

Generación de un modelo de Células de Purkinje de cerebelo para el estudio de dos enfermedades raras neurodegenerativas: PLAN y ARSACS

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Neurociencias

Candela Machuca Arellano

Dirigida por: Carmen Espinós y Slaven Erceg

Valencia
Septiembre 2022



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Eduardo Primo Yúfera, 3
46012 Valencia (España)
Teléfono: + 34 96 328 96 80

Dra. Carmen Espinós y **Dr. Slaven Erceg**, ambos Investigadores Principales en el Centro de Investigación Príncipe Felipe en Valencia, en los grupos de Enfermedades Raras Neurodegenerativas y Terapias Avanzadas con células madre en Enfermedades Neurodegenerativas, respectivamente.

INFORMAN:

Que **Dña. Candela Machuca Arellano** ha realizado, bajo nuestra tutorización y dirección, el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada “Generación de un modelo de células de Purkinje de cerebelo para el estudio de dos enfermedades raras: PLAN y ARSACS”, en el Centro de Investigación Príncipe Felipe. Considerando que constituye trabajo de tesis doctoral, autorizamos su presentación para optar al grado de Doctor.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente informe:

Dra. Carmen Espinós

Dr. Slaven Erceg

Dña. Candela Machuca Arellano

Para la realización de la presente Tesis Doctoral, la autora ha disfrutado de un contrato como Investigadora Predoctoral mediante una beca (Ref: P.I.06/2017) otorgada por el centro de investigación Príncipe Felipe (CIPF) bajo el Programa de Investigación Intergrupo en los laboratorios de Enfermedades Raras Neurodegenerativas y Terapias con Células Madre en Enfermedades neurodegenerativas. Además, el Centro de Investigación Príncipe Felipe le otorgó en 2019 una beca para la realización de una estancia de cinco meses en el laboratorio del Dr. Mustafa Sahin, del Departamento de Neurología, F.M. Kirby Center for Neurobiology /Boston Children's Hospital/Harvard Medical School, Boston, Massachusetts (EE. UU.).

Así mismo, el trabajo se ha enmarcado dentro de los siguientes proyectos de investigación:

- Título del proyecto: “Estudios clínicos, bases genéticas y biomarcadores pronóstico en enfermedades raras neurodegenerativas”
Duración: 2019-2021
Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III (Expediente PI18/00147)
IP: C. Espinós

- Título del proyecto: “De genes a terapia en enfermedades neurodegenerativas y neuromusculares”
Duración: 2018-2021
Entidad financiadora: Generalitat Valenciana, Programa Prometeo para grupos de investigación de excelencia (Expediente: PROMETEO/2018/135)
Consorcio de investigadores formado por F.V. Pallardó (coordinador), J.M. Millán, I. Galindo, P. Sanz, T. Sevilla y C. Espinós.

- Título: “*Cerebellar cells derived from induced pluripotent stem cells in 3D culture generated from ARSACS patients as faithful disease model*”
Entidad financiadora: ARSACS Foundation, Quebec (Canadá).
Duración: 2016-2017
IP: S. Erceg

- Título del proyecto: “Estudio preclínico de potencial regenerativo de astrocitos derivados de células madre en tratamiento de lesión medular en ratón”,
Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III (Expediente: PI18/00286)
Duración: 2019-2021. IP: S. Erceg.

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, **Slaven** y **Carmen**. Gracias por la dedicación y apoyo que me habéis brindado durante este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas, por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza depositada en mí desde que llegué al CIPF, y por darme la oportunidad de desarrollar esta tesis doctoral en vuestros laboratorios. Espero de todo corazón que vaya todo bien, que sigamos en contacto y aunque Slaven no nos conteste a los mails..caiga alguna cerveza de vez en cuando en el chalet de Carmen (guiño guiño).

Gracias a mis compañeros de mis labos i59 e i54, a los que están a día de hoy (**Javi**, **Lola**, **Ana**) y a los que han estado durante estos años, pero ya no están, con quienes he compartido muchos momentos, proyectos e ilusiones durante esta etapa. Gracias por vuestro tiempo, apoyo y ayuda. Especialmente, me gustaría dar las gracias a **Isabel**, a **Nuria** y a mi **Paquilli**, ¡porque vaya sprint final! Gracias chicas, por el esfuerzo y las ganas de ayudar siempre. Y muy especialmente a mi **Mariam**, ay, ¡mi Mariam! Mi compi de zulo y charlas, de fines de semana, de cultivos celulares infinitos, de carreras con el coche, de bocatas a deshoras, mi hermana mayor y por supuesto mi amiga, que, aunque sigo AUN sin conocer a tu familia, llevo sintiéndome parte de ella mucho tiempo. Gracias por todo.

Este trabajo también es fruto de ideas, proyectos y esfuerzo que corresponden a otras personas. Creo que no ha quedado nadie en toda Valencia (por lo menos y que yo sepa) que se haya librado de mí en ese aspecto, así que muchas gracias a toda la gente del CIPF, gente de otros labos, centros y universidades, servicios y animalario, por de haber sido una gran ayuda para desarrollar esta tesis doctoral y para mí. Y a Cafetería del CIPF, por supuesto y no menos importante, ¡porque comer feliz es tan importante como que te salgan los experimentos!

My 5 month internship in Boston Children's Hospital/Harvard Medical School (Boston) was for me the clue to develop this work. So I need to thank from the bottom of my heart for the time I spent in your lab, **Mustafa**. Looking back on my time in Boston, I evolved into a critical-minded, mature and better scientist and I am sure that I will benefit from this experience for the rest of my career. Boston me ha dado muy buenos momentos tanto científicos como personales. Gracias a las personas con las que he compartido ese tiempo, y especialmente a mi Cape Code Forever group, que hacen que cuando echo la vista atrás sonrío y me den ganas de volver a pasar, por un tiempito más, un poco más de frío bostoniano. **Marian**, **Xaquín**, **Jesús**, **Sara** y **Dafne**, gracias por toooodo los momentos, allí y aquí y en cualquier sitio, y por vuestro cariño. ¡Qué suerte la mía de haberos conocido!
Ámsterdam 2022/Muros 2023.

Cuando tu vida está entre distintos lugares tienes que aceptar que va a estar llena de constantes bienvenidas y despedidas, de aprovechar al máximo el tiempo con la gente a la que quieres y que no ves en un tiempo, de recordar cómo era hacer cosas juntos para después irte a otro sitio en el que también hay gente que quieres, pero pensando que no puedes unirlo todo.

Haber realizado esta tesis en Valencia y en el CIPF me ha hecho encontrarme con gente maravillosa con la que he compartido y comparto mi vida entre penas y alegrías, cumpleaños, experimentos fallidos y alguno que otro que salía bien, congresos, migas, queso y vino, fallas, playa, viajes, orquestas...y todo lo que sigue viniendo vaya.

GRACIAS:

Jose Miguel por estar siempre atento de todo y de todos y amenizarnos con ese humor bonito (sigue quedando pendiente ir a Villena); **Fátima** por tus mil planes (sí a todo) y tu sonrisa e ilusión constante, aun estando a unos cuantos km a día de hoy; **Espe** y nuestra afición por los chuletones y el vino que nos hacen desconectar, y por tener a mi **patatilla** y sobrina pelirroja preciosa; a mis rebeldes, con las que comparto ese genio y pasión por tantas cosas.. **Arantxi**, the best person apañada in the world, por mediar en todo y tener el don de hacer lo difícil fácil, ah, y por ese amor por las migas...chica me tienes ganada con eso; **Maji**, gracias por el cariño, la comprensión y las ganas de que todo nos vaya bien a todas, nos das mucho!!; **Andrei**, mi confidente, si te conociese en otra vida te volvería a abordar y obligar a ser mi amiga o mi novia..tú eliges eh! T'estime. Y por supuesto a todos los **consortes** (como diría JM) **Mar**, **Emilio**, **Vicent** y **María**, partícipes en muchísimos de estos momentos, y miembros de esta nuestra familia.

A mi familia buñolera, **Sandra** y **Rafa**, por adoptarme(nos), cuidarnos y darnos de comer pese a llegar tarde siempre, por hacerme sentir parte del segundo mejor pueblo del mundo (Buñol), después de Guadamur claro. A **Javi** y **Darren**, casi buñoleros también, y mención especial por tanta ayuda durante esta tesis, ¡os debo un par de cervezas mínimo... sois muy bonicos! Y a mi mix de familia castellana, asturiana, alicantina, que siempre están al pie del cañón día tras día en Valencia o donde sea, **Elena**, **Irene** y **Gus**, gracias por todo, sois casa.

GRACIAS:

A mi familia y amigos de Guadamur, por cuidarme siempre, desde lejos y desde hace bastantes años. Por el apoyo incondicional, por los consejos, por recibirme con ilusión y sacar siempre de debajo de las piedras un rato para estar juntos, por recordarme de dónde vengo y por hacer que cada vez que vuelvo, me sienta como si nunca me hubiese ido. No os voy a nombrar a todos porque sois muchos, y que suerte tengo de que así sea.

Alfs, Lore, Almu, Cris, Laura, Thomas, Maripili y Clarita, gracias por el apoyo estos años y por el cariño en la distancia, ha sido casi casi como teneros aquí cerquita.

A mi compañero de vida, **Lorente**. No podría expresar aquí todo el agradecimiento que realmente te mereces. Gracias por quererme, por cuidarme y por aguantarme(nos) durante este viaje lleno de curvas. Sigamos compartiendo momentos. Te quiero mucho. Y por supuesto muchas gracias a la familia **Lorente-Erenas**, que también es la mía.

Y, por último, y lo más importante, muchas gracias a **mis padres**. Soy lo que soy por vosotros, y no puedo sentir más orgullo por ello. Esta tesis es realidad por vosotros, y en especial por ti mamá. Gracias por ser la Manager de mi vida. Os quiero.

Como diría mi abuelo Segundo... ¿Ya has acabado en ese punto? ¿Te tratan bien? ¿Estás contenta? Este "cacharro" ya ha terminado abuelo, y todo bien sí, pero te echo mucho de menos.

A menudo, la realidad se opone a obtener los resultados que te gustaría tener, pero al final puedo decir con orgullo que estoy muy contenta con lo que muestro en esta tesis, fruto de duro trabajo y fuertes ganas de tirar para adelante, venga lo que venga. Y aunque el destino ha sido importante, también lo ha sido el viaje. Estoy muy contenta de haber tenido muchos compañeros y amigos que me han acompañado y ayudado durante este camino, y bueno, probablemente haya generado más buenos recuerdos que (buenos) datos durante estos años.

Índice

A. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	21
1. INTRODUCCIÓN.....	23
1.1 CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES Y MODELOS CELULARES EN ENFERMEDADES RARAS NEURODEGENERATIVAS	23
1.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE PURKINJE DE CEREBELO A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES	29
B. CAPÍTULO 1: ATAXIA ESPÁSTICA AUTOSÓMICA RECESIVA DE CHARLEVOIX-SAGUENAY (ARSACS).....	49
1. INTRODUCCIÓN.....	51
1.1 CLASIFICACIÓN, SÍNTOMAS Y CURSO CLÍNICO DE ARSACS	51
1.2 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	54
1.3 GENÉTICA DE ARSACS.....	55
1.4 MECANISMOS MOLECULARES Y MODELOS DE ENFERMEDAD DE ARSACS	62
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	83
3. RESULTADOS	85
3.1 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS HIPSCS GENERADAS A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PORTADOR Y PACIENTES ARSACS	85
3.1.1 GENERACIÓN DE LÍNEAS HIPSCS POR REPROGRAMACIÓN CELULAR.....	85
3.1.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y GENÉTICA.....	86
3.1.2.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE FACTORES DE REPROGRAMACIÓN EXÓGENOS	86
3.1.2.2 ANÁLISIS MUTACIONAL POR SECUENCIACIÓN.....	88
3.1.2.3 CARIOTIPADO	89
3.1.2.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PLURIPOTENCIA	90
3.1.3 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL	95
3.1.3.1 FORMACIÓN DE CUERPOS EMBRIONARIOS <i>IN VITRO</i>	95
3.2 CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA GENERACIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS DE CEREBELO Y CÉLULAS DE PURKINJE DE CEREBELO FUNCIONALES A PARTIR DE LÍNEAS HIPSCS	97
3.2.1 EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA ORGANIZACIÓN DEL TUBO NEURAL Y LA REGIONALIZACIÓN DURANTE EL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	97
3.2.2 EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO CEREBELAR DE NEURONAS GABAÉRGICAS Y CÉLULAS DE PURKINJE DE CEREBELO DURANTE EL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	101
3.2.3 EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA MADURACIÓN FUNCIONAL DE LAS NEURONAS GABAÉRGICAS DURANTE EL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	103
3.2.4 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL DESARROLLO NEURONAL Y CEREBELAR DE NEURONAS GABAÉRGICAS Y CÉLULAS DE PURKINJE DE CEREBELO DURANTE EL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	104

3.3 LAS CÉLULAS DE PURKINJE DE CEREBELO DERIVADAS DE PACIENTES ARSACS MUESTRAN ALTERACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR, TAMAÑO DEL SOMA, REDUCCIÓN DEL CRECIMIENTO NEURONAL Y ARBORIZACIÓN Y NÚMERO DE SINAPSIS ALTERADO	111
3.4 LAS CÉLULAS DE PURKINJE CEREBELO DERIVADAS DE LÍNEAS HIPSCs DE PACIENTES ARSACS Y PORTADORES ARSACS MUESTRAN DEFECTOS EN LAS PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS	115
3.5 LAS MUTACIONES EN EL GEN <i>SACS</i> CAUSAN UNA DEFICIENCIA DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL CITOSÓLICA EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS DE NEURONAS DE CEREBELO DE PACIENTES ARSACS	118
3.6 LAS MUTACIONES EN EL GEN <i>SACS</i> ALTERAN EL POTENCIAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL, Y GENERAN ROS MITOCONDRIALES EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS DE NEURONAS DE CEREBELO DE PACIENTES ARSACS	123
3.7 LAS MUTACIONES EN EL GEN <i>SACS</i> CAUSAN DEFICIENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SISTEMA DE RECICLAJE A TRAVÉS DE AUTOFAGIA INDICANDO DISFUNCIÓN EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS DE NEURONAS DE CEREBELO DE PACIENTES ARSACS	126
3.8 LAS MUTACIONES EN EL GEN <i>SACS</i> NO INTERFIEREN EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS UBIQUITINADAS ASOCIADAS AL CORRECTO FUNCIONAMIENTO DEL PROTEASOMA EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS DE NEURONAS DE CEREBELO DE PACIENTES ARSACS	126
3.9 LAS MUTACIONES EN EL GEN <i>SACS</i> CAUSAN DEFICIENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA REGULACIÓN DE LA DINÁMICA Y ENSAMBLAJE DE FILAMENTOS INTERMEDIOS EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS DE CEREBELO DE PACIENTES ARSACS	128
3.10 MUTACIONES EN EL GEN <i>SACS</i> PROVOCAN UNA DESREGULACIÓN DE LA DINÁMICA Y ENSAMBLAJE DE LOS NEUROFILAMENTOS DE CADENA PESADA EN LAS CÉLULAS DE PURKINJE DE CEREBELO DERIVADAS DE HIPSCs ARSACS.....	131
4. DISCUSIÓN	135
C. CAPÍTULO 2: NEURODEGENERACIÓN ASOCIADA A <i>PLA2G6</i> (PLAN)	147
1. INTRODUCCIÓN	149
1.1 CLASIFICACIÓN, SÍNTOMAS Y CURSO CLÍNICO DE PLAN	149
1.2 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	152
1.3 GENÉTICA DE PLAN.....	154
1.4 MECANISMOS MOLECULARES Y MODELOS DE ENFERMEDAD DE PLAN.....	159
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	173
3. RESULTADOS	175
3.1 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS HIPSCs GENERADAS A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PORTADOR Y PACIENTES PLAN	175
3.1.1 GENERACIÓN DE LÍNEAS HIPSCs POR REPROGRAMACIÓN CELULAR.....	175
3.1.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y GENÉTICA.....	176

3.1.2.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE FACTORES DE REPROGRAMACIÓN EXÓGENOS	176
3.1.2.2 ANÁLISIS MUTACIONAL POR SECUENCIACIÓN.....	178
3.1.2.3 CARIOTIPADO	180
3.1.2.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PLURIPOTENCIA	181
3.1.3 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL	185
3.1.3.1 FORMACIÓN DE CUERPOS EMBRIONARIOS <i>IN VITRO</i>	185
3.2 CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA GENERACIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS DE CEREBELO Y DE NEURONAS DE CÉLULAS DE PURKINJE DE CEREBELO MADURAS FUNCIONALES A PARTIR DE LÍNEAS HIPSCS.....	186
3.2.1 EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA ORGANIZACIÓN DEL TUBO NEURAL Y LA REGIONALIZACIÓN DURANTE EL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	188
3.2.2 EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO CEREBELAR DE NEURONAS GABAÉRGICAS Y CÉLULAS DE PURKINJE DE CEREBELO DURANTE EL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	190
3.2.3 EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA MADURACIÓN FUNCIONAL DE LAS NEURONAS GABAÉRGICAS DURANTE EL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	191
3.2.4 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL DESARROLLO NEURONAL Y CEREBELAR DE NEURONAS GABAÉRGICAS Y CÉLULAS DE PURKINJE DURANTE EL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	192
3.3 LAS CÉLULAS DE PURKINJE DE CEREBELO MADURAS DERIVADAS DE PACIENTES PLAN MUESTRAN ALTERACIONES EN LA MORFOLOGÍA CELULAR, TAMAÑO DEL SOMA, REDUCCIÓN DEL CRECIMIENTO NEURONAL Y ARBORIZACIÓN Y NÚMERO DE SINAPSIS ALTERADO	197
3.4 LAS CÉLULAS DE PURKINJE DE CEREBELO MADURAS DERIVADAS DE LÍNEAS HIPSCS DE PACIENTES PLAN Y PORTADOR PLAN MUESTRAN DEFECTOS EN LAS PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS.....	201
3.6 ANOMALÍAS DEL POTENCIAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL Y GENERACIÓN DE ROS MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS DE NEURONAS DE CEREBELO DE PACIENTES PLAN	209
3.7 LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA CITOSÓLICA ESTÁN AUMENTADOS EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS DE NEURONAS DE CEREBELO DE PACIENTES PLAN.....	212
3.8 LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO Y LA FERRITINOFAGIA ESTÁ DISMINUIDA EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS DE NEURONAS DE CEREBELO DE PACIENTES PLAN	214
3.9 LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SISTEMA DE RECICLAJE MEDIADO POR AUTOFAGIA MUESTRA DISFUNCIÓN EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS DE NEURONAS DE CEREBELO DE PACIENTES PLAN	217
3.10 LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA FERROPTOSIS ESTÁ ALTERADA EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS DE NEURONAS DE CEREBELO DE PACIENTES PLAN	219
4. DISCUSIÓN	225

D. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	241
E. MATERIALES Y MÉTODOS.....	247
1. MATERIALES.....	249
1.1 MATERIALES Y EQUIPAMIENTO	249
1.2 MUESTRAS HUMANAS.....	249
2. MÉTODOS.....	251
2.1 CULTIVO CELULAR.....	251
2.1.1 BIOPSIA POR PUNCH CUTÁNEO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS HUMANOS DE ORIGEN DÉRMICO	251
2.1.2 FIBROBLASTOS ALIMENTADORES HUMANOS O <i>FEEDERS</i>	253
2.1.3 CÉLULAS HUMANAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS (HIPSCs).....	254
2.2 CRIOPRESERVACIÓN Y DESCONGELACIÓN	255
2.3 AISLAMIENTO Y CULTIVO NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATÓN POSTNATAL	256
2.4 REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS HUMANOS Y GENERACIÓN DE LÍNEAS HIPSCs	260
2.5 DIFERENCIACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS LÍNEAS HIPSCs A PRECURSORES CEREBELARES Y CÉLULAS DE PURKINJE DE CEREBELO	263
2.6 SELECCIÓN CELULAR POR CLASIFICACIÓN CELULAR ACTIVADA POR FLUORESCENCIA O FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING (FACS) SELECTION	266
2.7 EXTRACCIÓN DE RNA.....	269
2.8 TRANSCRIPCIÓN INVERSA O SÍNTESIS DE cDNA.....	269
2.9 PCR Y RT-PCR	271
2.9.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	271
2.9.2 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL O RT-PCR.....	272
2.10 IMMUNOCITOQUÍMICA / INMUNOFLUORESCENCIA	273
2.11 MICROSCOPIA	274
2.12 ANÁLISIS DE IMAGEN.....	275
2.13 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	278
2.14 SECUENCIACIÓN DE MUTACIONES.....	278
2.15 ANÁLISIS DE LA HUELLA GENÉTICA O <i>FINGERPRINTING</i>	279
2.16 ANÁLISIS DE CAROTIPO	280
2.17 ENSAYO DE DIFERENCIACIÓN <i>IN VITRO</i> DE CUERPOS EMBRIOIDES	281
2.18 TINCIÓN POR FOSFATASA ALCALINA	282
2.19 DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN POR MICOPLASMA.....	283
2.20 ANÁLISIS DE IMAGEN POR INCELL ANALYZER	284
2.21 ANÁLISIS DE SUSTANCIAS REACTIVAS CON ÁCIDO TIOBARBITÚRICO	286

2.22 DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO: RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL Y BIOENERGÉTICA CELULAR	289
2.23 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	296
2.24 WESTERN BLOT	297
2.25 CITOMETRÍA DE FLUJO	298
2.26 ANÁLISIS ELECTROFISIOLÓGICO NEURONAL: <i>WHOLE-CELL PATCH CLAMP</i>	300
2.27 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	304
F. ANEXOS	305
G. SUMMARY	313
H. ABREVIATURAS	357
I. BIBLIOGRAFÍA	363

A. Introducción general

1. Introducción

1.1 Células madre pluripotentes y modelos celulares en enfermedades raras neurodegenerativas

Aproximadamente existen entre 5000-8000 enfermedades raras diferentes que afectan al 6-8% de la población de la Unión europea, es decir, entre 27-36 millones de personas (1).

No existe una definición universal de enfermedad rara, pero está estrechamente ligada al concepto de prevalencia, por lo que las definiciones existentes se basan implícita o explícitamente en un umbral de prevalencia. En Europa, se considera a una enfermedad rara cuando ésta afecta al menos a 5 personas de cada 10.000. Los datos muestran que esta definición de prevalencia no aplica al 90,5% de las enfermedades raras registradas en Orphanet (www.orpha.net), y que la gran mayoría de estas, el 84,5%, se considera ultra rara, siendo su prevalencia de 1 entre 100.000 o menos (1,2). Alrededor del 80% de las enfermedades raras son genéticas y, por tanto, son de carácter crónico, presentando además en la mayoría de los casos déficit motor, sensorial o intelectual, mostrando sus primeros síntomas en la infancia o en la adolescencia. En general, las opciones terapéuticas para las enfermedades raras son escasas y poco efectivas, teniendo solo opciones paliativas. De hecho, alrededor del 94% de las enfermedades raras carecen de tratamiento específico (3). El desarrollo de nuevas terapias y medicamentos para estas enfermedades requiere un esfuerzo en investigación y desarrollo de medicamentos, siendo este uno de los hitos propuestos por el IRDiRC (*International Rare Diseases Research Consortium*) para la década 2017-27 (4).

Más de 15 millones de personas en la Unión Europea sufre alguna enfermedad rara neurodegenerativa según los datos de la Red Europea de Referencia de

Enfermedades raras Neurológicas (*European Reference Network for Rare Neurological Diseases* o ERN-RND), cuyo diagnóstico puede tardar entre meses y años y para la mayoría de ellos no existe tratamiento curativo posible. Los trastornos neurológicos son enfermedades del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP) que pueden presentarse con síntomas heterogéneos según las partes del sistema involucradas en estos procesos patológicos. Existen más de 600 enfermedades del sistema nervioso, siendo algunas más comunes y conocidas como la epilepsia, enfermedad de Parkinson o el accidente cardiovascular, así como otras menos frecuentes como la demencia frontotemporal, ataxias cerebelosas o distonías, trastornos NBIA (*Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation*) y trastornos paroxísticos entre otras, según los datos recogidos por la ERN-RND (**Figura A1**).

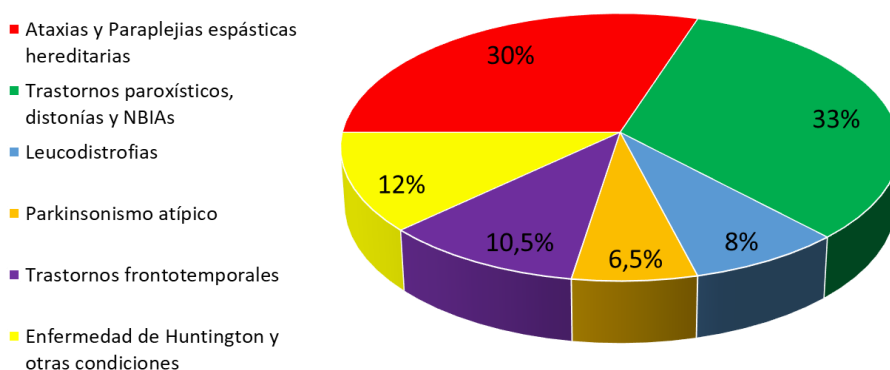


Figura A1 Enfermedades raras neurológicas más representativas según la Red Europea de Referencia de Enfermedades raras Neurológicas. NBIA: *Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation*

A lo largo de estos años, la creciente producción científica está permitiendo establecer las bases moleculares subyacentes a la patología de las enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, revelando procesos dañados que podrían estar asociados a las distintas enfermedades, como la acumulación de proteínas aberrantes o mal plegadas, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, fallos en el transporte axonal y/u homeostasis de metales, provocando a su vez disfunción sináptica. Todos estos eventos unificados, y en muchos casos de progresión lenta, son los causantes de los trastornos neurodegenerativos.

Los modelos de enfermedad están siendo herramientas indispensables para entender los mecanismos moleculares y celulares que guían la patogénesis y facilitan y permiten el desarrollo de nuevos fármacos. Modelar trastornos neurológicos siempre ha sido un desafío particular debido a la complejidad del sistema nervioso humano y de sus propiedades. Los modelos animales, las células primarias neuronales y las líneas celulares inmortalizadas han contribuido a la comprensión de las enfermedades neurológicas, y en estos últimos años, los modelos basados en la utilización de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) han ganado relevancia en tanto que replican la fisiopatología existente en el paciente (5).

La principal ventaja de utilizar modelos animales es que permiten estudiar la enfermedad *in vivo* en un organismo completo. Sin embargo, los mecanismos moleculares de diferenciación pueden variar de un organismo a otro, no reproduciendo de forma fidedigna la enfermedad en humanos debido a la composición y organización compleja de los tejidos y órganos humanos, y a diferencias genéticas y metabólicas entre especies. Además, la respuesta de los modelos animales a cribados masivos de tratamientos (*drug screening*) no siempre coinciden con los estudios realizados en células humanas *in vitro* o incluso en

organismos humanos, lo que provoca una alta tasa de fracaso en el desarrollo de fármacos basados en modelos animales (6,7).

En otros estudios, se están usando células primarias humanas (y/o de origen animal) como modelo de enfermedad para simplificar la complejidad de un organismo vivo y permitir una manipulación experimental más sencilla (8). Sin embargo, la inaccesibilidad a los tejidos frescos de pacientes es un obstáculo, especialmente la obtención de tejidos del sistema nervioso. Los tejidos *post-mortem* tienen una disponibilidad limitada y representan la enfermedad en la etapa final donde, por lo general, se ven alterados por procesos secundarios asociados a la enfermedad. No obstante, las células neuronales son extremadamente sensibles al suministro de oxígeno y sangre, lo que hace su aislamiento un desafío. Además, las células primarias, en particular las células primarias neurales, tienen carácter post-mitótico y son difíciles de expandir para satisfacer la necesidad de experimentos en un entorno de cultivo *in vitro* en el laboratorio (9–11).

Para aumentar la disponibilidad de células para experimentos, las líneas celulares inmortalizadas derivadas de tumores cerebrales son utilizadas como modelos de enfermedad neuronal. Sin embargo, a pesar de que tienen una alta capacidad proliferativa en comparación con las células primarias, su linaje oncogénico hace que sus características metabólicas difieran lo suficiente como para no reflejar por completo los procesos de la enfermedad en estudio (11–13).

La utilización de células madre pluripotentes, incluyendo tanto las células madre embrionarias humanas (hESCs) como las iPSCs, de individuos sanos y pacientes, ha permitido la creación de modelos *in vitro* para el estudio del desarrollo del cerebro humano y la patología de enfermedades neurológicas asociadas, siendo

especialmente útiles por ejemplo en patologías donde los modelos animales no son posibles o no están disponibles. Su capacidad de renovación, pluripotencia y diferenciación permite la generación de distintas poblaciones celulares neurales con fenotipos específicos de cada enfermedad, haciendo de ellas una herramienta muy útil para su estudio.

En 1998, Thomson y cols. obtuvieron las primeras líneas de hESCs, cultivando células del blastocisto con un cóctel de factores de crecimiento y sobre una capa de células alimentadoras (en inglés *feeder*) de fibroblastos de ratón (14). Los primeros modelos generados se consiguieron a partir de embriones que portaban una enfermedad monogénica conocida o a partir de la modificación genética de las hESCs, lo que hace de este un método muy restrictivo puesto que solo está disponible para unas pocas enfermedades (15). Sin embargo, actualmente el uso tanto en investigación básica como en aplicaciones clínicas de las hESCs se está complicando por los problemas éticos originados por la utilización de embriones humanos (16,17).

En 2007, tanto Yamanaka y cols. como Thomson y cols., descubrieron cómo utilizar las células somáticas para generar células madre humanas pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs) mediante la introducción de varios factores de transcripción (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, LIN28, NANOG). Utilizaron distintas combinaciones de estos factores con el fin de sobre-expresarlos y reprogramar las células de partida. Esto supuso un nuevo método para generar células madre pluripotentes específicas de pacientes con una determinada enfermedad (18,19).

Desde entonces y hasta ahora, la metodología para el desarrollo de esta tecnología ha ido mejorando enormemente. Teóricamente, las hiPSCs pueden derivarse a partir cualquier tipo de célula somática, aunque las más utilizadas son las células de

la sangre (monocitos), de orina o células dermales como los fibroblastos, debida a su mínima invasión y disponibilidad (**Figura A2**) (20).

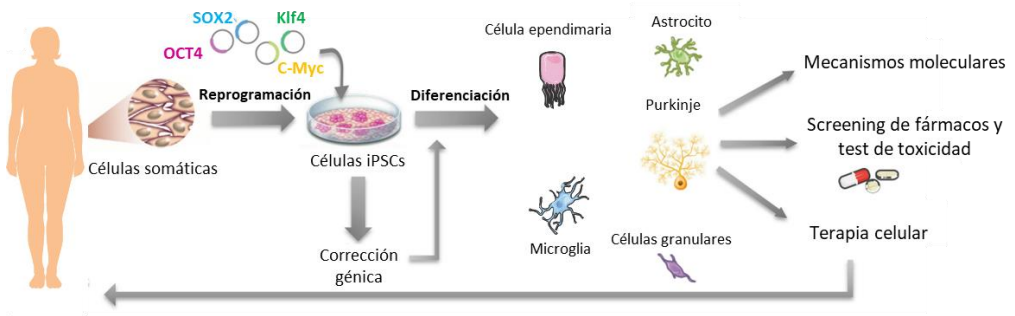


Figura A2 Resumen esquemático del proceso de reprogramación y diseño de modelos celulares de enfermedad. Las células somáticas de pacientes se reprograman hacia hiPSCs mediante la utilización de cuatro factores de transcripción (OCT4, SOX2, Klf4, c-Myc). Posteriormente, a las hiPSCs se les somete a un proceso denominado diferenciación, dando lugar a células neurales que podrían servir como fuente de células para investigar los mecanismos de la enfermedad, la patología y la detección de fármacos para el desarrollo futuro de nuevas terapias de distintas enfermedades.

Esta tecnología se ha aplicado con éxito para estudiar varias enfermedades raras neurodegenerativas como por ejemplo el síndrome de Rett, la ataxia de Friedrich (FRDA) o el síndrome de Dravet, diferenciando hiPSCs generadas a partir de células dermales de los mismos pacientes hasta distintos tipos neuronales en sistemas de dos dimensiones (2D), donde han podido establecer distintas características celulares asociadas a cada enfermedad (21–23). Además, esta tecnología sirve para investigar condiciones genéticas tales implicadas en el desarrollo como la microcefalia, mediante la diferenciación de hiPSCs a modelos en 3 dimensiones (3D) de partes del cerebro, denominados organoides neurales (24,25).

El desarrollo de modelos celulares en 2D y 3D basados en la utilización de las hiPSCs ofrece una fuente muy necesaria de herramientas para el modelado

neurológico y el estudio de los procesos que subyacen en una enfermedad porque replica con mayor exactitud la fisiopatología existente en el paciente. Si bien estos modelos son fisiológicamente más simples que los animales, a medida que avanza la tecnología (ingeniería tisular en 3D/organoides y/o co-cultivos celulares definidos) la capacidad de aumentar la complejidad y de modelar los tipos de células neuronales humanas y los circuitos es cada vez mayor (26–28). Al mismo tiempo, su relevancia para la condición humana es mucho mayor en comparación con el cultivo tradicional de líneas celulares primarias inmortalizadas o no humanas. Una combinación de distintos enfoques basados en hiPSCs y modelos animales ofrecería la mejor oportunidad para recapitular tanto la complejidad fisiológica como la relevancia para el cerebro humano.

1.2. Obtención de células de Purkinje de cerebelo a partir de células madre pluripotentes

El desarrollo neural es un proceso complejo regulado por diversos factores, y aunque muchos estudios en modelos animales han revelado mecanismos asociados, este complicado sistema no se ha dilucidado por completo a nivel celular y/o molecular. Históricamente, se han utilizado animales modelo como *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *Xenopus Laevis* (ranas), aves y roedores para estudiar los mecanismos moleculares para la inducción neural de los vertebrados (29–32). En el estadio de embrión, las células madre (no comprometidas) adquieren características específicas de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) gracias a patrones de señalización que normalmente proceden de centros de señalización especiales (33). En esta etapa, las zonas o áreas de señalización especial denominadas organizadores, ejercen fuertes efectos inductivos en un área relativamente amplia de los tejidos embrionarios jugando un papel crucial en la formación de patrones mediante la

creación de gradientes de morfógenos y secretando los factores que se denominan “inductores neurales”.

En primer lugar, el organizador de Spemann, denominando así por su descubrimiento por Spemann y Mangold en 1924, especifica el patrón dorsoventral (DV) y anteroposterior (AP) del embrión de *Xenopus Laevis* en la etapa gástrula. El organizador en mamíferos se denomina nódulo, y provoca la diferenciación de la masa celular embrionaria en mesodermo dorsal (notocorda) que a su vez induce a la formación la placa neural que dará lugar al tubo neural (neuroectodermo) (**Figura A3**). Los inductores neurales producidos en el tubo neural actúan sobre las células ectodérmicas adyacentes convirtiendo de manera consecutiva los progenitores neurales en neuronas (34–36). Dentro del neuroectodermo regionalizado, y debido a los procesos reguladores morfogenéticos, se forman organizadores secundarios que regulan la identidad y la polaridad de regiones neuroepiteliales vecinas. Por lo que posteriormente, el organizador ístmico (IsO) secundario ejerce su actividad definiendo las identidades neurales locales induciendo el patrón AP y marcando el límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo (*mesoderm-hindbrain boundary* o MHB) (37).

En los primeros estudios sobre el neurodesarrollo se identificaron varias moléculas con actividad inductiva neural como son *Noggin*, *Follistatin* y *Chordin* (38–41). Estas moléculas ejercen su actividad inductiva neural a través de la inhibición de vías que favorecen la diferenciación en linajes no neuronales, como la vía de señalización de la proteína morfogénica ósea (BMP), que conduce a la especificación del destino epidérmico del ectodermo o la vía de la Activina/Nodal que promueve la inducción a linaje meso-endodérmico (42–44). Se demostró que estas moléculas son antagonistas de las BMP y la Activina/Nodal, cuya señalización es a través de

componentes de la vía, eran capaces de inducir la inducción neural del ectodermo (45,46).

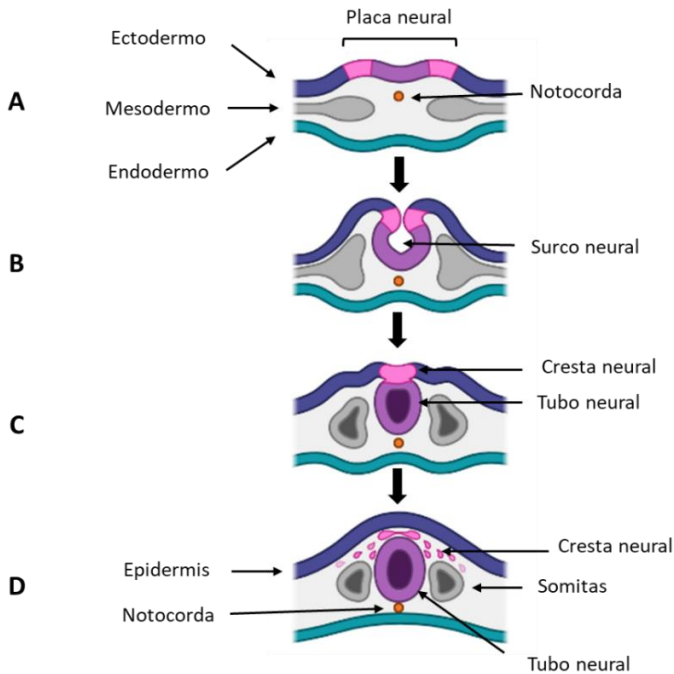


Figura A3 Esquema del desarrollo del tubo neural o neurulación. **A)** Establecimiento de las tres capas germinales en el embrión: ectodermo (azul), mesodermo (gris) y endodermo (verde). En naranja: notocorda. La placa neural se forma gracias a la inducción de las células que migran debajo del a través del nodo para convertirse en endodermo y mesodermo. Las señales emitidas por el centro organizador, por la línea primitiva y por la notocorda inducen la diferenciación de las células ubicadas en la línea media, convirtiéndolas en células progenitoras neurales formadoras de la placa neural. **B)** las células de la placa neural proliferan y se elevan, hasta convertirse en los pliegues neurales. **C)** los pliegues se fusionan para formar el tubo neural. **D)** Segunda neurulación. Formación del ectodermo no neural o epidermis (azul), neuroectodermo o tubo neural (morado), somitas a partir de mesodermo (gris) y en células de la cresta neural (rosa). Imagen creada utilizando elementos de SMART (Servier Medical Art), Creative Commons.

La diferenciación de células madre pluripotentes a células neurales *in vitro* lleva realizándose desde hace muchos años, a partir del establecimiento de las primeras

células madre embrionarias (ESCs) (47). En dichos estudios, los protocolos se basaban en el cultivo de células madre embrionarias de ratón (mESCs) en agregados o cuerpos embrioides (EBs), formados de manera espontánea, además de utilizar como método de diferenciación distintos factores inductivos como el ácido retinoico, consiguiendo que las células expresasen múltiples fenotipos normalmente asociados con las neuronas. Sin embargo, estos métodos eran muy sensibles a las variaciones de un experimento a otro (48,49).

Para abordar el problema de la variación entre experimentos y en base a los estudios anteriores sobre neurodesarrollo, Studer L y cols. (50) desarrollaron un método rápido y eficiente para la inducción neural de células madre pluripotentes. Este método se basaba en la inhibición dual de la vía SMAD (dSMADi) mediante la utilización de inhibidores de la vía BMP e inhibidores la vía Activina/Nodal mediante la utilización de las moléculas Noggin y SB431542 respectivamente, demostrando claramente que dSMADi es el requisito mínimo para la especificación neuronal en la embriogénesis de mamíferos (Figura A4). Este método es ahora el estándar de oro para la generación de células neuronales derivadas de células madre pluripotentes (51).

