3. Graduate Program in Medical Physiopathology, UNICAMP, Campinas, Brazil
4. Medical Genetics Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.
5. Departamento de Neurologia, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.
6. Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, São Paulo SP, Brasil.
7. Department of Neurology, Ataxia Unit Universidade Federal de São Paulo São Paulo Brazil
8. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo SP, Brazil.
9. Department of Neurology, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil
10. Neurology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.
11. Internal Medicine Department, Faculdade de Medicina, Universidade Federal

do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author:

Jonas Alex Morales Saute

Medical Genetics Division, HCPA

Ramiro Barcelos, 2350, Zip-code 90035-903, Porto Alegre, Brazil

Phone:+55-051-33598011

e-mail: jsaute@hcpa.edu.br

Acknowledgements

We are grateful to patients for participating in this study. The study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant Number: 460941/2014-3) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos-Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) (Grant Number: 14-0695).

Conflict of interest statement:

All authors have no disclosures related to this study.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Abstract

The present study aimed to characterize clinical and molecular data of a large historical cohort of subjects with childhood-onset hereditary spastic paraplegias (HSPs). A multicenter historical cohort was performed at five centers in Brazil, in which probands and affected relatives' data from consecutive families with childhood-onset HSP (onset <12 years-old) were reviewed from 2011 to 2020. One hundred and seven individuals (84 families) with suspicion of childhood-onset HSP, being 72 (52 families) with solved genetic diagnosis and 6 (5 families) with candidate variants in HSP-related genes were evaluated. The most common childhood-onset subtype was SPG4, 11/52 (21.1%) families with solved genetic diagnosis; followed by SPG3A, 8/52 families (15.4%). Missense pathogenic variants in *SPAST* were found in 54.5% of probands, favoring the association of this type of variant to childhood-onset SPG4. Survival curves to major handicap and cross-sectional *Spastic Paraplegia Rating Scale* progressions confirmed the slow neurological deterioration in SPG4 and SPG3A. Most common complicating features and

twenty variants not previously described in HSP-related genes were also reported. These results are fundamental to understand the molecular and clinical epidemiology of childhood-onset HSP, which might help on differential diagnosis, patient care and guiding future collaborative trials for these rare neglected diseases.

Keywords: hereditary spastic paraplegia; childhood; genotype-phenotype; disease progression; SPG4; SPG3A

INTRODUCTION

Hereditary spastic paraplegias (HSP) are a group of heterogeneous genetic disorders characterized by the presence of progressive spastic hypertonia and muscle weakness, predominantly affecting the lower limbs, caused by the degeneration of corticospinal tract longest axons.^{1,2} HSP are clinically classified as pure or complex forms. Individuals with pure HSP present an isolated pyramidal syndrome with or without vibratory sensation impairment or neurogenic bladder, whereas in individuals with complex HSP, the pyramidal syndrome is accompanied by additional neurological or systemic findings.³ HSP are associated to >80 genes or *loci* and to all patterns of inheritance, with ages at onset ranging from early infancy up to the eighth decade of life.^{2,4}

Prevalence estimations of HSP in different geographical regions ranges from 2 to 10 per 100,000 individuals.⁵ However, there is a lack of epidemiological data about HSP in Latin America, with a few studies suggesting SPG4 as the most frequent autosomal dominant and SPG11 as the most frequent autosomal recessive HSP subtype in Brazil.⁶

Little is known about clinical and molecular epidemiology of childhood onset HSPs.^{4,7-11} Early reports in specific populations suggested that SPG3A was the most frequent subtype;⁷ however, more recent studies in larger samples pointed SPG4 as the most common HSP across all age-groups.⁴ Therefore, we aimed to characterize clinical and genetic data of a large historical cohort of HSPs with childhood onset from Brazil, in a collaborative study encompassing five specialized centers.

METHODS

2.1 | Design and subjects

We performed a multicenter historical cohort at five neurogenetic disorders centers in Brazil: one center from Southern and four centers from Southeastern regions. Childhood onset HSP was defined as disease onset before twelve years of age.

Index cases and affected relatives' data were reviewed from consecutive families with clinical suspicion of HSP recruited from 2011 to 2020. Subjects were eligible if there was a suspicion of childhood-onset HSP, according to clinical diagnosis criteria,^{5,9} and the

diagnosis was confirmed by genetic testing. Patients with unsolved genetic diagnosis were also included at two of the five centers, when there was a negative diagnostic workup evaluation that included a next generation sequencing panel with 12 genes related to the most frequent genes related to HSP (for full description see reference 6) or exome sequencing (ES) analysis. Patients with adolescent or adult onset, undefined age at onset or that were diagnosis with an acquired disease or with another neurogenetic disease in which the pyramidal findings were not the main clinical syndrome were excluded from the study. The study was approved by the Ethics in Research Committee of our institution (GPPG-HCPA/14-0695; 62653816.7.0000.5404), which follows the Declaration of Helsinki. Informed written consent was obtained from individuals' or their guardians or data utilization consent was signed for reviewing medical records.

2.2. Neurological and genetic evaluation

We collected data regarding sex, age, parental consanguinity, family recurrence, age at onset (first motor sign), disease duration, disease duration at walking aid (DDWA) and wheelchair (DDWC) dependency. Such information was reviewed from medical records, being confirmed by patients and relatives only when necessary. We also collected information on disease severity with the Brazilian Portuguese version of Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS, range: 0–52, crescent in severity)¹². Most patients had a single SPRS measurement, so calculations of annual progression were performed based on the last SPRS. HSP clinical form and frequency of complicating features defined by the neurological examination and anamnesis were also reviewed in medical records, which included information about intellectual disability, ataxia, extrapyramidal and bulbar symptoms, dysphagia, dysarthria, peripheral neuropathy, lower motor neuron disease and deformities; and magnetic resonance imaging (MRI) findings, when available.

DNA was extracted from peripheral blood. A single center performed a targeted NGS panel including 12 HSP-related genes *ATL1*, *BSCL2*, *CYP27A1*/*CYP7B1*, *KIAA0196*, *KIF5A*, *NIPAI*, *REEP1*, *SPAST*, *SPG7*, *SPG11* and *ZFYVE26* and the remaining centers, performed ES or target Sanger sequencing of *SPAST*. Sequences were searched for using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) protein database. Sequence variations were compared to data available in the Human Gene Mutation Database (HGMD) and ClinVar. Variants were classified according to the 2015 American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)/Association for Molecular Pathology (AMP) criteria¹³ and the updated recommendations for PVS1¹⁴ and PP5¹⁵. PolyPhen-2,¹⁶ SIFT,¹⁷ CADD,¹⁸ M-CAP,¹⁹ REVEL,²⁰ Mutation-Taster²¹ were used for *in silico* analysis.

Phylogenetic conservation was estimated with Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP++)²², and allele frequencies were searched on gnomAD.²³

2.3 | Statistical analysis

Normal distribution was evaluated by Shapiro-Wilk test. Quantitative features were reported as mean and standard deviation (SD) for parametric and median and interquartile range (IQR) for non-parametric data. Median and IQR of DDWA or DDWC were calculated by Kaplan–Meier survival analysis

RESULTS

We included 107 patients (from 84 families) with suspicion of childhood-onset HSP, being 72 (from 52 families) with solved genetic diagnosis and 6 (from 5 families) with candidate variants in HSP-related genes. Pure HSP phenotype was present in 55/102 (53.9%) individuals in the overall cohort, in 40/72 (55.6%) individuals with solved genetic diagnosis and in 24/52 (46.2%) index cases with solved genetic diagnosis. HSP form was not classified for 05 subjects of the cohort.

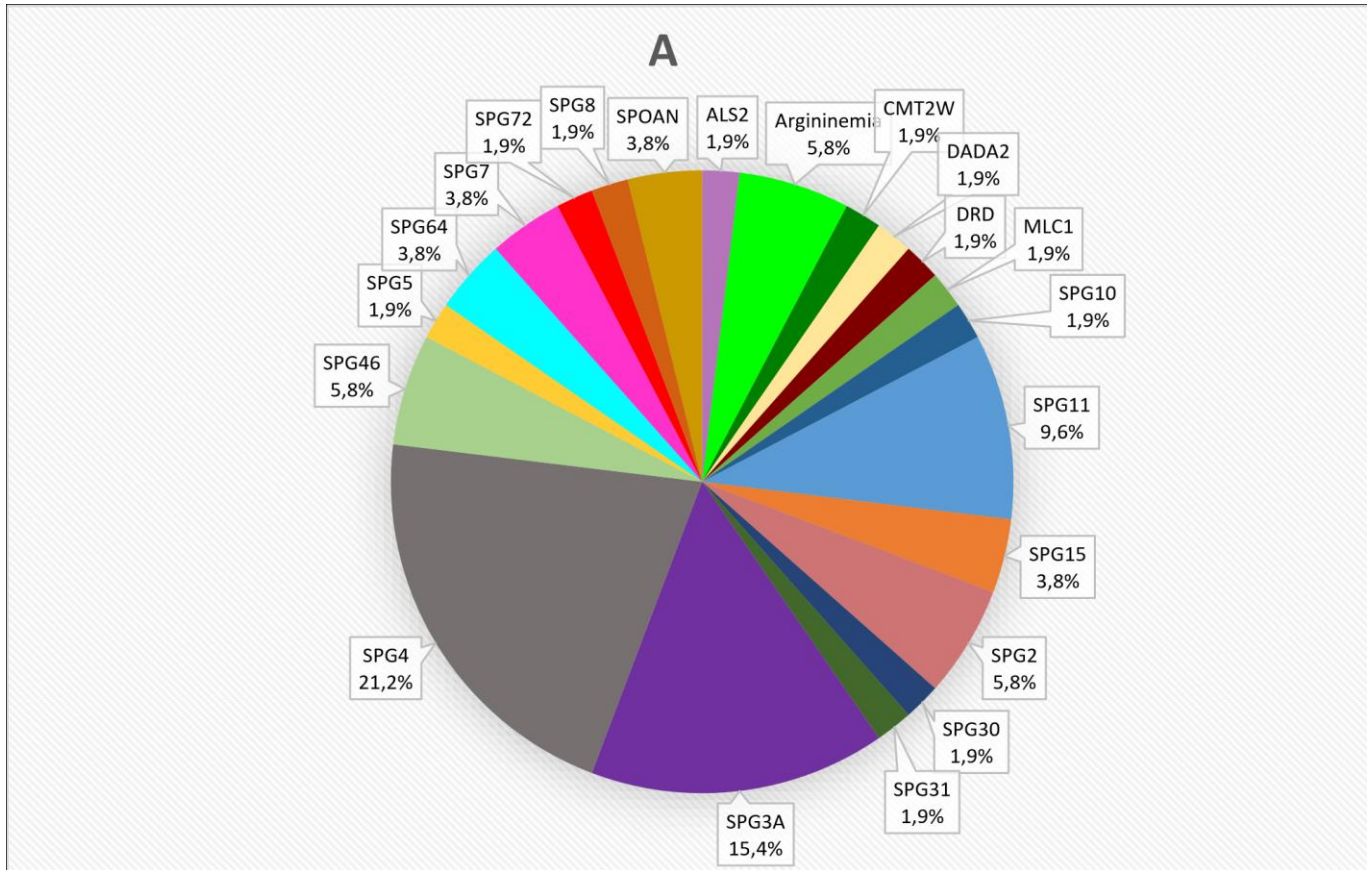
Pure-HSP with solved diagnosis: 19/24 (79,1%) index cases were classified as AD-HSP, 2/24 (8.3%) as AR-HSP and 1/24 (4.2%) was an isolated case; mean (SD) age at onset was 2.98 (3.07) years, disease duration 23.8 (15.4) years, SPRS 17.7 (10.2) points and SPRS cross-sectional disease progression 1.06 (1.12) points/year (available from 13/24 cases); 8/24 (33.3%) individuals with pure HSP required walking aids and 3/24 (12.5%) were wheelchair dependent.