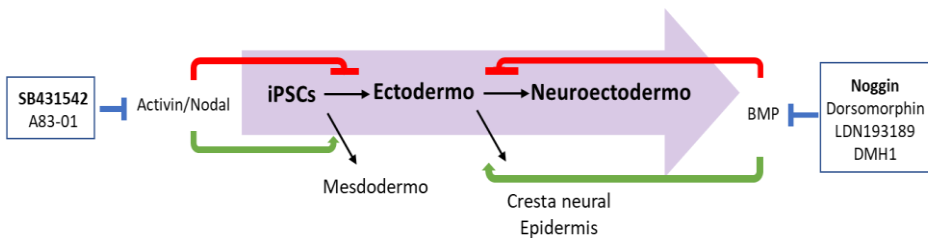


Figura A4 Diferenciación dirigida de PSC en el linaje neural mediante inhibición dual de SMAD (dSMADi). Esquema para la diferenciación neuronal de las iPSCs. La inhibición dual de la vía SMAD conduce a la inducción selectiva de neuroectodermo mediante la prevención de linajes no neurales. SB431542 y Noggin se utilizaron inicialmente en el informe original de Studer et al.2009 (50), y ahora también se han utilizado otros inhibidores de molécula pequeña dirigidos a vías de señalización SMAD específicas. Adaptada de Imaizumi et al. 2020 (51).

El destino celular y la función de los progenitores neurales del sistema nervioso formados durante el neurodesarrollo depende en gran medida de su posición a lo largo de los ejes DV y AP, es decir, de la información posicional proporcionada por señales extracelulares (p. ej., moléculas de señalización secretadas). El tubo neural se subdivide, a lo largo del eje AP, en prosencéfalo (cerebro anterior), mesencéfalo (cerebro medio), rombencéfalo (cerebro posterior) y médula espinal (52).

Una característica importante de los progenitores neurales derivados de células madre pluripotentes es que adoptan de manera espontánea el destino del prosencéfalo rostral, de acuerdo con el “modelo de activación-transformación de Nieuwkoop”, a menos que reciban señales caudalizadoras (52–54). A partir de los experimentos con anfibios, Nieuwkoop propuso un modelo de dos pasos para la especificación regional, conocido como “activación-transformación” (55,56). Este modelo sostiene que las células ectodérmicas primero son inducidas a una identidad neural equivalente al prosencéfalo (“activación”), y luego las células entran en destinos posteriores, convirtiéndose en mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal (“transformación”).

En los modelos neuronales basados en células madre pluripotentes, incluidos los métodos basados en la formación EBs y dSMADi, las células diferenciadas se ajustan por defecto a la especificación del prosencéfalo, lo que demuestra que el paso de activación en el modelo de Nieuwkoop (52,57). Sin embargo, igualmente se puede recapitular el paso de transformación.

La transformación o posteriorización está modulada por varias señales de patrones, como por ejemplo el ácido retinoico, donde el tratamiento con niveles moderados en progenitores neurales de tipo prosencéfalo hace que adquieran identidad de mesencéfalo/rombencéfalo. Mientras que, a altas concentraciones de ácido

retinoico las células se convierten en progenitores neurales de tipo médula espinal (58,59). La señalización por la vía canónica de WNT y factores de crecimiento de fibroblastos (FGF; *fibroblast growth factor*) podría explicar la inducción a la posteriorización de células neurales de una manera dependiente de la concentración a lo largo del eje AP en vertebrados. Esto se ha demostrado también en modelos basados en células madre pluripotentes, en los que se han obtenido distintas células neurales regionalizadas (60–62).

Durante el desarrollo embrionario, el cerebelo surge de la región dorsal del rombencéfalo rostral (rombómero 1) y depende de la formación y función del IsO. El factor de crecimiento de fibroblastos 8b (FGF8b; *fibroblast growth factor 8b*) es secretado por el propio IsO y tras el inicio de su expresión, aumenta la expresión de *Wnt1*, factor de señalización clave en el MHB. Estos dos factores forman un bucle de retroalimentación positiva automática necesaria para impulsar la expresión de otros factores de transcripción específicos de la región, como *En1/2*, *Pax2/5/8*, *Otx2* y *Gbx2* (37,63,64). Además, la señalización de FGF8B puede actuar en el IsO junto con otras moléculas de señalización como *Sonic Hedgehog* (SHH) y miembros de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF- β). La actividad morfogénica del IsO es así la consecuencia de la expresión temporoespacial específica de señales moleculares que regulan la especificación y el desarrollo estructural de los territorios neuroepiteliales mesencefálicos y cerebelosos. Un gradiente decreciente de concentración de FGF8B en la placa alar del istmo y rombómero 1 (r1) es fundamental para la supervivencia celular y el desarrollo diferencial de las regiones cerebelosas (65).

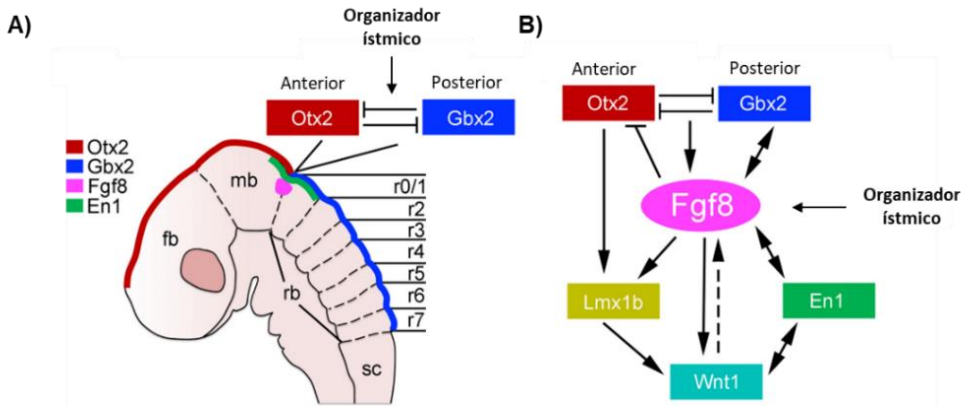


Figura A5 Esquema del establecimiento del patrón anteroposterior (AP) y del límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo (MHB). **A)** Visualización esquemática del establecimiento molecular y anatómico de los bordes cerebrales anterior y posterior mediante la expresión de Otx2 y Gbx2 en un embrión de ratón en desarrollo entre E8-E8.5. Se indican el prosencefalo (fb), el mesencéfalo (mb), el rombencéfalo (rb) y la médula espinal (sc). Se representan unidades morfológicas transitorias del rombencéfalo (rombomero r1) y la expresión de los factores esenciales FGF8b y En1 para el desarrollo del cerebelo. **B)** Vías moleculares que operan en el MHB y el establecimiento del organizador ístmico (IsO). Figura adaptada de Lowenstein. *et al.* 2022 (66).

Los primeros protocolos que se desarrollaron para la recapitulación *in vitro* del desarrollo embrionario del cerebelo se basaron en el cultivo de mESCs y la aplicación de señales extracelulares implicadas en la inducción del patrón temprano del tubo neural y la región cerebelosa, seguidas de factores proteicos morfogenéticos óseos, mitógenos y neurotrofinas para inducir su regionalización/especificación celular (67,68).

En estos estudios se generaron cultivos de células cerebelosas funcionales como células granulares, células gliales del cerebelo y **células de Purkinje de cerebelo (CPCs; ingl: cerebellar Purkinje cells)** en monocapa o en suspensión. Sin embargo, aunque la diferenciación a células granulares fue altamente eficiente en estos estudios, la inducción de CPCs fue de moderada a baja (1-3% del total de neuronas) incluso con tratamientos con BMP4 y FGF8b (69,70).

Estos primeros estudios implementaron la diferenciación de mESCs en neuronas cerebelosas, utilizando diferentes enfoques, sirvieron de guía para varios estudios destinados a aumentar su eficiencia. En 2010, Muguruma y cols. (71) presentaron un estudio por el cual, a partir de la diferenciación de mESCs en 3D, se podían obtener células del linaje cerebelar de una manera eficiente, incluidas las CPCs (25-35% del total de células). Este nuevo método se basó en la utilización en cultivo de dos factores moderadamente caudalizantes como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2/bFGF; ingl: *(basic) fibroblast growth factor 2*) y la insulina, que permitían recapitular el microentorno de señalización del IsO de manera auto inductiva. Esta combinación permitía la formación *in vitro* del IsO en cultivo mediante la inducción de un gradiente de expresión de En2+/Otx2+. Observaron una diferenciación robusta (> 80 % de eficacia) de los progenitores neuronales En2+, que representan las regiones del mesencéfalo caudal a las regiones rostrales del rombencéfalo (**Figura A5**). Al mismo tiempo, confirmaron que estas señales aumentan los niveles de FGF8b y Wnt1, promoviendo a su vez la especificación/regionalización cerebelar del resto de progenitores neuronales derivados del cultivo de las mESCs. La aparición de precursores de CPCs surge por la inhibición de la señalización de SHH por medio de un antagonista, la ciclopamina (71). Mediante este protocolo se incrementó la proporción de **células precursoras cerebelares (CCPs; cerebelar cell precursors)**, generando entre un 35–42 % de progenitores de CPCs en el día 11 de la diferenciación de mESCs (**Figura A6**) (66,69).

Este nuevo método de especificación dorsal de manera pasiva de la diferenciación de las mESCs permitió además obtener CPCs que expresaban marcadores específicos de neurona madura aparte de una morfología y características propias con dendritas muy arborizadas (72). Con este propósito, se utilizó el marcador de superficie Neph3 para seleccionar los progenitores de CPCs y obtener un enriquecimiento de estas células a día 13 del protocolo. Aproximadamente un 87 %

eran L7+ (marcador específico de CPC en ratones, también denominado PCP2 en humanos; en inglés *Purkinje cell protein 2*) a las 4 semanas después de inyectarlas en la palca cerebelar de un ratón a estadio E15.5, confirmando así la capacidad de generar CPCs (73–75).

Posteriormente y para conseguir una alta supervivencia y una maduración *in vitro* de los progenitores de CPCs, Muguruma y cols. co-cultivaron las células Neph3+ con células granulares del cerebelo de ratón derivadas del labio rómbico (E15.5), promoviendo un microambiente (microambiente trófico) propicio para la maduración y supervivencia de las CPCs *in vitro*, generando una gran cantidad de neuronas L7+/Calbindina+/Parvalbúmina+ con dendritas características altamente arborizadas pasados 40-80 días de protocolo (**Figura A6**) (71,76).

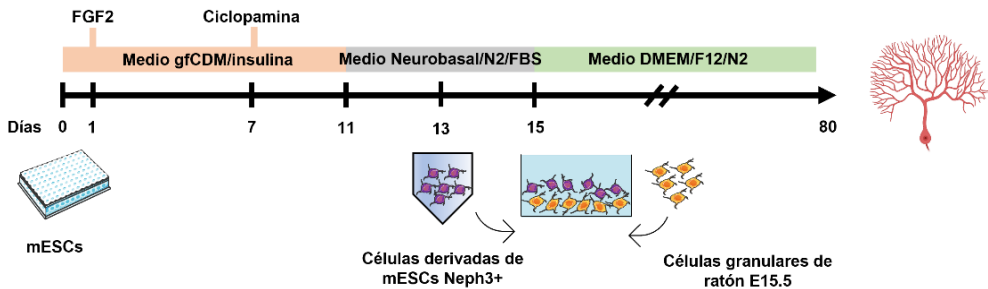


Figura A6 Esquema representativo del protocolo de diferenciación *in vitro* de mESCs a células de Purkinje de cerebelo. Inicialmente, las mESCs se disociaron y se cultivaron en pocillos de una placa de 96 pocillos de baja adhesión celular (fondo en U). Las células se reagregaron rápidamente de manera espontánea en 1 a 2 días. Después de la inducción neural y diferenciación cerebelar mediante FGF2 y ciclopamina, se seleccionaron por FACS los precursores de CPCs Neph3+. Las células seleccionadas por FACS se reagregaron el día 13, y el día 15 se disociaron y se volvieron a colocar en placas junto con precursores de células granulares del labio rómbico superior de ratones E15.5. Figura adaptada de Muguruma *et al.* 2010 (71) utilizando elementos de SMART (Servier Medical Art), Creative Commons.

Los estudios pioneros de la diferenciación cerebelosa de mESCs se tradujeron posteriormente a protocolos con células madre pluripotentes humanas que con los años se han ido refinando y aplicando en hESCs e iPSCs (77–80).

En 2015, tras del éxito en la inducción de los componentes neuronales del cerebelo en mESCs, Muguruma y cols. cultivaron las hESCs en suspensión para favorecer la autoformación de agregados y diferenciarlos en tejidos tridimensionales ensamblados espacialmente con múltiples tipos de células, que imitan la organización tisular del cerebelo mediante la inducción a neuroectodermo y posterior formación *in vitro* del IsO en cultivo. Describieron por primera vez *in vitro*, la formación de tejido cerebeloso 3D autoformado, denominados organoides cerebelosos, más próximos al programa de desarrollo endógeno (Figura A7) (77).

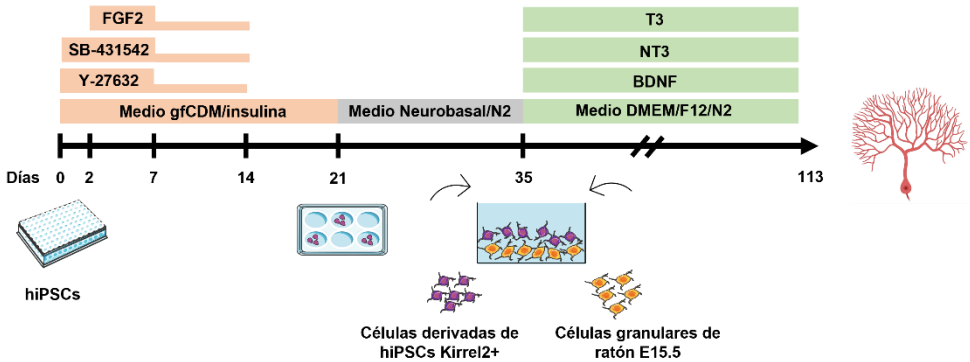


Figura A7 Esquema representativo del protocolo de diferenciación *in vitro* de hESCs a células de Purkinje de cerebelo. Inicialmente, las hESCs se disociaron y se cultivaron en pocillos de una placa de 96 pocillos de baja adhesión celular (fondo en V). Las células se reagregaron rápidamente de manera espontánea en 1 a 2 días. Después de la inducción neural y diferenciación cerebelar mediante Insulina/FGF2/SB-431542, el día 21, los agregados se transfirieron de una placa de 96 pocillos a una placa de Petri de baja adherencia y se cultivaron en suspensión utilizando medio Neurobasal/N2. A día 35 se seleccionaron por FACS los precursores de CPCs Kirrel2+. Las células seleccionadas por FACS se reagregaron el día 35, y el día 37 se disociaron y se sembraron con precursores de células granulares del labio rómbico de ratones E15.5. Figura adaptada de Muguruma et al. 2015 (77) utilizando elementos de SMART (Servier Medical Art), Creative Commons.

Además de utilizar SB431542 como inhibidor del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) para bloquear la diferenciación mesenquimal y promover la diferenciación neuroectodérmica del cultivo celular (**Figura A4**), utilizaron factores caudalizantes como el FGF2 y la insulina para inducir la formación del ISO y el límite entre el mesencéfalo y rombencéfalo (81). Identificaron además dos factores, el factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19) y el factor 1 derivado de células estromales (SDF1), que promueven la autoformación de tejidos similares a CCPs, ordenadas de distintas maneras con polaridad espontánea en el cultivo de las hESCs 3D (82,83).

Bajo las condiciones expuestas anteriormente, las células generadas en los organoides cerebelares expresaban la proteína Kirrel2 (homólogo murino Neph3), marcador temprano de CPCs, que sirvió para su selección por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS; *fluorescence-activated cell sorting*) para obtener un enriquecimiento de estas células a día 35 del protocolo. A continuación, se co-cultivaron con células ratón, células de la capa externa granular (EGL; *external granule layer*) derivadas de labio rómbico embrionario para promover la maduración de las CPCs (**Figura A7**) (71,77). Después de un cultivo a largo plazo, las células obtenidas y positivas para la proteína Calbindina desarrollaron ramas y espinas dendríticas elaboradas que son positivas para el receptor GRID2 de glutamato específico de las CPCs (69). El diámetro de estas células derivadas de hESCs era similar al de las CPCs fetales humanas ($27,2 \pm 2,4 \mu\text{M}$, referido entre 25 y $40 \mu\text{M}$ en Laphan y Markserhy (84). Las CPCs maduras derivadas de hESCs tenían un diámetro celular y un crecimiento dendrítico más largo que las células derivadas de mESCs (cultivadas 89-97 días).

Sin embargo, otros estudios apuntan a que ni el co-cultivo de los precursores de CPCs generadas mediante los factores caudalizantes FGF2 e insulina, con

precursores de células granulares de embrión de ratón ni con rodajas de cerebelo de rata, es óptimo para la maduración y correcta funcionalidad de las CPCs en condiciones de cultivo *in vitro*, aunque sí en morfología y expresión de proteínas características. Wang. y cols. sostienen que el co-cultivo con rodajas de cerebelo fetal humano les condujo a obtener Purkinje, no solo morfológicamente correctas, sino también electrofisiológicamente funcionales (78).

Otros enfoques han tenido como objetivo aumentar la proporción de CCPs derivadas de hESCs mediante la aplicación de distintas moléculas para recapitular un patrón del cerebro posterior, descritas en mESCs (67,68). En 2010, Erceg y cols. diseñaron por primera vez un protocolo para inducir la diferenciación de hESCs a células progenitoras del IsO (mesencéfalo/rombencéfalo) y posteriormente a células del linaje cerebelar, aplicando señales distintas inductivas que también están envueltas en el desarrollo temprano del tubo neural y especificación. Los resultados fueron consistentes con los estudios previamente realizados con las mESCs, donde utilizando los factores FGF, WNT y ácido retinoico inducían el desarrollo temprano de la región cerebelar en el tubo neural, seguido de las señales de los factores BMP4/BMP6 y GDF3, mitógenos como SHH y JAG1 y neurotrofinas como BDNF y NT3, provocando la diferenciación directa de hESCs a células cerebelares funcionales como neuronas granulares, CPCs, interneuronas y células gliales. La inducción de CPCs PCP2+ derivadas de hESCs fue considerablemente mayor (en torno a un 11%) en comparación con los protocolos derivados de mESCs. Este estudio, a pesar de inducir a una mayor diferenciación del linaje cerebelar, produjo una población heterogénea que expresaba marcadores de células cerebelares. Sin embargo, los resultados confirmaron que sí se podían aplicar los mismos mecanismos de diferenciación neuronal en las hESCs que en las mESCs, pese a la poca información disponible sobre los patrones de desarrollo y especificación neuronal en el cerebelo humano, pues los análisis de

expresión génica de este proceso coincidían con sus homólogos murinos durante la diferenciación, aunque algunos marcadores revelaron un patrón de expresión temporal distinto (85).

Utilizando un enfoque de diferenciación más dirigido y directo, en 2018, Sundberg y cols. diseñaron un protocolo de diferenciación basado en la inducción de la diferenciación neural mediante la inhibición dual de la vía SMAD y en presencia de nicotinamida, que mejora el compromiso neural de las células madre durante el desarrollo (**Figura A8**) (50,86,87). A continuación, para la posterización y diferenciación al linaje cerebelar de células neuroepiteliales resultantes, utilizaron distintos factores de crecimiento y moléculas pequeñas cruciales en el desarrollo del cerebelo embrionario *in vivo* (**Figura A5**). El protocolo se basó en la activación de la señalización de la vía de WNT utilizando la molécula CHIR-99021, para generar un gradiente que siguiera el patrón específico rostral-caudal y dirigir la diferenciación de las iPSCs.

Después de la inducción neural y el patrón rostral-caudal inicial, la utilización de FGF8b y bFGF, indujo el desarrollo de los límites del mesencéfalo/rombencéfalo *in vitro*, induciendo así la especificación posterior de los precursores neuronales hacia cerebelo. Las CCPs resultantes de esta inducción expresaban, siguiendo un patrón temporal durante la diferenciación, distintos marcadores progenitores neurales asociados al rombencéfalo, como EN1/2, GBX2, y a CPCs, PTF1a, KIRREL2 y SKOR2. Además, se detectaron también marcadores de fenotipo GABAérgico y marcadores de CPCs inmaduras, como PCP2 (87). A continuación, Sundberg y cols. (87), para conseguir la maduración de los precursores de CPCs y obtener neuronas adultas funcionales, co-cultivaron la población de progenitores de CPCs derivadas de iPSCs, previamente enriquecida con células granulares de ratón postnatal (P4-7). Para su enriquecimiento, utilizaron un método utilizado anteriormente para

purificar CPCs de ratón a partir de cultivos de cerebelo primario que se basó en la selección de células mediante el marcador THY1 en lugar de KIRREL2, utilizado hasta entonces en otros protocolos con hESCs (88,89) (Esquema recogido en **Figura A8**).

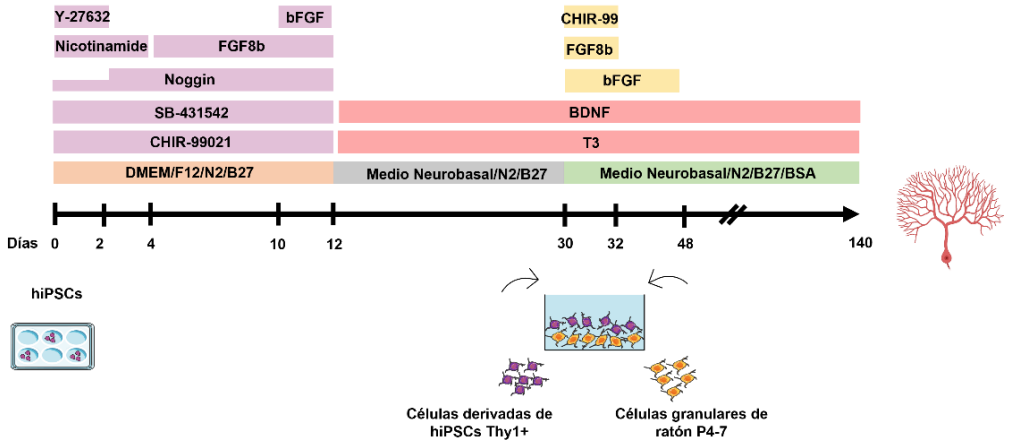


Figura A8 Esquema representativo del protocolo de diferenciación *in vitro* de hiPSCs a células de Purkinje de cerebelo. Inicialmente, las hiPSCs se disociaron y se cultivaron en pocillos de placas de 6 pocillos de baja adherencia. En este procedimiento, las células se reagregaron rápidamente de manera espontánea en 1 a 2 días. Después de la inducción neural y diferenciación cerebelar mediante los distintos factores en el esquema expuestos el día 30, se seleccionaron por FACS los precursores de CPCs THY1+. Las células seleccionadas por FACS se reagregaron el día 30, y el día 37 se disociaron y se volvieron a colocar en placas junto con precursores de células granulares del cerebelo de ratones P4-7. Figura adaptada de Sundberg *et al.* 2018 (87) utilizando elementos de SMART (Servier Medical Art), Creative Commons.

Las CPCs derivadas de hiPSCs en co-cultivo, adquirieron una morfología bipolar con ramificaciones cortas alrededor del día 54-60, que posteriormente aumentaron en tamaño y número. El soma celular desarrolló una forma ovalada típica de las PC en torno a los días 83-90 de cultivo. Las CPCs más maduras expresaban los marcadores tardíos de Purkinje como PCP2 y calbindina, y en torno a los días 100-140 presentaban una estructura/morfología altamente ramificada además de expresar

marcadores pre y postsinápticos, indicando sinapsis y funcionalidad de las Purkinje (87).

A día de hoy, para conseguir un fenotipo realmente maduro de las CPCs y células granulares derivadas de células madre pluripotentes, ya sea de mESCs, hESCs o hiPSCs, solo se ha conseguido bajo condiciones muy definidas de co-cultivo o mediante el trasplante de células diferenciadas en el cerebelo de ratón. En los primeros estudios de diferenciación cerebelar se demostró el potencial que tenían las neuronas derivadas de mESCs y hESCs en convertirse en neuronas cerebelosas funcionales mediante trasplante ortotópico en cerebelo de ratón en desarrollo (67,68,71,87). La presencia de células gliales y otros tipos de células neuronales, así como el contacto célula-célula facilita la diferenciación y maduración de las células a neuronas, regulando el desarrollo sináptico y la conectividad mediante la liberación al medio de glutamato o ATP, entre otras moléculas con actividad sináptica (76,90). Por esta razón, la mayoría de los protocolos anteriormente mencionados, han usado la técnica del co-cultivo para favorecer la maduración de las CCPs, y en concreto los precursores de CPCs y poder estudiar sus características electrofisiológicas *in vitro*.

A la vez que una neurona se diferencia y madura, aumenta su complejidad neuronal a través del crecimiento dendrítico y la expresión de canales iónicos como canales de sodio y potasio (72,76). Si bien el uso de inmunofluorescencia ha permitido revelar la presencia de estos marcadores neuronales clave y el desarrollo dendrítico en neuronas derivadas de células madre pluripotentes, la observación de parámetros electrofisiológicos ha demostrado estados de inmadurez. En los últimos años, algunos estudios han investigado la evolución de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas derivadas de mESCs durante su maduración a

partir de progenitores en ratones o ratas *in vivo* o *in vitro*, aunque estos trabajos no se han replicado completamente en neuronas derivadas de hiPSCs (91,92).

Algunos estudios recientes han descrito el cambio de las propiedades electrofisiológicas basales de las células durante su diferenciación en neuronas y su maduración, centrándose en protocolos particulares de diferenciación o en la comparación entre mESCs e iPSCs (93,94). Los parámetros asociados a propiedades intrínsecas o fisiológicas, como pueden ser la presencia de potenciales de acción, corrientes de sodio-potasio, la resistencia de membrana y el potencial de reposo de membrana, actividad eléctrica espontánea están asociados a la maduración neuronal.

Las propiedades electrofisiológicas de las CPCs derivadas de células madre pluripotentes han sido analizadas, entre otras, mediante la técnica conocida en inglés como *whole cell patch clamp*, basada en la aplicación de un pulso a un voltaje determinado y registrando la variación del potencial de membrana (94,95). Las CPCs cerebelares derivadas de hiPSCs o hESCs presentaron propiedades electrofisiológicas de CPCs conocidas en otras especies como potenciales de acción de repetición típicos de neuronas tras la inyección de corriente, siendo capaces de despolarizarse y repolarizarse, además de presentar señales inhibitorias y excitatorias espontáneas (77,87). Wang *et al.* co-cultivaron las células precursoras de Purkinje con cortes de cerebelo fetal humano dando como resultado CPCs electrofisiológicamente activas. Propusieron la necesidad de interacciones no solo con neuronas granulares sino con células gliales, además de factores específicos humanos para una maduración adecuada. Sin embargo, la utilización de rodajas de cerebelo fetal humano afronta, además de problemas con la disponibilidad del tejido, diversos problemas éticos que dificultan su utilización (78).

Un desafío importante para la obtención de neuronas de cerebelo maduras derivadas de células madre pluripotentes es el cultivo a largo plazo y la maduración sin la presencia de co-cultivo con células/tejidos de ratón. A pesar de la capacidad demostrada de las neuronas derivadas de células madre pluripotentes para madurar y convertirse en neuronas cerebelosas funcionales utilizando el uso del sistema de co-cultivo, este tiene limitaciones *per se*. Las células alimentadoras introducen una variabilidad inherente al procedimiento, dejándose ver la necesidad de comprender mejor los factores que promueven su maduración. Además, otra limitación para la mayoría de las neuronas de cerebelo derivadas de hiPSCs o hESCs, como para las neuronas humanas en general, es la falta de firmas transcriptómicas que permitan identificar de manera más rigurosa los tipos específicos de neuronas y poder comparar su desarrollo entre especies (94,96).

En los últimos dos años, diversos estudios han desarrollado protocolos basados en la aplicación de mejoras a los problemas en los anteriormente descritos, buscando dilucidar distintos métodos de obtención, diferenciación y maduración de las células cerebelares a partir de hiPSCs.

Bulchoz *et al.*, en 2020, realizaron un análisis comparativo de patrones de expresión de la diferenciación de CPCs derivadas de hiPSCs (utilizando el protocolo Sundberg *et al.* 2018 (87) como base con algunas modificaciones) y del desarrollo de CPCs de ratón. Mediante el análisis, observaron que las CPCs derivadas de hiPSCs comparten firmas de expresión génica clásicas y de desarrollo con las CPCs de ratón en desarrollo. Además, el perfil de expresión génica también identificó genes específicos de humanos en CPCs derivadas de hiPSCs además de diferencias en el momento de expresión de estos. Sorprendentemente, las CPCs derivadas de hiPSCs maduras mediante co-cultivo, durante aproximadamente dos meses, son

las más cercanas a las CPCs de ratón joven (P21), lo que sugiere que son relativamente maduras (97).

Por último, Silva y cols., obtuvieron neuronas del linaje cerebelar maduras sin co-cultivo de neuronas de otras especies (80). Inicialmente, cultivaron hiPSCs en un medio definido utilizando los factores descritos por el estudio de Muguruma *et al* 2015 (77) (FGF2, SB43, FGF19 y SDF1) para inducir la formación del neuroepitelio cerebelar y recapitular la estructura multicapa, aunque no la formación del labio róbico que inicialmente describieron. Posteriormente, las células CCPs generadas, sin selección o enriquecimiento, se disgregaron y se sembraron y se diferenciaron mediante un cultivo 2D hasta 145 días un medio basal definido optimizado para el cultivo de células neuronales (98). En torno al día 50, aparecieron CCPs postmitóticas, en concreto de progenitores de CPCs (SKOR2+) y más delante de CPCs más maduras (Calbindina). A pesar de observar una maduración progresiva de las neuronas con el tiempo en cultivo 2D mediante ensayos de electrofisiología e imagen, las CPCs no alcanzaron el nivel de maduración neuronal equivalente al que ocurre en el cerebelo humano posnatal, aunque sí de una red neuronal funcional.

A pesar de los últimos avances descritos, existen distintos retos a superar para la óptima generación de modelos neuronales basados en iPSCs y la obtención de células y tejidos cerebelosos *in vitro*. Esto requiere una comprensión precisa de los eventos moleculares complejos durante el desarrollo de cada subtipo neuronal, además de marcadores específicos para identificar y caracterizar las células generadas. Con ese fin, los futuros estudios deberían centrarse en identificar moléculas de señalización adicionales para que las células diferenciadas *in vitro* recapitulen completamente los procesos de maduración que ocurren en el

cerebelo humano en desarrollo. Igualmente, el establecimiento de modelos celulares eficientes y reproducibles es importante para dilucidar las bases moleculares de enfermedades raras que cursan con degeneración y disfunción cerebelosa, además de brindar oportunidades para detectar fármacos que puedan corregir los fenotipos observados en las distintas enfermedades. Los enfoques más dirigidos y/o complejos permitirán la generación de modelos precisos y acertados de la enfermedad para el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a las ataxias cerebelosas y el desarrollo de terapias.

**B. Capítulo 1:
Ataxia espástica autosómica
recesiva de Charlevoix-
Saguenay (ARSACS)**

1. Introducción

1.1 Clasificación, síntomas y curso clínico de ARSACS

En 1978 se describió por primera vez la ataxia autosómica-recesiva de Charlevoix-Saguenay (ARSACS) (OMIM: 270550), gracias al estudio genético de 200 familias francocanadienses en la región Charlevoix-Saguenay situada en Quebec (Canadá), (99). Se caracteriza por la degeneración de las CPCs, provocando una ataxia cerebelar progresiva y degeneración de la médula espinal, con trastornos neuromusculares, síndrome piramidal y neuropatía periférica. Inicialmente se definió como una enfermedad endémica en Quebec (Canadá), pero posteriormente se han identificado casos en más de 20 países (100–104). Su incidencia y prevalencia mundial continúan siendo desconocidas. En un principio, la enfermedad estaba restringida a la región de Quebec y su incidencia se estimaba en 1 cada 2000 casos, pero era y es muy poco frecuente en países con casos descritos como Turquía, Japón, Países Bajos, Italia, Bélgica, Francia y España (105,106).

En los pacientes pertenecientes a la región de Quebec, ARSACS debuta entre los 12 y 18 meses de edad, mientras que en pacientes pertenecientes a otras partes del mundo debuta en una horquilla que engloba desde infancia tardía al inicio de la juventud (y en algunos casos hasta el inicio de la edad adulta) (107,108). La mayoría de los pacientes con ARSACS muestran un curso lento y progresivo de la enfermedad, denostando alteraciones y dificultades en el modo de andar asociado con espasticidad durante la niñez y neuropatía durante la adolescencia, lo que conduce a la ausencia de reflejos en el tendón de Aquiles, distrofia muscular distal y graves alteraciones sensoriales. Estos pacientes también experimentan pérdida de tejido muscular (amiotrofia) y deterioro del lenguaje. Otros síntomas clínicos

característicos iniciales incluyen disartria, característica asociada a la disfunción cerebelar, nistagmo y síndrome piramidal, que se caracteriza por la pérdida de los reflejos rápidos en los tendones del hueso de la rodilla y por los signos de Babinski. (99,109,110). Una característica común en los pacientes de ARSACS de Quebec, pero ausente en pacientes procedentes de otros países es la hipermielinización de la retina (sin pérdida de visión) (**Figura B1**) (111–113). Además, las variaciones clínicas la aparición tardía de los síntomas, retraso mental, oftalmoplejía, disfunción urinaria, hiperlipidemia, ausencia de espasticidad e hipermielinización retiniana han sido ampliamente reportadas en pacientes fuera de Quebec. No obstante, en pacientes con debut más tardío de la enfermedad se han descrito otras manifestaciones atípicas que pueden incluir el prolapso de la válvula mitral, pérdida de audición o epilepsia. Además, los pacientes pueden mostrar disfunciones bioquímicas, como alteración de la oxidación de piruvato, hiperbilirrubinemia y niveles bajos en sangre de lipoproteínas beta o HDL (99,105,114). En cuanto a la esperanza de vida de estos pacientes, existe un único estudio hasta la fecha que concluye que la esperanza de vida de pacientes con ARSACS se reduce a 51 años de media (115).

Los estudios de imagen por resonancia magnética nuclear (RMN) describen la presencia de atrofia cerebelar en la parte superior del vermis cerebeloso. Estos resultados muestran también franjas lineales hipointensas en la protuberancia paramediana, una protuberancia lateral hiperintensa donde se fusiona con los pedúnculos cerebelosos y pedúnculos cerebelosos medios engrosados, además de un borde hiperintenso alrededor del tálamo (**Figura B1**). Sin embargo, se ha visto que algunas personas con ARSACS no muestran estas últimas anomalías en la RMN, por lo que esto debe interpretarse con cautela, ya que incluso algunos de los casos publicados muestran solo franjas hiperintensas en la protuberancia en una

inspección más cercana. Estas características van acompañadas de atrofia cerebral más adelante en la vida (106,108,109,116,117).

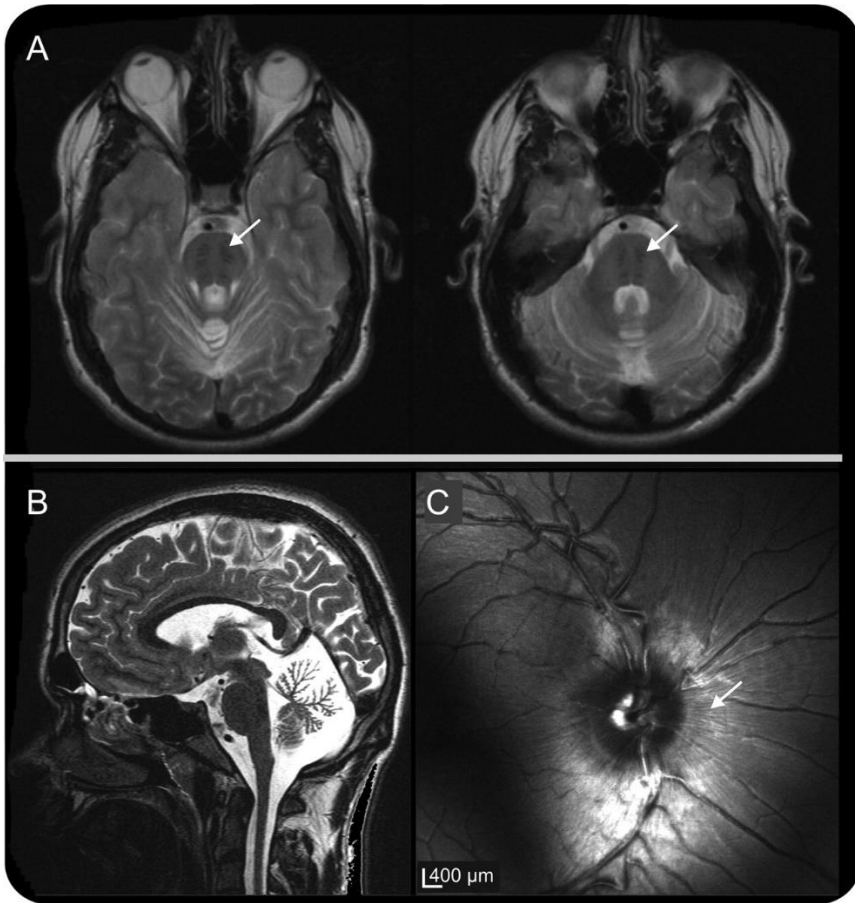


Figura B1 Imagen de resonancia magnética y fundoscopia de un paciente ARSACS de la región de Quebec. **A)** RMN ponderada en T2 muestra hipointensidades lineales cerca del tracto piramidal en la protuberancia en cortes transversales y **B)** atrofia cerebelosa, predominantemente del vermis superior en cortes sagitales. **C)** Imagen de oftalmoscopia que muestra fibras mielinizadas que irradian desde el disco óptico. Figura obtenida de Martin *et al.* 2007 (116).

1.2 Diagnóstico y tratamiento

Para realizar una primera aproximación al diagnóstico clínico de pacientes ARSACS, se utilizan los datos obtenidos tanto de estudios de neuroimagen como de los neurofisiológicos, entre otros. En primer lugar, se realizan pruebas de RMN y tomografía computada para detectar y /o descartar la atrofia en la parte superior del vermis del cerebelo y del extremo cervical de la médula espinal. Mientras que, los estudios neurofisiológicos buscan signos de neuropatía como atrofia y desmielinización axonal, además de la pérdida de conducción nerviosa-sensorial, así como una reducción en la velocidad de conducción de la señal de los nervios motores. Recientemente, algunos datos obtenidos por la realización de oftalmoscopia han demostrado que la hipermielinización de la fibra retinal puede ser muy útil como marcador diagnóstico temprano de ARSACS, sobre todo en pacientes de la región de Quebec. Aunque las anomalías observadas en RMN y electroneuromiografía (ENMG) son características comunes en la mayoría de los pacientes ARSACS, pueden estar ausentes en algunos pacientes y, por esta razón, no pueden usarse sistemáticamente como un marcador de rasgos de la enfermedad (109,118,119).

El diagnóstico diferencial es imprescindible e incluye distintas pruebas para descartar otros tipos de ataxias autosómicas recesivas como la ataxia de Friedrich, la ataxia por deficiencia de vitamina E o α -tocoferol (AVED) y formas hereditarias de paraplejia por trastornos neuromusculares (llamadas SPG). Actualmente, ARSACS se considera uno de los tipos más frecuentes de ataxia espástica recesiva en todo el mundo, después de la ataxia de Friedrich (FRDA) y la ataxia telangiectasia (120). La atrofia cerebelosa más marcada en el vermis cerebeloso superior y asociada con atrofia espinal observada en RMN distingue a pacientes ARSACS del resto de pacientes con otras ataxias anteriormente citadas (121).

Las pruebas genéticas son clave para establecer de forma definitiva el diagnóstico de pacientes ARSACS. El diagnóstico genético se establece en pacientes con cuadros clínicos compatibles con la enfermedad y su asociación con variantes bialélicas patogénicas identificadas en el gen *SACS* (122). Para los pacientes ARSACS, no existe una terapia eficaz, el tratamiento es sintomático y tiene como objetivo controlar la espasticidad y las contracciones musculares. Se ha propuesto la actividad física y la fisioterapia como rehabilitación para proporcionar un tratamiento sintomático en estos pacientes. Además de este tipo de estrategias, existen terapias con medicamentos como el baclofeno, que pueden ayudar a controlar la espasticidad y contracciones musculares en fases tempranas. Este fármaco es un agente bloqueador de los reflejos sinápticos y su uso está bastante extendido como agente terapéutico en pacientes con ataxias cerebelosas (123).