Complex-HSP with solved diagnosis: 19/28 (67.9%) index cases were classified as AR-HSP, 3/28 (10.7%) as AD-HSP, 3/28 (10.7%) as X-linked HSP and 1/24 (3.6%) was an isolated case; mean (SD) age at onset was 4.7 (3) years, disease duration 26 (12.8) years, SPRS 27.8 (13.7) points and SPRS cross-sectional disease progression 1.12 (0.53) points/year (available from 10/19 cases); 16/28 (62.9%) individuals with complex HSP required walking aids and 14/28 (50%) were wheelchair dependent.

Relative frequencies of childhood onset HSP

The most common childhood onset HSP subtype in our cohort was SPG4, comprising 11/52 (21.1%) families with solved genetic diagnosis; followed by SPG3A, 8/52 families (15.4%); SPG11 in 5 families (9.6%) and SPG46 in 3 families with solved diagnosis and two families with bi-allelic candidate variants in *GBA2* (**Figure 1A**). We were also able to report the overall frequency of subtypes in patients with HSP suspicion, including patients with unsolved genetic diagnosis, with data from two centers, one from southern and one from southeastern region of Brazil, which reported in total 62 index cases (80

individuals). In this sample 30/62 (48.4%) of index cases remained with unsolved diagnosis, but in 3/30 we identified strong candidate variants in HSP related genes (**Supp. Table 1**). SPG4 was the most frequent childhood onset HSP subtype, representing 15% of childhood onset HSP and 21% of childhood onset HSP with solved genetics diagnosis, followed by SPG3A as the second most common subtype, see **Figure 1B**.



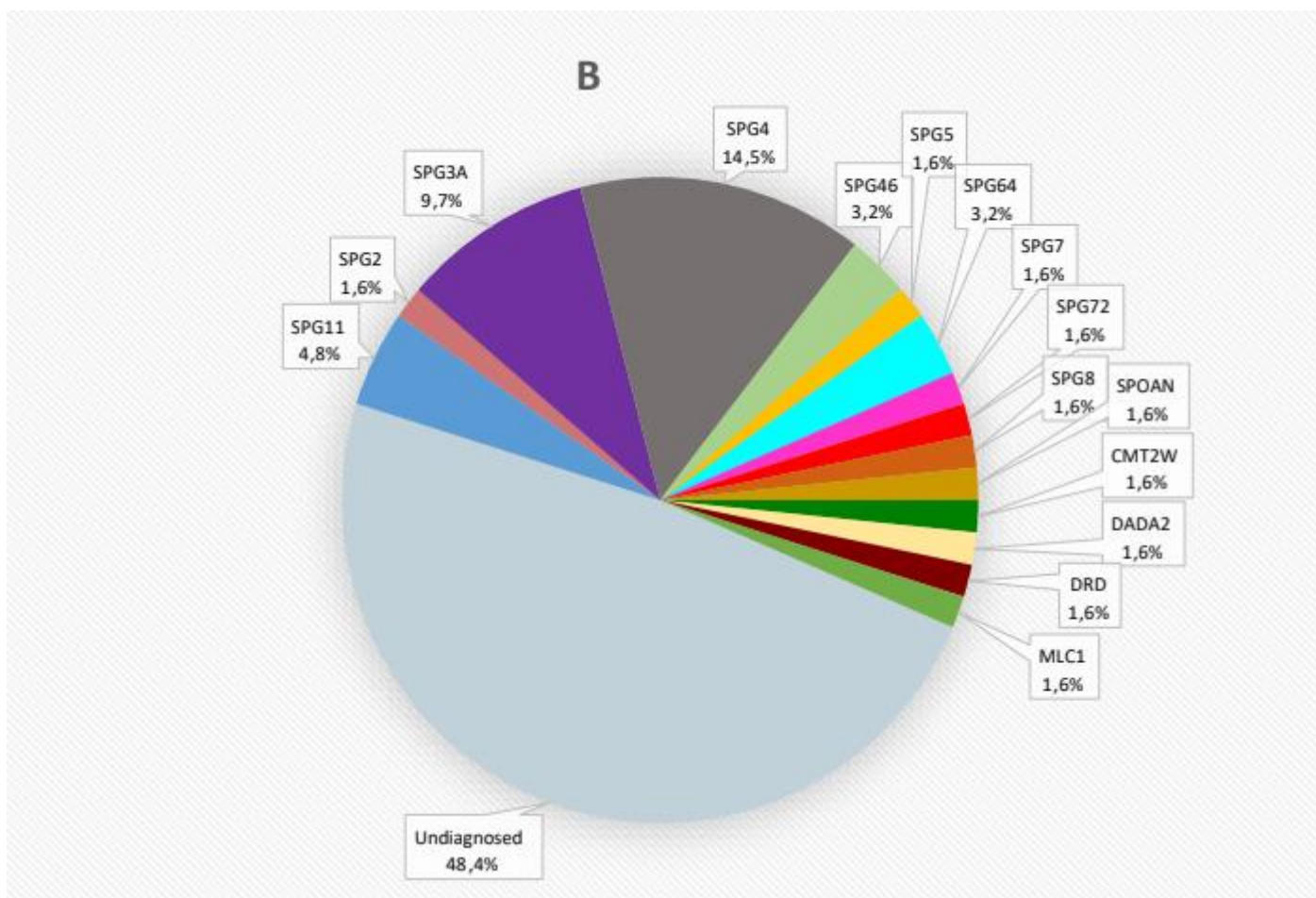


Figure 1: Relative frequencies of childhood-onset HSP in Brazil

Relative frequencies of childhood-onset HSP subtypes in Brazil with solved genetic diagnosis (52 probands, A) and of patients with childhood-onset HSP suspicion, including patients with unsolved genetic diagnosis, with data from two centers (62 probands, B) is presented in percentages. CMT, Charcot-Marie-Tooth disease; DADA2, adenosine deaminase 2 deficiency; DRD, dopa-responsive dystonia; HSP, hereditary spastic paraplegia; MLC1, megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1; SPOAN, spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy.

Most frequent childhood-onset HSPs

Table 1 depict clinical and demographical characteristic of the most frequent HSP subtypes in the present cohort. **Figure 2** depicts the frequencies of complicating features in patients with solved diagnosis.

Table 1 – Clinical characteristics of most frequent childhood-onset HSP subtypes

	SPG4	SPG3A	SPG11	SPG46
Gene	<i>SPAST</i>	<i>ALT1</i>	<i>SPG11</i>	<i>GBA2</i>
Patients (Families)	16 (11)	16 (8)	5 (5)	5 (5)
Male sex (%)	43.8%	50%	80%	40%
Pure form (%)	100%	87.5%	0%	0%
Age (years)	21.1 (13.07)	24.8 (15.2)	27.6 (10.1)	40.4 (10)
Age at Onset (years)	3 (3.09)	2.2 (2.54)	7,2 (1.79)	7.8 (2.3)
Disease Duration (years)	18.2(12.4)	23,4 (15.1)	20,4 (10.4)	32.6 (11.4)
Walking aid (%)	4/16 (25%)	8/16 (50%)	4/5 (80%)	3/4 (75%)
DDWA (years)	NA	36 (4 to NA)	11 (11 to 25)	18 (5 to 20)
Wheelchair bound (%)	1/16 (6.2%)	1/16 (6.2%)	4/5 (80%)	1/4 (25%)
DDWC (years)	NA	NA	23 (5 to 25)	NA
SPRS^a	12 (8.3)	20.3 (10.6)	24.3 (18.5)	NA
SPRS/ disease duration	1.08 (0.87)	1.14 (1.32)	1.37 (0.57)	NA

Data are shown as mean and standard deviation, except for DDWA and DDWC in which data are shown as median and interquartile ranges. **DDWA**, disease duration at walking aid dependency; **DDWC**, disease duration at wheelchair dependency; **HSP**, Hereditary spastic paraplegias; **SPRS**, Spastic Paraplegia Rating Scale. ^aavailable for 11 cases with SPG4, 10 cases with SPG3A and 3 cases with SPG11.