1.3 Genética de ARSACS

La ataxia espástica autosómica recesiva de Charlevoix-Saguenay (ARSACS) está causada por mutaciones en el gen *SACS*. Este gen se localiza en el cromosoma 13 (13q12.12: chr13:23,288,689-23,433,763(GRCh38/hg38), y cuenta con 145.075 bases (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SACS> acceso el 21 de abril de 2022). Está compuesto por 10 exones, 9 de los cuales son codificantes, y el décimo exón es el más largo de los exones conocidos en vertebrados hoy en día, contiene 11.487 pares de bases (**Figura B2**) (122).

Se han descubierto, hasta la fecha, más de 200 mutaciones patogénicas diferentes en el gen *SACS* asociadas a cuadros clínicos compatibles con la enfermedad de ARSACS, la mayoría de ellas situadas en el exón 10. Las mutaciones descritas pueden ser de distintos tipos: Mutación con cambio de sentido (*missense*); Mutación con codón de terminación prematuro (*non-sense* o *STOP codon*

mutation); y, mutación por desplazamiento del marco de lectura (*frameshift mutation*). Estas mutaciones pueden estar asociadas a patogenicidad tanto en homocigosis como heterocigosis compuesta (124,125).

Inicialmente, en la región de Quebec la mutación en la posición c.8844delT (p.I2949FfsX2952) era relativamente la más común entre los pacientes ARSACS. Además, se identificaron también otras dos variantes patogénicas bastante comunes, como la mutación en posición c.6594delT (p.I2949Ffs*4) presente en el 94% de los alelos mutantes o, c.5254C>T (p.Q1752X) presente en el 3% de los alelos. Posteriormente, distintas variantes adicionales han sido descritas en esa misma región, incluyendo variantes *missense* y mutaciones por inserción/delección (*indel*) y deleciones grandes del gen (*large genome deletion*) (99,126).

Además de las variantes ancestrales inicialmente descritas en la región de Quebec, se han identificado varias mutaciones en SACS y asociadas a pacientes con cuadros clínicos compatibles con ARSACS en todo el mundo. En Europa se han descrito varios casos de ARSACS en diferentes países, con síntomas clínicos similares en a los casos de la región de Quebec en alguno de los casos. Los países con mayor índice de casos en Europa, y por tanto en estudio, están siendo Turquía e Italia. Sin embargo, se han reportado casos aislados en países como Bélgica, España, Países Bajos, Grecia, Polonia o Alemania entre otros (99,103,124).

Grieco y cols., (127) descubrieron los primeros casos de pacientes con ARSACS en Italia en 2004, describiendo tres variantes genéticas noveles asociadas a la enfermedad. Desde entonces y durante los siguientes años, distintos investigadores han ido describiendo la aparición de nuevas mutaciones asociadas a la patología ARSACS, generando un fenotipo variable entre pacientes, desde un

debut en la niñez hasta la juventud o edad adulta, teniendo estos últimos como rasgo común, aparte de la ataxia, la retina hipermielinizada (124).

Los casos de pacientes con ARSACS de origen tunecino tienen un inicio tardío de los síntomas clínicos en comparación con casos de la región de Quebec, pero similares entre ellos. Las primeras mutaciones se observaron en un estudio en el año en 2004, en el que se recogen dos mutaciones sin sentido y dos *indel* (103,128).

En el año 2008, se describieron por primera vez variantes deletéreas en pacientes ARSACS asociadas a la enfermedad en varias familias holandesas. Habían desarrollado un fenotipo clínico uniforme entre todos ellos, acorde con el fenotipo original de la enfermedad descrita anteriormente, presencia de ataxia cerebelosa de aparición temprana, neuropatía axonal, atrofia del vermis cerebeloso por RMN. Entre ellos, 16 pacientes mostraron nuevas mutaciones en el gen *SACS*, con herencia homocigota o heterocigota compuesta. Entre estas nuevas variantes, hubo ocho *STOP codon mutations*, tres *missense*, dos variantes de *splicing* y tres *indels* (110).

La primera mutación descrita en España fue en 2005. Este estudio describió una nueva variante de tipo *missense* en homocigosis, c.7848C>T (p.R2556C), presente en dos hermanos afectados. Los pacientes presentaban una clínica muy parecida a los de la región de Quebec, presentando atrofia cerebelosa en la parte superior del vermis, y atrofia de la médula espinal, pero no hipermielinización de la retina. También se ha descrito que esta variante afecta a un residuo conservado de la proteína (R2556) que codifica este gen, lo que también confirmó su papel en la enfermedad (129). En 2015, Sánchez *et al.* (130) describieron una paciente con síntomas clínicos compatibles con la enfermedad de ARSACS. El estudio genético

concluyó con la caracterización de dos nuevos cambios en heterocigosis compuesta en el gen SACS (p.R276C y p.P1302S).

En 2011, se describió el primer caso de un paciente con ARSACS en EE. UU. También se han publicado casos de ARSACS y nuevas variantes asociadas a la enfermedad en países asiáticos como China, Irán, Corea, o Japón, donde están siendo estudiados en profundidad. Desde el año 2015 hasta el día de hoy, se han ido descubriendo en más de 20 países, casos ARSACS asociados a nuevas variantes, como, por ejemplo, en los últimos años se han descrito casos en Tailandia, India, África, Brasil o nueva Zelanda (124).

El gen SACS codifica por la proteína SACSINA, que consta de 4.579 aminoácidos y un peso molecular de 520 kDa (Referencia de acceso UniProt: Q9JC8). Se organiza en diferentes dominios que podrían tener distintas funciones y/o cooperar entre ellos o en diferentes vías. La proteína SACSINA tiene 5 dominios que están ubicados desde el extremo N-terminal al C-terminal de la siguiente manera: *Ubiquitin-like domain* (Ubl), *large saccin internal repeats* (SIRPT1/SIRPT2/ SIRPT3 o SRR), *xeroderma pigmentosum C-binding domain* (XPCB), J-domain (DNAJ); *Higher Eukaryotes and Prokaryotes of a Nucleotide-binding domain* (HEPN) (131–134).

A día de hoy, la SACSINA está considerada una chaperona molecular involucrada en el control de calidad de las proteínas, la dinámica de la red mitocondrial y la homeostasis de los neurofilamentos (131,135). Sin embargo, los mecanismos moleculares patológicos que subyacen a la neurodegeneración en las neuronas con mutación en SACS no están dilucidados por completo.

En la región N-terminal de la proteína, se sitúa en primer lugar un dominio similar a la ubiquitina funcional (Ubl), capaz de interactuar con la proteasoma por la

unidad 26S, lo que sugiere un posible papel en la maquinaria de degradación de proteínas defectuosas o mal plegadas. A continuación de este primer dominio, se encuentran los dominios SIRPT, tres regiones repetitivas homólogas a la chaperona Hsp90, lo que sugiere estar involucrada en actividades ATPasa (136,137). Estos dominios contienen en su interior una zona conservada compuesta por un residuo de arginina que acepta fosfatos después de la hidrólisis de ATP. Mutaciones patológicas descritas en pacientes ARSACS en este residuo, como por ejemplo la mutación en c.1420C>T (p.R474C) en la región *SIRPT1-sr2*, muestran que la pérdida de función del dominio SIRPT se asocia con una reducción o pérdida de actividad de hidrólisis de ATP en la SACSINA y una posible causa de la aparición de la enfermedad. La hidrólisis de ATP es indispensable para su actividad chaperona *in vivo* (132,136,137).

El dominio XPCB contiene 75 aminoácidos que forman 5 hélices anfipáticas, y mantiene una gran similitud con un sustrato proteico de la Ube3A ubiquitina ligasa, denominado HHR23A (138). La unión al sustrato por parte de las ligasas de ubiquitina es muy fuerte y es posible que disfunciones en la interacción Ube3A-SACSINA pueda afectar a la patología de ARSACS como se piensa que también puede afectar a la aparición de la ataxia relacionada con el síndrome de Angelman (134).

Cerca de la parte C-terminal, la SACSINA también cuenta con un dominio DNAJ funcional. Este dominio tiene un 60% de secuencias homólogas a la Hsp40. Este dominio regula en parte la actividad de proteínas de choque térmico, incluida la Hsp70, mejorando las interacciones proteína, por lo que se le asocia la función de chaperona y un papel en la homeostasis proteica. Las interacciones de los dominios co-chaperona y de la SACSINA en sí con proteínas Hsp70 y con el sistema del sistema ubiquitin-proteasoma podrían ser parte relevantes en los mecanismos de

defensa del organismo contra la agregación anormal de proteínas y contribuir así al mecanismo de enfermedad de ARSACS. Junto con el dominio J, los dominios SIRPT podrían estimular la actividad ATPasa de Hsp70 (131,139).

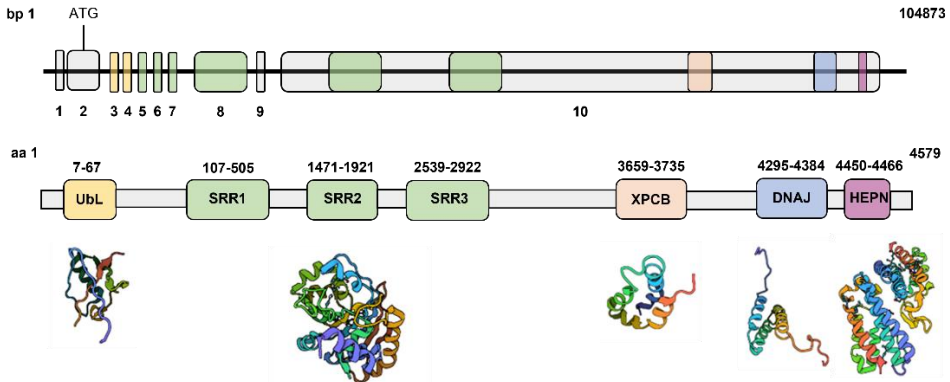


Figura B2 Esquema del gen SACS y la proteína SACSINA. A) Estructura primaria del gen SACS distribuida por exones. **B)** Organización de los dominios de la proteína SACSINA y representación estructura tridimensional según la base de Datos Protein Data Bank (PDB): *Ubiquitin-like domain* (Ubl) (PDB:5VSX), *Sacsin internal repeats* (SRR1/SRR2/SRR3 o SIRPT) (PDB:5V46), *xeroderma pigmentosum C-binding domain* (XPCB) (PDB:1TP4), *J-domain* (DNAJ) (PDB:1IUR), *Higher Eukaryotes and Prokaryotes of a Nucleotide-binding domain* (HEPN)(PDB:3O10). Figura adaptada de adaptada de Kozlov *et al.* 2011 (133) y Ménade *et al.* 2019 (137).

Por último, en el extremo C-terminal de la SACSINA, se encuentra el dominio HEPN. Este dominio se describió por primera vez en procariontas, donde su supuesta función de unión a nucleótidos y/o a ARN podría mediar la resistencia a los antibióticos (por ejemplo, kanamicina) mediante la eliminación de grupos monofosfato (133). Sin embargo, la función del dominio HEPN en la SACSINA no está del todo clara. Se ha propuesto que esta región podría mediar la dimerización de la SACSINA, formando una región de alta afinidad para la unión de GTP/ATP que podría afectar a la actividad de la proteína mediante la colaboración con otros dominios como el dominio J o con la proteína Hsp70. Las mutaciones en la región HEPN han descrito una alteración en la actividad de unión de nucleótidos dando

como resultado un plegamiento u oligomerización anormal de la SACSINA (133,140).

La expresión de la proteína SACSINA se detectó por primera vez y de manera predominante y heterogénea en el tejido cerebral de roedores, aunque también en testículos. De manera específica, la SACSINA se localiza en el soma y procesos neuronales, lo que incluye a dendritas y axones. En cuanto a la distribución subcelular, la SACSINA distribuye mayoritariamente y de manera homogénea por todo el citoplasma y/o puntualmente en la cara citoplasmática de las mitocondrias, sugiriendo un posible papel en la regulación mitocondrial. La parte del cerebro con mayor expresión de la SACSINA es el cerebelo, en concreto los mayores niveles tanto de expresión génica de *SACS* como de la proteína SACSINA los tienen las CPCs, situadas en la capa molecular. En las neuronas del tracto corticoespinal y las motoneuronas craneales la expresión de la SACSINA es alta, sobre todo en los axones. Además, los núcleos precerebelosos que proyectan procesos aferentes al cerebelo también tenían una expresión significativa de SACSINA, lo que sugiere que la entrada al cerebelo también podría verse afectada por la función alterada de la SACSINA (131).

Las distintas mutaciones descritas en la SACSINA pueden reprimir la traducción, lo que resulta en la degradación de la transcripción del gen *SACS*. Por lo que la falta de expresión o cantidades insuficientes de la proteína estaría asociada con la enfermedad de ARSACS.

Un estudio reciente ha descrito que la SACSINA está prácticamente ausente en fibroblastos de pacientes ARSACS independientemente del tipo de mutación, al menos en su versión completa. Las mutaciones *frameshit* y *non-sense* evitan que la proteína se traduzca, pues ese cambio de marco de lectura es degradado por

nucleasas. Mientras que las mutaciones *missense* generan una traducción estable de la proteína y esta es degradada por mecanismos cotraduccionales. En este supuesto, la variabilidad fenotípica de ARSACS no se debería a los diferentes niveles de SACSINA residual o a la posición de la mutación, pues se define la pérdida de la proteína SACSINA como un mecanismo común compartido por las diferentes mutaciones de SACS (141).

1.4 Mecanismos moleculares y modelos de enfermedad de ARSACS

Las chaperonas son proteínas que tienen como principal función molecular en la célula impedir o contrarrestar la tendencia de las proteínas a agregarse en condiciones de estrés celular o durante su síntesis. En general, las chaperonas, ayudan a mantener la homeostasis proteica celular mediante el correcto plegamiento de las proteínas sin aportar información conformacional ni ser parte de la estructura final biológicamente activa. A lo largo de la evolución, se han identificado distintos sistemas de chaperonas como las Hsp70/Hsp40 (DnaK/DnaJ en bacterias) y Hsp90, descrita su presencia en la proteína SACSINA, así como las chaperoninas (142). Estos sistemas, utilizan la hidrólisis y unión de ATP que permiten la reestructuración proteica de la chaperona, que a su vez permite la unión o liberación a otras proteínas para llevar a cabo su función, siendo el dominio HEPN en la SACSINA candidato a proporcionar esa función de hidrólisis (133). La homeostasis proteica celular o proteostasis, se subdivide en una red adaptativa de tres vías funcionales principales que gobiernan sinérgicamente el control de calidad de las proteínas a través de la acción de 1) la maquinaria de síntesis de proteínas; 2) mecanismos de mantenimiento que incluyen chaperonas moleculares involucradas en el plegamiento de proteínas; y 3) vías degradativas (p. ej., Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS)), vía endolisosomal y autofagia. Son varios los que estudios indican que el SNC parece ser particularmente susceptible a la

desregulación de la proteostasis, ya que muchos de estos trastornos afectan específicamente a las neuronas, lo que conlleva a pensar la importante función de una proteína como la SACSINA en el SNC (143,144).

Para definir la actividad de la SACSINA en las neuronas, la relación con la enfermedad de ARSACS y entender los mecanismos subyacentes, se han diseñado a lo largo de estos años distintos modelos de enfermedad donde poder estudiarlos. Los modelos de enfermedad deben proporcionar información y reducir el tiempo y los costes de análisis para, posteriormente, poder usarse en la detección de candidatos a fármacos en estudios preclínicos posteriormente.

El estudio del tejido post-mortem de pacientes ARSACS como modelo de enfermedad, independientemente de la mutación encontrada, presenta atrofia de la parte anterior del vermis cerebeloso como característica común, acompañada de la muerte de las CPCs (99,116,117). Sin embargo, la falta de disponibilidad de tejidos cerebelares de los pacientes afectados y la información sobre la enfermedad a punto final ha hecho necesaria la exploración de otros modelos de enfermedad basados en animales modificados genéticamente y/o células.

Para determinar si es posible que las mutaciones asociadas al gen *SACS* y la consiguiente falta de expresión y/o actividad de la proteína SACSINA por la que codifica sean responsables de la atrofia cerebelar observada en pacientes ARSACS y por consiguiente la enfermedad, se ha generado recientemente un ratón *Sacs knock-out* para *SACS* (*SACS KO*). Este modelo animal recapitula los síntomas tempranos de pacientes ARSACS como la disfunción en la coordinación motora similar a la ataxia, así como la muerte de CPCs en los lóbulos anteriores del vermis cerebeloso (145,146). El modelo de ratón *SACS KO* percibe la pérdida de CPCs de una manera progresiva en el tiempo, detectándose esta misma de forma

significativa en el día posnatal (P) 90, después de que se observaran los déficits de coordinación motora en el día P40, en consonancia con los datos de pacientes ARSACS. El modelo de ratón KO para SACS también presenta síntomas de patología piramidal y neuropatía periférica, además de presentar hinchazón axonal (*axonal swellings*) a partir del día P30. Estos resultados apuntan a que la disfunción cerebelar es debido a la falta de función de la SACSINA y que precede a la muerte celular de las CPCs (146), sugiriendo que la pérdida de CPCs no es la base de la ataxia temprana observada en pacientes ARSACS, sino otras alteraciones en las CPCs que contribuyen al inicio de los primeros síntomas.

El modelo de ratón SACS KO presenta un desarrollo normal del cerebelo en cuanto a posibles defectos en la lobulación y foliación del cerebelo, pero muestra un mayor nivel de neurofilamentos no fosforilados en la región somato dendrítica de las CPCs a día P14 en comparación con los controles. Además, el modelo de ratón SACS KO presenta también alteraciones de morfología en los árboles dendríticos de las CPCs que preceden a la muerte celular, lo que sugiere deficiencias en la distribución normal del citoesqueleto en las neuronas SACS KO (**Figura B3**) (146).

Para analizar el efecto de la falta de SACSINA en el citoesqueleto de las neuronas de ratones SACS KO, se analizaron neuronas motoras en cultivo y neuronas obtenidas de la zona de los ganglios de raíz dorsal (DRG) de embriones de ratón SACS KO. Las neuronas motoras y DRG derivadas de ratones SACS KO se asociaron con un retraso en la maduración asociada a un menor diámetro del cuerpo celular en comparación con las neuronas control. Además, la expresión de la Periferina, una proteína de filamento intermedio neuronal que normalmente disminuye a medida que maduran las neuronas motoras, fue continuada en el tiempo en ratones SACS KO, llegando a mostrar un agrupamiento/acumulación somato dendrítica de este neurofilamento a los días 21-42 *in vitro*. Este fenotipo se

confirmó en neuronas de hipocampo de ratón WT que tienen una alta expresión de SACSINA, eliminando su expresión mediante un lentiviral de shRNA, y confirmando así una redistribución anormal similar de los neurofilamentos por la falta de expresión (146).

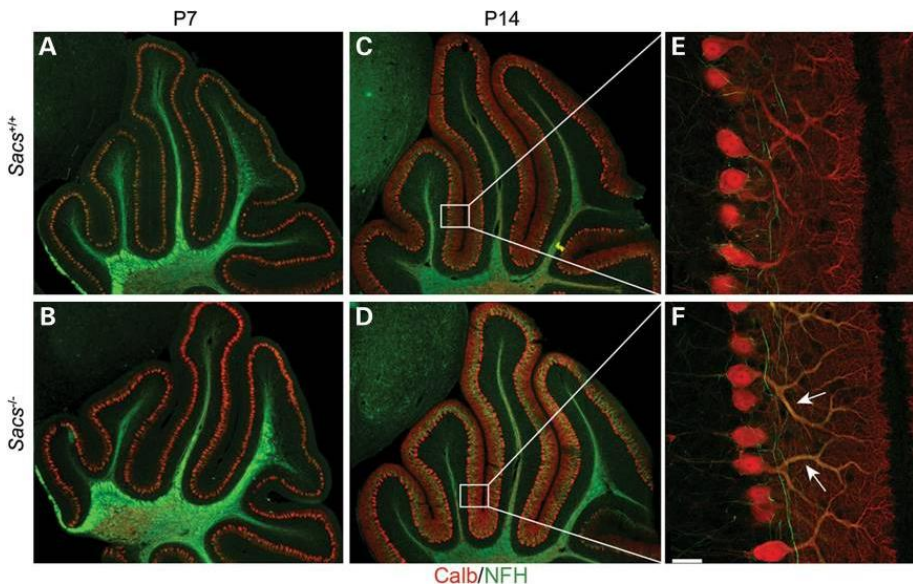


Figura B3 Imágenes de inmunofluorescencia representativas del desarrollo del cerebelo de ratones *SACS* KO y controles. **A-D)**, El desarrollo del cerebelo es normal en tanto en ratones *SACS* KO como en los controles, pero los niveles de NFH aumentan en las dendritas de las CPCs de ratones *SACS* KO **F)** en comparación con los ratones control **E)**. La inmunofluorescencia de las secciones sagitales de cerebelo con anticuerpos se realizó contra Calbindina (rojo) y anti-NFH (verde) (barra de escala = 35 μ m). Figura tomada de Lariviere *et al.* 2015 (146).

Debido a que estudios previos habían indicado que la SACSINA se localizaba en mitocondrias, y que el citoesqueleto, en concreto los neurofilamentos (NFs), jugaban un papel en la regulación de la morfología y motilidad mitocondrial en las neuronas, se analizó también el efecto de la eliminación de SACSINA en el transporte mitocondrial y la relación con las acumulaciones de NFs en los axones de neuronas motoras cultivadas de ratones *SACS* KO (146). Esta posible relación

mitocondria-NFs ya se ha publicado en distintos estudios, relacionando además el estado de fosforilación de los neurofilamentos de alto peso molecular (NFH) a la función de la red mitocondrial *in vitro* (147,148).

Las anomalías mitocondriales y citoesqueléticas halladas en el modelo de ratón SACS KO podrían estar relacionadas con la posible ausencia de chaperona de la SACSINA, pudiendo ser consecuencia de una proteostasis anormal, indispensable para la supervivencia y el funcionamiento de todas las células. Para analizar posibles problemas en la proteostasis en neuronas en cultivo de ratones SACS KO, se estudiaron la presencia acúmulos de proteínas mal plegadas y/o desajustes en su eliminación mediante la distribución de ubiquitina y proteínas asociadas a la autofagia como Lamp2 o p62. En este caso, la ubiquitina tenía una distribución más perinuclear en las neuronas SACS KO, mientras que no hubo una redistribución significativa en las proteínas autofágicas (149).

Para comprender mejor la fisiopatología del cerebelo en ARSACS, en 2018 se analizaron las propiedades electrofisiológicas intrínsecas y extrínsecas de las CPCs en el modelo de ratón SACS KO (145), mediante estudios de electrofisiología. Observaron que solo las CPCs SACS KO de los lóbulos anteriores mostraban una reducción de la tasa de activación y de la capacidad sináptica a P50-60, edad en la que se observan déficits motores (146), así como semanas antes de la detección de los déficits motores. Estos resultados demuestran que los déficits de activación de las CPCs están relacionados con la posterior pérdida de las CPCs, ya que las alteraciones de activación solo se observan en los lóbulos que luego sufren una degeneración. La pérdida de CPCs fue prominente en los núcleos celulares profundos y las alteraciones aparecieron en el circuito cerebeloso (150).

Existen datos recientes que sostienen que tanto la identidad molecular como la localización de las CPCs en el cerebelo les confiere distintas propiedades y funciones sinápticas y electrofisiológicas, sin embargo, no se conoce el mecanismo o mecanismos moleculares asociados a este comportamiento (151,152). Por lo que, debido a que la muerte de las CPCs en la enfermedad de ARSACS sigue un patrón muy definido tanto en humanos como en el modelo de ratón *SACS KO*, en 2021, un estudio planteó la posibilidad de la existencia de característica común en las CPCs que degeneraban en la parte anterior del vermis cerebeloso (153). Utilizaron como modelo de enfermedad el ratón *SACS KO* descrito por Girard et al. (145), en el que estudiaron la muerte de las CPCs en función del patrón de expresión de la proteína La aldolasa C, también conocida como Zebrina II, efecto observado ya en otras condiciones y enfermedades cerebelares (154). La Zebrina II se expresa únicamente en ciertas subpoblaciones de CPCs siguiendo un patrón de rayas distintivo a lo largo del cerebelo que se conserva evolutivamente en vertebrados y presenta una actividad eléctrica específica (155,156).

El estudio realizado por Toscano-Márquez y cols. (153), sugiere que el desarrollo cerebelo en ratones *SACS KO* es normal con una distribución normal de la Zebrina, al inicio de su etapa postnatal. Sin embargo, apuntan a que el subconjunto de las CPCs negativas para Zebrina situadas en los lóbulos anteriores del vermis cerebeloso son más susceptibles a la pérdida de la SACSINA, pues se observa una pérdida de estas mismas en torno a los días P50-60, es decir, cuando aparecen los primeros síntomas de disfunción motora en el ratón *SACS KO*. probablemente también sean las que muestran un déficit en sus propiedades electrofisiológicas estudiadas en el modelo (150,153,156).

Recientemente, se ha generado una línea de pez cebra (*Danio rerio*) *SACS KO* mediante la tecnología CRISPR/CAS9, que replica las principales características del

fenotipo descrito en otros modelos de enfermedad y en pacientes ARSACS. El pez SACS KO muestra deterioro motor, atrofia del cerebro posterior, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo. La arquitectura general y los tipos de células del cerebelo están muy conservados, desde los peces teleósteos hasta los mamíferos. El rombencéfalo (y más adelante en el desarrollo el cerebelo) se desarrolla, diferencia y alcanza la madurez entre la etapa embriogénica y el estadio de larva en el pez cebra. Durante esta etapa el pez es prácticamente transparente, lo que permite el análisis de todo el cerebro mediante técnicas de bioimagen *in vivo*. En el pez cebra, en el que la SACSINA muestra un 35 % de identidad con la proteína humana, los resultados del análisis mostraron que el área del “cerebelo” de las larvas SACS KO era menor que en los controles. Este defecto se podría deber a la pérdida de CPCs, que además son la principal población neuronal y la única salida del cerebelo en el pez cebra. Además, las CPCs de las larvas de pez cebra mostraban una desregulación en la señalización de Ca²⁺, pudiendo contribuir a la disfunción cerebelosa (157). Asimismo, en este modelo de pez cebra SACS KO se han analizado algunos fármacos que no habían sido testados previamente, pero que se están estudiando para contrarrestar la neurodegeneración progresiva de las células cerebelares en otros tipos de ataxias. Se analizaron los efectos terapéuticos de la acetil-DL-leucina (ADLL, Tanganil™) y el ácido tauroursodesoxicólico, resultado en una mejora de la función locomotora y rescate de función bioquímica en larvas SACS KO (157).

Aunque los modelos animales ayudan significativamente en la disección de los diversos mecanismos de disfunción cerebelosa, las diferencias entre los modelos animales y los trastornos humanos dificultan la precisión imitan las condiciones humanas, generalmente debido a las diferencias en anatomía, metabolismo y comportamiento entre ratones y humanos (158). Sin embargo, las diferencias en el genoma, la anatomía y el metabolismo entre humanos y animales vertebrados o no

como roedores o el pez cebra entre otros, presentan limitaciones en la replicación de las características de la enfermedad. Por lo tanto, modelos celulares más precisos de ARSACS humanos necesitan generarse para imitar las condiciones humanas.

La utilización de líneas celulares derivadas de tumores cerebrales modificadas, como SH-SY5Y o C6, junto con otras líneas tumorales como SW-13, Cos7 o Hela se han utilizado para generar modelos de enfermedad de ARSACS buscando generar la fisiopatología de la enfermedad *in vitro* (135,145,159). La ventaja de la utilización de estos tipos celulares es el bajo coste y la disponibilidad, además de la capacidad para controlar la expresión de la SACSINA mediante la edición génica y analizar los posibles cambios moleculares o celulares derivados, a pesar de no disponer de protocolos estándar para su cultivo y la dificultad para la obtención de células de interés y la variabilidad celular (158). En paralelo, y buscando reflejar de manera más fidedigna las condiciones humanas de los mecanismos de la enfermedad y la fisiopatología, se han utilizado fibroblastos dermales de pacientes ARSACS como modelo de enfermedad (160,161). Los fibroblastos dermales humanos (*Human dermal fibroblasts*; HDF) se llevan utilizando años para estudiar enfermedades neurológicas debido al origen celular común con las células del SNC, el ectodermo (162), y ofrecen la posibilidad de conservar el fondo genético del paciente sin necesidad de la ingeniería genética. Sin embargo, las técnicas de aislamiento y cultivo de HDF *in vitro* consumen bastante tiempo, además de ser células senescentes que requieren materiales y estudios extensos para mejorar la optimización y calidad de los protocolos.

En 2012, se realizó por primera vez la caracterización funcional de la SACSINA en múltiples tipos de células, indicando posibles disfunciones en ARSACS. Los autores encontraron que la SACSINA se localizaba en el citoplasma y en las mitocondrias, y

que tanto en células SH-SY5Y SACSINA *Knock Down* (SACSINA KD) como en HDF de pacientes ARSACS la falta de expresión llevaba a cambios morfológicos y alteraciones funcionales mitocondriales. La falta de expresión de SACSINA lleva a las mitocondrias mostrar un fenotipo hiperfusionado (*balloon-like*) y red mitocondrial altamente interconectada por la presencia de este tipo de mitocondrias, sugiriendo un fallo en la función de fisión mitocondrial (145,161). La fisión mitocondrial se basa en el aislamiento de pequeños fragmentos mitocondriales dañados o no, y es muy importante para la movilización, renovación y eliminación mitocondrial posterior a través de un proceso de nominado mitofagia. Este proceso es particularmente importante en las neuronas, ya que tienen una alta demanda energética en sitios lejanos al citoplasma y requieren de mitocondrias de un tamaño concreto para su transporte por las dendritas y axones (163). Por lo que, los defectos asociados a la falta de SACSINA en las células en la función mitocondrial, la distribución y la organización podrían explicarse por un aumento en la fusión mitocondrial o una disminución en la fisión.

Para intentar entender el mecanismo a través del cual deficiencias en la fisión celular contribuye a la patología ARSACS, se analizó la localización celular en de la proteína relacionada con la dinamina GTPasa relacionada con la dinamina 1 (DRP1), clave en el proceso de fisión, mostrando una localización reducida en la membrana externa mitocondrial de las células SACS KD y HDF de pacientes ARSACS (161). Además, Girard y cols., (145) demostraron la interacción entre la SACSINA y la proteína DRP1 a través de un ensayo de inmunoprecipitación, resultando en una interacción entre los primeros 1638 aminoácidos empezando por la parte N-terminal de la SACSINA (abarcando los dominios UBL y SRTP1) y DRP1 (145).

Las alteraciones en la fisión mitocondrial tienen consecuencias importantes para el correcto funcionamiento mitocondrial, incluyendo alteraciones en la fosforilación

oxidativa, así como la acumulación de mitocondrias dañadas que acumulan especies reactivas de oxígeno (ROS), pudiendo empeorar la disfunción mitocondrial y celular. Los distintos estudios basados líneas SH-SY5Y modificadas genéticamente y en HDF ARSACS, han analizado la funcionalidad de las mitocondrias. Los resultados muestran que las células deficientes en SACSINA tienen un consumo de oxígeno reducido, una reducción de síntesis de ATP lo que resulta en un estrés oxidativo con mayores niveles de ROS mitocondrial y un mayor daño en el ADN. El perfil de expresión génica también es diferente en células deficientes en SACSINA: genes expresados de diferencial se observaron en varias vías como la autofagia, la fosforilación oxidativa y dinámica mitocondrial, el estrés oxidativo y la apoptosis (**Figura B4**) (160,161,164).

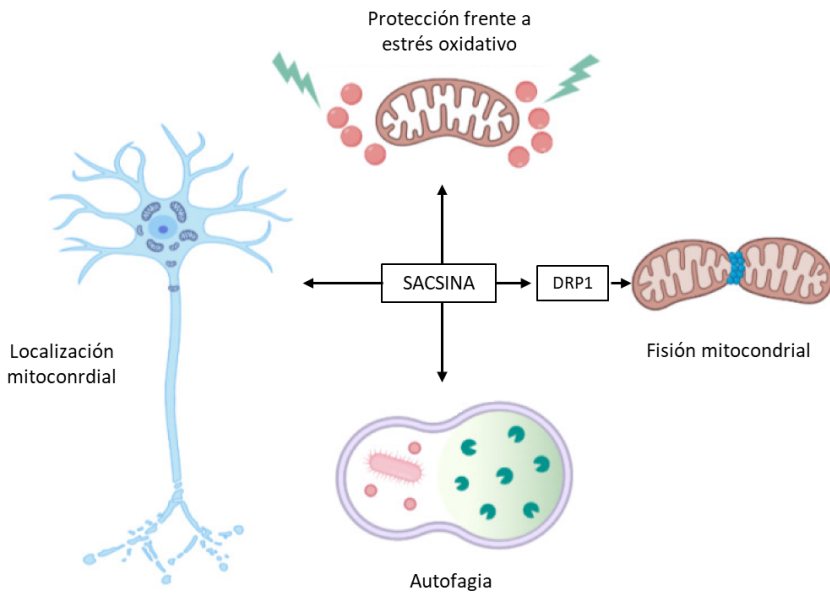


Figura B4 Esquema representativo de las posibles funciones de la SACSINA en la función mitocondrial. Adaptado de Bagaria *et al.* 2022 (124).

De la misma manera que la SACSINA se localiza en las mitocondrias en células de linaje no neuronal (fibroblastos, SH-SY5Y), también lo hace en neuronas primarias del modelo de ratón *SACS* KO. Las mitocondrias de las CPCs de ratón *SACS* KO también muestran el mismo fenotipo que las descritas en fibroblastos de pacientes ARSACS y células SACSINA KD, morfología tipo “*balloon-like*” o alargada, agrupándose y acumulándose en el soma y en las dendritas proximales y mostrando un potencial de membrana reducido que indica daño mitocondrial (145,146). Este fenotipo junto con la baja interacción de con la proteína relacionada con la proteína DRP1 favorecería la falta de movilidad mitocondrial descrita en los cultivos de neuronas motoras de ratones *SACS* KO mencionados anteriormente.

Además de la disfunción mitocondrial asociada a la falta de expresión de la SACSINA, el cambio citopatológico más temprano identificado en neuronas, y en concreto en CPCs, tanto en el modelo de ratón *SACS* KO como en tejido post mortem de pacientes ARSACS es acumulación de neurofilamentos en el soma celular. Por ello, distintos estudios basados en modelos celulares, además de los ya descritos en las neuronas del modelo animal *SACS* KO y su cultivo, han ahondado en la relación de la SACSINA con la homeostasis y organización citoesqueleto (135,145,146,149). Distintos estudios han mostrado que en HDF de pacientes ARSACS la agregación de la proteína Vimentina, proteína mayoritaria de los filamentos intermedios en estas células (145,149,160,165). En los fibroblastos ARSACS, los filamentos intermedios se agregan alrededor del centro de organización de los microtúbulos (MTOC), sin alteraciones en la distribución de los microfilamentos, pero sí desplazando a la periferia a otros orgánulos como el aparato de Golgi y el núcleo (149). Esto suele ocurrir cuando los mecanismos de homeostasis del citoesqueleto fallan o en respuesta a condiciones de estrés celular como la acumulación de proteínas malformadas (166). Sin embargo, alrededor de

estos acúmulos de filamentos intermedios en fibroblastos no observaron acúmulos de proteínas ubiquitinadas, pero sí de proteínas que pertenecen a la maquinaria de proteostasis y proteínas asociadas a la autofagia en comparación con las células control, donde se encuentran distribuidos por todo el citoplasma. Estas proteínas incluyen a las chaperonas Hsp70, Lamp2 y p62. Los niveles de p62 se redujeron en los fibroblastos ARSACS, mientras que los niveles de Lamp2 se elevaron. p62 se degrada por autofagia y Lamp2 promueve la fusión de auto fagosoma con lisosomas (149).

Analizaron en paralelo los niveles de la proteína LC3II, proteína que marca la formación de auto fagosomas, así como los niveles de la proteína p62, mediador que dirige las proteínas poliubiquitinadas al lisosoma, en presencia del inhibidor de degradación lisosomal bafilomicina A1 (167). Los resultados, confirmados también por co-localización celular, sugerían que la falta de SACSINA en fibroblastos ARSACS es crucial para la formación de la auto fagolisosoma e impide la degradación de proteínas u orgánulos dañados, como podría ser la mitocondria (**Figura B5**). Estos hallazgos también fueron confirmados en células SH-SY5Y donde se eliminó la expresión de la SACSINA por modificación genética. Además, la reactivación de la autofagia en células deficientes de SACSINA es posible bajo la utilización el fármaco Rapamicina a una dosis y tiempo determinado (164).

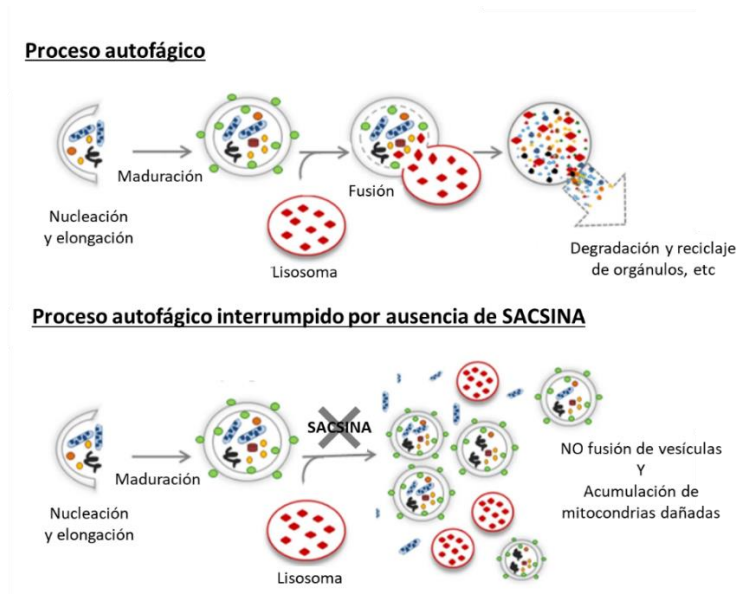


Figura B5 Esquema del papel de la SACSINA en el proceso de autofagia. **A)** La cascada de autofagia consiste en (de izquierda a derecha): 1. formación de autofagosomas; 2. Fusión con lisosomas para crear autofagolisosoma; 3. Degradación de la carga citoplasmática por hidrolasas lisosomales. **B)** En el modelo celular SACSINA KO en no se produce el paso de fusión, resultando en la acumulación de autofagosomas y mitocondrias dañadas en el citoplasma. Figura adaptada de Morani et al. 2019 (164).

Sin embargo, el fenotipo descrito en los fibroblastos ARSACS y en células SH-SY5Y modificadas solo recapitulan en parte al que se describe en los estudios de neuronas en cultivo de ratón SACS KO. Por ejemplo, mientras que la vimentina se organiza alrededor del MTOC en fibroblastos ARSACS, en las neuronas SACS KO los neurofilamentos forman haces especialmente en las dendritas, lo que refleja una diferencia en la organización de la citoarquitectura. Además, no se observó una redistribución de los componentes de la vía autofágica-lisosomal en las neuronas primarias del ratón SACS KO, pero sí una acumulación perinuclear de ubiquitina, pudiendo deberse a que la autofagia en las neuronas podría estar regulada por mecanismos diferentes a las de las células de linaje no neural (167). Estas diferencias entre neuronas y fibroblastos o células SH-SY5Y reflejan aspectos de la

regulación célula- específica de la proteostasis y homeostasis del citoesqueleto (168).

A principio del año 2022, Murtinheira y cols. (159) publicaron un estudio sobre la presencia de fenotipo ARSACS en células C6 SACS KO y N9 SACS KO, obtenidas de glioma y microglía de ratón respectivamente. Utilizaron estas líneas debido a que la expresión de mRNA de SACSINA no solo es alta en las neuronas sino también en astrocitos y microglía. La expresión es alta al menos al inicio del nacimiento, tanto en ratón como en humano, y va disminuyendo con la edad. La eliminación por modificación genética de SACSINA en las líneas celulares C6 y N9 indujo la acumulación de filamentos intermedios comunes de estas células, como de la proteína ácida fibrilar glial de filamentos intermedios gliales (GFAP), nestina y vimentina. Además, las células C6 SACS KO mostraban daño mitocondrial en respuesta a estrés oxidativo y a estímulos antiinflamatorios, confirmando el fenotipo de disfunción mitocondrial observado hasta la fecha en células deficientes de SACSINA (159).