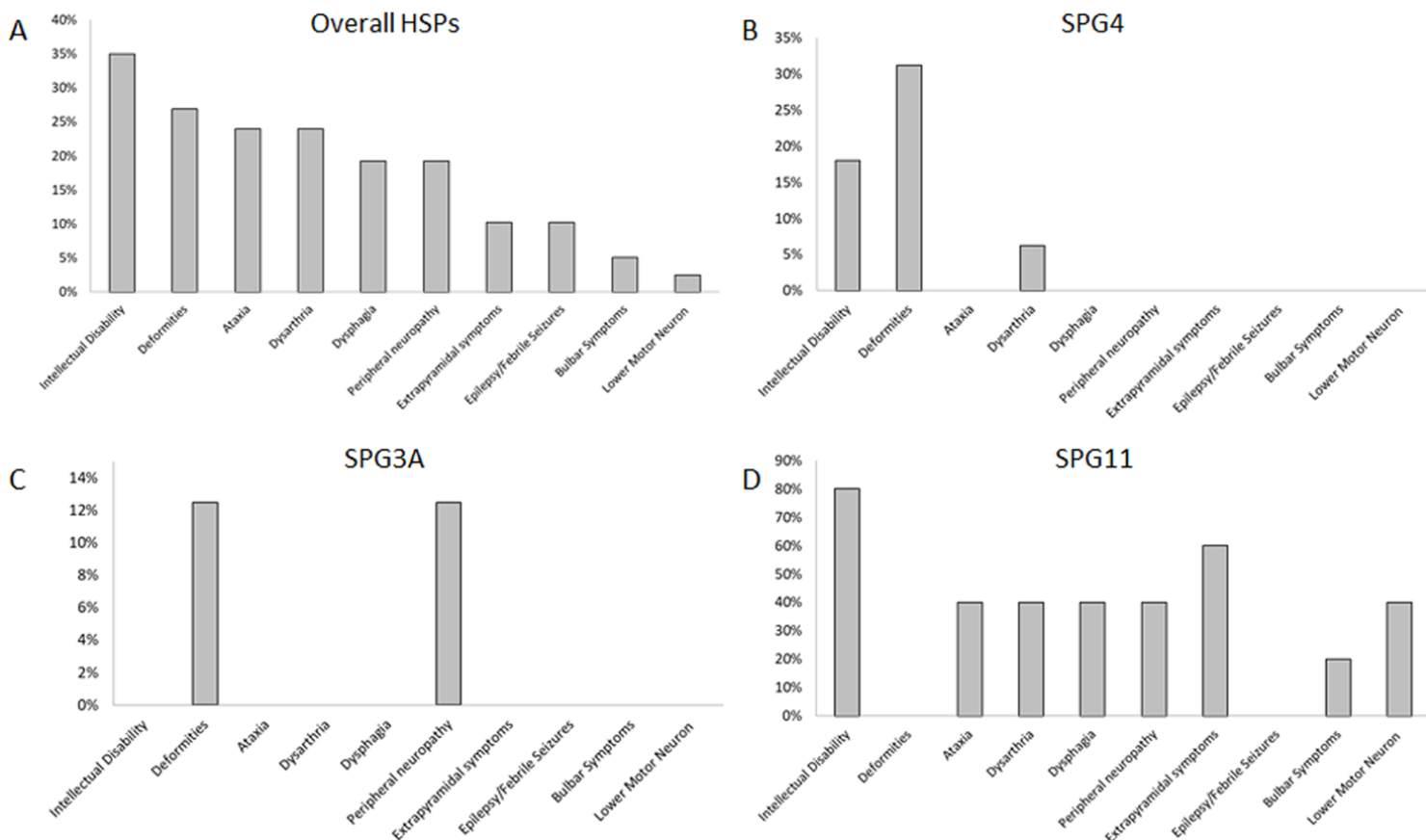


Figure 2: Most frequent complicating features of childhood-onset HSP

Most frequent complicating features, presented in percentages, in the overall childhood-onset HSP subjects (A), in SPG4 (B), in SPG3A (C) and in SPG11 (D). HSP, hereditary spastic paraplegia

SPG 4

The most common childhood onset HSP in our cohort was SPG4, in which eleven families with 16 individuals in total were described. Missense variants were observed in 6/11 (54.5%) families, nonsense variants in 2/11, and frameshift, canonical splice site and intronic variants in 1 family each. **Figure 3** shows the survival curves for walking device assistance in SPG4. Because only 25% of individuals required walking aid the median DDWA was not achieved for SPG4. A single SPG4 subject was wheelchair bound. Cross-sectional SPRS disease progression (available for 11/16 patients) was 1.08 (0.87) points per year of disease. Three SPG4 patients from a single family presented mild intellectual disability, one of them with mild dysarthria. Five patients presented foot deformities (3 families, **Figure 2B**). Brain MRI was available for 7 cases, one presenting a small pineal cyst and the others normal scans.

Walking aid dependency

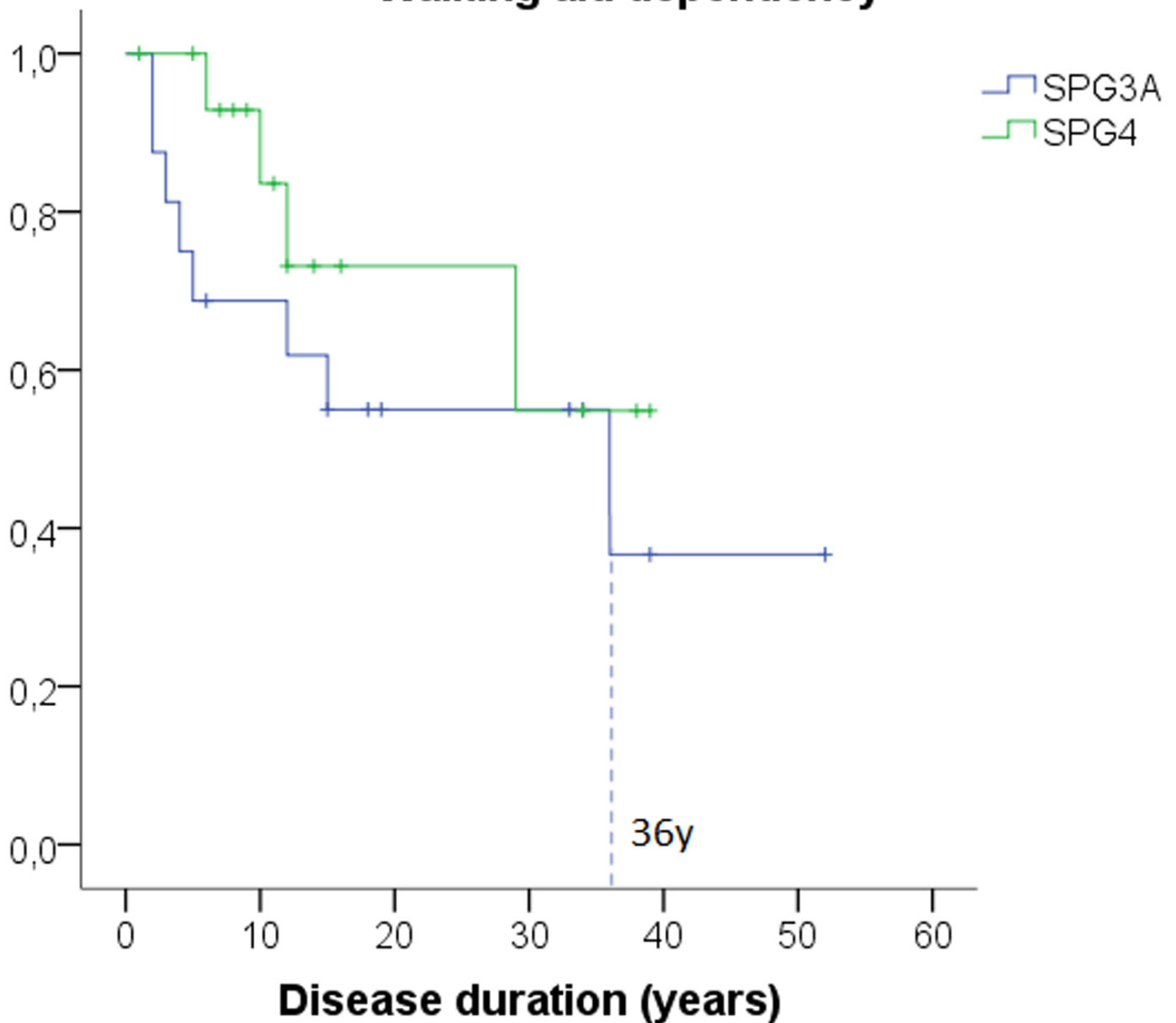


Figure 3: Progression to major handicap in SPG4 and SPG3A.

The figure shows Kaplan–Meier analysis of loss of independent walking to disease duration for individuals with SPG4 and SPG3A. Median values of any walking aid assistance for SPG3A is informed and highlighted by dashed lines.

SPG3A

The second most common childhood onset HSP in our cohort was SPG3A, in which eight families with 16 individuals in total were described. Missense variants were observed in all families. One SPG3A subject presented complex HSP. **Figure 3** shows the survival curves for walking device assistance, with a median DDWA of 36 years. A single SPG3A subject was wheelchair bound. Cross-sectional SPRS disease progression

(available for 10/16 patients) was 1.14 (1.832) points per year of disease. Frequencies of complicating features are presented in **Figure 2C**. Brain MRI was available for 4 cases, none with abnormal scans.

SPG11

Five patients (5 families) with SPG11 were reported, all of them with complex HSP. All patients presented loss of function pathogenic variants, 2 with canonical splice site, 2 with frameshift and 1 with nonsense variants. Only a single SPG11 patient did not require walking aid assistance. Median DDWA was 11 years and median DDWC was 23 years; however, there was one missing data for age at wheelchair dependency, in which we have imputed the same values of DDWA (conservative bias) in order to avoid that DDWC would be lower than DDWA. Cross-sectional SPRS disease progression was 1.37 (0.57) points per year of disease (available for 3/5 patients). Frequencies of complicating features are presented in **Figure 2D**. Brain MRI of the five SPG11 patients presented thin corpus callosum and the ears of lynx sign and one individual presented unspecified leukoencephalopathy.

SPG46

Five patients from 3 families with solved and 2 families with bi-allelic candidate variants in *GBA2* were reported, all of them with complex HSP. Walking aid assistance was required for 75% of individuals and 25% were wheelchair bound. Median DDWA was 18 years and median DDWC was not achieved. Cross-sectional SPRS disease progression was available for a single patient, being 0.66 points per year of disease. Brain MRI was available for 3 cases, none with abnormal scans.

Novel variants

We have described 20 variants not previously described in HSP-related genes (**Table 2**). All variants found in the present study are described in **Supplemental Table 1**.