A lo largo de los últimos años, los distintos autores de estudios sobre modelos de enfermedad de ARSACS han sostenido que la formación los agregados de filamentos intermedios (célula-dependiente) y la disfunción mitocondrial pueden ser resultado de una función anormal de eliminación de proteínas y a la disfunción autofágica, debido a la pérdida de la función de chaperona de la SACSINA entre otras, y que no son aspectos fenotípicos que no son mutuamente excluyentes dada la importancia del citoesqueleto en la regulación de la dinámica mitocondrial.

En las neuronas maduras, los principales filamentos intermedios son las proteínas asociadas a los NFs como el polipéptido ligero de neurofilamento (NFL), el polipéptido medio de neurofilamento (NFM), el polipéptido pesado de neurofilamento (NFH) y la periferina. Los NFs, como todos los filamentos

intermedios, tienen una estructura tripartita común: (1) un dominio amino-terminal, conocido como dominio de la cabeza, adyacente a (2) un dominio de núcleo o barra central α -helicoidal altamente conservado, seguido de (3) un dominio carboxilo- dominio terminal o de cola. Los terminales Carboxilo de los neurofilamentos como los NFM o los NFH son capaces de formar puentes cruzados con otros elementos celulares, como orgánulos, microtúbulos, otros neurofilamentos u a otras proteínas asociadas permitiendo crear así una citoarquitectura celular funcional (Figura B6)(169).

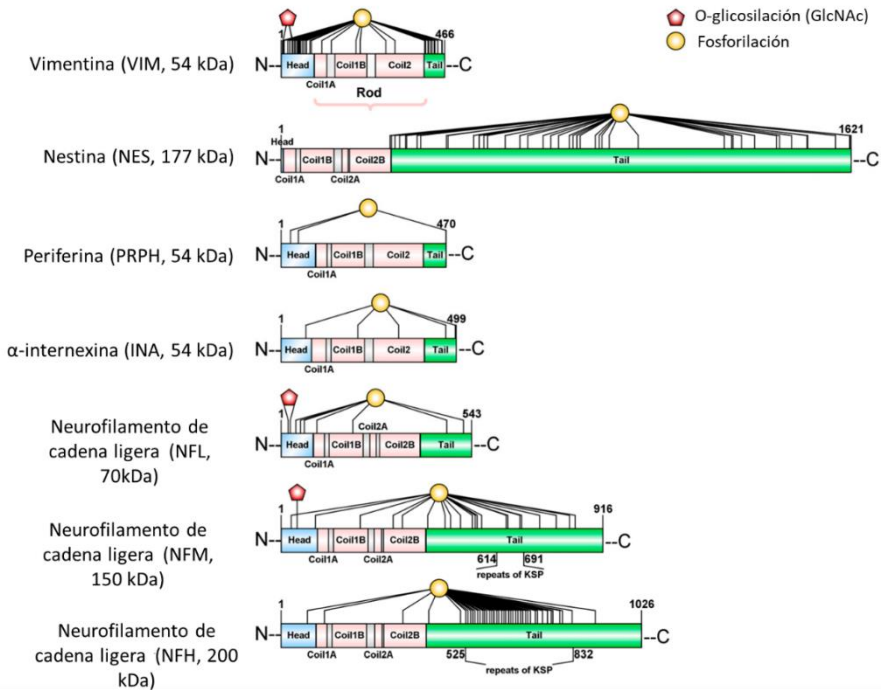


Figura B6 Composición, citoarquitectura y ensamblaje de los neurofilamentos (NFs). Esquema de los dominios y modificaciones postraduccionales de filamentos intermedios. Vimentina, nestina y α -internexina son las subunidades de los neurofilamentos (NF) en el sistema nervioso en desarrollo. El neurofilamento ligero (NFL), el neurofilamento medio (NFM), el neurofilamento pesado (NFH), la y la periferina son subunidades de NFs en el sistema nervioso maduro. estructura: cabeza globular variable en el N-terminal (azul); dominio en espiral alfa-helicoidal (rosa); dominio de cola C-terminal (verde). Se muestran los residuos de fosforilación (esferas amarillas) y O-Glicosilación (estrellas rojas). Figura adaptada de Muñoz-Lasso *et al.* 2020 (170).

Para regular el ensamblaje y renovación de los neurofilamentos, se han descrito distintos sitios de unión a serina y treonina en la parte de la cabeza y la cola que pueden ser fosforilados por variedad de quinasas que a su vez son dependientes de segundos mensajeros, haciendo de ello un proceso complejo (169,171). La regulación del ensamblaje y la renovación de los neurofilamentos además estar mediada por la fosforilación de los mismos, también está mediada por otras proteínas como las chaperonas que regulan las interacciones, maduración y degradación de los neurofilamentos (172). Aunque se conoce poco sobre el papel de las chaperonas en la homeostasis de los neurofilamentos, se han descrito mecanismos clave que, cuando se perturban dan lugar a distintas enfermedades. Por ejemplo, mutaciones en los genes que codifican por las proteínas HSP25/27 y HSP22 causan neuropatías periféricas con agregados de neurofilamentos (173).

Gentil BJ. y cols. (135) ahondaron en el estudio del papel de la SACSINA en el ensamblaje de los filamentos intermedios y describieron como este proceso interfiere en la fisiopatología de la enfermedad de ARSACS. Analizaron la función de las distintas subunidades de proteicas de la SACSINA por separado en el proceso de ensamblaje de los neurofilamentos utilizando modelos celulares basados en cultivos primarios de neuronas de ratón SACS KO (**Figura B7**).

Todos los dominios proteicos de la SACSINA mostraron tener una función diferente para la organización y la dinámica de los neurofilamentos *in vivo* dependiendo del dominio. Para ahondar en el estudio de esas funciones, emplearon el uso de células SW13^{Vim-} que carecían de filamentos intermedios endógenos e introdujeron de manera exógena plásmidos expresando los neurofilamentos de interés y constructos con cada dominio proteico de la SACSINA en estudio (135). Los resultados indicaron que el dominio UBL y el dominio J tenían un efecto inhibitorio general en el establecimiento *de novo* de la red compleja de neurofilamentos, es

decir, no impedían el ensamblaje de los neurofilamentos. Además, promovían la formación de filamentos de longitudes variables más cortas y la formación de estructuras oligoméricas más pequeñas y dispersas, respectivamente. Sin embargo, los dominios SIRPT y HEPN sí que promovían la formación de nuevos neurofilamentos, ensamblaje y agregación (**Figura B7**).

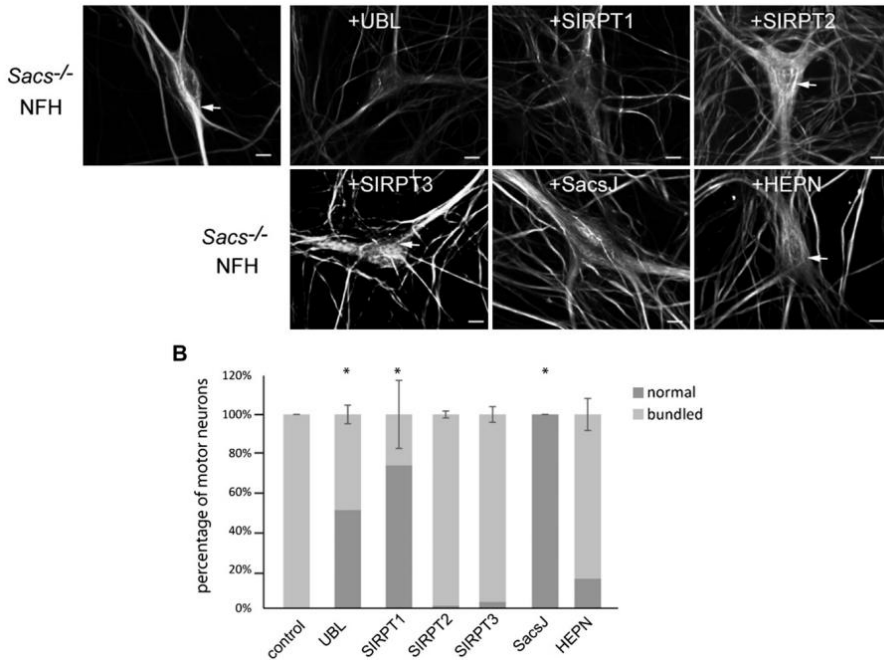


Figura B7 Imágenes de neuronas motoras de SACS KO y el efecto de los distintos dominios de la SACSINA en los NFs. **A)** Imágenes representativas de reconstrucciones tridimensionales de la red NFs 3 días después una microinyección intranuclear de plásmido vacío o plásmido que codifica dominios UBL, SacsJ (o DNAJ), HEPN, SIRPT1, SIRPT2 o SIRPT3 etiquetados con myc. La expresión del dominio de SACSINA se visualizó mediante inmunomarcaje anti-myc y la red NFs se evaluó mediante doble marcaje con anti-NFH. **B)** Cuantificación del efecto de la expresión ectópica de SACSINA sobre el porcentaje de NFs ensamblados (o en haces) de neuronas motoras SACS KO cultivadas *in vitro*. La expresión de UBL, SIRPT1 y SacsJ redujo eficientemente la proporción de neuronas motoras con NFs agrupados, y el dominio HEPN tuvo un efecto mínimo. Figura tomada de Gentil *et al.* 2018 (135).

El efecto de los dominios proteicos de la SACSINA descritos en las células SW13^{Vim-} modificadas sobre el ensamblaje de los neurofilamentos es consistente con el descrito en las neuronas motoras SACS KO, excepto el efecto del dominio SIRPT1. SIRPT1 promovió la formación de filamentos largos *de novo*, así mismo se redujo la formación de neurofilamentos agregados en neuronas, sin embargo, al agregar el dominio J a esta combinación el resultado fue que no se produjeron casi agregados de NFs, indicando que ambos dominios podrían impedir su ensamblaje (135).

En 2018 Gentil BJ. y cols. describieron por primera vez, como la sobreexpresión de distintas chaperonas podían revertir en parte los defectos en la organización de los neurofilamentos provocados por la falta de SACSINA. La sobreexpresión de las chaperonas HSPA1A, DNAJB1 y HSPB1 y el uso del Celsatrol promueve la solubilidad en neurofilamentos defectuosos, promueve la solubilidad de los agregados de NFs en neuronas en cultivo del modelo de ratón SACS KO (**Figura B8**) (135,174). La inducción de las chaperonas puede, según estos datos, reducir la agregación de proteínas mediante una regulación positiva, compensando la pérdida de SACSINA y restaurando la red de filamentos intermedios.

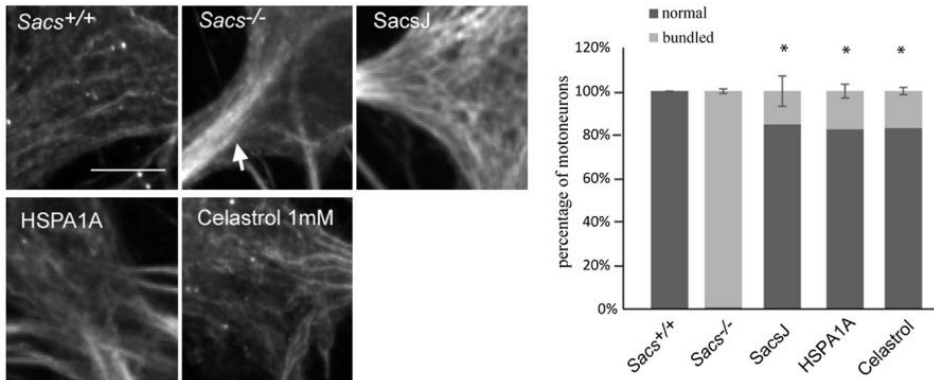


Figura B8 Análisis del ensamblaje de NFs resultante del aumento de expresión de distintas proteínas de choque térmico (HSP) y Cleastrol en neuronas motoras SACS KO *in vitro*. El efecto sobre los haces de NFs en las neuronas motoras analizado mediante inmunomarcaje de NFH y se comparó con la expresión del dominio SacsJ. **A)** Imágenes representativas de los haces de NFs donde las HSP se regularon al alza mediante la expresión de la isoforma HSPA1A de HSP70 o con el fármaco inductor de HSP, Celastrol (1 mM). **B)** Cuantificación del efecto de la expresión ectópica del dominio SacsJ o HSPA1A a los 2 días después de la inyección en el agrupamiento de NFH en neuronas motoras SACS KO en cultivo o después de 24 h de tratamiento con Celastrol 1 mM. Figura tomada de Gentil *et al.* 2018 (135).

A finales del año 2021 Nethisinghe y cols. (175), propusieron la utilización del fármaco KU-32 como una posible terapia para pacientes ARSACS basándose en la fisiopatología y fenotipos hasta entonces descritos *in vitro*. Ku-32 es un derivado de novobiocinio, un inhibidor de la chaperona Hsp90 dirigido su extremo C-terminal que puede inducir la expresión de la chaperona Hsp70 de manera potente, y que protege contra la muerte celular neuronal. Los inhibidores de Hsp90 han sido considerados potenciales terapias para enfermedades neurodegenerativas donde la acumulación de proteínas mal plegadas o agregadas es una característica clave (175,176). Nethisinghe y cols. utilizaron muestras de fibroblastos de pacientes ARSACS y portadores de la enfermedad y observaron que el tratamiento con KU-32 reduce significativamente el fenotipo de agrupación de vimentina en ambos grupos. Previamente los fibroblastos de portadores asintomáticos habían mostrado más acúmulos de vimentina que las células de control, aunque en cantidades

mucho menores que la observada en fibroblastos de pacientes. Igualmente, describieron la recuperación de fenotipo mitocondrial en fibroblastos ARSACS con el tratamiento de KU-32, sugiriendo que los tratamientos dirigidos a la respuesta al choque térmico (HSR) son un área prometedora de tratamiento para pacientes ARSACS (176).

En los últimos años, el estudio de las ciencias ómicas como los estudios proteómicos, metabolómicos y transcriptómicos están ayudando a la comprensión de los mecanismos de la enfermedad ARSACS. Los estudios proteómicos de SH-SY5Y SACS KO y fibroblastos de pacientes ARSACS han permitido describir posibles nuevas funciones de la SACSINA en varios procesos biológicos como la neuroinflamación, sinaptogénesis y absorción de células, cuya expresión era significativamente diferencial en pacientes y en células KO en comparación con los controles (177). Las vías afectadas y las funciones relacionadas de la sinaptogénesis y la muerte celular neuronal relacionadas con la pérdida de función de la SACSINA se conocen en ratones, e indican un deterioro de las CPCs y el desarrollo axonal. Sin embargo, los mismos autores sostienen que son necesarios más estudios para corroborar el deterioro de la vía/función biológica específica, o bien en el tipo de célula específico de la enfermedad, como en las CPCs, o *in vivo* (ratones SACS KO) (177).

Las últimas investigaciones sobre la enfermedad de ARSACS apuntan también a que la proteína SACSINA puede tener un papel esencial en otras vías además de en la homeostasis de los filamentos intermedios y que contribuirían a la fisiopatología. El análisis proteómico de líneas celulares SH-SY5Y donde se ha eliminado el gen SACS, ha identificado cambios en varias proteínas descritas previamente en pacientes ARSACS, pero además una alta cantidad de proteínas hiperfosforiladas no descritas hasta entonces. Este análisis indica que las proteínas más repetitivas encontradas

estaban asociadas con las 'adherencias focales', que incluyen además 'señalización de integrina', 'adherencias de matriz celular' y 'unión de cadherina' (178). Algunos de estos datos se confirmaron con análisis moleculares en células SH-SY5Y y en neuronas de cultivo primario de ratón SACS KO. Por lo que, los datos apuntan a que la SACSINA podría desempeñar un papel crucial en la adhesión celular, siendo las adherencias focales en el cerebro fundamentales para la remodelación estructural durante el crecimiento del axón y la formación y mantenimiento de sinapsis. Además, describieron que en células SACS KO existía un déficit de las proteínas involucradas en las vías de señalización de procesos como la organización de microtúbulos y tráfico de proteínas, que a su vez están regulados por las HSP. Esto sugiere que la interacción entre las proteínas de choque térmico o (HSP, en ingl. *Heat shock protein*) y la SACSINA puede ser una interacción especialmente crítica que se pierde en pacientes ARSACS (178,179).

2. Hipótesis y objetivos

El continuo desarrollo de protocolos basados en células o animales para modelar la enfermedad de ARSACS está permitiendo descubrir distintos procesos biológicos disfuncionales que podrían ser objetivos de futuras investigaciones y de posibles dianas farmacológicas. Sin embargo, obtener datos que representen lo más fielmente posible la fisiopatología de la enfermedad crea la necesidad de desarrollar modelos de origen humano.

Las hiPSCs están abriendo nuevas vías en el modelado de enfermedades neurológicas, en concreto en enfermedades raras neurodegenerativas. Las hiPSCs mimetizan las condiciones de la enfermedad desde las primeras etapas del desarrollo humano y eliminan los problemas éticos que pueden tener la utilización de otras fuentes como hESCs o tejido humano. Por todo ello, las hiPSCs y sus derivados servirían como modelo apropiado para el estudio del mecanismo de enfermedad y su tratamiento.

Sin embargo, no se ha descrito ningún protocolo de diferenciación celular a partir de hiPSCs derivadas de muestras de pacientes con ARSACS que haya tenido como objetivo final la creación de CPCs. El desarrollo de este modelo CPC ARSACS, en tanto que deriva de muestras de pacientes con ARSACS que cursan con afectación predominante de este tipo celular neuronal, debiera resultar más idóneo para investigar el estudio de la fisiopatología subyacente de esta patología.

En el Capítulo 1 de la presente tesis doctoral, el objetivo general es desarrollar un protocolo de diferenciación cerebelar específico para pacientes con ARSACS a partir de hiPSCs que refleje de la manera más completa y cercana la fisiopatología del proceso patológico y sirva como modelo de enfermedad para el desarrollo de fármacos efectivos en el tratamiento de estos pacientes.

Los objetivos específicos son:

Objetivo 1 – Generación y caracterización molecular y funcional de cuatro líneas de hiPSCs reprogramadas a partir de fibroblastos dermales de pacientes y portadores ARSACS sanos.

Objetivo 2 – Generar CCPs en cultivo de las líneas hiPSCs generadas y caracterizar su desarrollo y morfología mediante RT-PCR e inmunofluorescencia.

Objetivo 3 – Generación de CPCs a partir de las líneas hiPSCs generadas mediante la técnica de co-cultivo con neuronas granulares de ratón neonato y caracterizar su desarrollo y morfología mediante inmunofluorescencia y el estudio de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas neuronales.

Objetivo 4 – Caracterización y estudio del fenotipo ARSACS en CCPs y CPCs derivadas de hiPSCs mediante distintas técnicas moleculares.

3. Resultados

Los materiales y métodos utilizados para la obtención de los siguientes resultados se describen en **E. Materiales y métodos** de este trabajo, así como las muestras biológicas utilizadas resumidas en la **Tabla E1** de **E. Materiales y métodos**

3.1 Generación y caracterización de las líneas hiPSCs generadas a partir de fibroblastos de portadores sanos y pacientes ARSACS

3.1.1 Generación de líneas hiPSCs por reprogramación celular

Los fibroblastos derivados de muestras de piel de portadores heterocigotos sanos y pacientes ARSACS se cultivaron 48 horas antes de la transducción con virus Sendai (SeV) con medio de fibroblastos. El día 0, las células se transdujeron con los factores de transcripción de SeV e incubadas toda la noche en condiciones de 37°C y 5% CO₂ (**Figura 3E** en **E. Materiales y métodos**). A día 7 de cultivo, se apreciaban los primeros cambios en la morfología celular (**Figura B9**) indicando el proceso de reprogramación celular. A día 7, las células transducidas se sembraron sobre *feeders*, donde posteriormente se observaron los primeros agrupamientos de células con morfología característica de células pluripotentes. Dependiendo de la línea celular, entre los días 20-26 del protocolo de reprogramación, se observaron las primeras colonias bien definidas de hiPSCs que fueron seleccionadas y cultivadas individualmente durante las siguientes semanas (**Figura B9**).

Tras varios pases sobre *feeders*, se seleccionaron varios clones de cada línea, aquellos clones que presentaban una mejor morfología celular se pasaron a cultivar en Matrigel con medio mTeSR™1 (#05850. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) (**Figura B9**). Finalmente, se seleccionaron dos clones por línea para su

posterior caracterización. En los siguientes apartados se exponen los resultados asociados a la caracterización de un clon por cada línea generada.

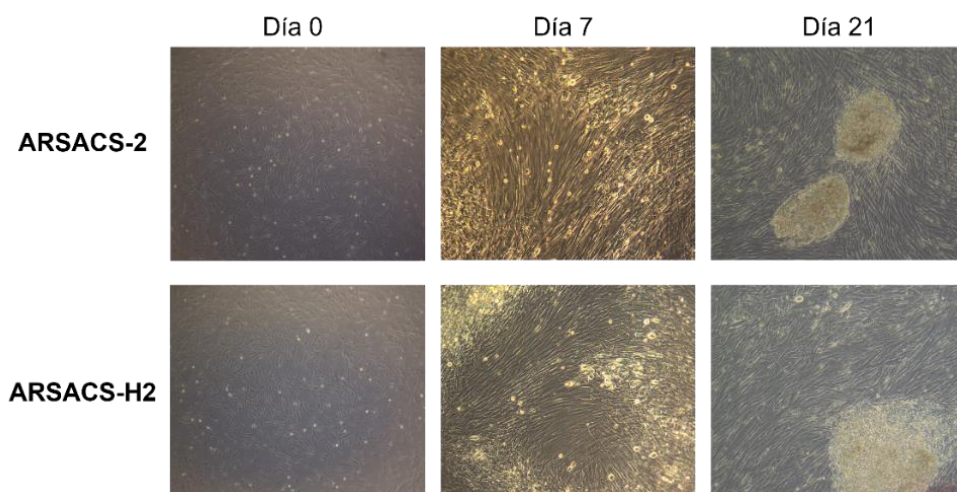


Figura B9 Imágenes representativas del proceso de reprogramación celular de fibroblastos ARSACS a hiPSCs. Las hiPSCs se generaron a partir de fibroblastos dermales humanos de paciente ARSACS-2 y heterocigoto ARSACS-H2. **Día 0:** Cultivo de fibroblastos en adherencia antes de la transducción. **Día 7:** fibroblastos ya transducidos donde se observan cambios morfológicos. **Día 21:** colonia de hiPSCs cultivadas en *feeder*. Posteriormente se pasaron a cultivo *feeder-free*: cultivo celular de hiPSCs sobre Matrigel. Imágenes 10X.

3.1.2 Caracterización molecular y genética

3.1.2.1 Análisis de expresión de factores de reprogramación exógenos

Las hiPSCs reprogramadas pueden contener genoma viral de los SeV que no se integra en el genoma celular, pero su presencia de partículas virales puede interferir las pruebas de caracterización y análisis de la pluripotencia. Por lo que, para su eliminación, y dependiendo de la línea, fueron necesarios de 7 a 13 pases en condiciones de cultivo en *feeders* o *feeder free* en Matrigel hESC-qualified Matrix (#354277. Corning, Nueva York, EE. UU.) con mTeSR™1 (#05850. StemCell

Technologies, Vancouver, Canadá). En ocasiones, fue necesaria la aplicación de un ciclo de incubación de 5 días a 39°C para eliminar algunos de los vectores termosensibles, como Klf4.

Para comprobar si la eliminación de los SeV fue completa, se analizó por RT-PCR la expresión de los genes transducidos por los SeV durante la reprogramación. El producto de esta PCR se corrió en un gel de agarosa al 2% (Figura B10). Se puede observar la ausencia de bandas para los genes SeV para los clones de las líneas ARSACS-1, ARSACS-2, ARSACS-H1 y ARSACS-H2, indicando la no amplificación para ninguno de los factores de reprogramación. Por tanto, estos resultados indican que se eliminaron los SeV mediante la combinación de varios pases y/o ciclos a 39°C en las células de interés.

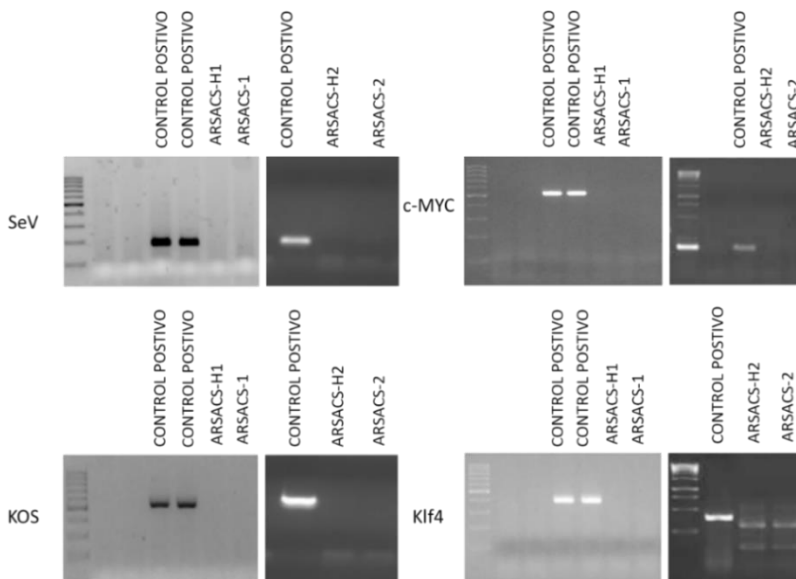


Figura B10. Análisis de expresión de los factores exógenos de reprogramación en células control (+CTL), ARSACS-1, ARSACS-2, ARSACS-H1 y ARSACS-H2. Los datos representan los genes amplificados: Exo-c-myc, Exo-KOS, Exo-Klf4 y Exo-SeV. Como control positivo de amplificación se utilizó mRNA de células transducidas con SeV a día 7 del protocolo de reprogramación.

3.1.2.2 Análisis mutacional por secuenciación

Tras el proceso de reprogramación celular y eliminación de los SeV, se comprobó si los clones de las líneas hiPSCs generadas mantenían las mutaciones originales en el gen *SACS* en los pacientes y portadores ARSACS. Partiendo de DNA genómico de las líneas ARSACS-1, ARSACS-2, ARSACS-H1 y ARSACS-H2, se amplificó por PCR un fragmento del gen *SACS* correspondiente a la localización de la mutación dependiendo de cada línea celular. En paralelo, y como control, se analizó la secuencia génica de la línea control en cada fragmento del gen de interés.

En la **Figura B11** se observan los electroferogramas obtenidos en las cuatro muestras analizadas. Se puede comprobar que la línea generada de ARSACS-1 posee los cambios en c.9938delC (p.G3313Qfs*11) y c.11374C>T (p.R3792*) en heterocigosis compuesta, la línea ARSACS-H1 mantiene el cambio en c.11374C>T (p.R3792X) en heterocigosis. La línea generada de ARSACS-2 posee los cambios en c.826C>T (p.R276C) y c.3904C>T (p.P1302S) en heterocigosis compuesta, y la línea ARSACS-H2 mantiene el cambio en c.826C>T (p.R276C) en heterocigosis, tras la reprogramación celular. De igual manera, se analizó si el portador ARSACS-H2 mantenía la mutación c.2370T>G en heterocigosis (**Figura B11**).

Por tanto, el análisis de secuenciación demuestra que se han reprogramado los fibroblastos originales de la pacientes y portador ARSACS y que durante la reprogramación celular no se ha alterado la mutación que provoca la enfermedad. De esta manera se confirmó que las líneas celulares eran válidas para continuar con el proceso de caracterización.

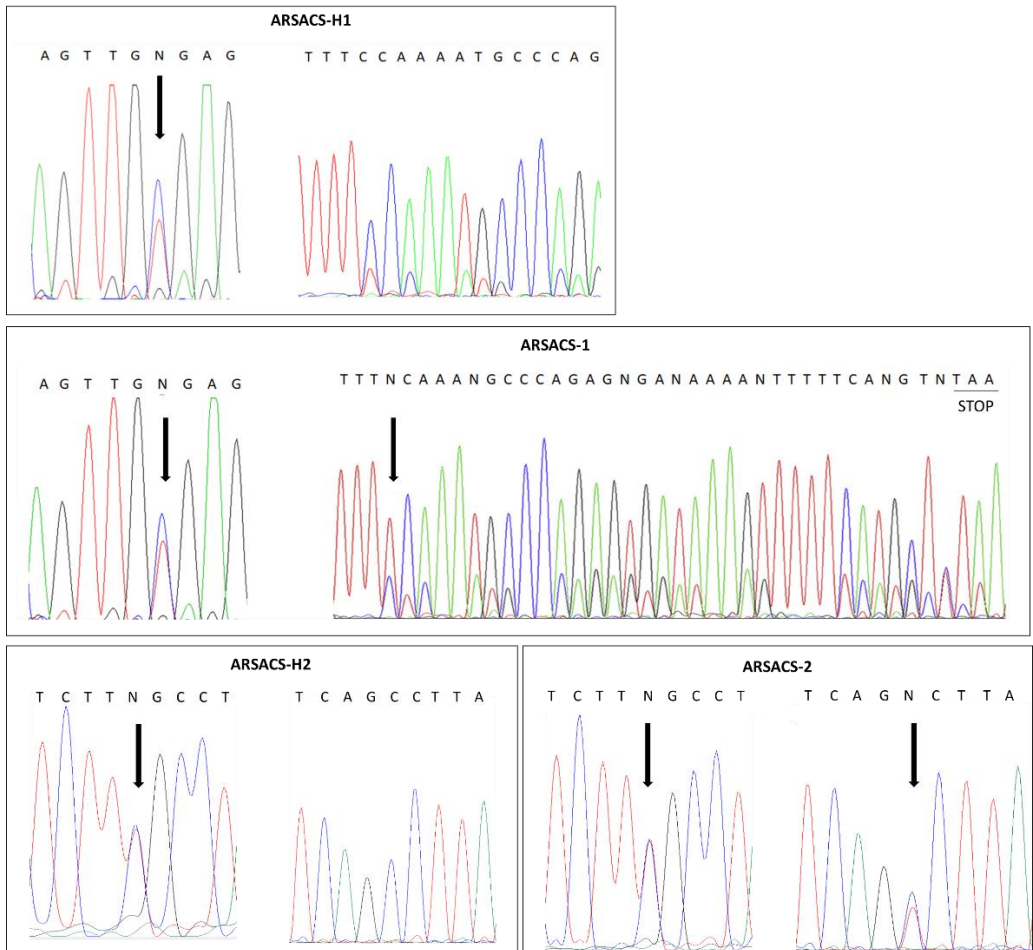


Figura B11 Secuenciación de ADN de la zona de la mutación en el gen *SACS* de ARSACS-1, ARSACS-2, ARSACS-H2 y ARSACS-H2 después de la reprogramación. Electroferograma obtenido de la secuenciación de ADN de las hiPSCs de ARSACS-H1 (panel superior), ARSACS-1 (panel central), ARSACS-H2 y ARSACS-2 (paneles inferiores).

3.1.2.3 Cariotipado

Para evaluar la integridad genómica de las células tras el proceso de reprogramación celular, se analizó el cariotipo de cada línea. Los resultados de la tinción con Giemsa muestran que se trata de cariotipos normales (**Figura B12**). Por

lo tanto, los resultados indican que las líneas hiPSCs generadas se han mantenido genéticamente estables a lo largo del proceso de reprogramación celular, presentando un cariotipo normal.

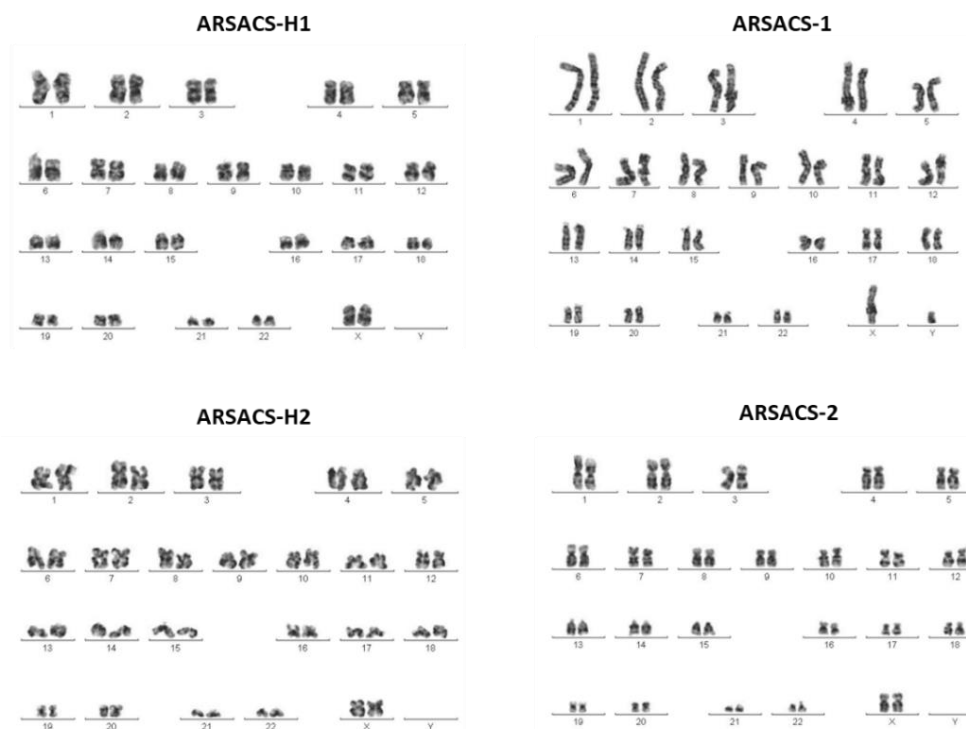


Figura B12 Tinción de bandeado cromosómico en las líneas hiPSCs ARSACS reprogramadas. Imágenes del cariotipo obtenido de las hiPSCs de ARSACS-H1, ARSACS-1, (paneles superiores) y ARSACS-H2 y ARSACS-2 (paneles inferiores). ARSACS-H1 → 46, XX; ARSACS-1 → 46, XY; ARSACS-H2 → 46, XX; ARSACS-2 → 46, XX.

3.1.2.4 Análisis de expresión de marcadores de pluripotencia

Tras el proceso de reprogramación celular, se comprobó la expresión de los marcadores de pluripotencia. Se utilizaron tres técnicas complementarias:

A) Inmunofluorescencia

Se analizó la expresión de distintas proteínas relacionados con la pluripotencia celular por inmunofluorescencia, que son expresadas de manera endógena por las hiPSCs y son los responsables del mantenimiento de la pluripotencia en el cultivo (180). En las **Figuras B13 y B14** se puede comprobar que en las cuatro líneas ARSACS-1, ARSACS-2, ARSACS-H1 y ARSACS-H2 la expresión de proteínas que permiten el establecimiento y mantenimiento de la pluripotencia celular ha sido inducida. En todas las líneas hiPSCs generadas se observa la expresión de los marcadores de pluripotencia tal como: NANOG, OCT4, SOX2, SSEA4.

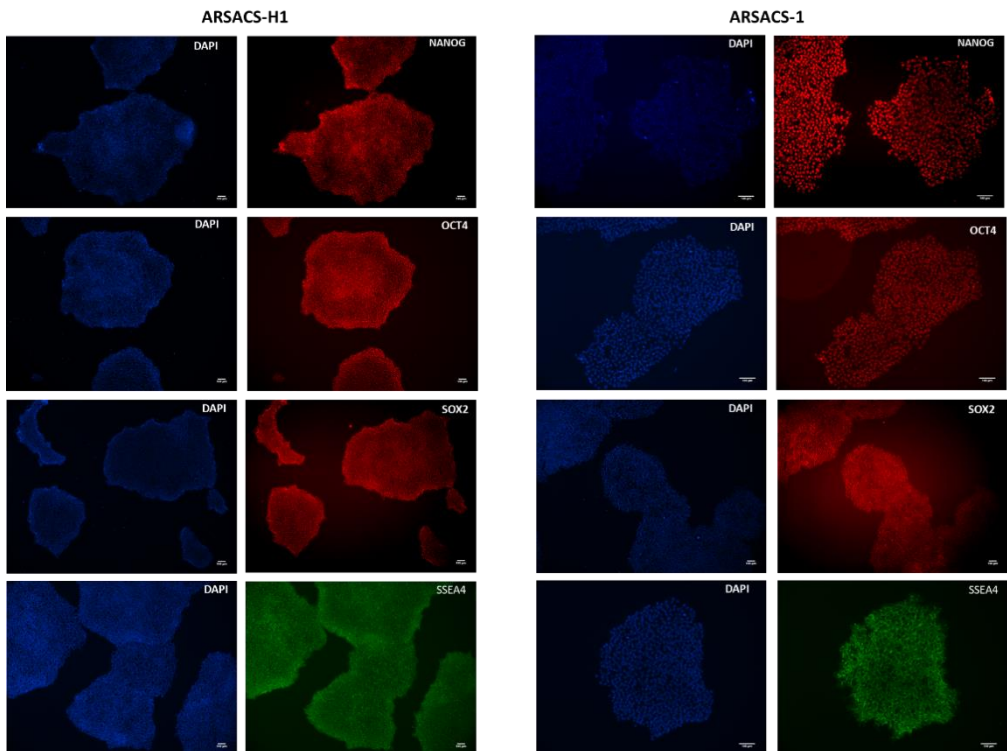


Figura B13 Imágenes de inmunofluorescencia representativas de marcadores de pluripotencia en colonias de hiPSCs ARSACS-H1 y ARSACS-1. DAPI (azul), y de arriba abajo: NANOG (rojo); OCT4 (rojo); SOX2 (rojo); SSEA4 (verde). En todas las imágenes la escala representa 100 μm.

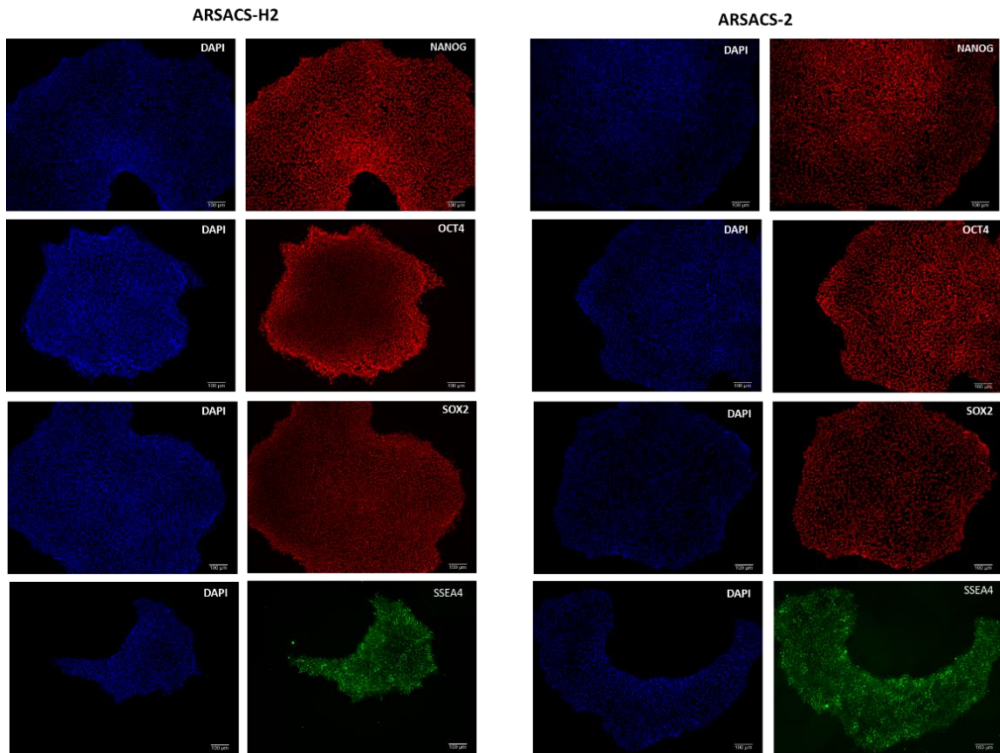


Figura B14 Imágenes de inmunofluorescencia representativas de marcadores de pluripotencia en colonias de hiPSCs ARSACS-H2 y ARSACS-2. DAPI (azul), y de arriba abajo: NANOG (rojo); OCT4 (rojo); SOX2 (rojo); SSEA4 (verde). En todas las imágenes la escala representa 100 µm.