Table 2 – Novel variants in muscular HSP-related genes

Gene (Transcript)	Nucleotide/AA change	Variant type	AF ¹	SIFT	Poly Phen2	MT	MCAP	CADD	REVEL	GERP++ ²	Segregation	Fam	N ³	CLINVAR	Classification	ACMG criteria ⁴
ALS2 NM_020919.4	c.328delA p.(Asn109Metfs*17)	Frameshift	0	NA	NA	1.000	NA	NA	NA	2.85	NA	1	1	No	Likely pathogenic	PVS1, PM2
ATL1 NM_015915.4	c.574C>G p.(Leu192Val)	Missense	0	0	0.459	0.999	0.156	25.3	0.678	4.93	Yes	1	2	No	Likely pathogenic	PM1, PM2, PM5, PP1, PP2, PP3
ATL1 NM_015915.4	c.829G>C p.(Ala277Pro)	Missense	0	0	0.955	0.999	0.134	23.8	0.719	4.74	NA	1	1	No	Likely pathogenic	PM1, PM2, PP2, PP3
ATL1 NM_015915.4	c.1239T>G p.(Phe413Leu)	Missense	0	0.09	0.117	0.999	0.08	19.96	0.674	-0.334	Yes	1	3	No	Likely pathogenic	PM1, PM2, PM5, PP1, PP2, PP3
CYP7B1 NM_004820.5	c.650T>A p.(Leu217*)	Nonsense	0	NA	NA	0.999	NA	33	NA	1.82	NA	1	1	No	Likely pathogenic	PVS1, PM2
CYP7B1 NM_004820.5	c.887A>C p.(Asn296Thr)	Missense	0	0	1	0.999	0.018	26.1	0.538	5.93	NA	1	1	No	Likely pathogenic	PM1, PM2, PP2, PP3
ENTPD1 NM_001164178.1	c.610-8_610-5delTCCTT	Intronic	0	NA	NA	1.000	NA	NA	NA	3.97 (2.45)	Yes	1	2	No ⁶	VUS	PM2, PP1, PP3
ENTPD1 NM_001164178.1	c.808_807delGG p.(Gly269Gluufs*18)	Frameshift	0	NA	NA	1.000	NA	NA	NA	5.1 (0.63)	NA	2	3 ⁷	No ⁶	Likely pathogenic	PVS1, PM2
GBA2 NM_020944.3	c.1365G>C p.(Trp455Cys)	Missense	0.00000398	0	1	0.999	0.156	32	0.715	5.6	NA	4	4	No	Likely pathogenic	PS4, PM2, PP3, BP1
GBA2 NM_020944.3	c.1789G>T p.(Asp597Tyr)	Missense	0	0.01	0.997	0.999	0.014	32	0.737	5.69	NA	2	2	No	VUS	PM2, PM3, PP3, BP1
GBA2 NM_020944.3	c.1943_1944delGCT p.(Cys648Serfs*7)	Frameshift	0	NA	NA	1.000	NA	NA	NA	4.31 (1.22)	NA	1	1	No	Likely pathogenic	PVS1, PM2
KIF1A NM_001244008.2	c.153C>G p.(Ser51Arg)	Missense	0	0.02	0.572	0.999	0.096	25.6	0.477	2.64	NA	1	1	No	Likely pathogenic	PM1, PM2, PP2, PP3
KIF5A NM_004984.4	c.1022A>G p.(Gln341Arg)	Missense	0	0	0.413	0.999	0.116	23.6	0.554	4.38	NA	1	1	No	Likely pathogenic	PM1, PM2, PP2, PP3
PLP1 NM_000533.5	c.617T>C p.(Met206Thr)	Missense	0	0.01	0.446	0.990	0.941	24.3	0.804	5.58	NA	1	1	No	Likely pathogenic	PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP4
REEP1 NM_022912.3	c.55C>A p.(Pro19Thr)	Missense	0	0.04	0.247	0.999	0.129	24.6	0.552	4.35	NA	1	1	No	Likely pathogenic	PM1, PM2, PM5, PP2, PP3
REEP2 NM_001271803.2	c.741dupC/x1 p.(Ser248Leufs*39)	Frameshift	0	NA	NA	0.999 ⁵	NA	NA	NA	-1.44 (0.46)	Yes	1	4	No	Pathogenic	PVS1, PM2, PP1
SPAST NM_014946.4	c.1255G>T p.(Gly419*)	Nonsense	0	NA	NA	1.000	NA	42	NA	5.62	NA	1	1	No	Likely pathogenic	PVS1, PM2
SPG7 NM_003119.4	c.1997G>T p.(Gly666Val)	Missense	0	0	1	0.999	0.833	28.6	0.976	5.21	NA	1	1	No ⁶	Likely pathogenic	PM2, PM5, PP2, PP3
SPG11 NM_025137.4	c.5490delT p.(Glu1831Asnfs*7)	Frameshift	0	NA	NA	1.000	NA	NA	NA	-1.05	NA	1	1	No	Likely pathogenic	PVS1, PM2
ZFYVE26 NM_015346.4	c.3642_3643insCCACACTTAG p.(Ala1215PProfs*22)	Frameshift	0.00000401	NA	NA	1.000	NA	NA	NA	3.79 (0.03)	NA	1	1	No	Likely pathogenic	PVS1, PM2

Allele frequencies on ¹gnomAD; ²GERP++ data is shown as mean (standard deviation) or raw value; ³total number of individuals in which the variant was detected; ⁴American College of Medical Genetics and Genomics criteria, Richards et al, 2015; ⁵polymorphism prediction; ⁶ClinVar descriptions are related to the reported cases; ⁷Two patients with genetic diagnosis and one deceased sibling with clinical diagnosis. AA, amino acid; AF, allele frequency; Fam, families; MT, Mutation Taster; NA, not available; VUS, variant of unknown significance.

DISCUSSION

In the present study, we have comprehensively described clinical and molecular data of a large Brazilian cohort of patients with childhood-onset HSP. Our study indicates that SPG4, closely followed by SPG3A, is the most frequent childhood-onset subtype in Brazil. We have described 20 novel variants in HSP-related genes and provided the progression to major handicap of the most frequent subtypes in our cohort.

A slightly predominance of complex forms (53.8%) was found among probands with childhood-onset HSP, which is a similar finding to a recent cohort of 47 childhood-onset HSP individuals from Italy, in which the prevalence rate of complex forms was 55%.⁸ A greater frequency of complex forms in childhood-onset HSP was previously reported in smaller sample studies that evaluated individuals from populations with high consanguinity rates,^{24,25} and also in another study carried out in Brazil that showed a prevalence rate of complex forms of 65.8% among 20 individuals with childhood-onset HSP suspicion, but without molecular diagnosis confirmation.²⁶

SPG4 was the most frequent childhood-onset HSP in our study, representing 21% of probands with solved genetic diagnosis, followed by SPG3A, representing 15% of probands. There has been controversy about the most frequent HSP subtype with childhood-onset. While some reports indicated SPG3A as the most frequent subtype, with

frequencies varying between 36 and 75% of patients^{7,8,9}; others reported SPG4 as the most common childhood-onset subtype^{4,9,10}, and the most common subtype across all age groups.⁴ Worldwide data suggest that both SPG4 and SPG3A are the most common childhood-onset HSPs and the predominance of one subtype over another in the different countries might be explained by different population genetic background and sampling biases.

One of the core explanations for families with childhood-onset SPG4 is genotype-phenotype correlation, implicating missense variants to early onset.^{27,28} A very large sample study that evaluated 842 SPG4 individuals most from France reported that missense variants were related to 10 years earlier ages at onset when compared to truncating variants in *SPAST*, and that most subjects with pathogenic missense variants *in SPAST* had disease onsets before the second decade of life (Parodi et al, 2018).²⁹ We found that 54.5% of probands with childhood-onset SPG4 carried missense pathogenic variants in *SPAST*. The proportion of missense causative variants in childhood-onset SPG4 that we have found is greater than the proportion found in the above-mentioned French study, which reported missense variants among 87/266 (33%) of the overall SPG4 probands. It was also a greater proportion than what was reported in recent Portuguese and Russian studies, which reported missense variants being responsible for 11/27 (40%) and 10/31 (32.2%) of SPG4 probands regardless of the age at onset, respectively.^{28,30} Our results favor the concept that missense variants are associated to earlier ages at onset of SPG4, since our sample was exclusively of childhood-onset HSP subjects. Future studies covering the entire HSP population across all age groups in Brazil will be able to perform further analysis on this genotype-phenotype correlation.

Although missense variants are related to earlier ages at onset in SPG4, 45.5% of childhood-onset SPG4 in our study were not related to this type of variant, indicating that additional factors should also explain earlier onset in this disease. The study by Parodi and collaborators²⁹ showed that the intragenic polymorphism in *SPAST* p.(Ser44Leu) was associated with earlier ages at onset, starting on average 11 years earlier than subjects that did not carry the polymorphism. However, as the *SPAST* p.(Ser44Leu) polymorphism was present in only 11/558 cases in that study, it does explain only a little proportion of families with childhood-onset SPG4. On the other hand, the effect of this polymorphism in the age of onset of a small subpopulation of SPG4 individuals, indicates that other polymorphisms, intragenic or not, might be capable of modulating the disease onset. Among the 3/11 SPG4 probands with childhood onset of the present study in which this

information was available, none carried the *SPAST* p.(Ser44Leu) polymorphism.

Missense variants around the GTPase binding domain were previously associated to earlier ages at onset in SPG3A, while frameshift variants in the C-terminus of atlastin-1 were associated to later disease onset.³¹ All childhood-onset subjects with SPG3A in our study carried missense variants, supporting this concept. However, considering that SPG3A is caused mainly by missense variants^{28,30} and that it usually starts during childhood it is harder to establish this genotype-phenotype correlation. A toxic gain of function related to atlastin-1 modification by missense variants would be a plausible explanation for this disease being rarely caused by truncated variants; however, data from Genome Aggregation Database (gnomAD) indicate that this gene does not tolerate loss-of function with a pLI score of 0.98,²³ arguing against a toxic gain of function as the major molecular mechanism of this disease. Future studies covering the entire HSP population across all age groups in Brazil and might be able to perform further analysis on this genotype-phenotype correlation for SPG3A.

Pure-HSP: Twenty-five percent of subjects with SPG4 (after mean disease duration of 18 years) and fifty percent of subjects with SPG3A (after a mean disease duration of 23.4 years) required some kind of walking aid assistance. Median disease duration at walking aid assistance (DDWA) was just possible to calculate for SPG3A and it occurred 36 years after disease onset (**Figure 3**). Since one subject with SPG4 and one with SPG3A required wheelchair, it was not possible to calculate DDWC for these subtypes. Cross-sectional SPRS progressions were presented for SPG4 and SPG3A with data from 11 and 10 individuals per subtype, respectively. The progression of 1.08 and 1.14 points per year for SPG4 and SPG3A, respectively, is compatible with a very slow disease progression, although longitudinal data from future studies are needed to better establish SPRS progressions in these diseases.