B) Citometría de flujo

La citometría de flujo permite conocer por un lado la viabilidad celular y, la presencia de marcadores de pluripotencia en las colonias de las líneas hiPSCs obtenidas después de la reprogramación (180).

Los resultados obtenidos mostraron una alta expresión de ambos marcadores estudiados en el cultivo de las líneas hiPSCs de ARSACS-H1, ARSACS-1, ARSACS-H2 y ARSACS-2. En el caso de las células marcadas con SSEA4, todas las líneas hiPSCs superaban, en todos los casos, la expresión en más del 95% de las células viables

(Figura B15). En el caso del marcaje de las líneas hiPSCs con TRA-1-60, el porcentaje de positividad variaba del 45 al 60%, siendo por tanto la expresión menor de este marcador en las líneas generadas.

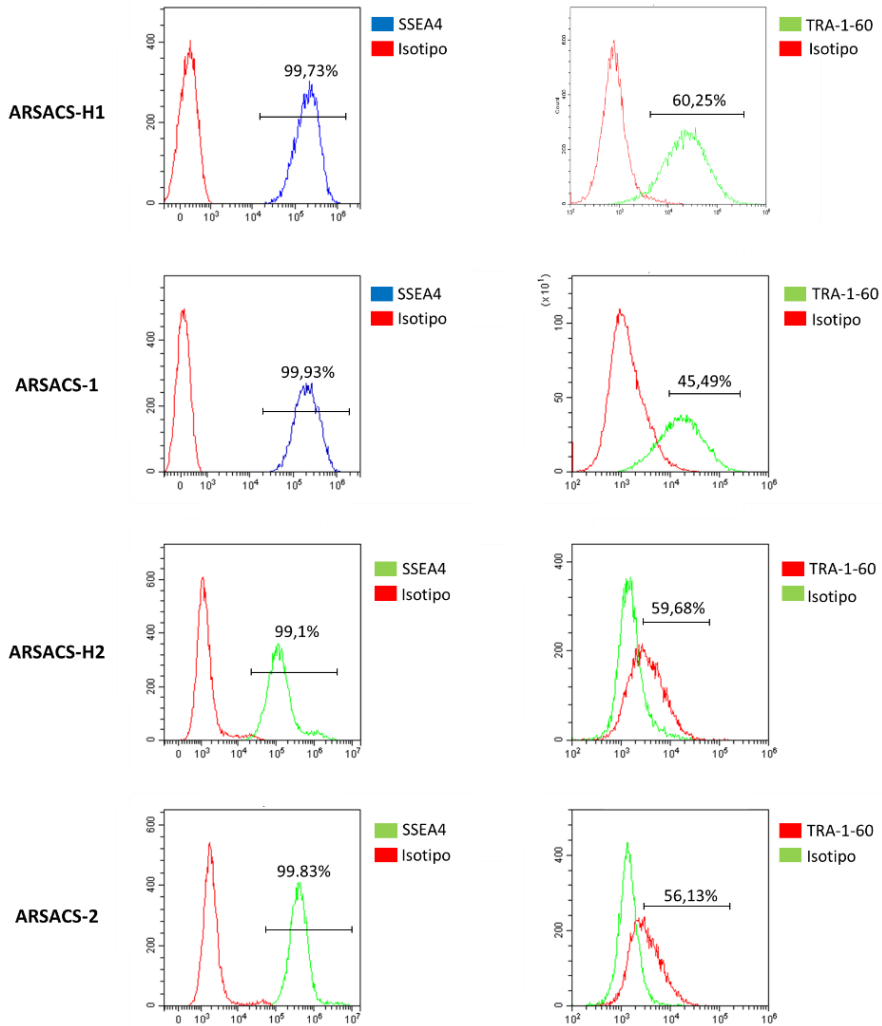


Figura B15 Análisis de citometría de marcadores de pluripotencia SSEA4, Tra1-60 en las células hiPSCs ARSACS-H1, ARSACS-1, ARSACS-H2 y ARSACS-2. Histogramas de hiPSCs marcadas con SSEA4 y TRA1-60 en hiPSCs marcadas con el isotipo correspondiente a cada anticuerpo como control negativo.

C) Fosfatasa alcalina

Se analizó la tinción por fosfatasa alcalina en las líneas hiPSCs generadas como marcador de pluripotencia (181). En la **Figura B16** se recogen los resultados de la reacción de hidrólisis de los fosfatos de los ésteres que cataliza se visualizó mediante la tinción del producto, dando como resultado colonias de color morado/rosa.

Los altos niveles de coloración indicaron una elevada actividad de la fosfatasa alcalina En las cuatro líneas hiPSCs generadas, ARSACS-1, ARSACS-2, ARSACS-H1 y ARSACS-H2, y por la correcta generación de hiPSCs.

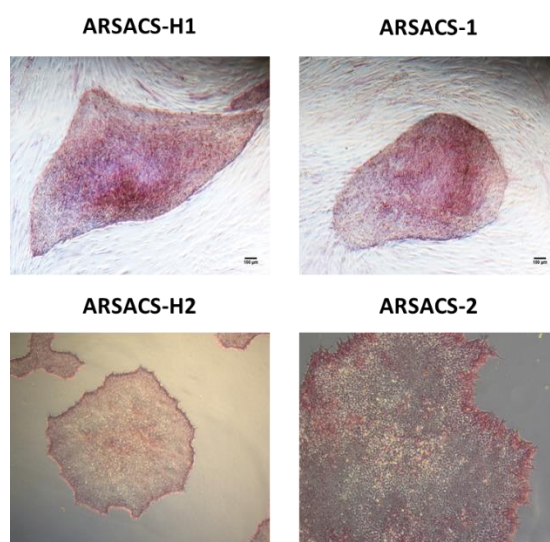


Figura B16. Tinción de fosfatasa alcalina en las líneas hiPSCs ARSACS. Los paneles superiores corresponden a colonias de hiPSCs sobre feeder de ARSACS-H1 y ARSACS-1. Los paneles inferiores corresponden a colonias hiPSCs cultivadas en *feeder-free* de ARSACS-H2 y ARSACS-2. En todas las imágenes la escala representa 100 μ m.

3.1.3 Caracterización funcional

Las hiPSCs deben tener la capacidad de generar los tres tipos celulares pertenecientes a las tres capas germinales. Para evaluar esta característica se realizó un ensayo de inducción de cuerpos embrionarios o *embryo Bodies* (EBs) a partir del cultivo de cada una de las líneas hiPSCs generadas.

3.1.3.1 Formación de cuerpos embrionarios *in vitro*

Para verificar la capacidad de diferenciación de las líneas hiPSCs generadas se analizó la expresión de proteínas, por inmunofluorescencia, asociadas a la formación de las tres capas germinales. En las cuatro líneas hiPSCs generadas se detectó la presencia de proteínas asociadas a las tres capas germinales, tales como la actina de músculo liso o SMA (endodermo), α -fetoproteína o FOXA2 (endodermo) y Tuj1 (ectodermo) (180).

Las imágenes obtenidas del análisis de los anticuerpos analizados se muestran en la **Figura B17**. Estos resultados indican que las cuatro líneas son capaces de generar cualquier tipo celular *in vitro*.

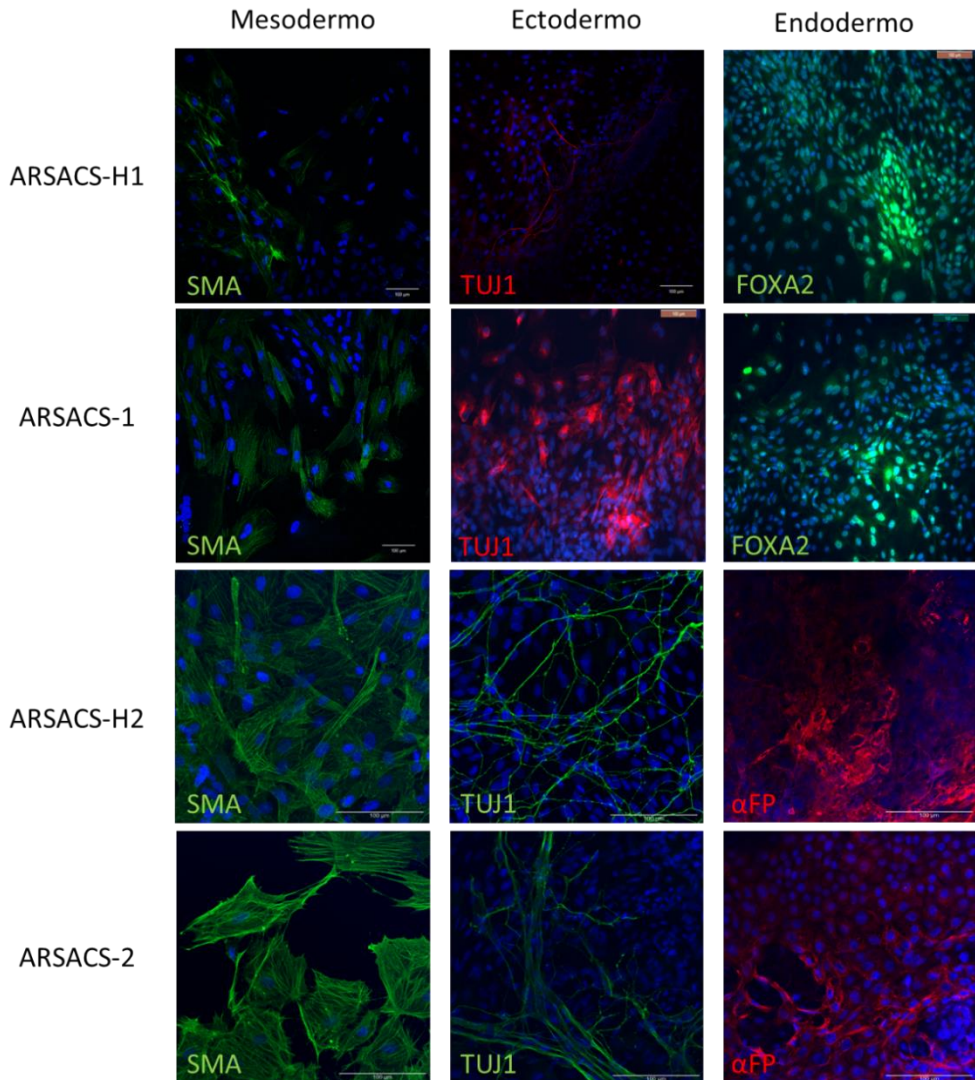


Figura B17. Imágenes de inmunofluorescencia representativas de marcadores de las tres capas germinales asociadas a la formación de cuerpos embrionarios (EBs) a partir de los cultivos de hiPSCs ARSACS. De arriba abajo se muestran los EBs generados de ARSACS-H1, ARSACS-1, ARSACS-H2 y ARSACS-2. De izquierda a derecha: Actina de músculo liso (SMA) (verde) asociada a mesodermo; β -III tubulina (Tuj1) (rojo o verde) asociada a ectodermo. α -fetoproteína (α FP) o FOXA2 asociada a endodermo (rojo o verde). En todas las imágenes la escala representa 100 μ m.

3.2 Caracterización y validación de la generación de células precursoras de cerebelo y células de Purkinje de cerebelo funcionales a partir de líneas hiPSCs

Para confirmar la correcta diferenciación neural/cerebelar de las líneas hiPSCs generadas de control, portadores y pacientes ARSACS, se analizó la expresión de los genes *OTX2*, *EN1*, *EN2*, *HOXA2* y *GBX2*, relacionados con la formación y regionalización del tubo neural, la aparición de células precursoras cerebelares, así como marcadores específicos del desarrollo fenotípico de neuronas GABAérgicas y CPCs. Estos estudios se realizaron tanto por RT-PCR que permite la obtención de resultados precisos relacionados con pequeños cambios de expresión génica, como por ensayos de inmunocitoquímica/inmunofluorescencia para comprobar visualmente la formación de un fenotipo neuronal cerebelar mediante la detección de proteínas asociadas (**Figuras B18 y B19**). Mediante RT-PCR se estudió el patrón de expresión temporal de mRNA de cada gen analizado en cada línea celular por separado, tomando como referencia para las comparaciones relativas de expresión de cada gen el día 0 de la diferenciación de cada una de ellas con el fin de investigar su expresión temporal de manera independiente.

3.2.1 Expresión de genes relacionados con la organización del tubo neural y la regionalización durante el protocolo de diferenciación celular

En primer lugar, se analizó si los factores utilizados para la diferenciación neuronal inducían a la pérdida de propiedades pluripotentes y, por tanto, la inducción a la diferenciación neural era correcta. A su vez, y durante el inicio de la diferenciación a neuroectodermo caudal, se comprobó que el cultivo no adquiriría un carácter rostral. Para ello, se estudiaron los niveles de expresión génica de *OCT4* y *OTX2* mediante RT-PCR, siendo *OCT4* uno de los marcadores de transcripción de pluripotencia por excelencia, y *OTX2* un marcador cuya expresión está relacionada con el desarrollo temprano de la parte rostral de SNC, como el diencefalo,

mesencéfalo y telencéfalo. En las **Figuras B18 y B19** se muestra una rápida inhibición de *OCT4* y *OTX2* desde el inicio de la diferenciación neuronal.

A continuación, se estudió la expresión de genes relacionados con la regionalización del tubo neural hacia el rombencéfalo en estadios tempranos del desarrollo, como los genes *HOXA2* y *GBX2*. En las **Figuras B18 y B19** se muestra como *GBX2* se expresa al inicio del protocolo (día 10) del modelo generado por la diferenciación de las líneas hiPSCs, induciendo así la diferenciación neural cerebelar, y terminando por decaer su expresión a lo largo del protocolo. A su vez, se estudió la expresión del gen *HOXA2* que resultó estar aumentada también en los primeros días de la diferenciación *in vitro* y, por tanto, del desarrollo neural del cultivo de las líneas hiPSCs. *HOXA2* pertenece a la familia de los genes *HOX*, que son los responsables temporales y espaciales del desarrollo del SNC. Los datos de expresión temprana de estos genes en el proceso de diferenciación cerebelar se recogen en las **Figuras B18 y B19**, en las que se observa cómo la expresión de los genes asociados a la diferenciación cerebelar aumenta en los primeros días del protocolo de diferenciación, y esta disminuye conforme avanza el protocolo de diferenciación en el tiempo.

La expresión temprana de estos genes en el cultivo indicaría la correcta diferenciación hacia las estructuras que posteriormente darán lugar al cerebelo y, por lo tanto, a la aparición de células neurales responsables del proceso. La expresión de estos genes es imprescindible para que cada región adquiriera las propiedades básicas de los tejidos que allí se generarán.

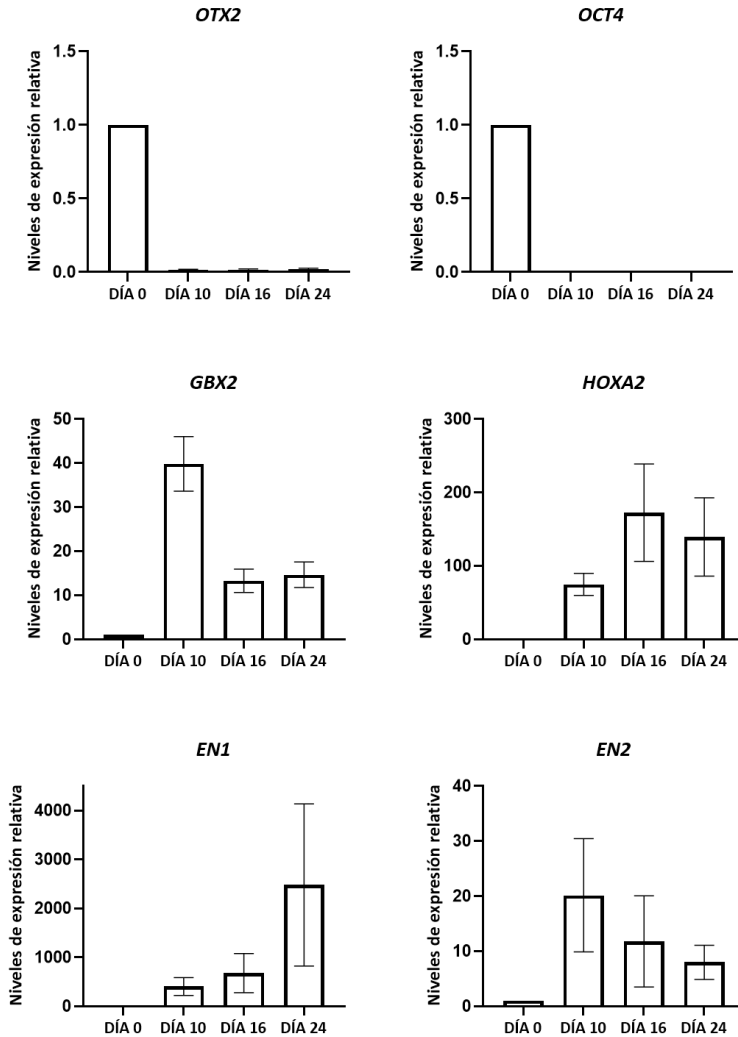


Figura B18 Análisis de expresión génica de marcadores de regionalización cerebelar durante la diferenciación neural *in vitro* de las hiPSCs control. Mediante RT-PCR, se analizó la expresión de los genes *OTX2*, *OCT4*, *HOXA2*, *GBX2*, *EN1* y *EN2*, en los días 10-24 de diferenciación en comparación con hiPSCs indiferenciadas (fold change = 1). Los datos representan la expresión media por día \pm SEM en unidades relativas de cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (N=5).

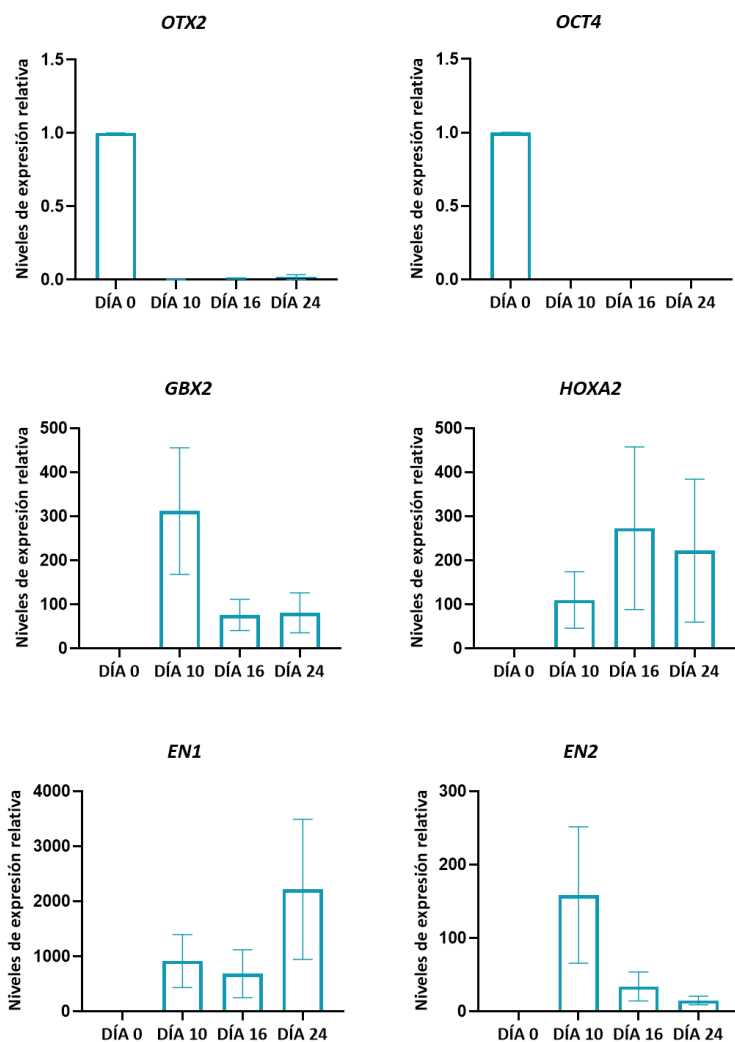


Figura B19 Análisis de expresión génica de marcadores de regionalización cerebelar durante la diferenciación neural *in vitro* de las hiPSCs ARSACS-1. Mediante RT-PCR, se analizó la expresión de los genes *OTX2*, *OCT4*, *HOXA2*, *GBX2*, *EN1* y *EN2* en los días 10-24 de diferenciación en comparación con hiPSCs indiferenciadas (*fold change* = 1). Los datos representan la expresión media por día \pm SEM en unidades relativas de cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (N=3-5).

3.2.2 Expresión de genes relacionados con el desarrollo cerebelar de neuronas GABAérgicas y células de Purkinje de cerebelo durante el protocolo de diferenciación celular

En segundo lugar y una vez confirmada la regionalización del cultivo de las líneas celulares, se investigó la expresión de genes marcadores de precursores de CPCs durante el proceso de diferenciación celular. Se analizó la expresión del gen *KIRREL2*, asociado a precursores neuronales muy tempranos de neuronas GABAérgicas cerebelares durante el desarrollo, siendo el orden de expresión de genes descrito de este tipo de neuronas *Ptf1a/Kirrel2* > *Olig2* > *Lhx1/5* > *Neurog1* (73). Durante el protocolo de diferenciación neuronal/cerebelar del cultivo, la expresión de *KIRREL2* aumenta hasta alcanzar su pico máximo en torno a los días 16-24, indicando la presencia de precursores de neuronas GABAérgicas de cerebelo (Figuras B20 y B21).

Se analizó además la expresión del gen *SKOR2* (o *CORL2*), que se expresa de manera específica durante el desarrollo, aunque también en etapas adultas, en las células del linaje de las CPCs. Las CCPs post-mitóticos que derivan de células *Lhx1/5+* expresan *SKOR2*. Los resultados del análisis de expresión de RT-PCR de la diferenciación de la línea control y paciente ARSACS-1 indican que en estadios tempranos existe una ausencia de expresión (días 0-24), coincidiendo con la expresión de marcadores tempranos de CPCs (*KIRREL2*). Durante el proceso de diferenciación, la expresión de *SKOR2* aumenta en estadios medios y tardíos (días 32-48), cuando la de *KIRREL2* empieza a disminuir por la maduración de las CCPs (Figuras B20 y B21).

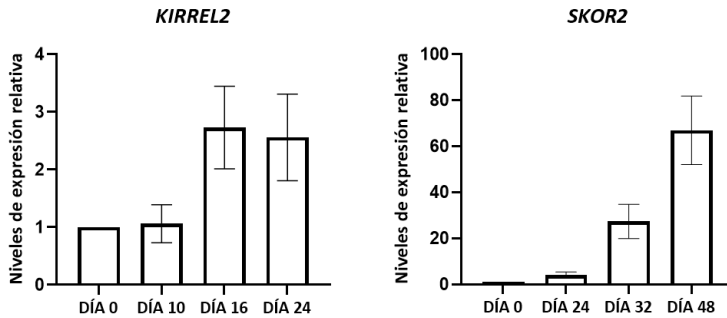


Figura B20 Análisis de expresión de los genes *KIRREL2* y *SKOR2* durante la diferenciación cerebelar de las hiPSCs Control. La expresión de los genes marcadores tempranos y tardíos del desarrollo de CPCs se analizó mediante RT-PCR en los días 10-24 y 24-48 de diferenciación cerebelar *in vitro*, y en comparación con hiPSCs indiferenciadas (*fold change* = 1. Los datos representan la expresión media por día ± SEM en unidades relativas de cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (N=5).

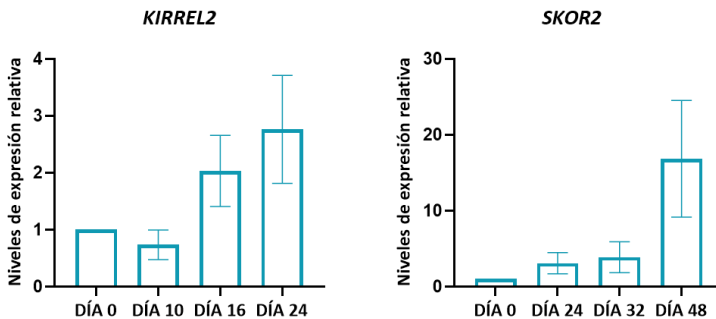


Figura B21 Análisis de expresión de los genes *KIRREL2* y *SKOR2* durante la diferenciación cerebelar de las hiPSCs ARSACS-1. La expresión de los genes marcadores tempranos y tardíos del desarrollo de CPCs se analizó mediante RT-PCR en los días 10-24 y 24-48 de diferenciación cerebelar *in vitro*, y en comparación con hiPSCs indiferenciadas (*fold change* = 1. Los datos representan la expresión media por día ± SEM en unidades relativas de cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (N=3-5).

3.2.3 Expresión de genes relacionados con la maduración funcional de las neuronas GABAérgicas durante el protocolo de diferenciación celular

Una vez estudiados los genes implicados en la especificación regional y la adquisición del cerebelar, se analizaron aquellos genes relacionados con la maduración y la funcionalidad de este tipo de neuronas. Para ello se determinó la expresión tanto del gen que codifica glutamato descarboxilasa (*GAD1* o *GAD67*), como de la subunidad α -2 del receptor de ácido γ -aminobutírico (*GABRA2*) a diferentes días de diferenciación (días: 0, 24, 32 y 48). Al estudiar el patrón temporal de expresión de *GAD1* (Figuras B22 y B23) se observó cómo aumenta con la diferenciación hasta día 48 tanto en las células control como en paciente ARSACS-1, asociándose la aparición y maduración de neuronas GABAérgicas. En el caso *GABRA2*, el pico de expresión también se encuentra a los 48 días en células control y paciente ARSACS, indicando la activación del canal iónico activado por GABA y formación de sinapsis GABAérgicas conforme avanza la maduración de las neuronas en el cultivo (Figuras B22 y B23).

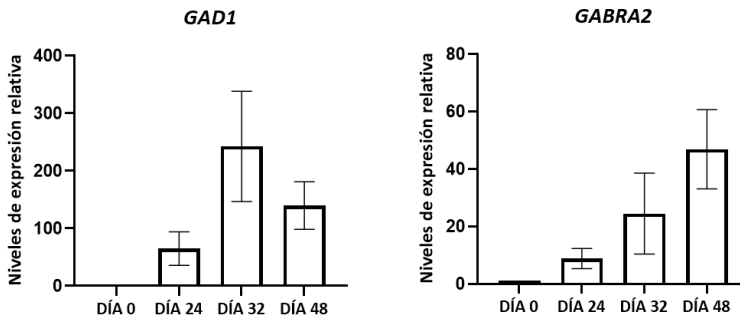


Figura B22 Análisis de expresión de los genes *GAD1* y *GABRA2* durante la diferenciación cerebelar de las hiPSCs control. Se analizó mediante RT-PCR la expresión de genes involucrados en la adquisición de fenotipo GABAérgico y desarrollo de CPCs in vitro entre los días 10-24 y 24-48 de, y en comparación con hiPSCs indiferenciadas (fold change = 1. Los datos representan la expresión media por día \pm SEM en unidades relativas de cada línea tras normalizar frente a GAPDH, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (N=5).

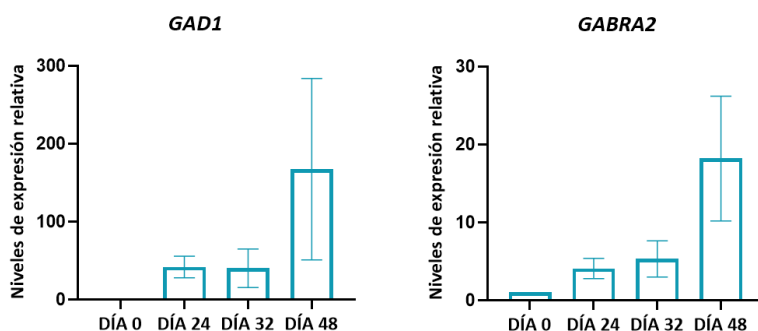


Figura B23 Análisis de expresión de los genes *GAD1* y *GABRA2* durante la diferenciación cerebelar de las hiPSCs ARSACS-1. Se analizó mediante RT-PCR la expresión de genes involucrados en la adquisición de fenotipo GABAérgico y desarrollo de CPCs *in vitro* entre los días 10-24 y 24-48 de, y en comparación con hiPSCs indiferenciadas (*fold change* = 1. Los datos representan la expresión media por día \pm SEM en unidades relativas de cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (N=3-5).

3.2.4 Expresión de proteínas relacionadas con el desarrollo neuronal y cerebelar de neuronas GABAérgicas y células de Purkinje de cerebelo durante el protocolo de diferenciación celular

Para la inducción neural del cultivo de hiPSCs se utilizó la técnica de cultivo de esferoides de células en suspensión para una rápida formación de neuroectodermo o tubo neural, como se muestra en la imagen correspondiente al día 4 de la **Figuras B24 y B25**. Posteriormente los esferoides se cultivaron en 2 dimensiones (2D) o pseudo-2D para el favorecimiento de la formación de estructuras celulares en el cultivo que permitieron la aparición de células del linaje cerebelar y morfología característica de alta densidad en cultivo (**Figuras B24 y B25**; imágenes tomadas en microscopio óptico de campo claro a día 10 del protocolo).

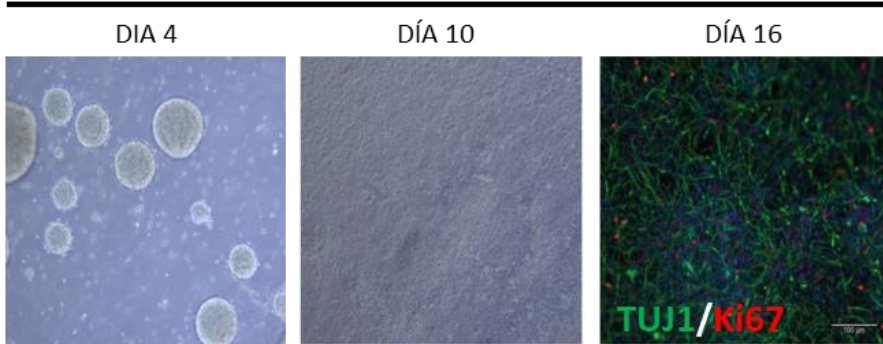
A día 16 del protocolo de diferenciación, la formación de neuronas se observó mediante el marcaje de estas con Tuj1, marcador de microtúbulos y que se expresa en todas las neuronas. Además, las nuevas neuronas en formación se marcaron

también con Ki67 que expresaba la proliferación celular o fase activa de mitosis, indicando la presencia de precursores neuronales en crecimiento y división en este punto del protocolo. A día 24 del protocolo de diferenciación eran incluso visibles las células positivas para el marcador Lhx1 (**Figuras B24 y B25**), marcador temprano asociado a la formación de neuronas GABAérgicas.

A día 32 del protocolo de diferenciación, se investigó si efectivamente y en paralelo a la expresión génica, en el cultivo había células positivas para SKOR2, marcador temprano/medio de CPCs. La **Figura B24 y B25** a día 32 muestra grupos de células que expresan el marcador SKOR2, corroborando la formación en el cultivo de CCPs y en concreto de CPCs.

Por último, el cultivo se mantuvo hasta día 48 sin co-cultivo para demostrar que, con el paso del tiempo, las CCPs forman CPCs adultas mediante marcaje con PCP2, marcador habitualmente empleado para CPCs Post mitóticas. Los resultados indicaron que se lograron obtener marcadores de etapas tardías o maduras de CPCs derivadas de hiPSCs (**Figuras B24 y B25**).

Inducción neural y diferenciación neuronal



Diferenciación a precursores cerebelares

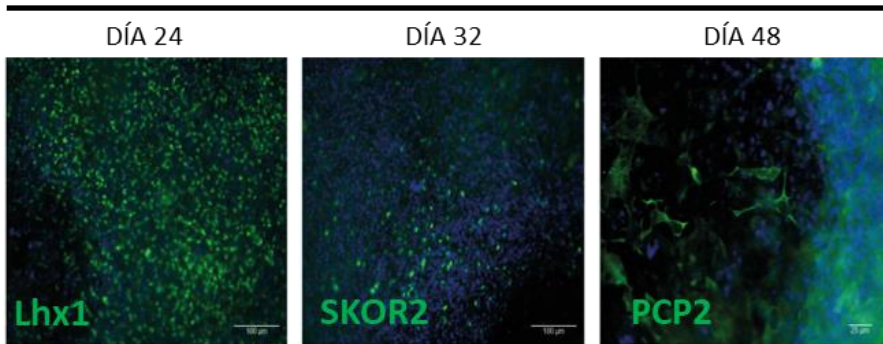


Figura B24 Imágenes representativas de la inducción neural y formación de células precursoras de cerebelo derivados de hiPSCs control durante del protocolo de diferenciación. **Día 4)** Formación de esferoides para la inducción a neuroectodermo del cultivo de hiPSCs; **Día 10)** Inducción cerebelar en cultivo 2-D de los esferoides formados; **Día 16)** Marcaje de precursores neurales con Tuj1/ Ki67 a día 16; **Día 24)** Marcaje de progenitores de cerebelares de neuronas GABAérgicas a día 24 con Lhx1; **Día 32)** Marcaje de precursores de CPCs a día 32 con SKOR2; **Día 48)** Marcaje de CPCs a día 48 sin co-cultivo por PCP2. En todas las imágenes la escala representa 100 μm , excepto en la imagen del día 48), que representa 25 μm . Las imágenes correspondientes al día 4 y 10 representan representativas del cultivo a un aumento en 10X en un microscopio óptico de campo claro.

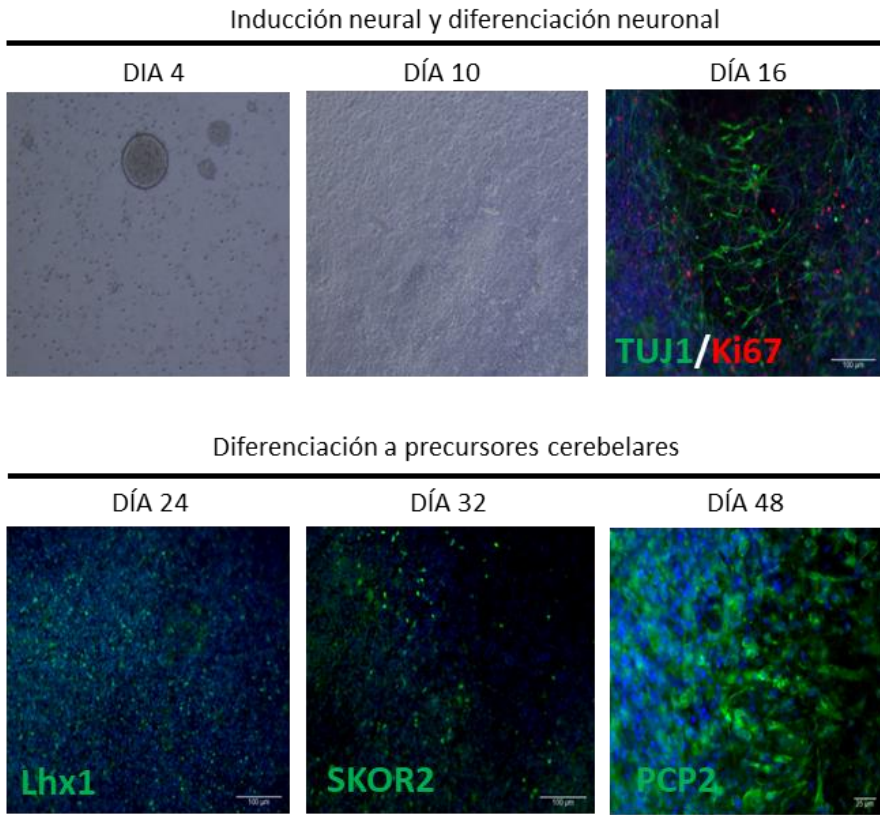


Figura B25 Imágenes representativas de la inducción neural y formación de células precursoras de cerebelo derivados de ARSACS-1 durante del protocolo de diferenciación. **Día 4)** Formación de esferoides para la inducción a neuroectodermo del cultivo de hiPSCs; **Día 10)** Inducción cerebelar en cultivo 2-D de los esferoides formados; **Día 16)** Marcaje de precursores neurales con Tuj1/ Ki67 a día 16; **Día 24)** Marcaje de progenitores de cerebelares de neuronas GABAérgicas a día 24 con Lhx1; **Día 32)** Marcaje de precursores de CPCs a día 32 con SKOR2; **Día 48)** Marcaje de CPCs a día 48 sin co-cultivo por PCP2. En todas las imágenes la escala representa 100 μm , excepto en la imagen del día 48), que representa 25 μm . Las imágenes correspondientes al día 4 y 10 representan representativas del cultivo a un aumento en 10X en un microscopio óptico de campo claro.

Alrededor del día 30 del protocolo de diferenciación, la presencia SKOR2 implicó la existencia de precursores de Purkinje no maduras o postmitóticas, permitiendo seleccionar los precursores de CPCs mediante marcaje con THY1 para su posterior co-cultivo con células granulares de ratón P4-7. El co-cultivo se realizó para mejorar la diferenciación y maduración de las células precursoras de Purkinje y poder estudiar su desarrollo morfológico y función sináptica.

Las células PCP2+ derivadas de las hiPSCs de ARSACS-1 a día 60 empiezan a migrar del conjunto de células sembrado en el co-cultivo y comenzando a obtener una morfología bipolar (**Figuras B26 A) y B27 A)**). Posteriormente, en torno a los días 82-90, el soma de las CPCs marcadas con calbindina-D28k (CALB) desarrollaron la forma ovalada típica además de aumentar su extensión y ramificación de las dendritas. En torno a los días 100-130 del protocolo de diferenciación, las CPCs crecieron en extensión y tamaño, además de presentar múltiples ramificaciones indicando el avance de la maduración del cultivo (**Figuras B26 D) y B27 D)**).

Las CPCs humanas, además, alrededor del día 120-130 empezaron a expresar marcadores de presencia de receptores GABA y de glutamato, como VGAT y VLGUT1 (**Figuras B26 y B27, E) y F)** respectivamente).

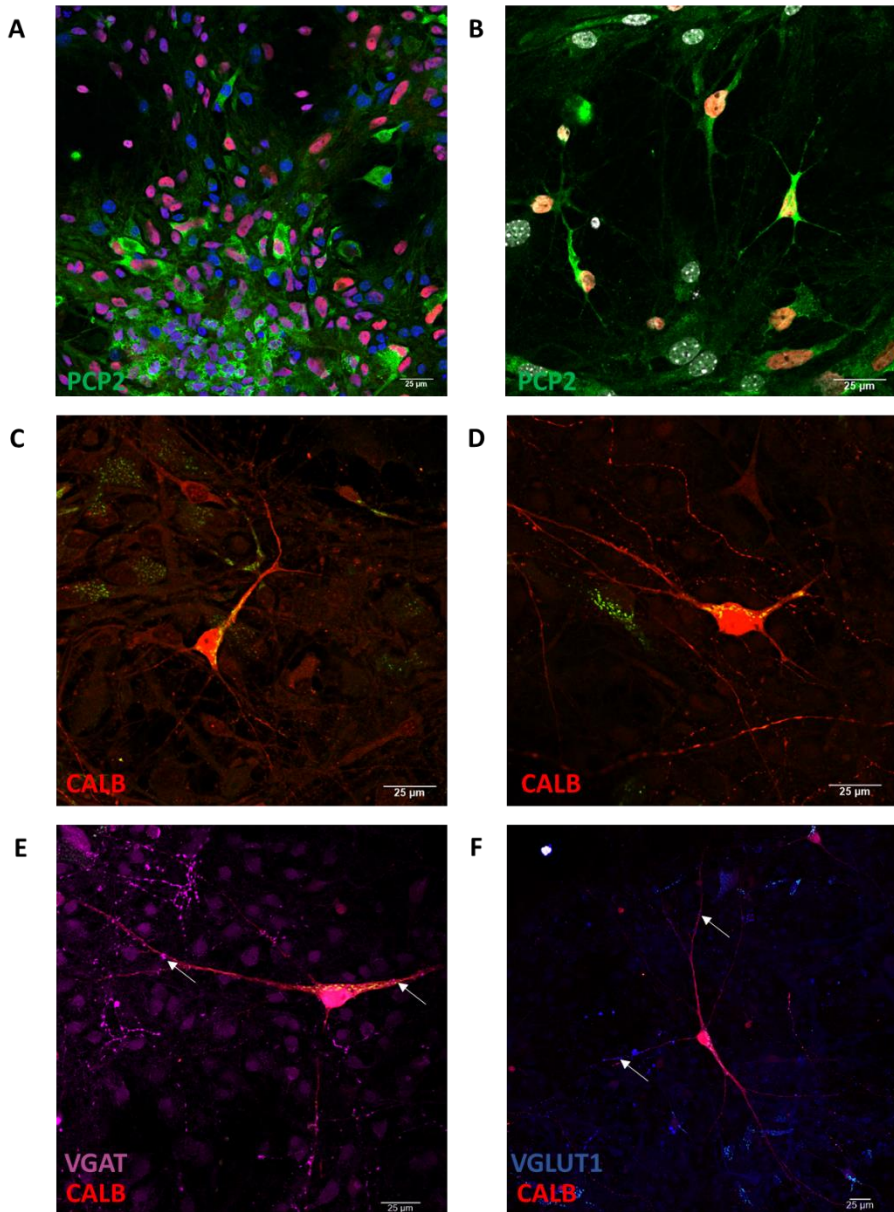


Figura B26 Desarrollo morfológico de CPCs a partir de hiPSCs control en co-cultivo con células granulares de ratón. Las imágenes se tomaron en los días **A)** 60, **B)** 82, **C)** 100 y **D)** 130 del protocolo de diferenciación. Marcadores de CPCs en verde PCP2, en rojo CALB; VGAT y VGLUT en morado y azul respectivamente. (Punteado señalado con flechas blancas). Marcador de núcleo humano en rojo (HuNu); marcador de Golgi humano en verde (HuGolgi). En todas las imágenes la escala representa 25 μm.