Complex-HSP: SPG11 and SPG46 were the most common subtypes of complex HSPs with childhood in the present study. Similar to previous studies, although presenting later disease onset than pure forms, complex HSPs presented faster disease progressions with greater handicap, requiring canes or wheelchair assistance earlier than SPG3A and SPG4, with 80% of SPG11 and 25% of SPG46 cases being wheelchair bound. Although we have presented cross-sectional SPRS progressions for SPG11 in **Table 1**, this information was based in data from only three subjects and cross-sectional SPRS progressions in SPG46 was available for a single case, suggesting that this information should be interpreted with caution and that further larger sample studies will need to address SPRS progression for

these subtypes.

The most common complicating features of childhood-onset HSP in our series was cognitive impairment/intellectual disability, which was present in 35% of subjects; followed by joint deformities (mostly feet deformities), present in 27% of cases; ataxia and dysarthria, present in 24% of cases; and by peripheral neuropathy and dysphagia, present in 19.2% of cases. Similar to our findings, some studies have reported cognitive impairment/intellectual disability as the most common complicating feature of childhood-onset HSP, varying from 23%²⁴ to 87%²⁶. Of note, most of complicating features were reported among subjects with complex HSP. For instance, 80% of SPG11 individuals presented intellectual disability and 60% signs of extrapyramidal involvement. Additionally, all patients suffering from SPG64, SPG2 and arginase deficiency presented cognitive impairment/intellectual disability. On the other hand, in subjects with HSP subtypes usually classified as pure forms, like SPG4, the most frequent complicating features, joint deformities, more likely represent a consequence of the pyramidal syndrome than a true complicating feature. Interestingly, three SPG4 patients from a single family presented mild intellectual disability, which in the initial evaluation was not considered clinically relevant enough by the evaluating neurologist to classify the phenotype as a complex form. However, on formal cognitive evaluations of these subjects, previously reported,³² the three individuals presented mild, but abnormal cognitive performances. Similar findings were reported for SPG3A in which foot deformities were the most frequent complicating features, together with peripheral neuropathy, which was reported in 2 subjects. One of these SPG3A subjects presented focal neuropathic pain in one foot, that could be related to foot deformities and nerve entrapment, and the other was reported as presenting signs of peripheral neuropathy, although nerve conduction studies were not available. Therefore, the finding of peripheral neuropathy as a complicating feature of SPG3A in 12.5% of cases in our study should be interpreted with caution, although axonal motor neuropathy was previously reported several times in individuals with SPG3A.³¹

Qualitative findings on brain MRI have been evaluated in the present study with available data for 58 subjects, 43 of them with solved genetic diagnosis, in which 16/43 (37.2%) presented abnormal findings. The most frequent MRI abnormality was thin *corpus callosum* (TCC), which was present in 10/43 subjects (5 with SPG11, 2 with SPG15, 1 each with argininemia, SPG30 and SPG64). In 8/10 of subjects with TCC it was also described the “ears of the lynx” sign, which was not reported only in the subject with

argininemia and SPG64. Other relevant MRI features were brain atrophy and leukoencephalopathy, findings that were detailed in **Supplemental Table 1**. MRI findings of the present study are similar to the literature.³³

Study limitations

Our study represents one of the largest reported cohorts with comprehensive clinical and molecular data on childhood-onset HSP reported so far. However, it has several limitations. Genetic investigation protocols and genetic testing availability was not homogenous across centers and therefore we were only able to include consecutive cases with confirmed genetic diagnosis in 3/5 centers, limiting the information regarding the proportion of unsolved cases after performing targeted panel of genes or ES. Nevertheless, the classification of genetic variants was standardized across centers and all variants were reviewed and classified by the same medical geneticists (JAMS) with posterior validation of the study group. We have calculated cross-sectional SPRS disease progressions for SPG4, SPG3A and SPG11; which are valuable information considering the lack of clinical course and natural history data on validated instruments for HSP; however, future longitudinal studies are required to establish progression rates in HSP in a more reliable way and with lower chance of recall bias related to information regarding age at onset and disease duration. We had significant missing data for some variables, for instance, we only have brain MRI information for 58/107 subjects. Because all cases were recruited at specialized neurogenetics centers in teaching hospital, relative frequencies of HSP in Brazil based on population-based studies might be different than ours.

CONCLUSION

In conclusion, in this large-scale historical cohort study, we were able to define SPG4 as the most frequent childhood-onset subtype of HSP in Brazil, closely followed by SPG3A and to reinforce the finding relating missense variants in *SPAST* to earlier onsets of SPG4. Probands presenting with complex forms were slightly more common than probands with pure forms in the childhood population. Cognitive impairment/intellectual disability was the most common complicating feature, followed by joint deformities, ataxia, dysarthria, peripheral neuropathy and dysphagia, which, with the exception of joint deformities, mostly presented in complex forms. Our data confirmed the slow progression to handicap for SPG4 and SPG3A, which was in accordance with the slow cross-sectional SPRS progression for these subtypes. These results are paramount to understand the epidemiology of early-onset HSP in Brazil, as well as to understand better these disease progressions.

REFERENCES

1. Hensiek A, Kirker S, Reid E. Diagnosis, investigation and management of hereditary spastic paraplegias in the era of next-generation sequencing. *J Neurol*. 2015 Jul;262(7):1601-12.
2. Tesson C, Koht J, Stevanin G. Delving into the complexity of hereditary spastic paraplegias: how unexpected phenotypes and inheritance modes are revolutionizing their nosology. *Hum Genet*. 2015 Jun;134(6):511-38.
3. Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet*. 1983 May 21;1(8334):1151-5.
4. Schüle R, Wiethoff S, Martus P, Karle KN, Otto S, Klebe S, Klimpe S, Gallenmüller C, Kurzwelly D, Henkel D, Rimmel F, Stolze H, Kohl Z, Kassubek J, Klockgether T, Vielhaber S, Kamm C, Klopstock T, Bauer P, Züchner S, Liepelt-Scarfone I, Schöls L. Hereditary spastic paraplegia: Clinicogenetic lessons from 608 patients. *Ann Neurol*. 2016 Apr;79(4):646-58.
5. Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*. 2014;42(3):174-83.
6. Burguez D, Polese-Bonatto M, Scudeiro LAJ, Björkhem I, Schöls L, et al. Clinical and molecular characterization of hereditary spastic paraplegias: A next-generation sequencing panel approach. *J Neurol Sci*. 2017; 15: 8-25.
7. Namekawa M, Ribai P, Nelson I, Forlani S, Fellmann F, Goizet C, Depienne C, Stevanin G, Ruberg M, Dürr A, Brice A. SPG3A is the most frequent cause of hereditary spastic paraplegia with onset before age 10 years. *Neurology*. 2006 Jan 10;66(1):112-4.
8. Schiavoni S, Spagnoli C, Rizzi S, Salerno GG, Frattini D, Pisani F, Fusco C. Paediatric-onset hereditary spastic paraplegias: a retrospective cohort study. *Dev Med Child Neurol*. 2020 Sep;62(9):1068-1074
9. Battini R, Fogli A, Borghetti D, Michelucci A, Perazza S, Baldinotti F, Conidi ME, Ferreri MI, Simi P, Cioni G. Clinical and genetic findings in a series of Italian children with pure hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol*. 2011 Jan;18(1):150-7.
10. Polymeris, Alexandros A.; Tessa, Alessandra; Anagnostopoulou, Katherine; Rubegni, Anna; Galatolo, Daniele; Dinopoulos, Argirios; Gika, Artemis D.; Youroukos, Sotiris; Skouteli, Eleni; Santorelli, Filippo M.; Pons, Roser (2016). *A series of Greek children with pure hereditary spastic paraplegia: clinical features and genetic findings. Journal of Neurology*, 263(8), 1604–1611.

11. de Bot ST, van de Warrenburg BP, Kremer HP, Willemsen MA. Child neurology: hereditary spastic paraplegia in children. *Neurology*. 2010 Nov 9;75(19):e75-9.
12. Servelhere KR, Faber I, Coan AC, França M Junior. Translation and validation into Brazilian Portuguese of the Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS). *Arq Neuropsiquiatr*. 2016 Jun;74(6):489-94.
13. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. 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;17: 405-424.
14. Abou Tayoun AN, Pesaran T, DiStefano MT, Oza A, Rehm HL, Biesecker LG, Harrison SM; ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group (ClinGen SVI). Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion. *Hum Mutat*. 2018;39:1517-1524.
15. Biesecker LG, Harrison SM; ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group. The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants. *Genet Med*. 2018;20:1687-1688.
16. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7: 248-249.
17. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res*. 2001;11:863-874.
18. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:D886-D894.
19. Jagadeesh KA, Wenger AM, Berger MJ, et al. M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nat Genet* 2016;48:1581–1586.
20. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, et al. “REVEL: An ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants.” *American Journal of Human Genetics* 2016; 99(4):877-885.
21. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014; 11:361-362.
22. Cooper GM, Stone EA, Asimenos G, et al. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res*. 2005;15: 901-913.
23. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, et al. Genome Aggregation Database

Consortium, Neale BM, Daly MJ, MacArthur DG. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020;581:434-443.

24. Koul R, Al-Murshedi FM, Al-Azri FM, Mani R, Abdelrahim RA, Koul V, Alfutaisi AM. Clinical Spectrum of Hereditary Spastic Paraplegia in Children: A study of 74 cases. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2013 Aug;13(3):371-9.

25. Kamate M, Detroja M. Clinico-Investigative Profile of Hereditary Spastic Paraplegia in Children. *Ann Indian Acad Neurol*. 2019 Jul-Sep;22(3):341-344.

26. Ortega RPM, Rosemberg S. Hereditary spastic paraplegia: a clinical and epidemiological study of a Brazilian pediatric population. *Arq Neuropsiquiatr*. 2019 Jan;77(1):10-18.

27. Shoukier M, Neesen J, Sauter SM, Argyriou L, Doerwald N, Pantakani DV, Mannan AU. Expansion of mutation spectrum, determination of mutation cluster regions and predictive structural classification of *SPAST* mutations in hereditary spastic paraplegia. *Eur J Hum Genet*. 2009 Feb;17(2):187-94.

28. Rodrigues R, Silva R, Branco M, Brandão E, Alonso I, Ruano L, Loureiro JL. Determinants of age at onset in a Portuguese cohort of autosomal dominant spastic paraplegia. *J Neurol Sci*. 2020 Mar 15;410:116646.