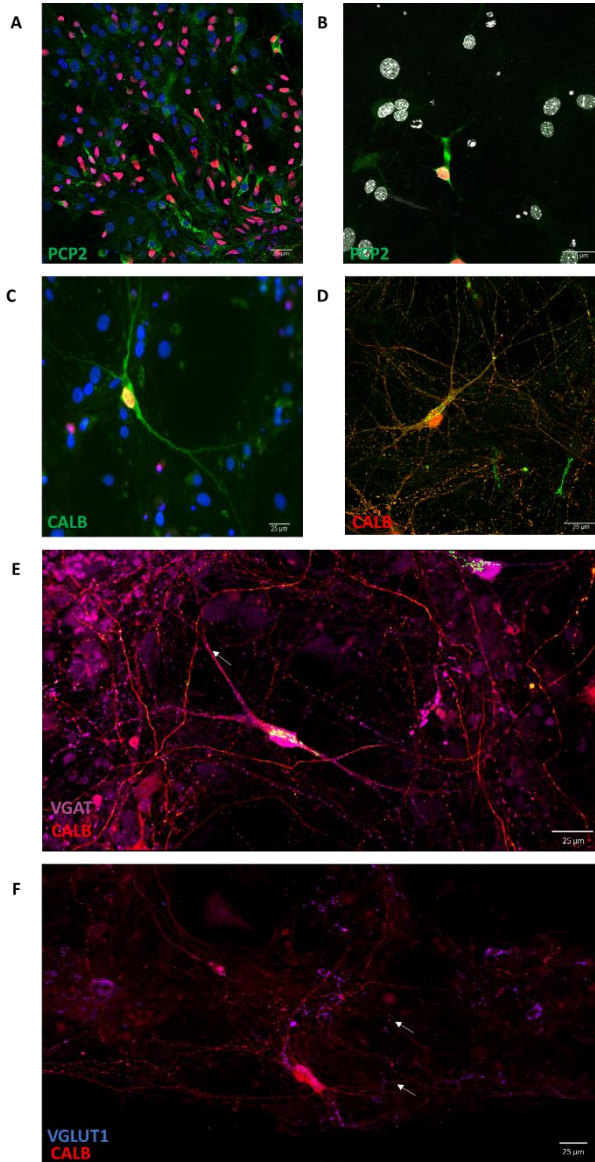


Figura B27 Desarrollo morfológico de CPCs a partir de hiPSCs de ARSACS-1 en co-cultivo con células granulares de ratón. Las imágenes se tomaron en los siguientes días: **A)** 60, **B)** 82, **C)** 100 y **D)** 130 del protocolo de diferenciación. Marcadores de CPCs en verde PCP2 y en rojo CALB; VGLUT en morado y azul respectivamente. (Punteado señalado con flechas blancas). Marcador de núcleo humano en rojo (HuNu); marcador de Golgi humano en verde (HuGolgi). En todas las imágenes la escala representa 25 μm .

3.3 Las células de Purkinje de cerebelo derivadas de pacientes ARSACS muestran alteración de la morfología celular, tamaño del soma, reducción del crecimiento neuronal, arborización y número de sinapsis alterado

Los precursores de CPCs se seleccionaron con el marcador THY1 y fueron co-cultivados con neuronas granulares de cerebelo ratón durante 130 días para su maduración. Tras este periodo y con el fin de analizar las diferencias morfológicas neuronales relacionadas con el desarrollo neuronal, las CPCs humanas derivadas de las líneas hiPSCs ARSACS, portador y control se marcaron con un marcador de Golgi humano (HuGolgi) y calbindina (CALB), marcador por excelencia de CPCs (**Figura B28**).

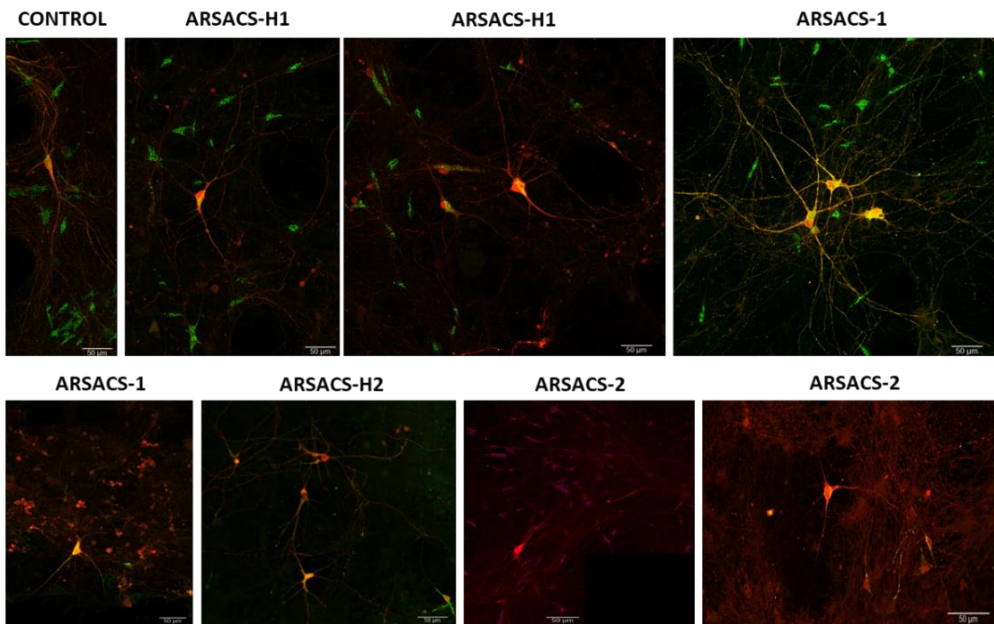


Figura B28 Imágenes representativas de células de Purkinje de cerebelo derivadas de las líneas hiPSCs control y ARSACS. Las imágenes se tomaron en los días 130 del protocolo de diferenciación y se analizó la morfología neuronal. Marcador de CPC calbindina (rojo); marcador de Golgi humano (HuGolgi) (verde). En todas las imágenes la escala representa 50 μm .

Las CPCs derivadas de hiPSCs seleccionadas y marcadas con HuGolgi+/CALB+ en co-cultivo con neuronas granulares a día 130 de la diferenciación mostraron que el tamaño del soma es mayor en CPCs de ARSACS-H1 y ARSACS-1, y menor en ARSACS-H2 y ARSACS-2 con respecto al control, pero no de manera significativa. (**Figura B29 B**); Promedio \pm SEM; Control = $256,41 \pm 23,55$; ARSACS-H1 = $271 \pm 20,70$; ARSACS-1 = $323,17 \pm 21,36$; ARSACS-H2 = $200,58 \pm 80,66$; ARSACS-2 = $213,63 \pm 21,29$).

Se analizó de igual forma el diámetro de la dendrita primaria como característica morfológica específica de CPCs ARSACS. Las CPCs derivadas de hiPSCs seleccionadas y marcadas con HuGolgi+/CALB+ en co-cultivo a día 130 de la diferenciación mostraron que diámetro de la dendrita principal es mayor en CPCs de ARSACS-H1, ARSACS-1, ARSACS-H2 con respecto al control de manera significativa, excepto en ARSACS-2 que sí que es mayor pero no estadísticamente significativo (**Figura B29 A**).

Para evaluar la morfología y madurez neuronal, se analizó el crecimiento dendrítico/neuronal de las CPCs derivadas de pacientes y portadores ARSACS y control, mediante análisis cuantitativo de imágenes utilizando el software Image J y el plugin Neuron J. Las CPCs derivadas de hiPSCs seleccionadas y marcadas con HuGolgi+/CALB+ en co-cultivo con neuronas granulares a día 130 de la diferenciación no mostraron cambios significativos en el crecimiento total (o complejidad neuronal) y el número de procesos dendríticos primarios con respecto al control. Sin embargo, el número de ramificaciones secundarias era menor en las CPCs de pacientes ARSACS, siendo estadísticamente significativo en el caso de ARSACS-2 (**Figura B29 E**).

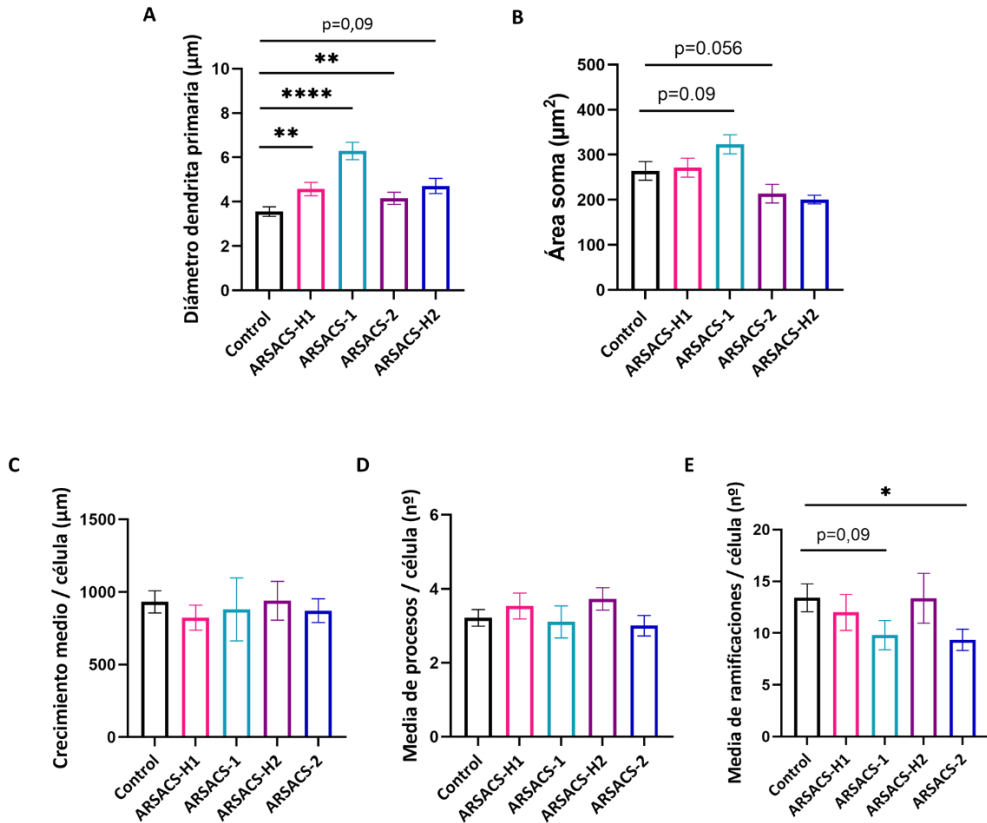


Figura B29 Análisis cuantitativo de la morfología y desarrollo de las células de Purkinje de cerebelo derivadas de las líneas hiPSCs control y ARSACS. El estudio se realizó con las CPCs humanas derivadas de las líneas hiPSCs control, ARSACS-H1, ARSACS-1, ARSACS-H2 y ARSACS-2 a día 130 del protocolo de diferenciación. **A)** Diferencias en diámetro de la dendrita primaria de CPCs derivadas de hiPSCs ARSACS en comparación con las obtenidas de hiPSCs control en co-cultivo *in vitro*. **B)** Diferencias en área del soma de CPCs derivadas de hiPSCs ARSACS en comparación con las obtenidas de hiPSCs control en co-cultivo *in vitro*. **C)** Análisis del crecimiento dendrítico total de las CPCs humanas derivadas las líneas hiPSCs ARSACS-H1, ARSACS-1, ARSACS-H2 y ARSACS-2 a día 130 del protocolo de diferenciación en comparación con la línea control. **D)** Número de neuritas primarias de las células derivadas de las líneas hiPSCs control y ARSACS. **E)** Análisis del número de ramificaciones neurales totales por CPC humana derivada de las líneas ARSACS en comparación con la línea control. Los datos de la gráfica representan la media de cada análisis estudiado en cada línea \pm SEM. Datos determinados por al menos tres experimentos de diferenciación independientes un total de 15-20 células por grupo. Los niveles de significancia (** $P \leq 0,001$; * $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

Por último, para determinar si las mutaciones en *SACS* estaban asociadas con cambios en la sinapsis, se analizó la localización del transportador de GABA en la membrana de las vesículas sinápticas y marcador de neuronas GABAérgicas VGAT, mediante análisis cuantitativo de imágenes utilizando ImageJ. La densidad de VGAT en las neuritas se analizó en CPCs derivadas de la diferenciación de hiPSCs de pacientes y portadores ARSACS con respecto al control durante 130 días y en co-cultivo. Tanto las CPCs ARSACS como las CPCs ARSACS-H1 y H2 mostraron menor densidad de puntos VGAT en las dendritas en comparación con las CPCs control (**Figura B30 A**). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la cantidad de puntos VGAT en el soma en ninguna línea con respecto al control, excepto en ARSACS-2, que disminuyó (**Figura B30 B**).

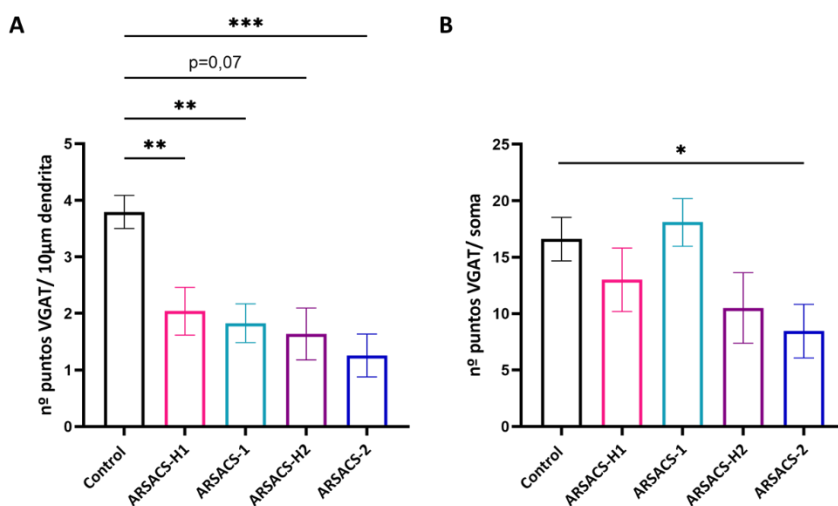


Figura B30. Expresión de VGAT en células de Purkinje de cerebelo derivadas de hiPSCs ARSACS y control. **A)** Cuantificación de punteado VGAT en dendritas; **B)** Cuantificación de punteado VGAT en soma; Datos determinados por al menos tres experimentos de diferenciación independientes un total de 15-20 células por grupo. Los niveles de significancia (** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

3.4 Las células de Purkinje de cerebelo derivadas de líneas hiPSCs de pacientes ARSACS y portadores ARSACS muestran defectos en las propiedades electrofisiológicas

Se analizó si las diferencias observadas en la morfología neuronal y la disminución de la expresión del marcador sináptico VGAT asociada mutaciones en *SACS* en las CPCs derivadas de hiPSCs afectaban a las propiedades funcionales electrofisiológicas básicas del modelo celular CPC ARSACS .

Las neuronas registradas fueron identificadas como CPCs en base a sus características morfológicas, como son el gran soma de forma poligonal con un núcleo grande, dendrita o dendritas principales que desarrollan un árbol dendrítico y una gran complejidad neuronal y se aseguró que todas ellas presentaran un potencial de membrana en reposo estable y no dieran lugar a potenciales de acción espontáneos. Las neuronas que cumplieron estas características fueron registradas y divididas según grupos de estudio: control, portadores ARSACS-H (conjunto de ARSACS-H1 y ARSACS-H2) y pacientes ARSACS (en conjunto ARSACS-1 y ARSACS-2). De 7 a 15 neuronas fueron incluidas en cada grupo. Solo se tomaron los datos de las neuronas que al menos presentaron un potencial de acción.

Algunas de las células registradas se rellenaron con biocitina en el momento del registro y posteriormente se observó la morfología característica de célula CPC en cada una de ellas mediante visualización por inmunofluorescencia, y se confirmó que eran humanas al expresar el marcador HuGolgi (**Figura B31**).

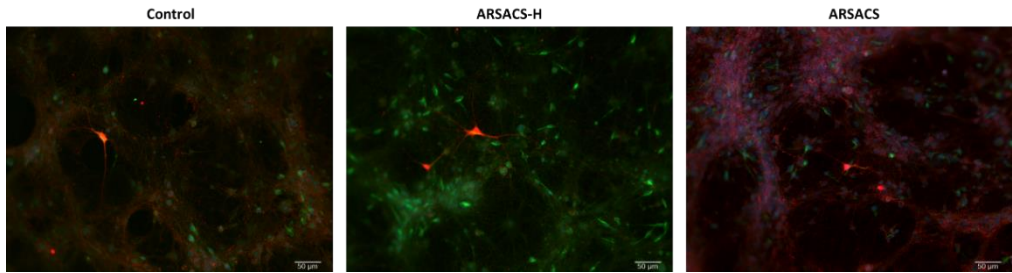


Figura B31 Imágenes representativas de células de Purkinje de cerebelo derivadas de las líneas hiPSCs control y ARSACS registradas e inyectadas con biocitina. Biocitina (rojo); marcador de Golgi humano (HuGolgi) (verde). En todas las imágenes la escala representa 50 μm .

Los registros electrofisiológicos de célula completa (*whole cell patch clamp*) se realizaron en CPCs humanas derivadas de células THY1+, que fueron co-cultivadas hasta el día 130 aproximadamente, en presencia de bloqueadores sinápticos descritos en la sección de 2.26 en **E. Materiales y métodos**.

Los resultados en cuanto al potencial de acción se observaron como la amplitud del potencial de acción como la duración de estos estaba alterada en CPCs derivadas de hiPSCs ARSACS y ARSACS-H, sugiriendo una menor frecuencia y duración ante un mismo voltaje. En la **Figura B32** se muestran las respuestas en voltaje de dos neuronas representativas ARSACS-H y ARSACS (en azul y amarillo respectivamente), cada una correspondiente a un grupo de estudio frente al control (en negro), a pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes.

Se analizó el potencial de membrana en reposo (RPM; *Resting membrane potential*). En la **Figura B32** se muestra como las CPCs derivadas de hiPSCs ARSACS y ARSACS-H exhibieron un potencial de membrana en reposo más alto en comparación con las células control, mostrándose una hiperpolarización cuando se compararon los grupos frente al control. Sin embargo, no se encontraron

diferencias significativas entre ARSACS y ARSACS-H. El potencial de membrana en reposo se calculó como la diferencia entre los potenciales intracelulares y extracelulares tras la extracción del electrodo de registro de la célula.

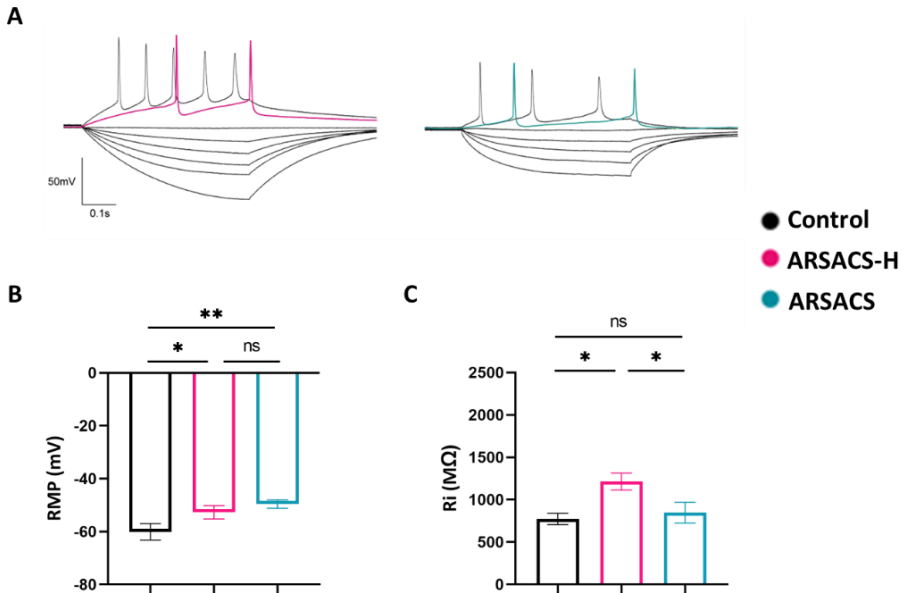


Figura B32 Cambios en las propiedades pasivas de membrana de las células de Purkinje de cerebelo derivadas de las líneas hiPSCs ARSACS, ARSACS-H y control. **A)** Respuestas representativas en voltaje de células Control (negro), ARSACS-H (portadores en rosa) y ARSACS (pacientes en azul) a un paso de inyección de corriente de 100 ms y 10 pA que generan pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes **B)** Histograma donde se muestran los valores medios potencial de membrana de reposo y **C)** Histogramas donde se muestran los valores medios de la resistencia de membrana. Los niveles de significancia (** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$; ns= no significativo) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

Además, se analizó la resistencia de membrana o de entrada (R_i , *input resistance*) en las CPCs derivadas de hiPSCs de portadores sanos y pacientes ARSACS. Los portadores sanos exhibieron una R_i más baja en comparación con sus respectivos controles. Sin embargo, no se observaron diferencias en R_i en ARSACS con respecto

al control, aunque sí entre ARSACS-H y ARSACS ([Figura B32](#)). La resistencia de membrana o resistencia de entrada se midió mediante la inyección de pulsos cuadrados de corriente positivos y negativos.

3.5 Las mutaciones en el gen *SACS* causan una deficiencia de la función mitocondrial citosólica en las células precursoras de neuronas de cerebelo de pacientes ARSACS

La *SACSINA* se localiza en la mitocondria y se asocia a los procesos de fusión y fisión mitocondrial, y por lo tanto interviene en la correcta morfología y función mitocondrial, involucrada en los procesos esenciales de la función neuronal. Por lo que para analizar si las mutaciones en *SACS* contribuían al desajuste de la bioenergética celular se llevó a cabo el ensayo *Sehorse XF Cell MitoStress* utilizando la tecnología *Seahorse Bioscience XFe 96 Extracellular Flux Analyzer*, metodología detallada en la sección 2.13 de E. Materiales y métodos y resumida en la [Figura B33](#).

Los resultados obtenidos indican que la respiración basal (en inglés *Basal respiration*) en las CCPs de pacientes ARSACS y portador ARSACS-H2 es menor que en el control, mostrando así una menor demanda energética de las células en condiciones basales ([Figura B33](#)). Posteriormente, y después de la inyección del inhibidor del complejo V mitocondrial u oligomicina, se observa un menor consumo de oxígeno (OCR) ligado a la respiración por producción de ATP (en inglés *ATP-linked respiration*) en las CCPs de pacientes ARSACS y portador ARSACS-H2. La inhibición de este complejo mitocondrial muestra además que la respiración restante no acoplada a la síntesis de ATP o fuga de protones (en inglés *proton leak*), parámetro que se reduce significativamente en las CCPs de pacientes ARSACS y portador ARSACS-H2 en comparación con el control.

A continuación, se inyectó el agente desacoplante cianuro de carbonilo 4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), permitiendo calcular la capacidad respiratoria máxima, así como la capacidad de reserva ante un aumento de la demanda de ATP. La capacidad respiratoria máxima es el aumento de OCR después de la adición de FCCP y se calcula como la diferencia entre los valores de OCR alcanzados tras la administración de FCCP y la tasa de respiración tras la adición de oligomicina. La **Figura B34** muestra una disminución significativa tanto de la máxima capacidad respiratoria (en inglés *Maximal respiration*) como la capacidad de reserva respiratoria (en inglés *Reserve capacity/Spare respiratory capacity*) en las CCPs de pacientes ARSACS y portador ARSACS-H2, lo que indica la baja capacidad de respuesta de estas células para generar ATP en el caso de que aumentase la demanda (182).

Por último, al final del experimento se inyectó rotenona, como inhibidor del complejo I mitocondrial, y antimicina A, como inhibidor del complejo III para detener la transferencia de electrones mitocondriales, con el objetivo de obtener el OCR no asociado a los procesos mitocondriales. En las CCPs de paciente ARSACS-1 y portador ARSACS-H2 los valores de OCR asociados a procesos no mitocondriales disminuyen significativamente hasta valores de 40 pmol/min/céls respecto al control (**Figura B34**).

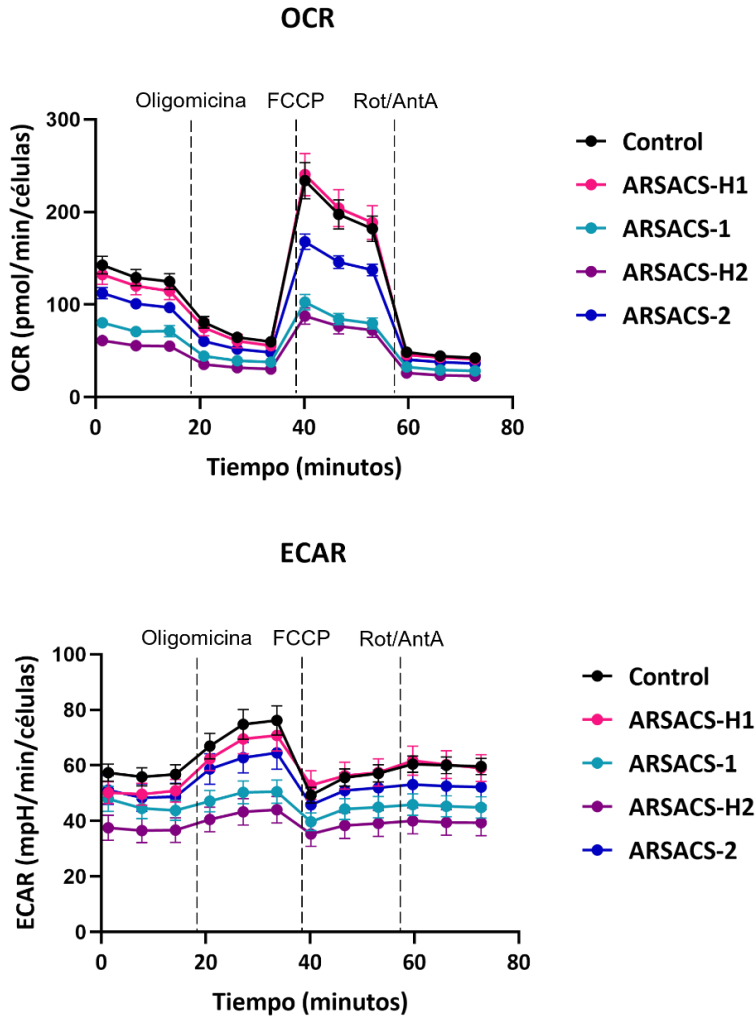


Figura B33 Perfil de mediciones de consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) asociado a la función mitocondrial y bioenergética celular por Seahorse XF96. Mediciones de OCR y ECAR de las CCPs a día 30 de las distintas líneas ARSACS y control en distintas condiciones y a la densidad de siembra óptima (60.000 células / pocillo) en una microplaca Seahorse XF96 de 96 pocillos con recubrimiento (poli-D-lisina/laminina). Cada punto de datos se presenta como media \pm SEM. Serie de inyecciones: (A) Oligomicina (1,5 μ M); (B) FCCP (1 μ M); (C) Rotenona/Antimicina A (0,5 μ M).

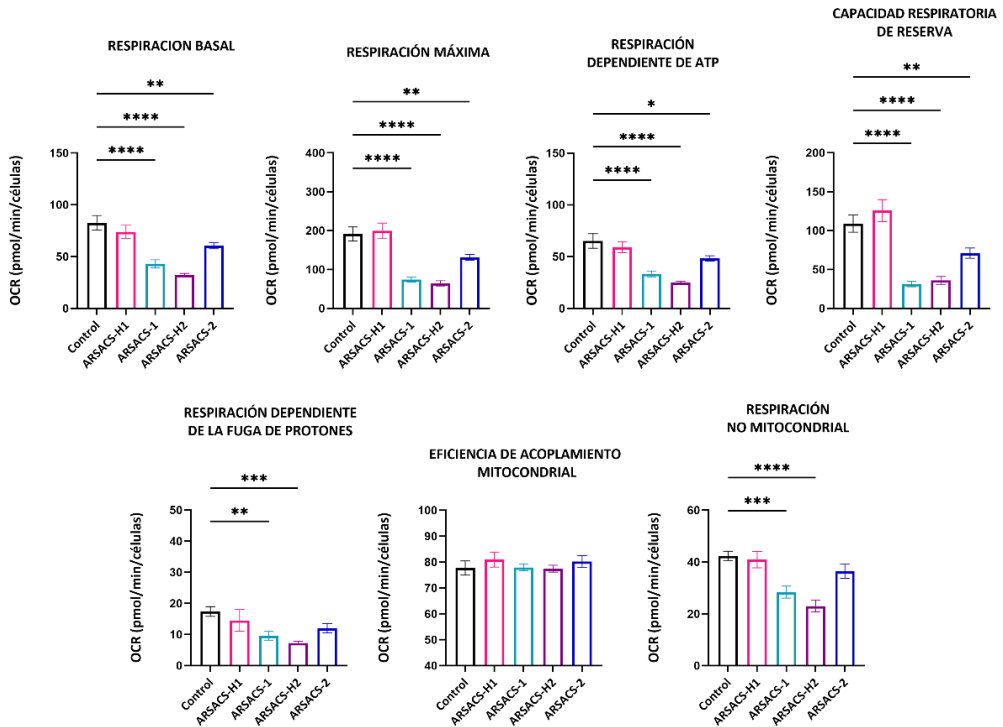


Figura B34 Estudio de disfunción mitocondrial empleando Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test. Se analizó la respiración basal, producción de ATP, respiración máxima, respiración ligada a ATP, eficiencia de acoplamiento, fuga de protones y la capacidad de reserva en CCPs de control, pacientes y portadores ARSACS. El ensayo se realizó en condiciones basales y después de la adición de oligomicina (1,5 μM), cianuro de carbonilo 4-trifluorometoxifenilhidrazona (1 FCCP) (μM) y rotenona / antimicina A (0,5 μM). Los datos en cada gráfica representan la media \pm SEM, determinada por tres experimentos de diferenciación independientes y al menos 4 réplicas técnicas de cada uno de ellos. Los niveles de significancia (**** $P \leq 0,0001$; *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *one-way* ANOVA y *post-hoc* Dunnet test.

Para obtener una imagen aproximada del metabolismo celular, se evaluó la acidificación extracelular o ECAR (*Extracellular Acidification Rate*) como índice de la actividad glucolítica. La acidificación extracelular es debida al transporte de lactato al medio celular, lo que conlleva la salida de protones de las células cuando solo se les suministra glucosa 25 mM como sustrato energético. En este experimento,

adicionalmente, se les ha suministrado a las células glutamina 200 mM y piruvato 100 mM. En este caso los niveles de ECAR basales son ligeramente menores en las CCPs de pacientes y portadores ARSACS en comparación con las células control, lo que sugiere una menor actividad glucolítica en estas células. Al inyectar oligomicina aumenta la acidificación en el medio extracelular haciendo que la síntesis de ATP dependa fundamentalmente de la glucólisis. Como se aprecia en la **Figura B35**, el aumento de la acidificación es significativamente menor en el paciente ARSACS-1 y portador ARSACS-H2 en comparación con las células control tras la administración de oligomicina, pudiendo indicar una menor capacidad glucolítica de estas células. Sin embargo, aunque también disminuyó en ARSACS-2 y portador ARSACS-H1, esta no es significativa.

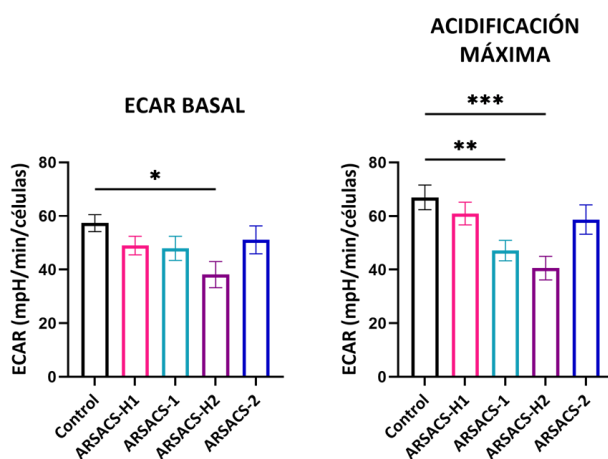


Figura B35 Análisis de la glucólisis basal y la capacidad glucolítica calculadas a partir del perfil de ECAR por Seahorse XF96. El ensayo se realizó en condiciones basales y después de la adición de oligomicina (1,5 μ M). La comparación entre los resultados de las CCPs control y los de pacientes ARSACS y portador ARSACS-H2, mostraron una menor capacidad glucolítica. Los datos en cada gráfica representan la media \pm SEM, N=3, y al menos cuatro réplicas técnicas de cada uno de ellos. Los niveles de significancia (***P \leq 0,001; **P \leq 0,01; *P \leq 0,05) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *one-way* ANOVA y el *post-hoc* Dunnet test.

3.6 Las mutaciones en el gen *SACS* alteran el potencial de la membrana mitocondrial y generan ROS mitocondriales en las células precursoras de neuronas de cerebelo de pacientes ARSACS

Para comprobar y analizar que las mutaciones en *SACS* intervenían en el correcto funcionamiento mitocondrial se analizaron CCPs a día 30 del protocolo de diferenciación en condiciones basales mediante la detección de ROS y el potencial de membrana mitocondrial (183).

En la **Figura B36** se muestra un pequeño aumento no significativo en la generación de ROS mitocondrial en las células de pacientes ARSACS y portador cuando se compara con las células control en condiciones basales.

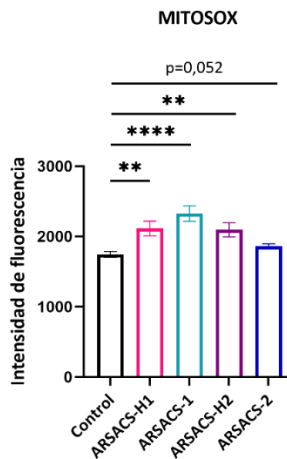


Figura B36 Detección de fluorescencia de ROS mitocondrial en células precursoras de cerebelo.

El estudio se realizó comparando las líneas de portadores y pacientes ARSACS con la línea control en condición basales usando la sonda MitoSOX (Molecular Probes, Invitrogen, OR, EE. UU. Se representan la media de fluorescencia \pm SEM en cada línea, determinada por tres experimentos de diferenciación independientes en al menos 300 células por línea. Los niveles de significancia (**** $P \leq 0,0001$; *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico *unpaired two-tailed t-test*.

En la **Figura B37** se muestra una reducción significativa de la señal de TMRM en las células de ambos pacientes ARSACS (ARSACS-1 y ARSACS-2), en comparación con la señal obtenida de las células Control, pudiendo indicar la disipación del potencial de membrana mitocondrial y por lo tanto una posible disfunción mitocondrial.

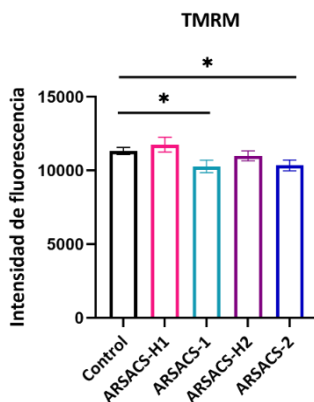


Figura B37 Detección de fluorescencia de TMRM asociada al potencial de membrana mitocondrial en células precursoras de cerebelo derivadas de hiPSCs ARSACS. El estudio se realizó comparando las líneas de portador y pacientes ARSACS con la línea control en condición basales. Los resultados mostraron una ligera disminución no significativa en los niveles de fluorescencia de TMRM en las células de pacientes ARSACS con respecto al control. Los datos de la gráfica representan la media de fluorescencia \pm SEM en cada línea, determinada por tres experimentos de diferenciación independientes en al menos 300 células por línea. Los niveles de significancia ($*P < 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

3.7 Las mutaciones en el gen SACS causan deficiencias en la expresión de proteínas relacionadas con el sistema de reciclaje a través de autofagia indicando disfunción en las células precursoras de neuronas de cerebelo de pacientes ARSACS

Para evaluar si mutaciones en *SACS* están asociadas con el proceso de degradación mediado por autofagia en el modelo CPC aquí descrito, se ha analizado la expresión de proteínas involucradas en la vía autofágica mediante la técnica del western blot (WB). Para discernir el papel de *SACS* en la autofagia, las CCPs de controles, portador y pacientes ARSACS derivadas de hiPSCs fueron cultivadas en condiciones basales y con bafilomicina A1 (BafA1), un inhibidor de la bomba ATPasa lisosomal (167) que inhibe la fusión del autofagosoma al lisosoma provocando la acumulación de los marcadores autofágicos que se hubieran degradado en el periodo de tiempo de actuación del inhibidor.

De esta manera, se hicieron estudios en paralelo entre cultivos de CCPs ARSACS, portador y control con y sin BafA1 para su análisis comparativo. A día 30 se obtuvieron los extractos solubles de las CCPs y se analizaron los niveles de P62/SQSTM1 y LC3-II (**Figura B38**). Al bloquear la degradación lisosomal con el inhibidor de la v-ATPasa Bafilomicina A1 durante 4h, se observó un incremento de los marcadores autofágicos de p62 y LC3II solo en el control y en el portador (**Figura B38**). Esta medida permitió confirmar la existencia de un flujo autofágico eficaz en CCPs control. Además, el no aumento de los marcadores con BafA1 respecto a la condición basal se podría atribuir a una mayor inducción de autofagia o a un bloqueo de la degradación por el lisosoma.