29. Parodi L, Fenu S, Barbier M, Banneau G, Duyckaerts C, Tezenas du Montcel S, Monin ML, Ait Said S, Guegan J, Tallaksen CME, Sablonniere B, Brice A, Stevanin G, Depienne C, Durr A; SPATAX network. Spastic paraplegia due to *SPAST* mutations is modified by the underlying mutation and sex. *Brain*. 2018 Dec 1;141(12):3331-3342.

30. Kadnikova VA, Rudenskaya GE, Stepanova AA, Sermyagina IG, Ryzhkova OP. Mutational Spectrum of Spast (Spg4) and *ATL1* (Spg3a) Genes In Russian Patients With Hereditary Spastic Paraplegia. *Sci Rep*. 2019 Oct 8;9(1):14412.

31. Hedera P. Spastic Paraplegia 3A. 2010 Sep 21 [Updated 2020 Jun 18]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021.

32. Jacinto-Scudeiro LA, Dariva Machado G, Ayres A, Burguêz D, Polese-Bonato M, González-Salazar C, Siebert M, Cavalcante França M Jr, Olchik MR, Morales Saute JA. Are Cognitive Changes in Hereditary Spastic Paraplegias Restricted to Complicated Forms? *Front Neurol*. 2019 May 24;10:508.

33. da Graça FF, de Rezende TJR, Vasconcellos LFR, Pedroso JL, Barsottini OGP, França MC Jr. Neuroimaging in Hereditary Spastic Paraplegias: Current Use and Future Perspectives. *Front Neurol*. 2019 Jan 16;9:1117.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação possuiu como objetivo principal realizar a caracterização do perfil clínico e genético dos pacientes com PEH com início infantil. Consideramos que este objetivo tenha sido atingido, uma vez que descrevemos a maior casuística de pacientes com PEH com início na faixa etária pediátrica, grande parte deles com diagnóstico genético confirmado. Pode-se concluir que o diagnóstico mais prevalente para os pacientes com início antes dos 12 anos é a SPG4, seguida de perto pela SPG3A. Este dado corrobora estudos mais recentes que afirmam que a SPG4 é o subtipo mais comum na infância, reforçando que tanto a SPG4 quanto a SPG3A sejam as formas de mais relevância na população pediátrica. As formas complicadas de PEH apresentaram uma frequência ligeiramente maior do que as puras, indo ao encontro do que já era descrito na literatura. A idade de início dos sintomas foi em média menor nos pacientes com formas puras, entretanto a evolução clínica dos pacientes medida pela duração de doença até a necessidade de uso de dispositivos auxiliares ou cadeiras de roda e pela progressão transversal da escala SPRS a gravidade e velocidade de progressão foram maiores nas formas de PEH complicadas.

Em relação aos objetivos secundários desta dissertação os seguintes dados foram observados:

- A complicação mais comum na nossa população foi o déficit cognitivo/deficiência intelectual, indo ao encontro dos dados na literatura sobre os pacientes desta faixa etária, mas diferindo do que é descrito para grandes coortes de pacientes com PEH de todas as idades. Foi também notado que deformidades, ataxia e disartria eram sintomas comuns nas formas de início pediátrico

- A presença de sinais e sintomas complicadores nos subtipos mais comuns, usualmente formas puras, SPG4 e SPG3A, foram raros ou mais comumente associados à própria síndrome piramidal de longa data como no caso das deformidades articulares. A exceção foi a descrição de uma família com 4 sujeitos com SPG4 em que foi identificado déficit intelectual leve e disartria e a presença de neuropatia periférica em dois casos com SPG3A. Já na forma complicada mais

comum, a SPG11, 80% apresentaram déficit cognitivo, 60% sintomas extrapiramidais e outras alterações também foram observadas.

- Foi notado uma frequência maior de variantes patogênicas do tipo *missense* nos pacientes com SPG4 e SPG3A com início na infância precoce comparado com o que é descrito na literatura, podendo ser uma das explicações para a idade de início precoce dos pacientes de nossa coorte, sendo compatível com o que já foi demonstrado na literatura.

- Destacamos também a descrição de 20 variantes que não haviam sido previamente descritas em genes relacionados às PEH, sendo 17 destas classificadas como provavelmente patogênicas, 2 como variantes de significado incerto e 1 como patogênica.

- Foi elaborado um artigo científico que está em processo de submissão na revista Scientific Reports.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tem-se como perspectivas futuras ampliar ainda mais nossa casuística maior, com a inclusão de dois novos centros e com isso chegar a conclusões ainda mais robustas. Além disso, há planos de realizar estudos comparando as características dos pacientes com início na infância com os de início da adolescência e vida adulta.

Outro ponto que parece ser promissor para futuros estudos é a comparação entre as características clínicas e evolução dos pacientes com formas puras de PEH com a de pacientes com paralisia cerebral dipléica, tendo em vista que as PEH são um diagnóstico diferencial importante para essas formas de paralisia cerebral, que no futuro poderão ter terapias específicas e que tem implicações para aconselhamento genético, sendo relevante termos subsídios adicionais para diferenciar os dois grupos. Nesta mesma linha, temos planos de realizar testagem genética para PEH na população diagnosticada com paralisia cerebral que não apresenta clara história de intercorrência perinatal ou alteração de neuroimagem específica para determinarmos a necessidade e o rendimento de investigações adicionais nesta população.

Este trabalho inaugurou uma série de estudos clínicos a serem desenvolvidos na temática das paraparesias espásticas hereditárias entre os pacientes com início na infância atendidos no Ambulatório de Neurogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Diversos estudos que estamos realizando nas formas de início adulto poderão ser futuramente avaliados na população pediátrica, incluindo estudos de história natural, biomecânica, biomarcadores neurofisiológicos e de neuroimagem.

10. ANEXOS E/OU APÊNDICES

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (p.38) (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found (p.39)
Introduction		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported (p40-41)
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses (p40)
Methods		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper (p40)
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection (p40-41)
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up (p40-41) <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants (b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable (pg-41)
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group (pg-41)
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias (pg-52)
Study size	10	Explain how the study size was arrived at (pg-41)
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (pg-41)

Statistical methods		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions
		(c) Explain how missing data were addressed
		(d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed
		<i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed
		<i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy
		(e) Describe any sensitivity analyses

Continued on next page

Results

Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (pg-42)
		(b) Give reasons for non-participation at each stage
		(c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (pg-44 table1)
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time (pg-44)
		<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure
		<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures
Main results pg- 44,45,46,47	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses

Discussion

Key results pg-52	18	Summarise key results with reference to study objectives
Limitations pg-52	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation pg-52	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
Generalisability pg-52	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results

Other information

Funding No	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based
---------------	----	---

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

Supplemental Table 1.

N	Fam	Sex	Diagnosis	Gene	NM	Nucleotide change (AA change)/zigosity	Classification (ACMG Criteria)	Nucleotide change (AA change)/zigosity
1	1	Male	SPG72	REEP2	NM_001271803.2	c.741dupC;p.(Ser248Leufs*39)/x1	Pathogenic (PVS1, PM2, PP1)	-
2	1	Female	SPG72	REEP2	NM_001271803.2	c.741dupC;p.(Ser248Leufs*39)/x1	Pathogenic (PVS1, PM2, PP1)	-
3	1	Male	SPG72	REEP2	NM_001271803.2	c.741dupC;p.(Ser248Leufs*39)/x1	Pathogenic (PVS1, PM2, PP1)	-
4	1	Female	SPG72	REEP2	NM_001271803.2	c.741dupC;p.(Ser248Leufs*39)/x1	Pathogenic (PVS1, PM2, PP1)	-
5	2	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
6	3	Male	SPG11	SPG11	NM_025137.3	c.2444+1G>C/x2	Pathogenic	NA
7	4	Male	SPG46 likely	GBA2	NM_020944.3	c.1365G>C; p.(Trp455Cys)/x1	Likely Pathogenic (PS4, PM2, PP3, BP1)	c.1943_1944delGT; p.(Cys648SerfsTer7)/x1
8	5	Female	SPG3A likely	ATL1	NM_015915.4	c.1239T>G; p.(Phe413Leu)/x1	Likely pathogenic (PM1, PM2, PM5, PP1, PP2, PP3)	-
9	5	Male	SPG3A likely	ATL1	NM_015915.4	c.1239T>G; p.(Phe413Leu)/x1	Likely pathogenic (PM1, PM2, PM5, PP1, PP2, PP3)	-
10	5	Female	SPG3A likely	ATL1	NM_015915.4	c.1239T>G; p.(Phe413Leu)/x1	Likely pathogenic (PM1, PM2, PM5, PP1, PP2, PP3)	-
11	6	Female	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.1785C>A; p.(Ser595Arg)/x1	Pathogenic	-
12	7	Female	MLC1	MLC1	NM_139202.3	c.240G>A; p.(Met80Ile)/x2	Pathogenic	-
13	8	Female	SPG11	SPG11	NM_025137.3	c.2444+1G>C/x1	Pathogenic	c.442+1G>C/x1
14	9	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
15	10	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
16	11	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
17	12	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
18	12	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
19	13	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
20	14	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
21	15	Female	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.839_840delAG; p.(Gln280Argfs*10)/x1	Pathogenic	-
22	16	Male	SPG4 likely	SPAST	NM_014946.3	c.1255G>T; p.(Gly419*)/x1	Likely pathogenic (PVS1, PM2)	-
23	17	Female	SPG8	WASHC5	NM_014846.4	c.1857G>C;p.(Leu619Phe)/x1	Pathogenic	-
24	18	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
25	19	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
26	20	Male	SPG3A	ATL1	NM_015915.4	c.1376A>G (p.Tyr459Cys)/x1	Pathogenic	-
27	20	Female	SPG3A	ATL1	NM_015915.4	c.1376A>G (p.Tyr459Cys)/x1	Pathogenic	-
28	21	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
29	22	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
30	23	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
31	24	Male	SPG11	SPG11	NM_025137.3	c.733_734delAT; p.(Met245Valfs*2)/x1	Pathogenic	c.5490delT; p.(Glu1831Asnfs*7)/x1
32	25	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
33	26	Male	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.583C>G; p.(Leu195Val)/x1	Pathogenic	-
34	27	Female	Unsolved	CAPN1	NM_001198868.2	c.1176G>A; p.(Trp392*)/x1	Pathogenic	-
35	28	Female	SPG46	GBA2	NM_020944.3	c.1365G>C; p.(Trp455Cys)/x2	Likely Pathogenic (PS4, PM2, PP3, BP1)	-
36	29	Male	SPG3A	ATL1	NM_015915.4	c.715C>T; p.(Arg239Cys)/x1	Pathogenic	-
37	30	Female	SPG3A	ATL1	NM_015915.4	c.574C>G; p.(Leu192Val)/x1	Likely Pathogenic (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	-
38	30	Female	SPG3A	ATL1	NM_015915.4	c.574C>G; p.(Leu192Val)/x1	Likely Pathogenic (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	-
39	31	Male	SPG3A	ATL1	NM_015915.4	c.829G>C; p.(Ala277Pro)/x1	Likely Pathogenic (PM1, PM2, PP2, PP3)	-
40	32	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
41	32	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
42	33	Male	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.1493G>C; p.(Arg498Thr)/x1	Pathogenic	-
43	34	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
44	35	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
45	36	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
46	37	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
47	38	Female	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.1495C>T; p.(Arg499Cys)/x1	Pathogenic	-
48	39	Female	SPG64	ENTPD1	NM_001164178.1	c.806_807delGG; p.(Gly269Glufs*18)/x2	Likely Pathogenic (PVS1, PM2)	-
49	40	Male	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.1273G>C; p.(Ala425Pro)/x1	Pathogenic	-
50	40	Male	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.1273G>C; p.(Ala425Pro)/x1	Pathogenic	-
51	40	Male	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.1273G>C; p.(Ala425Pro)/x1	Pathogenic	-
52	40	Female	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.1273G>C; p.(Ala425Pro)/x1	Pathogenic	-
53	41	Female	CMT2W	HARS1	NM_002109.6	c.305C>T; p.(Thr102Ile)/x1	VUS (previously reported as diagnosed)	-
54	42	Female	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.1412_1413delGTinsAC (p.Gly471Asp)	Pathogenic	-
55	42	Female	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.1412_1413delGTinsAC (p.Gly471Asp)	Pathogenic	-
56	42	Female	SPG4*	SPAST	NM_014946.3	c.1412_1413delGTinsAC (p.Gly471Asp)	Pathogenic	-
57	43	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
58	43	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
59	43	Male	Unsolved	-	-	-	-	-

60	44	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
61	45	Female	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.1004+5G>A/x1	Likely pathogenic (PS4, PM2, PP3)	-
62	46	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
63	47	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
64	48	Male	Unsolved	-	-	-	-	-
65	49	Female	DADA2	ADA2	NM_017424	c.139G>A;p.(Gly47Arg)/x1	Pathogenic	c.1358A>G;p.(Tyr453Cys)
66	50	Male	SPOAN	KLC2	M4,557_66,024,773del, GRCh37/x2	-	Pathogenic	-
67	51	Male	DRD ⁵	-	-	-	-	-
68	52	Female	SPG5	CYP7B1	NM_004820.3	c.887A>C; p.(Asn296Thr)/x2	Likely Pathogenic (PM1,PM2,PP2,PP3)	-
69	53	Female	SPG3A	ATL1	NM_015915.4	c.757G>A;p.(Val253Ile)/x1	Likely Pathogenic	-
70	53	Female	SPG3A	ATL1	NM_015915.4	c.757G>A;p.(Val253Ile)/x1	Likely Pathogenic	-
71	54	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
72	55	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
73	56	Male	SPG2	PLP1	NM_000533.5	c.374delG; p.(Gly125Valfs*22)/(x1)	Pathogenic	-
74	57	Female	Unsolved	ENTPD1	NM_001164178.1	c.574-8_574-5delITCTT/x2	VUS (PM2, PP1, PP3)	-
75	57	Female	Unsolved	ENTPD1	NM_001164178.1	c.574-8_574-5delITCTT/x2	VUS (PM2, PP1, PP3)	-
76	58	Male	SPG7	SPG7	NM_003119.2	c.1997G>T; p.(Gly666Val)/x2	Likely pathogenic (PM2, PM5, PP2, PP3)	-
77	59	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
78	60	Female	Unsolved	-	-	-	-	-
79	61	Female	SPG64	ENTPD1	NM_001164178.1	c.806_807delGG; p.(Gly269Glufs*18)/x2	Likely Pathogenic (PVS1, PM2)	-
80	62	Male	Unsolved	CYP7B1	NM_004820.3	c.650T>A; p.(Leu217*)/x1	Likely Pathogenic (PVS1, PM2)	c.1082G>A; p.(Arg361Gln)
81	63	Female	Argininemia	ARG1	NM_000045.4	c.404C>T; p.(Thr143Ile)/x2	Pathogenic	-
82	63	Female	Argininemia	ARG1	NM_000045.4	c.404C>T; p.(Thr143Ile)/x2	Pathogenic	-
83	64	Female	Argininemia	ARG1	NM_001244438.1	c.3G>A; p.(Met1Ile)/x2	Pathogenic	-
84	65	Male	Argininemia	ARG1	NM_000045.4	c.404C>T; p.(Thr143Ile)/x2	Pathogenic	-
85	66	Male	SPG2	PLP1	NM_000533.3	c.388C>T; p.(His130Tyr)/x1	Pathogenic	-
86	67	Male	SPG2	PLP1	NM_000533.3	c.617T>C; p.(Met206Thr)/x1	Likely Pathogenic (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP4)	-
87	68	Male	SPG11	SPG11	NM_025137.3	c.6100C>T; p.(Arg2034*)/x2	Pathogenic	-
88	69	Male	SPG15	ZFYVE26	NM_015346.3	c.3642_3643insCCACACTTAG; p.(Ala1215Profs*22) /x2	Likely Pathogenic (PVS1, PM2)	-
89	70	Male	SPOAN	KLC2	NM_001134775.1	c.-451_-235del/x2	Pathogenic	-
90	70	Female	SPOAN	KLC2	NM_001134775.1	c.-451_-235del/x2	Pathogenic	-
91	71	Male	SPG11	SPG11	NM_025137.4	c.733_734del; p.(Met245Valfs*2)/x2	-	-
92	72	Male	SPG15	ZFYVE26	NM_015346.4	c.6296dup; p.(Asn2100Glufs*12)/x2	Pathogenic	-
93	73	Male	SPG3A*	ATL1	NM_015915	c.715C>T (p.Arg239Cys)/x1	Pathogenic	-
94	73	Male	SPG3A*	ATL1	NM_015915	c.715C>T (p.Arg239Cys)/x1	Pathogenic	-
95	73	Male	SPG3A*	ATL1	NM_015915	c.715C>T (p.Arg239Cys)/x1	Pathogenic	-
96	73	Female	SPG3A	ATL1	NM_015915	c.715C>T (p.Arg239Cys)/x1	Pathogenic	-
97	74	Male	SPG4	SPAST	NM_014946	c.1493+21>A/x1	Pathogenic	-
98	75	Female	Unsolved	GBA2	NM_020944.3	c.1789G>T;p.(Asp597Tyr)/x2	VUS (PM2,PM3,PP3,BP1)	-
99	76	Male	Unsolved	GBA2	NM_020944.3	c.1365G>C; p.(Trp455Cys)	Likely Pathogenic (PS4,PM2,PP3, BP1)	c.1789G>T;p.(Asp597Tyr)/x2
100	77	Female	SPG46	GBA2	NM_020944.3	c.1365G>C; p.(Trp455Cys)/x2	Likely Pathogenic (PS4,PM2,PP3, BP1)	-
101	78	Male	SPG31	REEP1	NM_022912.2	c.55C>A; p.(Pro19Thr)/x1	Likely pathogenic (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	-
102	79	Female	SPG4	SPAST	NM_014946.3	c.1291C>T; p.(Arg431*)/x1	Pathogenic	-
103	80	Male	ALS2	ALS2	NM_020919.3	c.326delA; p.(Asn109Metfs*17)/x2	Likely pathogenic (PVS1, PM2)	-
104	81	Female	SPG7	SPG7	NM_003119.3	c.1529C>T; p.(Ala510Val)/x1	Pathogenic	-
105	82	Male	SPG3A	ATL1	NM_015915.4	c.749T>C; p.(Leu250Pro)/x1	Pathogenic	-
106	83	Male	SPG30	KIF1A	NM_001244008.2	c.153C>G; p.(Ser51Arg)/x1	Likely pathogenic (PM1,PM2,PP2,PP3)	-
107	84	Male	SPG10	KIF5A	NM_00494.2	c.1022A>G; p.(Gln341Arg)/x1	Likely pathogenic (PM1,PM2,PP2,PP3)	-