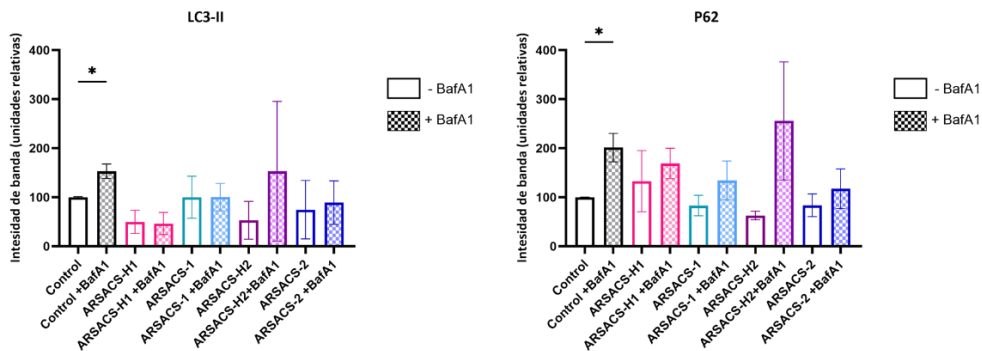


Figura B38 Análisis de los niveles de expresión proteica de proteínas asociados con la autofagia en células precursoras de cerebelo derivadas de hiPSCs. El estudio se realizó a día 30 de la diferenciación de las líneas hiPSCs control, ARSACS-H1, ARSACS-1, ARSACS-H2 y ARSACS-2 en presencia de Bafilomicina A1 (BafA1) en comparación con niveles basales por western blot (WB). Los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de LC3B y p62 en las células control respecto a sí mismas en tratamiento con BafA1, mientras que en el resto de las muestras no sí se observa ese aumento significativo, no es significativo. Los datos de la gráfica representan la media de expresión de cada proteína \pm SEM en cada línea, determinada por tres experimentos de diferenciación independientes. Los niveles de significancia (* $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

3.8 Las mutaciones en el gen *SACS* no interfieren en los niveles de expresión de proteínas ubiquitinadas asociadas al correcto funcionamiento del proteasoma en las células precursoras de neuronas de cerebelo de pacientes ARSACS

Los distintos dominios del gen *SACS* descritos en la literatura (Bibliografía) codifican por proteínas con función de chaperona o co-chaperona y ubiquitin-ligasa, pueden estar asociados con el correcto funcionamiento de procesos como la proteostasis y los distintos tipos de autofagia conocidos, como la micro y macro autofagia y la mediada por chaperonas (CASA) (143).

Para analizar si en las CCPs de pacientes y portadores ARSACS a día 30 del protocolo de diferenciación, la función del proteasoma estaba comprometida, se

analizaron los niveles de proteínas poli-ubiquitinadas tras el tratamiento a las células con el inhibidor del proteasoma MG-132, durante 12 horas.

Los resultados recogidos en la **Figura B39** mostraron un ligero aumento en los niveles de proteínas poli-ubiquitinadas (K48) en las células control respecto a sí mismas en tratamiento con MG132. El mismo resultado que en las células control se obtuvo en el resto, excepto en ARSACS-1, que se observa que disminuye. Sin embargo dado el bajo número de experimentos en este caso y la variabilidad del experimento, sería realizar más pruebas para obtener unos datos más robustos.

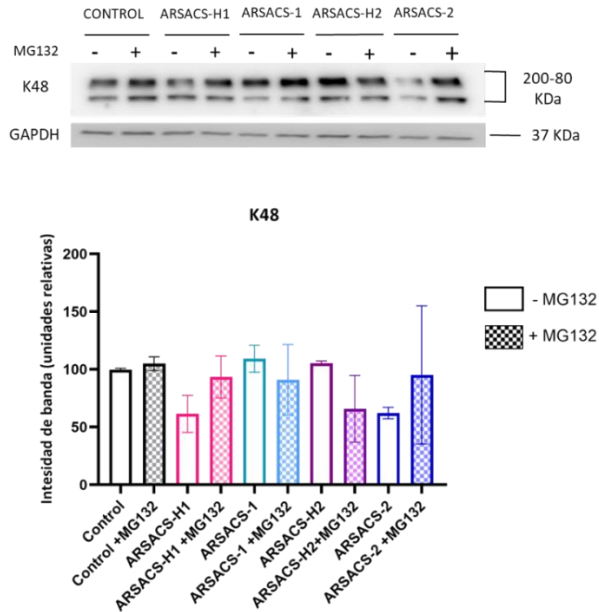


Figura B39. Análisis de los niveles de expresión proteica de proteínas poli-ubiquitinadas en células precursoras de cerebelo derivadas de hiPSCs. El estudio se realizó a día 30 de la diferenciación de las líneas hiPSCs control, ARSACS-H1, ARSACS-1, ARSACS-H2 y ARSACS-2 en presencia de MG132 en comparación con niveles basales por western blot (WB). Los datos de la gráfica representan la media de expresión de K48 \pm SEM en cada línea, determinada por dos experimentos de diferenciación independientes. El análisis estadístico se realizó por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*, comparando cada línea frente a ella misma con el tratamiento.

3.9 Las mutaciones en el gen *SACS* causan deficiencias en la expresión de genes relacionados con la regulación de la dinámica y ensamblaje de filamentos intermedios en las células precursoras de cerebelo de pacientes ARSACS

Tanto los neurofilamentos en neuronas maduras, como los NFL, NFM, NFH o α -internexina en precursores neuronales, son proteínas específicas de las neuronas que forman los principales elementos del citoesqueleto. La fosforilación de sus dominios C-terminales modula su dinámica estructural, y su función y está regulada principalmente por la interacción de distintas quinasas dirigidas por prolina como pueden ser la proteína quinasa activada por mitógeno p42/44 (ERK1/2 MAPK), p38 MAPK, quinasa terminal c-jun-N (JNK), glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK3) y quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), entre otras (169,184). Cada quinasa puede fosforilar distintos motivos de lisina-serina-prolina (KSP) en los dominios C-terminales, lo que sugiere la capacidad de estas para afectar de manera diferente el funcionamiento de los neurofilamentos. De hecho, se sabe que varias quinasas fosforilan distintas proteínas y chaperonas, como Hsp90 o HSP70, siendo la más destacada es la caseína quinasa II (CK2) (185).

Dado que la SACSINA está considerada una chaperona molecular involucrada en el control de calidad de las proteínas y en la homeostasis de los neurofilamentos se han analizado la expresión genes asociados a estos procesos por RT-PCR para evaluar las consecuencias de las mutaciones en *SACS*. A día 30 del protocolo se obtuvieron los RNA de las CCPs y se analizaron los niveles de expresión de los genes *CK2*, *CK1 α* , *MAP2K*, *GSK3- β* y *CDK5*.

Los resultados de expresión del gen *CK1 α* en CCPs pacientes ARSACS indican un aumento de expresión respecto al control, mientras que *CK2* solo se encuentra aumentado de forma significativa en ARSACS-2 con respecto al control (**Figuras B40 y B41**). Los niveles de expresión de los genes *MAP2K*, *GSK3- β* y *CDK5* se encuentran

ligeramente aumentados en las CCPs de los portadores ARSACS-H1 y ARSACS-H2, y en ARSACS-2 de manera significativa, pero no en las CCPs del paciente ARSACS-1 (Figuras B40 y B41).

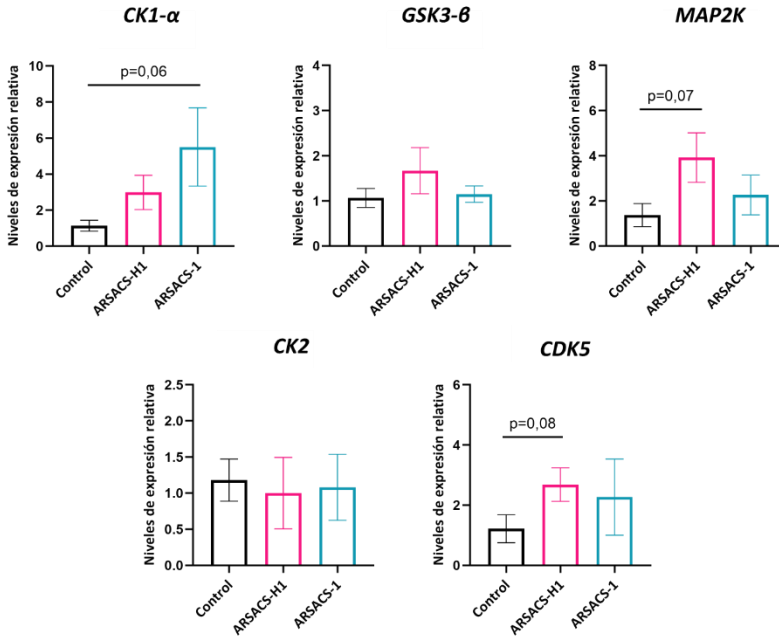


Figura B40. Expresión de genes en la regulación de la dinámica y ensamblaje de filamentos intermedios en células precursoras de cerebelo ARSACS-H1 y ARSACS-1. El estudio se realizó a día 30 de la diferenciación de las líneas hiPSCs control, ARSACS-H1 y ARSACS-1 en condiciones basales (*fold change*=1) por PCR cuantitativa (RT-PCR). Los datos de la gráfica representan la media de expresión de cada gen \pm SEM en cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Datos determinados por tres experimentos de diferenciación independientes y al menos tres réplicas técnicas por línea. Los niveles de significancia (** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

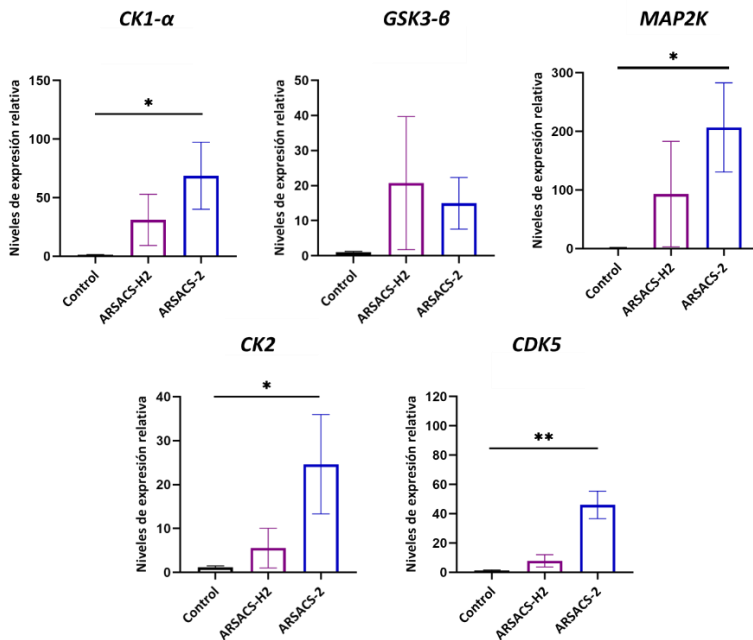


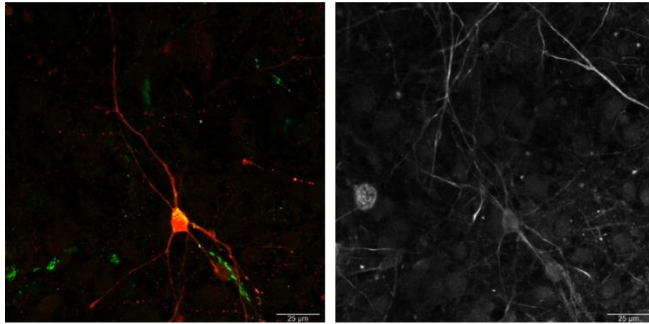
Figura B41. Expresión de genes en la regulación de la dinámica y ensamblaje de filamentos intermedios en células precursoras de cerebelo ARSACS-H2 y ARSACS-2. El estudio se realizó a día 30 de la diferenciación de las líneas hiPSCs control, ARSACS-H2 y ARSACS-2 en condiciones basales ($fold\ change=1$) por PCR cuantitativa (RT-PCR). Los datos de la gráfica representan la media de expresión de cada gen \pm SEM en cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Datos determinados por tres experimentos de diferenciación independientes y al menos tres réplicas técnicas por línea. Los niveles de significancia (** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

3.10 Mutaciones en el gen SACS provocan una desregulación de la dinámica y ensamblaje de los neurofilamentos de cadena pesada en las células de Purkinje de cerebelo derivadas de hiPSCs ARSACS

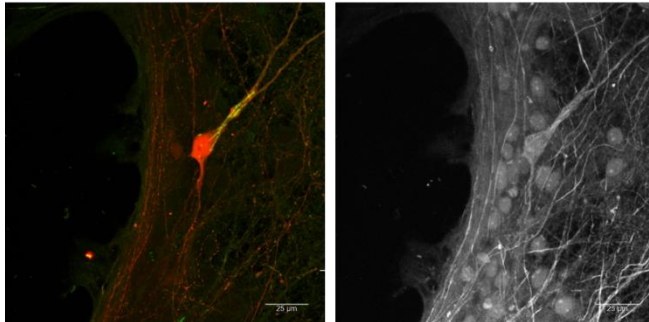
Se han detectado haces de NFs mediante marcaje con anticuerpos frente NFH in situ en secciones de cerebro y médula espinal de ratones SACS KO y en neuronas motoras espinales cultivadas y neuronas DRG derivadas de estos ratones. Además, se ha descrito que el agrupamiento y el colapso de la red de filamentos intermedios también ocurre en fibroblastos humanos ARSACS en cultivo, lo que sugiere un papel de la SACSINA en el ensamblaje y/o mantenimiento de IF en múltiples tipos de células (135,145).

Con el objetivo de comprobar si en el modelo CPC ARSACS generado, estaban presentes esos haces de NFH no fosforilados dispuestos de manera anormal, se fijaron CPCs a día 130 del protocolo de diferenciación en co-cultivo. Posteriormente, y mediante la técnica de inmunofluorescencia se marcaron las CPCs con Calbindina y los NFH no fosforilados con SMI-32 (**Figuras B42 y B43**). Los resultados indicaron que en las CPCs de pacientes ARSACS, los NFH se disponían en acúmulos en el soma y dendrita/s proximales. Aproximadamente el 75% de las CPCs ARSACS-1 y el 55% de las CPCs ARSACS-2 presentaban acúmulos de NFH, respecto al control. Mientras que las CPCs de los portadores ARSACS-H1 y ARSACS-H2, presentaban un 14% y 28% de NFH en acúmulos respectivamente (**Figura B44**).

CONTROL



ARSACS-H1



ARSACS-1

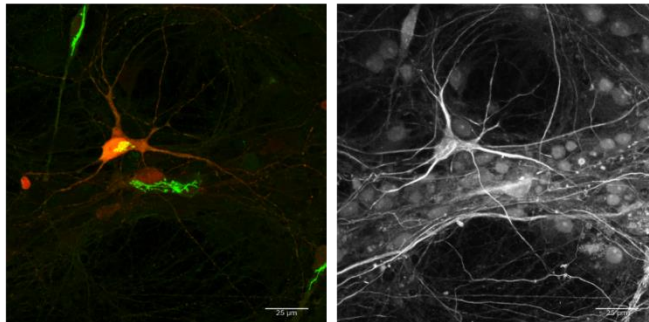


Figura B42 Imágenes representativas de la disposición de los NFH en células de Purkinje de cerebelo derivadas de hiPSCs control, ARSACS-H1 y ARSACS-1. La pérdida de SACSINA induce la agrupación de NFs que contiene múltiples proteínas NFs. Imágenes representativas de CPCs en co-cultivo con neuronas granulares de ratón a día 130 del protocolo de diferenciación. En los paneles de la izquierda se muestran imágenes en fluorescencia de marcadores Calbindina (en rojo para CPCs) y HuGolgi (en verde) e En los paneles de la derecha se muestran imágenes de las mismas neuronas en fluorescencia del marcador de NFH no fosforilados SMI-32 (en blanco).

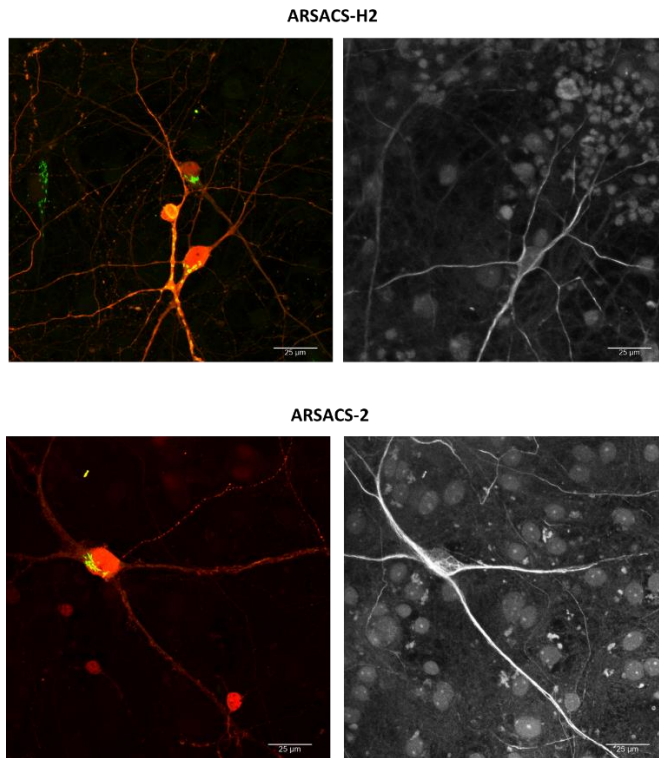


Figura B43 Imágenes representativas de la disposición de los NFH en células de Purkinje de cerebelo derivadas de hiPSCs ARSACS-H2 y ARSACS-2. La pérdida de SACSINA induce la agrupación de NFs que contiene múltiples proteínas NFs. Imágenes representativas de CPCs en co-cultivo con neuronas granulares de ratón a día 130 del protocolo de diferenciación. En los paneles de la izquierda se muestran imágenes en fluorescencia de marcadores calbindina (en rojo para CPCs) y HuGolgi (en verde). En los paneles de la derecha se muestran imágenes de las mismas neuronas en fluorescencia del marcador de NFH no fosforilados SMI-32 (en blanco).

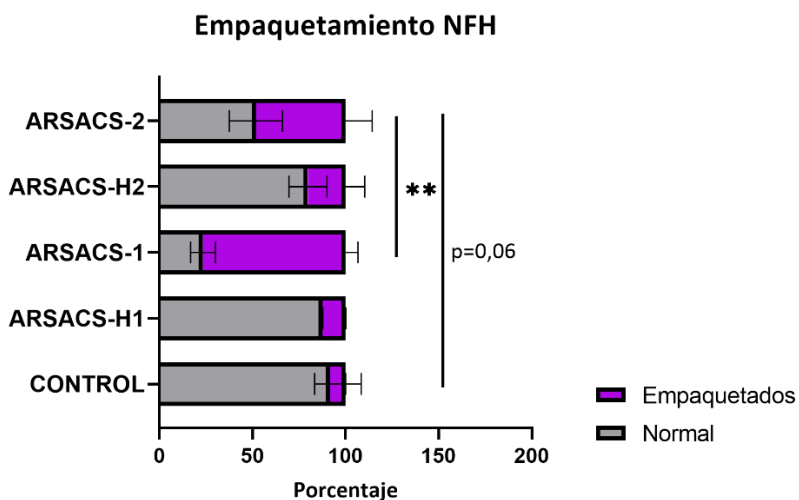


Figura B44 Cuantificación del efecto de las mutaciones en SACSINA sobre la presencia de haces de NFs en células de Purkinje de cerebelo ARSACS derivadas de hiPSCs. Se muestra el porcentaje de neuronas que exhiben una red de NFs normal (en gris), y haces de NFs empaquetados (morado). Datos obtenidos al menos de tres experimentos de diferenciación independientes y de 15-20 neuronas por diferenciación/muestra. Los niveles de significancia (** $P \leq 0,01$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *prueba one-way ANOVA* y *post-hoc Dunnet test*.

4. Discusión

La ataxia espástica autosómica recesiva de Charlevoix-Saguenay (ARSACS) es una enfermedad rara neurodegenerativa, de herencia autosómica recesiva y de aparición temprana que cursa con disfunción cerebelosa progresiva (99). Se caracteriza por presentar neuropatía periférica, degeneración de las CPCs y degeneración de la médula espinal. ARSACS es causado por mutaciones en el gen SACS, que codifica para la proteína SACSINA. Aunque ARSACS se describió por primera vez en 1978 y se definió como endémica en la región francocanadiense de Quebec, posteriormente han sido identificados casos en más de 20 países, existiendo más de 200 mutaciones distintas (124). El tratamiento disponible es sintomático con el fin de mitigar los síntomas de la enfermedad y mejorar la calidad de vida del paciente. Por lo que es necesaria descubrir el papel de SACS en la patología ARSACS que ayuden a definir terapias para estos pacientes.

La muerte de las CPCs y degeneración cerebelar asociada a ARSACS sigue siendo poco conocida, en parte debido a la falta de modelos animales y celulares adecuados. Sin embargo, estos modelos animales de enfermedad para ARSACS sí reproducen en gran parte los síntomas de la enfermedad y han iniciado el estudio de las posibles vías moleculares afectadas, lo que ha permitido diseñar experimentos que demuestran la relación directa de la alteración genética con los síntomas de ARSACS (145,146,150,161).

En el capítulo 1 de a la presente tesis, se ha diseñado un modelo celular de enfermedad para estudiar la patología ARSACS (CPC ARSACS), utilizando un protocolo de diferenciación neuronal basado en la generación de **células precursoras de cerebelo (CCPs)** y **células de Purkinje de cerebelo (CPCs)** a partir hiPSCs de pacientes y portadores sanos ARSACS. Obtener información sobre el

desarrollo cerebeloso temprano y los posibles mecanismos moleculares patológicos provocados por la deficiencia de *SACS* es clave para el desarrollo de terapias.

Las líneas hiPSCs se han originado a partir de la reprogramación celular de fibroblastos de la piel de pacientes y portadores ARSACS. Este proceso se ha realizado mediante la tecnología de reprogramación no integradora basada en la sobre expresión factores de reprogramación importantes en el desarrollo en las células somáticas *in vitro*, que permiten revertir el fenotipo diferenciado hacia un fenotipo embrionario con la potencialidad de originar la mayoría de las células del organismo, y entre ellas, neuronas (18,19). Las líneas hiPSCs obtenidas tenían características de células pluripotentes, una capacidad proliferativa ilimitada y un potencial para diferenciarse a cualquier tipo celular además de contener la mutación inicial que las caracterizaba. Este carácter pluripotente de las líneas hiPSCs se demostró por distintas técnicas moleculares, comprobando como estaban presentes marcadores específicos (180).

Para obtener el modelo celular humano creando CPC ARSACS a partir de hiPSC se utilizó, y en colaboración con Sundberg y cols. (87), un protocolo de diferenciación cerebelosa existente con algunas modificaciones que da lugar a neuronas que expresan genes específicos de cerebro posterior/rombencéfalo como durante la inducción y regionalización celular.

En etapas tempranas del neurodesarrollo, una regulación ascendente de *GBX2*, factor de transcripción que define la barrera del mesencéfalo o cerebro medio, junto a la bajada de expresión de *OTX2* sirve para dar lugar a la especificación del límite entre el mesencéfalo/rombencéfalo y permitir el inicio del desarrollo del cerebelo *in vivo*. Las hiPSCs sometidas a diferenciación neuronal mostraron una

regulación a la baja los factores de pluripotencia y posteriormente se detectó una regulación ascendente temprana de *GBX2* y descendieron los valores de *OTX2*, lo que indicó una adquisición casi uniforme de un destino neuronal en el cerebro posterior. El aumento de expresión de distintos tipos de genes en las células en diferenciación como *EN1*, *EN2* y *HOXA2* indicaron que el proceso de diferenciación neuronal mostraba fuertes paralelismos entre el modelo diferenciado *in vitro* y el desarrollo del cerebelo fetal humano. Además, los marcadores *KIRREL2* y *SKOR2* también se expresaron en las células en diferenciación, indicando la presencia en el cultivo de marcadores tempranos de CPCs al igual que en rombencéfalo fetal. Asimismo, se observó la expresión de marcadores GABAérgicos como *GABRA2* y *GAD1/GAD67* en el cultivo, cruciales para la neurotransmisión de del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en el SNC y las CPCs. Estos resultados sugieren la presencia de neuronas GABAérgicas como las CPCs con origen en el rombencéfalo. Además, los cultivos de CCPs de todas las líneas hiPSCs expresaron una variedad de marcadores neuronales de carácter general como *Tuj1* o específicos de CPCs como *LHX1*, *SKOR2* y *PCP2*.

Las CPCs generadas parecían haber alcanzado cierta madurez 130 días después del inicio del protocolo de diferenciación neuronal y tras el co-cultivo con neuronas granulares de cerebelo de ratón, pues expresaban el marcador de CPCs adulta Calbindina y el marcador presináptico *VGAT*. Mediante este protocolo, las CPCs manifestaron cambios morfológicos a lo largo del tiempo pasando por una morfología primaria bipolar y ramificaciones cortas, conforme describió Ramón y Cajal a la que denominó “fase de corpúsculo fusiforme” (186) para posteriormente aumentar la ramificación y extensión de las dendritas, lo que indicó un aumento en la maduración neuronal del cultivo (72). El soma celular desarrolló además una forma ovalada típica de las CPCs.

Todas las CPCs derivadas de las líneas hiPSCs además de expresar el marcador de VGAT, también manifestaron potenciales de acción tras la inyección de una corriente despolarizante directa en el soma neuronal. Estos potenciales de acción de carácter repetitivo en las CPCs generadas, confirmó el fenotipo neuronal y funcional del modelo.

Las propiedades electrofisiológicas, y por tanto la funcionalidad neuronal, están asociadas también con el crecimiento de neuritas y/o un mayor número de canales iónicos situados en la membrana plasmática durante el proceso de maduración neuronal (187). El patrón de arborización o de complejidad dendrítica, el tamaño del soma y el patrón de disparo de las CPCs obtenidas reveló un estado relativamente inmaduro después de 4 meses y medio de diferenciación, pues se parecían a CPCs humanas fetales (72,188). La falta de maduración también podría deberse a la falta de entradas sinápticas de células granulares, que en humanos es 20 veces mayor en humanos que en ratones. Además, otra posible razón del estado inmaduro de las CPCs obtenidas en este modelo podría ser por el hecho de que se las células se cultivan *in vitro* durante 4 meses, mientras que en el organismo humano vivo las CPCs maduran durante un período de aproximadamente de 2 a 3 años (189,190).

En este trabajo además se proporciona la evidencia de que las CPC ARSACS sufren alteraciones en la morfología neuronal, y en el desarrollo sináptico a punto final del ensayo, probablemente consecuencia de las alteraciones moleculares y metabólicas que se discuten a continuación. La mayoría de las CCPs ARSACS estaban afectadas en su capacidad para disparar potenciales de acción de manera repetitiva en respuesta a la inyección de corriente despolarizante, y una resistencia de membrana y potencial de membrana en reposos menos negativos que el observado en las CPCs control (94,95). Estos defectos pueden derivar de la

incapacidad de los CCPs para madurar en neuronas funcionales o de una disipación de energía dependiente de gradientes iónicos transmembrana, que en condiciones normales aseguran el flujo apropiado de corrientes iónicas a través de los canales de la membrana. Estos datos podrían estar en concordancia con datos publicados de modelos animales ARSACS, donde a altas amplitudes de inyección de corriente, las CPCs dispararan a frecuencias significativamente reducidas en comparación con las células control de la parte anterior del cerebelo, y previamente a la disfunción motora (146,150). Sin embargo, la relación entre las alteraciones específicas en el patrón de disparo y los síntomas motores aún no está clara, pues existe una gran variedad de mecanismos iónicos y sinápticos diferentes en las CPCs que se comportan de manera anormal, dando lugar a diferentes tipos de ataxia (191). Por lo que sería necesario un estudio más a fondo de las propiedades electrofisiológicas de las CPCs ARSACS para ahondar en su capacidad funcional.

El modelo CPC ARSACS presentado en este trabajo es el primer modelo basado en la utilización de hiPSCs derivadas de pacientes con la ARSACS que recapitula la acumulación de NFH en células neuronales. Entre un 45%-80% de las CPCs de los pacientes ARSACS y entre un 12%-25% de los portadores ARSACS-H, presentan haces o acúmulos de neurofilamentos. El estudio publicado por Benoit *et al.* 2018 propuso que cada dominio funcional de la SACSINA operaba de forma individual en la dinámica de NFs, y actuando de distinta manera funciones en la regulación del ensamblaje y la maduración (135). Este acúmulo de NFs en la zona somatodendrítica del soma de las CPCs está asociada con una desorganización espacial y un aumento en el diámetro de la dendrita principal en ARSACS. Este fenotipo ya se ha descrito en modelos animales ARSACS, donde el acúmulo de NFH en las CPCs del vermis cerebeloso superior, el engrosamiento de la dendrita principal y la desorganización del árbol dendrítico precede a la muerte neuronal. La diferencia de porcentaje de células con acúmulos de NFH encontradas en el

modelo CPCs ARSACS no solo entre pacientes sino también entre portadores, podrían indicar una actividad residual de alguna subunidad de la SACSINA, que dependiendo del tipo dominio con función residual contribuiría de distinta manera a la fisiopatología de la enfermedad en pacientes ARSACS, o bien la existencia de mecanismos de compensación en el caso de los portadores sanos (141,192). ARSACS comparte similitudes clínicas e histopatológicas con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alexander (AxD) y la neuropatía axonal gigante (GAN). Ambas cursan con ataxia disartria y nistagmo, probablemente por la pérdida de sustancia blanca. A nivel celular también presentan interrupción de los filamentos intermedios y dismotilidad y disfunción mitocondrial (193,194).

Además de proporcionar la evidencia de que las CPCs ARSACS a punto final del protocolo exhiben la característica principal asociada al citoesqueleto del fenotipo ARSACS, se ha observado el resto de los fenotipos patológicos específicos de ARSACS se pueden también observar en etapas del desarrollo en el cultivo celular, en concreto en CCPs.

La desregulación de la dinámica del citoesqueleto y por consiguiente la alteración de su estructura está relacionada directamente con mutaciones que codifican por sus proteínas o bien por proteínas secundarias que los regulan, como chaperonas, quinasas y queratinas entre otras (169,184,185). Los niveles de expresión de los genes *CDK5* y *MAP2K*, encargados de la asociación neurofilamento-neurofilamento y de la inhibición de la proteólisis de los neurofilamentos, estaban aumentados en las CCPs tanto de pacientes como de portadores sanos, aunque no en todos los casos de manera significativa. Además, los niveles de expresión de los genes asociados con promover el transporte axonal y restringir las asociaciones entre neurofilamentos en las neuritas axonales se encontraban también aumentados en

el caso de *CK1 α* y de manera significativa en las CCPs de pacientes ARSACS. Este mismo comportamiento no ocurrió con la expresión por *GSK3 β* , que igualmente previene la interacción NFs-NFs no solo en neuritas axonales sino también en el soma. Distintas enfermedades neurodegenerativas presentan importantes alteraciones en el citoesqueleto neuronal, y no se deben directamente a mutaciones en proteínas relacionadas con actina, microtúbulos o proteínas de neurofilamentos, pero afectan a la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, fallos en la acetilación de tubulina en CMT se han asociado a mutaciones en el gen *HSPB1* que codifica por la proteína de choque térmico 27 (HSP27) (170). Por lo que, en el presente estudio establece que es posible que desde etapas tempranas del desarrollo cerebelar la *SACSINA* podría mediar la disminución de la expresión de genes asociados al ensamblaje de los filamentos intermedios y promover la proteólisis de los mismos. Además, el mecanismo celular mediado por *CK1 α* y *GSK3 β* en las células deficientes en *SACSINA* no sería suficiente para compensar la pérdida de función y el agrupamiento de los filamentos intermedios (195).

Los cambios en la distribución de los neurofilamentos pueden afectar al transporte mitocondrial a través del transporte axonal, pudiendo interferir en su función y en el desarrollo de la patología de la enfermedad (196). Como en otros modelos de enfermedad ARSACS, los resultados aquí expuestos confirman, por primera vez en CCPs humanas de hiPSCs de pacientes y portadores ARSACS, la presencia de un estado oxidativo alterado en condiciones basales y el deterioro de las funciones mitocondriales mediante el ensayo de Mitostress en un analizador de flujo XFe96. Se ha demostrado que las CCPs tanto de pacientes como uno de los portadores sanos ARSACS tienen valores reducidos de los parámetros más importantes de la función mitocondrial como la respiración basal, respiración máxima, respiración ligada a la producción de ATP y la capacidad de respuesta. Las mutaciones en *INF2*, relacionadas con CMT, desregulan los procesos dependientes de actina, lo que

interfiere con la mielinización y la dinámica mitocondrial (197). De la misma manera, la acumulación de GFAP en Gan provoca dismotilidad mitocondrial (196,198). En neuronas motoras de modelo de ratón SACS KO también se ha descrito la reducción en la dinámica mitocondrial y los cambios morfológicos, sin embargo, la acumulación de neurofilamentos precede a los cambios en la dinámica mitocondrial lo que sugiere que la SACSINA actúa desde etapas tempranas de la enfermedad en la homeostasis del citoesqueleto (161).

Por otro lado, también en el presente trabajo se ha demostrado que las mutaciones en *SACS* están asociada con niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las primeras etapas de la enfermedad en CCPs de los pacientes ARSACS, acompañados de una bajada del potencial de membrana mitocondrial. Las ROS juegan un papel importante en la señalización celular y en niveles anormalmente altos son perjudiciales para las células y podrían conducir a la muerte celular (199). Además, otras características que indican disfunción mitocondrial como la alteración del potencial de la membrana mitocondrial, la morfología mitocondrial y la disminución de los niveles de ATP presentes en modelos celulares y animales ARSACS. Además, se ha descrito que la desregulación de la homeostasis del citoesqueleto provocaría la disminución de la dinámica o tráfico mitocondrial, que junto la mala localización de DRP1 en el citoplasma haría que con la se acumulasen mitocondrias hiperfusionadas disfuncionales (161,178). Esto sugiere un deterioro global de estos orgánulos pudiendo conducir a un fallo energético en la célula. Este fenotipo también se ha observado en otras enfermedades neurodegenerativas como en Alzheimer, donde la hiperfosforilación de la proteína Tau provoca una disminución del tráfico de mitocondrias a lo largo del citoesqueleto y la consiguiente acumulación de mitocondrias alrededor del MTOC y una reducción de la fisión mitocondrial por falta de la localización de DRP1 (200–202). Por lo tanto, dado que la producción de

energía mitocondrial es indispensable para el mantenimiento de la homeostasis neuronal, es probable que la falta de suministro de energía adecuada en las células ARSACS contribuya a la progresión de la enfermedad.

Mediante la interacción con el proteasoma o mediante la vía autofágica las HSP son capaces de controlar además la homeostasis de los filamentos intermedios, promoviendo su degradación (203,204). Dada la función de chaperona de la SACSINA se ha estudiado la posible participación de la disfunción de la autofagia en la neurodegeneración inducida por las mutaciones en SACS. En CCPs de pacientes y portadores ARSACS, al utilizar el inhibidor lisosomal BafA1, no se produjo un aumento del marcador de formación de autofagosomas (LC3II) ni del marcador de fusión del autofagolisosomal p62. Lo que podría indicar una interrupción en el flujo autofágico y acumulación de orgánulos dañados como las mitocondrias, que podrían liberar ROS y factores proapoptóticos, contribuyendo a la degeneración y muerte neuronal y a la fisiopatología de ARSACS (168).

El deterioro de la autofagia y/o mitofagia se ha visto involucrado en la pérdida de neuronas en múltiples enfermedades neurodegenerativas que cursan con disfunción en el citoesqueleto como característica principal como GAN o CMT, además de en ARSACS (149,164,193). La presencia de los dominios Ubl, DNAJ y XPCB de la SACSINA indican la interacción de esta misma con el sistema ubiquitina-proteasoma. Sin embargo, al igual que estudios anteriores se ha observado que las CCPs derivadas de pacientes y portadores ARSACS la inhibición del proteasoma parece eficiente (131). En enfermedades como GAN, la falta de Gigaxonina inhibiría la degradación por proteasoma pues codifica por una proteína Ube3A y está asociada con el acúmulo de filamentos intermedios por su disfunción. Se ha descrito que su sobreexpresión podría detener o incluso revertir la progresión de la enfermedad incluso a bajas concentraciones, mediante la desagregación de

filamentos intermedios (197). El acúmulo de los filamentos intermedios agregados y la acumulación de mitocondrias disfuncionales podrían ser resultado de un aclaramiento o flujo autofágico anormal en la patología ARSACS.

En este trabajo se ha observado además que existe una variabilidad de resultados genotipo-dependiente, sobre todo en lo que se refiere al portador sano ARSACS-H2 y entre los pacientes ARSACS. Estos cambios, podrían explicarse por la naturaleza de las mutaciones en el gen *SACS*, y la necesidad de la existencia de por los mecanismos de compensación en el caso del portador ARSACS-H2. Se ha descrito recientemente un mecanismo por el cual las mutaciones que causan la degradación del mRNA mutante desencadenan la modulación de los genes de adaptación que podrían compensar la pérdida de función de la proteína por la que codifica el gen mutado (205,206). Sin embargo, la degradación del mRNA provocada por las mutaciones en *SACS* descrita por Longo *et al.* 2022 (141), podría interrumpir la traducción aguas arriba en el mRNA de la copia sana, lo que derivaría en la presencia de fenotipo en portadores sanos (207). De hecho, se ha descrito en líneas celulares de fibroblastos de portadores sanos ARSACS, que la reducción de la proteína SACSINA provoca a la acumulación de filamentos intermedios, aunque no al nivel que ocurre en los fibroblastos de pacientes ARSACS (175). Sería interesante ahondar en los mecanismos complementarios que podrían tener algunos portadores sanos en enfermedades autosómicas recesivas, ya que podrían arrojar luz sobre los mecanismos de compensación y ser útiles para el estudio y desarrollo de terapias para enfermedades como ARSACS.

La asociación entre las HSP y otras neuropatías hereditarias como GAN o CMT hace que las proteínas chaperonas sean un posible objetivo terapéutico. A día de hoy se están estudiando vías y desarrollando fármacos basados en la regulación de las HSP para utilizarlos como terapias en ARSACS (135,175,178). La regulación ascendente

de las HSP podría facilitar el desempaquetamiento y/o eliminación por el proteasoma o por autofagia. Además, podría ser informativo identificar compuestos que promuevan la supervivencia de las neuronas ARSACS frente al estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial.

En resumen, se ha establecido por primera vez un modelo neuronal específico de cerebelo humano derivado de hiPSCs para el estudio de ARSACS. El modelo CPC ARSACS ofrece la oportunidad de ahondar en el estudio de los primeros defectos moleculares disfuncionales, tanto en células humanas de cerebelo en desarrollo como en CPCs adultas, que se han descrito en el presente trabajo y en otros modelos de enfermedad y pacientes ARSACS. Las CPCs derivadas de pacientes ARSACS permiten investigar directamente los mecanismos de enfermedad manera individual, genotipo-dependiente, por lo que este modelo representa una herramienta eficaz para identificar posibles dianas terapéuticas y diseñar fármacos que permitan revertir las alteraciones detectadas directamente en neuronas humanas ARSACS.

C. Capítulo 2:
Neurodegeneración asociada a
***PLA2G6* (PLAN)**

1. Introducción

1.1 Clasificación, síntomas y curso clínico de PLAN

La neurodegeneración asociada fosfolipasa A2 (PLAN) (OMIM: 610217) es una enfermedad rara neurodegenerativa que está englobada las denominadas enfermedades neurodegenerativas con acumulación cerebral de hierro (ENACH; NBIA, *Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation*) (208). Estas son enfermedades raras con una prevalencia de 1–3 entre 1.000.000. Los pacientes con NBIA, cursan habitualmente con depósitos de hierro en el cerebro, principalmente en el globo pálido y en la sustancia negra. Se caracterizan, además, por presentar trastornos del movimiento complejos y disfunción extrapiramidal, principalmente distonía, parkinsonismo y coreoatetosis. De igual manera, son síntomas clínicos comunes el deterioro cognitivo y los trastornos psiquiátricos (209).

De forma clásica, están aceptados diez genes NBIA. Sin embargo, debido al alto número de pacientes con sospecha de sufrir NBIA que no tienen diagnóstico genético, puede que existan otros genes que estén implicados en este tipo de patologías. La heterogeneidad genética y los fallos en las proteínas correspondientes indican que los mecanismos de enfermedad que subyacen a las distintas formas NBIA son muy diferentes (210). La acumulación anormal de hierro en el cerebro podría ser causada por un defecto molecular primario o ser la consecuencia de un defecto metabólico subyacente secundario.

PLAN es la segunda forma más común de NBIA, representando a alrededor de un 15% de los pacientes. Es una enfermedad ultra rara autosómica recesiva con una prevalencia aproximada de 1 entre 1.000.000. PLAN abarca tres fenotipos distintos: 1) Distrofia neuroaxonal infantil clásica (INAD); 2) Distrofia neuroaxonal atípica

(NAD); y 3) Parkinsonismo-distonía relacionado con *PLA2G6* (PARK14) (211,212). La forma PLAN más común es INAD con más de 150 casos descritos (208).