Classification (ACMG Criteria)	Inheritance	Age	AO	DD	HSP Form	SPRS	SPRS progression	Walking aid	DDWA	Wheelchair bound	DDWC	Intellectual Disability/Cognitive Decline	Ataxia	xtrapyramid:	Bulbar
-	AD	51	1	50	Pure	25	NA	0	50	0	NA	0	0	0	0
-	AD	16	4	12	Pure	4	NA	0	12	0	NA	0	0	0	0
-	AD	13	5	8	Pure	6	NA	0	8	0	NA	0	0	0	0
-	AD	42	8	34	Pure	NA	NA	0	34	0	NA	0	0	0	0
-	AR	67	0	67	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
-	AR	12	7	5	Complex	3	0.75	0	5	0	NA	0	1	1	0
Likely pathogenic (PVS1, PM2)	AR	57	6	51	Complex	34	0,67	1	20	1	NA	1	1	0	0
-	AD	43	4	39	Pure	25	0,69	1	15	0	NA	0	0	0	0
-	AD	20	1	19	Pure	25	1,47	0	19	0	NA	0	0	0	0
-	AD	14	NA	NA	Pure	33	2,75	1	2	0	NA	0	0	0	0
-	AD	9	1,5	7,5	Pure	12	1,33	0	7,5	0	NA	0	0	0	0
-	AR	56	7	49	Complex	NA	NA	1	20	NA	NA	1	1	0	0
Pathogenic	AR	33	5	28	Complex	36	1,50	1	25	1	25	1	0	0	0
-	Isolated	28	8	20	Complex	NA	NA	0	20	0	NA	1	0	0	0
-	Isolated	10	1,2	8,8	Pure	23	2,88	1	2	0	NA	0	0	0	0
-	AR	37	3	34	Complex	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
-	AD	47	2	45	Pure	2	0,05	1	12	0	NA	0	0	0	0
-	AD	17	2	15	Pure	NA	NA	0	NA	0	NA	0	0	0	0
-	Isolated	45	7	38	Pure	NA	NA	1	1	0	NA	0	0	0	0
-	AR	41	0	41	Complex	NA	NA	1	39	0	NA	1	0	0	0
-	AD	29	1	28	Pure	NA	NA	1	10	1	NA	0	0	0	0
-	AD	24	10	14	Pure	5	0,38	0	14	0	NA	0	0	0	0
-	AD	47	1	46	Pure	23	0,53	1	12	NA	NA	0	0	0	0
-	AR	40	4	36	Complex	NA	NA	0	36	0	NA	1	0	0	0
-	AD	18	10	8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
-	AD	8	2	6	Complex	NA	NA	0	6	0	NA	0	0	0	0
-	AD	39	5	34	Pure	12	0,38	0	34	0	NA	0	0	0	0
-	Isolated	23	2	21	Complex	NA	NA	1	NA	0	NA	1	0	0	0
-	Isolated	12	4	8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
-	AR	48	11	37	Complex	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	1	0	0
Likely Pathogenic (PVS1, PM2)	AR	29	10	19	Complex	34	1,89	1	11	1	5	1	0	1	0
-	Isolated	34	1	33	Pure	10	0,32	0	33	0	NA	0	0	0	0
-	AD	39	1	38	Pure	11	0,31	0	38	0	NA	0	0	0	0
-	AR	29	1	28	Complex	17	0,65	0	28	0	NA	0	1	0	0
-	AR	40	8	32	Complex	NA	NA	1	18	0	NA	1	1	1	0
-	AD	40	1,2	38,8	Pure	17	0,46	0	38,8	0	NA	0	0	0	0
-	AD	12	0	12	Pure	37	4,11	1	12	1	NA	0	0	0	0
-	AD	39	0	39	Pure	27	0,71	1	36	0	NA	0	0	0	0
-	AD	34	1	33	Pure	9	0,29	0	33	0	NA	0	0	0	0
-	AR	13	1	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
-	AR	10	1	9	Pure	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
-	AD	7	2	5	Pure	11	2,75	0	5	0	NA	0	0	0	0
-	Isolated	35	6	29	Pure	9	0,33	0	29	0	NA	0	1	0	0
-	AD	36	11	25	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
-	AD	50	3	47	Pure	NA	NA	1	7	0	NA	0	0	0	0
-	AR	51	12	39	Complex	NA	NA	1	NA	NA	NA	0	0	0	0
-	AD	16	0	16	Pure	8	0,53	0	16	0	NA	0	0	0	0
-	AR	29	2	27	Complex	NA	NA	1	14	1	12	1	0	0	0
-	AD	15	0	15	Pure	13	0,93	1	6	0	NA	1	0	0	0
-	AD	12	0	12	Pure	10	1,67	0	12	0	NA	1	0	0	0
-	AD	9	0	9	Pure	17	2,43	0	9	0	NA	0	0	0	0
-	AD	34	0	34	Pure	9	0,28	0	34	0	NA	1	0	0	0
-	AD	22	2	20	Pure	NA	NA	0	20	0	NA	0	0	0	0
-	AD	40	6	34	Pure	34	1,03	1	29	0	NA	0	0	0	0
-	AD	11	4	7	Pure	2	0,33	0	7	0	NA	0	0	0	0
-	AD	6	5	1	Pure	NA	NA	0	1	0	NA	0	0	0	0
-	AD	44	10	34	Pure	NA	NA	1	30	0	NA	1	0	0	0
-	AD	21	1	20	Pure	NA	NA	0	20	0	NA	1	0	0	0
-	AD	13	1	12	Complex	NA	NA	1	10	0	NA	1	1	0	0

-	Isolated	38	7	31	Complex	NA	NA	1	1	0	NA	0	1	0	0
-	Isolated	26	6	20	Pure	NA	NA	1	12	0	NA	0	0	0	0
-	AR	40	2	38	Complex	NA	NA	1	32	1	37	1	1	0	0
-	Isolated	20	2	18	Complex	NA	NA	1	11	0	NA	1	0	1	0
-	AD	36	7	29	Pure	NA	NA	1	11	1	11	0	0	0	0
Pathogenic	AR	30	6	24	Complex	NA	NA	1	22	0	NA	0	0	1	0
-	AR	32	1	31	Complex	NA	NA	1	23	1	23	0	0	0	0
-	Isolated	16	1	15	Complex	NA	NA	0	15	0	NA	1	0	1	0
-	AR	63	7	56	Pure	NA	NA	1	35	1	50	0	0	0	0
-	AD	54	2	52	Complex	13	0,25	0	52	0	NA	0	0	0	0
-	AD	28	10	18	Pure	5	0,29	0	18	0	NA	0	0	0	0
-	Isolated	8	0	8	Pure	NA	NA	1	2	0	NA	0	0	0	0
-	Isolated	17	10	7	Pure	NA	NA	0	7	0	NA	0	0	0	0
-	Ligado ao X	14	2	12	Complex	NA	NA	0	12	0	NA	1	1	0	0
-	AR	19	2	17	Complex	NA	NA	1	17	1	17	1	0	0	0
-	AR	17	2	15	Complex	NA	NA	0	15	0	NA	1	0	0	0
-	AR	27	9	18	Complex	14	0,82	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA	0
-	Isolated	6	1	5	Pure	NA	NA	0	5	0	NA	1	0	0	0
-	Isolated	17	1	16	Complex	NA	NA	0	16	0	NA	0	1	1	0
-	AR	15	2	13	Complex	NA	NA	0	13	0	NA	1	0	0	0
VUS (PM2,PM3,PP3)	Isolated	36	11	25	1	NA	NA	0	NA	0	NA	0	0	0	0
-	AR	46	1	45	Complex	40	0,95	1	3	1	11	1	1	0	1
-	AR	29	2	27	Complex	25	0,96	1	3	1	8	1	1	0	0
-	AR	43	9	34	Complex	NA	NA	1	5	1	11	1	1	0	0
-	AR	26	4	22	Complex	23	1,21	1	16	0	NA	1	1	0	0
-	Ligado ao X	35	5	30	Complex	NA	NA	1	10	0	NA	1	1	0	1
-	Ligado ao X	32	4	28	Complex	NA	NA	1	0	1	5	1	1	1	0
-	AR	39	7	32	Complex	NA	NA	1	11	1	23	1	0	0	0
-	AR	32	7	25	Complex	44	1,91	1	11	1	23	1	1	0	1
-	AR	34	2	32	Complex	37	1,23	1	2	1	18	0	NA	NA	NA
-	AR	36	2	34	Complex	42	1,35	1	3	1	16	0	NA	NA	NA
-	AR	25	7	18	Complex	NA	NA	1	2	1	2	1	1	1	1

-	AR	44	6	38	Complex	NA	NA	1	9	1	9	1	0
-	AD	9	1	8	Pure	NA	NA	1	5	0	NA	0	0
-	AD	8	1	7	Pure	NA	NA	1	4	0	NA	0	0
-	AD	6	2	4	Pure	NA	NA	1	2	0	NA	0	0
-	AD	28	2	26	Pure	NA	NA	1	3	0	NA	0	0
-	AD	46	7	39	Pure	NA	NA	0	39	0	NA	0	0
-	AR	37	5	32	Complex	NA	NA	1	5	0	NA	1	1
VUS (PM2,PM3,PP3,BP1)	AR	30	10	20	Complex	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
-	NA	38	10	28	Complex	NA	NA	0	28	0	NA	1	1
-	NA	14	3	11	Pure	NA	NA	0	11	0	NA	0	0
-	AD	15	4	11	Pure	NA	NA	0	11	0	NA	0	0
-	AR	10	1	9	Pure	NA	NA	0	9	0	NA	0	0
-	AD	17	10	7	Pure	NA	NA	0	7	0	NA	0	0
-	NA	16	1	15	Pure	NA	NA	0	15	0	NA	0	0
-	NA	17	1,2	15,8	Complex	NA	NA	1	15,8	1	NA	1	0
-	AD	9	1	8	Complex	NA	NA	0	8	0	NA	1	1

Dysarthria	Dysphagia	PNP	LMN	Contractures	Epilepsy	Brain MRI
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0	0	0	0	0	0	TCC, Ear of the lynx sign
1	0	1	0	0	0	Normal
0	0	0	0	1	0	NA
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	Leucoencephalopathy
0	0	0	1	NA	0	TCC, Ear of the lynx sign
1	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0	0	0	0	1	0	TCC, Ear of the lynx sign
0	0	0	0	1	0	NA
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	1	1	0	0	NA
1	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	TCC
0	0	0	0	0	0	NA

0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	TCC, cerebellar atrophy
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	Diffuse brain atrophy
0	0	0	1	0	0	TCC
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	NA
0	NA	1	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	1	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0	0	0	0	0	0	NA
1	0	0	0	0	0	Normal
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	1	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	Normal
NA	1	1	0	1	1	TCC, diffuse brain atrophy including hippocampus
0	0	0	0	1	0	Normal
0	0	0	0	1	0	Normal
0	0	0	0	1	0	NA
1	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	1	0	NA
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	1	0	NA
0	0	0	0	0	0	NA
1	1	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	1	NA

1	1	1	0	1	0	Normal
0	0	0	0	1	0	Normal
1	0	0	0	0	0	Normal
0	0	1	0	1	0	Normal
0	0	0	0	0	0	NA
1	1	0	0	0	0	Diffuse brain atrophy
1	0	1	0	1	0	Normal
1	0	0	0	1	0	Diffuse brain atrophy
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	1	0	1	0	NA
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	Normal
0	1	0	0	1	0	T2 hyperintensity dorsal brain stem
0	1	1	0	1	1	Inespecific findings
0	0	1	0	1	0	Normal
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0	0	0	0	0	0	TCC
1	0	0	0	0	1	Normal
0	0	NA	NA	1	1	Normal
0	0	0	0	1	1	
1	1	0	0	0	0	Normal
1	1	0	0	0	0	Normal
1	1	0	0	1	0	TCC
1	1	1	0	0	1	Normal
1	1	0	0	0	0	Normal
1	1	0	0	1	0	Leucoencephalopathy, cerebellar atrophy
1	1	1	0	0	0	TCC, Ear of the lynx sign
1	1	1	0	1	0	TCC, Ear of the lynx sign
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1	1	1	0	0	0	TCC, Ear of the lynx sign
1	1	0	0	0	0	TCC, Ear of the lynx sign
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	NA
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	Normal
1	0	0	0	0	0	Normal
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1	1	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	0	0	0	0	Normal
0	0	1	0	0	0	TCC, Ear of the lynx sign
0	0	0	0	0	1	Inespecific findings