La presentación clínica es bastante homogénea en la forma clásica de los trastornos PLAN. En INAD, el debut de la enfermedad es a una edad temprana, entre los 6 meses y los 3 años. En general, los niños que padecen INAD nacen sanos y tienen un desarrollo neurológico normal hasta que se observan los primeros síntomas motores. La progresión de la enfermedad es rápida y se caracteriza por presentar deterioro motor progresivo que puede causar hipotonía troncal como uno de los primeros síntomas clínicos, y más adelante tetraparesia espástica con signos piramidales (211–214). Las disfunciones oculares como el estrabismo y nistagmo también se observan con frecuencia en los pacientes; incluso se han reportado casos con atrofia óptica temprana como manifestación clínica diferencial en PLAN (215,216). A medida que la enfermedad evoluciona, la mayoría de los pacientes desarrollan deterioro cognitivo, dificultades del lenguaje y pierden la capacidad de caminar. Las convulsiones, aunque también presentes en algunos casos, son poco frecuentes en INAD y suelen ser una manifestación tardía de la enfermedad (217). También son otros signos la disfunción de la vejiga y distonía, que se superponen con otros signos comunes de trastornos NBIA. Sin embargo, cada vez se describen más casos y el espectro fenotípico se va ampliando (208,211,212). La muerte es frecuente a partir del final de la primera década y suele ser consecuencia de complicaciones secundarias tales como enfermedades respiratorias o neumonía aspirativa debido a la parálisis bulbar progresiva.

La atrofia cerebelosa es el signo más común y de aparición temprana en la RMN de pacientes con patología PLAN. En estos pacientes se observa una rápida progresión de la atrofia cerebelosa, que afecta tanto al vermis cerebeloso como a los hemisferios. La gliosis cerebelosa también se observa en muchos casos, pero no en

todos los pacientes con INAD. Asimismo, se han descrito anomalías secundarias menos frecuentes como un adelgazamiento cuerpo calloso posterior y reducción de la sustancia blanca cerebral, además de hipertrofia de la clava o hiperintensidad T2 en la corteza cerebral. En etapas finales de la enfermedad, las pruebas de RMN describen acumulación de hierro en el cerebro dentro del globo pálido y la sustancia negra. Sin embargo, la presencia de acúmulos de hierro es variable en localización y aparición en pacientes PLAN (208,213,218,219).

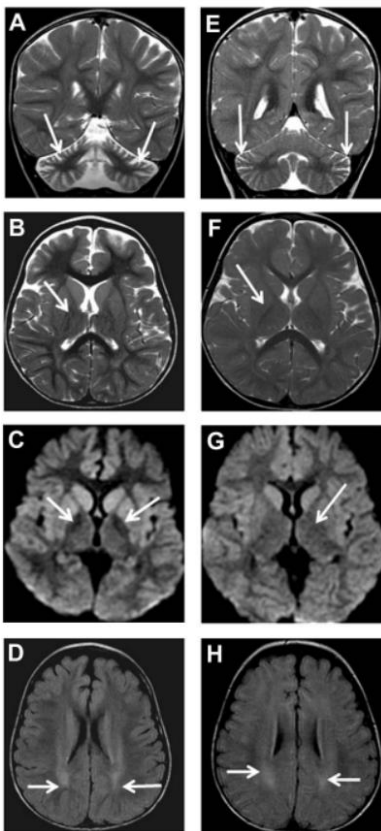


Figura C1 Imágenes representativas de RMN de pacientes PLAN: Paciente PLAN de 3 años y 3 meses (A-D); paciente PLAN de 1 año y 3 meses (E-H). **A) /E)** Imagen coronal T2 con intensidad de señal normal en el globo pálido (flechas). **B) /F)** Difusión axial, reducción de intensidad de señal y tenue deposición de hierro en el globo pálido (flechas). **C) /G)** Corte axial FLAIR, alta intensidad de la señal (flechas) en la sustancia blanca cerebral. **D)** Atrofia cerebelar con ensanchamiento de la folia cerebelosa (flechas). **H)** Atrofia cerebelar leve con ensanchamiento de la folia cerebelosa (flechas blancas). Imagen obtenida de Salih *et al.* 2013 (220).

La presencia de esferoides en las terminaciones nerviosas es igualmente una característica común en pacientes PLAN. Se han realizado estudios mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) de distintos tejidos de pacientes donde se describen la presencia de esferoides compuestos por acúmulos de membranas con estructuras tubulovesiculares (TVS, *tubular vesicular structure*) positivas para α -sinucleína (α -syn) y ubiquitina (208,211,221). Esta no es una característica común en todos los pacientes INAD ni un signo de aparición temprana en la enfermedad.

En pacientes NAD y PARK14 el inicio de los síntomas clínicos es más tardío, entre la niñez tardía/juventud hasta la adultez. La progresión de la enfermedad es más lenta y muestran signos piramidales, junto con anomalías en el movimiento de los ojos, deterioro cognitivo y características psiquiátricas. PARK14 igualmente se caracteriza por la presencia de temblor, rigidez y bradicinesia severa, asociada a la presencia cuerpos de Lewy. En los pacientes con NAD, la acumulación de hierro cerebral es la característica neuro radiológica principal, con o sin atrofia cerebelosa. Mientras que en los pacientes con PARK14, los estudios solo indican la presencia de cambios inespecíficos como la atrofia cerebral (208,211,213,222,223).

1.2 Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de pacientes PLAN se realiza en base a la neuroimagen (RMNs de cerebro/cerebelo) y las características electrofisiológicas, junto con los síntomas clínicos (208,220). La similitud del fenotipo PLAN con las otras formas causadas por mutaciones en *PLA2G6*, INAD y NAD, dificulta su diagnóstico. Muchos de los pacientes con INAD y NAD atípica desarrollan atrofia cerebelosa que se aprecia en las imágenes de RMN a una edad relativamente temprana. Esto, en presencia de depósitos de hierro cerebral y atrofia óptica, es indicativo del diagnóstico. Sin

embargo, como se ha descrito anteriormente, este acúmulo se observa solo en algunos pacientes y en la mayoría de los casos en etapas finales de la enfermedad. El deterioro cognitivo temprano o los síntomas psiquiátricos con síntomas motores, como parkinsonismo o distonía, se incluyen en el diagnóstico (208,211,212).

El diagnóstico diferencial también es necesario en pacientes PLAN, pues muchas de las características clínicas se solapan con otras enfermedades neurodegenerativas. Estas pruebas incluyen el descarte de la ceroidlipofuscinosis neuronal infantil, la ataxia telangiectasia o las ataxias hereditarias; otras formas de NBIA; la gangliosidosis infantil tipo 2 (GM2); la enfermedad de Niemann-Pick tipo C; el autismo o la enfermedad de Menkes (224). Sin embargo, para lograr un diagnóstico completo y veraz, el diagnóstico genético es imprescindible a día de hoy. Las pruebas genéticas incluyen el análisis de mutaciones en el gen *PLA2G6* (208).

En pacientes PLAN el tratamiento es sintomático o paliativo. Incluye tratamiento farmacológico para la distonía, la espasticidad y las convulsiones, con apoyo de tratamiento fisioterapéutico. Los ensayos clínicos (www.clinicaltrials.gov) se centran, entre otros, en el empleo de ácidos grasos poliinsaturados deuterados (D-PUFA) que, en principio, podrían rescatar parcialmente los problemas del aparato locomotor y funciones bioquímicas (213,225).

1.3 Genética de PLAN

Mutaciones en *PLA2G6* son responsables de PLAN (*PLA2G6-associated neurodegeneration*), término propuesto que incluye a todos los fenotipos posibles asociados y de aquí en adelante a los casos INAD) (208).

El gen *PLA2G6* se sitúa en el genoma en el cromosoma 22 (chr22:38,111,495-38,214,778(GRCh38/hg38). Cuenta con 103,284 bases y está compuesto por 17 exones. Las bases genéticas de PLAN fueron establecidas por Morgan y cols. en 2006, en un estudio de 44 mutaciones en pacientes NBIA. La mayoría de ellas eran sustituciones de aminoácidos, y el 85% se situaban en posiciones de aminoácidos muy conservados en vertebrados (226).

Hasta el día de hoy, y gracias a la secuenciación del exoma, se han descrito alrededor de 200 mutaciones distintas en *PLA2G6* de todos los tipos, incluyendo mutaciones complejas (227–229) (HGMD® Professional 2020.1; último acceso 20/05/2021). Debido a que PLAN es causado por mutaciones bialélicas, se espera que el mecanismo de la enfermedad consista en pérdida de función. Sin embargo, no se ha observado una correlación evidente entre el genotipo y el fenotipo PLAN. La mayoría de los pacientes PLAN con debut de la enfermedad durante la juventud o la edad adulta y/o un fenotipo menos agresivo compatible con PARK14 tienen cambios de aminoácido que no alteran la actividad catalítica (230).

PLA2G6 codifica por proteína fosfolipasa A2 independiente de calcio tipo VI (iPLA2/iPLA2 VIA-2/iPLA2β) y consta de 806 aminoácidos. La proteína se divide en: dominio N-terminal, dominio repetido de Anquirina (ANK) y dominio catalítico (CAT) (Figura C2). En el extremo N-terminal, se sitúa primero el dominio ANK con una inserción adicional rica en prolina de 54 aminoácidos en la última de las ocho repeticiones de residuos (395–449). El dominio catalítico lo forma un sitio de unión

a Ser-Asp cercano a un motivo rico en glicina (GX SXG), seguido de un sitio de unión a la proteína CAM kinasa (CAMKII β) en el extremo C-terminal (231,232). El dominio CAT es homólogo a la patatina y actúa como una lipasa, hidrolizando lípidos (**Figura C2**).

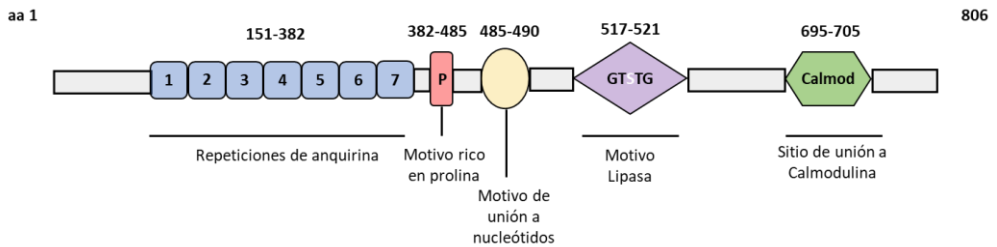


Figura C2. Representación esquemática de la proteína iPLA2 β codificada por PLA2G6. Se representan los diferentes dominios proteicos desde la posición N terminal hacia C terminal en el siguiente orden: dominio de repetición de anquirinas (en azul), motivo rico en prolina (rectángulo rojo), motivo de unión de nucleótidos rico en glicina (círculo amarillo), motivo de lipasa (motivo lipasa en morado); por último, en el extremo C terminal se encuentra el dominio de unión de calmodulina dependiente de Ca⁺² (en verde). aa: aminoácido.

La secuencia completa de cDNA de *PLA2G6* se identificó por primera vez en 1998 en células B humanas, así como las múltiples isoformas distintas a las isoformas iPLA2 β humanas de 85 kDa (VIA-1) y 88 kDa (VIA-2), que se generan por empalme alternativo y que contribuyen a su regulación (**Figura C3**) (231).

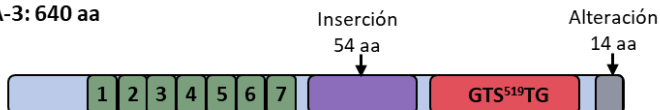
A) VIA-1: 752 aa



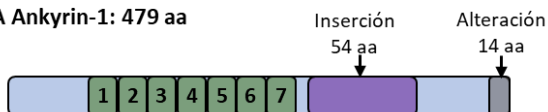
B) VIA-2: 806 aa



C) VIA-3: 640 aa



D) VIA Anquirin-1: 479 aa



E) VIA Anquirin-2: 427 aa

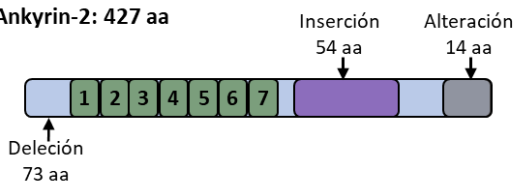


Figura C3. Representación esquemática de las múltiples isoformas de iPLA2 humanas identificadas. A) Grupo VIA-1. B) Grupo VIA-2. C) Grupo VIA-3. D) Grupo VIA Anquirina-1. E) Grupo VIA Anquirina-2. Las repeticiones de anquirina están numeradas del 1 al 7 o del 1 al 8 y se indica la serina catalítica. También se indican las inserciones y eliminaciones de secuencias. El exón 8 no está presente en la transcripción de VIA-1, lo que indica que surge por un mecanismo de salto de exón de corte y empalme alternativo. aa: aminoácido. Figura adaptada de Winstead *et al.* 1999 (233)

De las otras tres isoformas descritas adicionales, la isoforma VIA-3 es similar a iPLA2 β , pero termina justo después del sitio activo de la lipasa. Las otras dos isoformas contienen solo la secuencia repetida de anquirina de iPLA2 (anquirina-iPLA2-1 y -2) pero no el sitio activo. Por lo tanto, estas anquirina-iPLA2 podrían contribuir a la formación del complejo oligomérico iPLA2 y, por lo tanto, actúan como inhibidores *in vivo* de la enzima (Figura C4) (232,234,235).

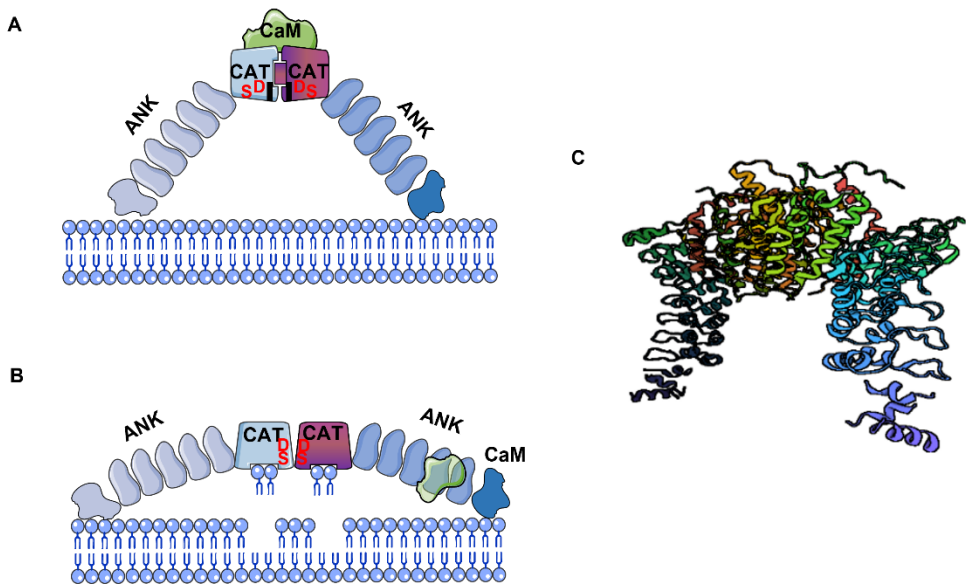


Figura C4. Mecanismo propuesto de regulación de iPLA2 β e interacciones macromoleculares.

A) Representación esquemática iPLA2 β en forma de dímero en un hipotético estado inhibido unido a CaM. Se representan los dominios CAT (azul y morado), los dominios ANK (en azul y en azul marino), y una molécula de CaM (verde). Las cavidades del sitio activo están representadas por canales estrechos (líneas negras verticales) que van desde la superficie expuesta al solvente hasta los residuos catalíticos Ser/Asp (en rojo). **B)** Representación de la conformación activa del dímero iPLA2 β . La disociación de CaM conduce a la apertura de los sitios activos. Los dominios ANK están disponibles para interacciones con proteínas asociadas, como se ilustra para CAMKII β (esfera transparente de color verde claro), que se sabe que interactúa con el dominio ANK. **C)** Representación del monómero iPLA2 β en dibujo (Código *Protein Data Bank* o PDB: 6AUN). Imagen modificada de Malley *et al.* 2018 (235) utilizando elementos de SMART (Servier Medical Art), Creative Commons.

La proteína iPLA2 β tiene como función principal la hidrólisis de los enlaces tipo éster en la posición sn-2 de los fosfolípidos de membrana, y la consecuente liberación de ácidos grasos libres y 2-lisofosfolípidos que a su vez actúan como segundos mensajeros en distintas vías de señalización. Clásicamente, la principal función que se le otorga a iPLA2 β es la de remodelación de las membranas celulares mediante su acción en el metabolismo lípidos. La acción de iPLA2 β libera ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA) que provienen de los

fosfolípidos de la membrana celular. Además, en los últimos años este proceso ha tenido especial interés en la eliminación de lípidos peroxidados de las membranas (235). También iPLA2 β juega un papel en la señalización de la inflamación, la respuesta inmunitaria, la quimiotaxis o mediando el estrés oxidativo. Además, iPLA2 β participa en la proliferación celular, la muerte celular y la transducción de señales y, por lo tanto, tiene un impacto en enfermedades como el cáncer o en anomalías cardiovasculares entre otras (236–238).

iPLA2 β está ampliamente distribuida por los distintos tejidos humanos (<http://www.proteinatlas.org>). Dado que iPLA2 tiene múltiples isoformas en los humanos, cada transcrito tiene una distribución tisular única; es decir, su expresión está sujeta a regulación génica tejido-específica. Los análisis sostienen que iPLA2 β se expresa de una manera amplia en el cerebro de mamíferos adultos. En el cerebro de un mono adulto, los mayores niveles de expresión de iPLA2 β se detectan en la corteza cerebral, el hipocampo, el cerebelo y el tronco encefálico, y una expresión menor en el tálamo y el hipotálamo (239). Dentro de estos tejidos, la expresión de iPLA2 β se localizó predominantemente en la envoltura nuclear de las neuronas, las espinas dendríticas o las terminales de los axones, mientras que la expresión es escasa o nula en los axones mielinizados, las dendritas de gran diámetro, las células gliales y las células endoteliales. En el cerebelo de rata, iPLA2 β muestra una fuerte expresión en los núcleos de las CPCs y las células granulares y estrelladas (240). Concretamente, iPLA2 β se distribuye en el citosol y en las mitocondrias con una localización subcelular variable en el núcleo, aparato de Golgi y RE en células de mamíferos. Diferentes variantes de iPLA2 β están asociadas con la membrana plasmática, las mitocondrias, el RE y la envoltura nuclear. iPLA2 β carece de dominios transmembrana, pero está enriquecido en supuestos motivos de interacción con proteínas (241–243).

Los estudios sobre expresión de iPLA2 β durante el desarrollo embrionario de ratón muestran señal en las secciones sagitales. Además, la expresión de iPLA2 β en este estadio también es alta en la placa alar del rombencéfalo y en una región análoga al mesencéfalo. Sin embargo, en el prosencéfalo en desarrollo (más adelante diencéfalo y telencéfalo), la expresión es bastante baja. Igualmente, se expresa en médula espinal y huesos del cráneo, cara, caja torácica y extremidades en desarrollo (239,244).

En desarrollo embrionario del cerebro humano adulto, iPLA2 se expresa, lo que sugiere que podría ser crucial en el desarrollo neuronal temprano. *PLA2G6* se expresa en el prosencéfalo y el mesencéfalo antes que en el rombencéfalo, además de en las zonas proliferativas VZ y SVZ de todas las regiones en desarrollo. En el diencéfalo, hay una fuerte expresión en el tálamo y el hipotálamo. La diferencia de expresión de *PLA2G6* entre especies podría deberse a diferencias temporales más que espaciales (244).

PLA2G6, además, se expresa en la retina y en el cristalino durante el desarrollo embrionario. Estudios recientes otorgan a iPLA2 β un papel regulador de la proliferación y migración del epitelio pigmentario de la retina (RPE; *retinal pigment epithelium*). Aunque la retinopatía no es común en pacientes PLAN, la atrofia óptica sí lo es, por lo que lo que concuerda con un importante papel posnatal de *PLA2G6* en el mantenimiento de la integridad del nervio óptico (245–247).

1.4 Mecanismos moleculares y modelos de enfermedad de PLAN

Las proteínas englobadas en el grupo de las fosfolipasas A2 (PLA2) catalizan la hidrólisis de glicerofosfolípidos en posición sn-2 de la membrana celular, liberando esta diversidad, se han descrito distintas funciones de las fosfolipasas A2 en varios

procesos bioquímicos y en varias enfermedades, siendo la regulación del AA y la remodelación de membranas por recambio de fosfolípidos los más estudiados (237,238).

La fosfolipasa A2 está totalmente activa en ausencia de calcio y no solo actúa frente a los fosfolípidos en posición sn-2 sino que también ejerce una actividad lisofosfolipasa en posición sn-1 y actividad transacilasa. Se ha descrito que iPLA2 β se expresa en el SNC, y a pesar de que otras PLA2 importantes como cPLA2 de la misma manera lo hacen, el 70% de la actividad fosfolipasa en el SNC está asociada a iPLA2 β (239,248,249).

Con el propósito de profundizar en la fisiopatología de PLAN para el desarrollo de terapias efectivas, durante los últimos años, se han diseñado distintos modelos de enfermedad, animales y células. En 2008, se publicaron dos estudios que recogían el desarrollo de los primeros modelos de ratón *knock-out* (KO) para PLAN mediante la ablación genética completa del gen *Pla2g6* o la expresión de mutaciones puntuales patogénicas descritas en pacientes. Estos ratones desarrollaban algunas de las características neuropatológicas vistas en pacientes PLAN, incluyendo una degeneración axonal progresiva, atrofia cerebelosa y acumulación de esferoides que contenían en su interior α -syn y/o estructuras TVS. Sin embargo, los defectos motores, aunque aparecían de una manera progresiva y lenta en el tiempo, eran evidentes en la etapa adulta de la vida de los ratones, más comunes en casos de aparición tardía de la enfermedad. La esperanza de vida de los ratones *Pla2g6* KO era significativamente más corta que la de los animales de tipo salvaje o control sano, pero sobrevivían a los 2 años. En algunos de los modelos no se observaron acumulaciones de hierro en los ganglios basales a punto final (250,251), aunque en 2009, se desarrolló un nuevo modelo de ratón que sí recapitulaba los síntomas clínicos de la enfermedad de PLAN durante las 7-8 primeras semanas de vida (252).

En el modelo de ratón diseñado por Shinzawa y cols.(250), se describió la aparición de esferoides en la parte proximal de los axones de distintas partes del cerebro y cerebelo a distintos tiempos. Observaron que ya desde las 15 semanas, estos contenían restos de membranas mitocondriales degeneradas. Las mitocondrias de los ratones *Pla2g6* KO se encontraban en una situación de colapso espacial en los axones terminales, acompañadas de una desaparición del citoesqueleto. Además, tenían un menor tamaño que las mitocondrias control, las crestas mitocondriales (membrana interna) se encontraban degeneradas, siendo esta además una característica similar de las mitocondrias observadas en axones degenerativos de casos de INAD (253).

Además, realizaron estudios en las membranas celulares en estadios posteriores, y observaron mediante microscopía electrónica de transmisión, la expansión de las membranas presinápticas, ausencia de vesículas sinápticas y pérdida de la continuidad de la membrana (254). Asimismo, constataron la ausencia de mitocondrias con la membrana interna degenerada (**Figura C5**). El análisis bioquímico de este modelo murino no reveló niveles de expresión reducidos de moléculas asociadas con la función presináptica, como la α -syn o del transportador de recaptación activa de dopamina. Esto indica que un subconjunto de presinapsis funcionaban bien y podría compensar presinapsis disfuncionales y degeneradas (254,255).

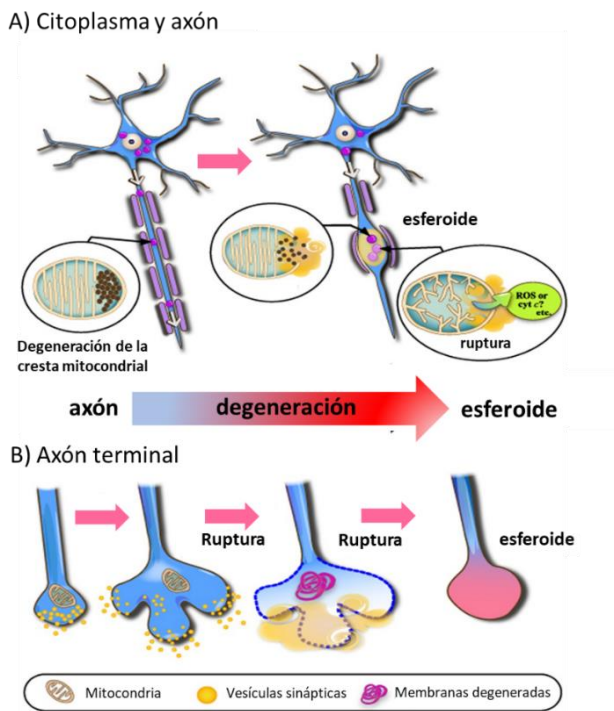


Figura C5 Mecanismo de degeneración axonal en ratones *Pla2g6* KO. A) Degeneración axonal mediada por la degeneración de la membrana mitocondrial. B) Degeneración axonal mediada por degeneración de la membrana presináptica. Modelo propuesto por (255) y revisado por (256).

Por lo tanto, los modelos KO de ratón para PLAN determinarían que, en las etapas tempranas, la función neuronal es normal y la degeneración axonal es mínima, aunque los terminales axónicos se encuentran expandidos de una manera irregular. Sin embargo, en los axones de ratones *Pla2g6* KO, los niveles de 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) están aumentados significativamente de una manera edad-dependiente (254). El 4-HNE es uno de los productos de peroxidación lipídica más representativos del organismo con una fuerte citotoxicidad y producido principalmente por las mitocondrias (257). El mecanismo de acción por el que la pérdida de iPLA2 β en las neuronas de ratón *Pla2g6* KO provoca la falta de integridad mitocondrial, colapso axonal y, por tanto, la enfermedad de PLAN se

basa en una degeneración progresiva de las membranas mitocondriales, con rotura de la doble membrana con la liberación de elementos tóxicos como ROS y lípidos peroxidados que dañarían la membrana axonal (**Figura C5**).

Estudios anteriores, ya habían propuesto que iPLA2 β ejercía un papel de protección frente a la peroxidación lipídica y en concreto en la mitocondria, mediante la reposición de cardiolipina peroxidada de sus membranas (258). La membrana mitocondrial interna contiene una alta proporción de cardiolipina, que es susceptible al ataque de ROS debido al alto contenido de ácidos grasos. Además, las mitocondrias tienen una composición de membrana distinta, tejido y célula dependiente. De hecho, las mitocondrias sinápticas no tienen la misma composición que las mitocondrias postsinápticas, siendo los niveles de cardiolipina más altos en éstas últimas, al igual que la membrana interna mitocondrial (259).

Varios modelos animales han demostrado que la expresión de iPLA2 β previene la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y atenúa la liberación de citocromo c, la disminución de ROS y la peroxidación lipídica mitocondrial en respuesta a la apoptosis inducida por estrés, protegiendo a las mitocondrias (254). La cascada apoptótica, las ROS y los lípidos peroxidados son suficientes para originar una respuesta neuroinflamatoria que podría potenciar la patología de PLAN (258,260–262).

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) unidos a la posición sn-2 de los fosfolípidos son los principales objetivos de los ataques de los radicales libres que provocan el daño de la membrana por la peroxidación lipídica (263). Estos PUFA peroxidados son eliminados de la membrana por las enzimas PLA2. Por lo tanto, la pérdida de la actividad normal de PLA2 o la acumulación de alto nivel de ROS que

excede la capacidad del sistema de reparación de PLA2 podría conducir a la disfunción mitocondrial y, en última instancia, a la muerte celular (264).

La selectividad enzimática de iPLA2 β , es más alta para el ácido linoleico (18:2 n-6), cuyo ácido graso predominante es la Cardiolipina, fosfolípido esencial para la integridad estructural y funcional de la membrana mitocondrial interna(265). El DHA es un ácido graso abundante en el cerebro que aumenta la fluidez de la membrana y funciona como un mensajero secundario. En los fosfolípidos cerebrales, el DHA es cinco veces o más que el ácido linoleico y quince veces más que el AA (266)

En base a la actividad canónica de iPLA2 β , en los modelos de ratón, se ha investigado si la deficiencia de iPLA2 β provoca diferencias en los niveles de fosfolípidos y ácidos grasos en comparación con los controles(254), concluyendo que los ratones *Pla2g6* KO de 4 a 5 meses de edad presentan alteraciones en la composición y el metabolismo de los fosfolípidos en todo el cerebro y en la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de los fosfolípidos. Adicionalmente, se ha apreciado que desarrollan anomalías morfológicas en la membrana axonal en una etapa temprana de la enfermedad, asociadas con una reducción en la tasa de incorporación de DHA no esterificado del plasma a los lípidos cerebrales (254,255,261). La baja concentración de DHA esterificado derivaría en la falta de síntesis de varias clases de lípidos como la neuroprotectina D1 (NPD1), que desempeña un papel crucial en la reacción inflamatoria por medio con el ácido AA (267).

Además de la desregulación de los niveles de DHA en el cerebro en ratones *Pla2g6* KO de edad avanzada, la falta de actividad de iPLA2 β provoca activación microglial y astrocítica, antes de la degeneración completa del cerebelo, que ocurre los 15 y

los 20 meses de edad en el modelo. Estos conducen a un aumento en los niveles de los marcadores de neuro inflamación como TNF- α e IL- β , que también están alterados en otros modelos ratón deficientes en iPLA2 β (268). Por lo tanto, la neuroinflamación puede provocar la muerte neuronal debida al daño de las mitocondrias y puede contribuir en gran medida al desarrollo patológico de la atrofia cerebelosa en la enfermedad PLAN. El estrés oxidativo y la neuroinflamación podrían potenciarse mutuamente para promover la progresión de la enfermedad PLAN.

Los modelos de ratón para PLAN han revelado que la disfunción de iPLA2 β está estrechamente relacionado con el estrés del ER, problemas en el proceso de mitofagia y con cambios en la señalización de Ca²⁺ (269–271). La adición de fosfolípidos como sn-2 lisofosfatidilcolina mejora las alteraciones la señalización de Ca²⁺ en astrocitos y restaura parcialmente la función mitocondrial en varios modelos de ratones *Pla2g6* KO (254,270).

En líneas generales, los modelos murinos de PLAN son viables y desarrollan en parte su fisiopatología. Estos presentan, al menos en la última etapa de la enfermedad, degeneración mitocondrial y de la membrana presináptica, con acumulación progresiva de TVS y esferoides que contienen proteínas ubiquitinadas en todo el cerebro, particularmente en los axones distales, como se observa en los pacientes (250–252,255,268). Sin embargo, la mayoría muestran un deterioro motor progresivo lento que debuta entre el primer y el segundo año, característica más compatible con los fenotipos de PLAN más atípicos como la NAD atípica.

Con el fin de estudiar más a fondo cómo las mutaciones en *PLA2G6* conducen a la neurodegeneración y la degeneración de la membrana mitocondrial, Kinghorn y cols (272), emplearon *Drosophila melanogaster* para diseñar un modelo de PLAN.

La función de *Pla2g6* parece estar conservada en moscas y la inserción de un elemento P en iPLA2-VIA logra alterar la expresión de iPLA2-VIA, pudiendo modularla. Las moscas con el inserto en homocigosis son viables, pero presentan defectos locomotores y una vida más corta (40 días). Igualmente, tienen anomalías mitocondriales y degeneración de las membranas internas mitocondriales en la etapa final (272). Estos fenotipos recapitulaban algunos de los defectos observados en ratones y humanos comentados anteriormente.

Kinghorn y cols. estudiaron la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial de las moscas KO para *Pla2g6* para confirmar la posible disfunción mitocondrial asociada a la patogénesis de PLAN (272). A una edad muy temprana (2 días de edad, cuando aún no se observan anomalías mitocondriales ultraestructurales mediante microscopía electrónica de transmisión), las moscas deficientes en *Pla2g6* presentan anomalías significativas en la cadena respiratoria en las mitocondrias, reducción del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y de los niveles de ATP, en comparación con controles. Estas moscas *Pla2g6* KO son más sensibles a inductores de estrés oxidativo como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el Paraquat, ya que la pérdida de actividad de iPLA2-VIA aumenta significativamente los niveles de peroxidación lipídica en el cerebro del modelo de mosca KO para *Pla2g6*, tal y como sucede en los modelos murinos. Sin embargo, en el modelo de *Drosophila* no es posible detectar alteraciones en la composición de Cardiolipina, ya que en las moscas el ácido palmítico es la principal cadena lateral de ácidos grasos en la Cardiolipina en vez del ácido linoleico, que es la cadena lateral predominante en la Cardiolipina de mamíferos, siendo el primero más resistente a la oxidación.

Por último, en este mismo trabajo concluyen que el tratamiento con D-PUFA reduce los niveles de sustancias asociadas a la peroxidación lipídica, rescatando

parcialmente el déficit locomotor (272). La neurodegeneración progresiva, los problemas motores edad-dependientes, la vida media más corta y la menor resistencia a estímulos de estrés oxidativo son características comunes a otros modelos de PLAN de *Drosophila* descritos en la bibliografía (273,274).

En 2018, un estudio publicado por Guan Lin y cols.(274), describeme su modelo de mosca PARK14, una neurodegeneración progresiva lenta, y acumulación de sustancias intermediarias de la ceramida, pero no muestra alteraciones en la composición o los niveles de fosfolípidos. Describen problemas funcionales en el retrómero, produciéndose una acumulación de ceramidas por la falta de recuperación de ceramida fosfoetanolamina/esfingomielina. Los autores de este estudio destacan que los resultados pueden ser relevantes para el estudio de PARK14, provocado por mutaciones en *PLA2G6*, dado que se ha descrito anteriormente la pérdida de vps35 o la ganancia de α -syn también afecta la función del retrómero y provoca la acumulación de ceramida. Aunque el modelo diseñado por Guan Lin y cols. no representa fielmente la fisiopatología de los pacientes PLAN clásicos, sino PARK14, pues no eliminan en su modelo toda la actividad de la iPLA2 β , describen posibles nuevos mecanismos de enfermedad, como la homeostasis de esfingolípidos o la función endolisosomal, en las que *PLA2G6* podría tener un papel esencial y contribuir al espectro PLAN (274).

A pesar de que el mecanismo de la enfermedad PLAN aún no se comprende bien, la peroxidación lipídica juega un papel central en, haciendo que las últimas investigaciones se centren en esta vía (275–277) (Figura C6) . Se ha descrito que la pérdida de la actividad de iPLA2 β conduce a una elevada peroxidación de lípidos y disfunción mitocondrial, incluidas anomalías de la membrana mitocondrial y niveles elevados de ROS citoplásmicas y mitocondriales no solo en los modelos animales descritos anteriormente (ratón y mosca), sino en modelos celulares

humanos como fibroblastos de pacientes, líneas celulares como las SH-SY5Y o neuronas inducidas (iNs) por reprogramación directa (262,278). La peroxidación lipídica es un proceso bioquímico en el que los radicales libres (p. ej., H_2O_2 , superóxido $[O_{2\cdot-}]$ o el radical hidroxilo $[\cdot OH]$) atacan los lípidos que contienen dobles enlaces carbono-carbono, especialmente a los PUFA de la membrana plasmática o de los orgánulos con doble membrana (279,280). La peroxidación lipídica se puede desarrollar por tres mecanismos distintos: oxidación enzimática, autooxidación espontánea no enzimática radical independiente y/u oxidación mediada por radicales libres. La acumulación excesiva de lípidos peroxidados induce una forma de muerte celular no apoptótica dependiente de hierro denominada ferroptosis. Los fosfolípidos peroxidados se generan a través de la oxidación de los PUFA de los fosfolípidos de las membranas. En condiciones normales de homeostasis celular, la ferroptosis está controlada por la proteína glutatión peroxidasa 4 (GPX4), que neutraliza los hidroperóxidos lipídicos convirtiéndolos en alcoholes lipídicos no tóxicos (280–282) (Figura C6).

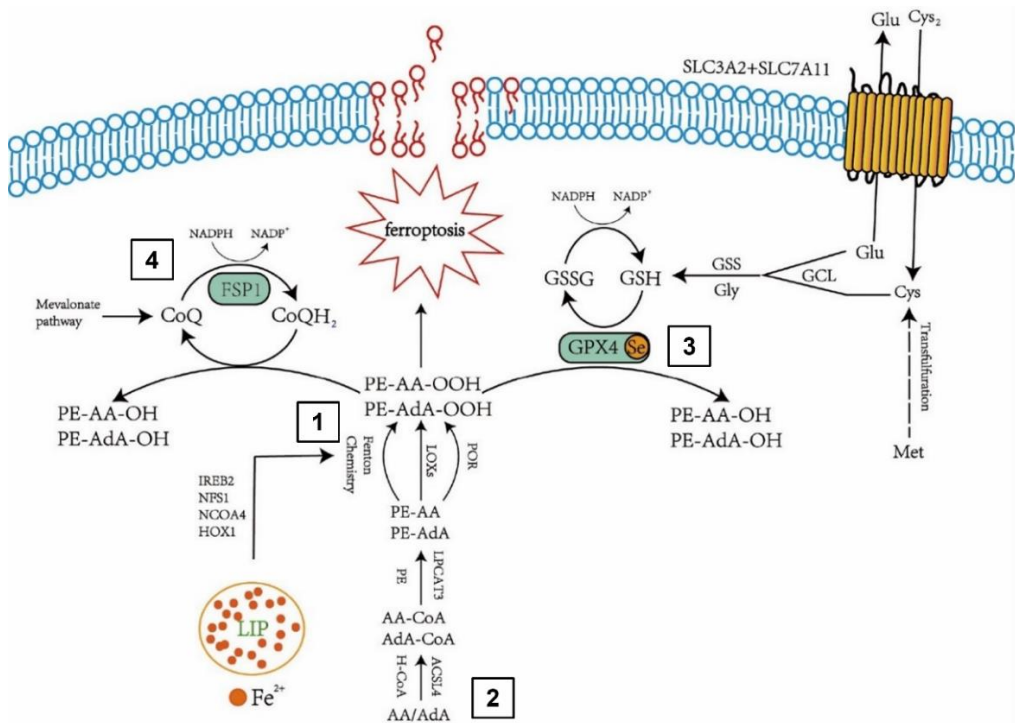


Figura C6 Mecanismos moleculares y vías de señalización de la ferroptosis por peroxidación lipídica. La producción y acumulación lípidos peroxidados que inician la ferroptosis se logra a través de diferentes vías: Vía 1) Oxidación de lípidos por la reacción de Fenton promovida por hierro; Vía 2) La fosfatidiletanolamina (PE) (AA-PE) /adrenol (AdA)-PE que contiene ácido araquidónico (AA) es metabolizada por el miembro 4 de la familia de cadena larga de la acil-CoA sintetasa (ACSL4) y la lisofosfatidilcolina aciltransferasa 3 (LPCAT3) y a su vez es oxidado por lipooxigenasas (LOX). Para compensar la peroxidación lipídica, la célula utiliza distintas vías: Vía 3) La glutatión peroxidasa 4 (GPX4) dependiente de glutatión (GSH); Vía 4) la coenzima Q10 (CoQ10) dependiente de la proteína supresora de ferroptosis 1 (FSP1). Adaptación de Figura de Yan *et al.* 2020. (282).

Sin embargo, se ha descrito además que, *PLA2G6* también ejerce un papel fundamental en la atenuación de la ferroptosis en un estudio de estrés placentario (275). De hecho, recientemente, un estudio que utiliza fibroblastos con la mutación p.R747W, que está implicada en *PARK14*, ha postulado a *PLA2G6* como un regulador de la ferroptosis (276). En conjunto, el mecanismo de enfermedad

relacionado con *PLA2G6* muestra características ferroptóticas observadas también en otros trastornos neurodegenerativos monogénicos (210,281).

El metabolismo y la disponibilidad del hierro son factores clave que contribuyen a la sensibilidad a la peroxidación lipídica y la ferroptosis. Los genes relevantes que controlan los niveles de hierro celular y modulan la ferroptosis incluyen la transferrina (Tf) y el receptor de transferrina (TfR1), encargados de importar y distribuir el hierro a las células (283). La sobrecarga de hierro en el cerebro es un hallazgo distintivo en las enfermedades NBIA, incluyendo PLAN, pero se observa de igual manera en otros trastornos neurodegenerativos comunes, como el Parkinson, el Alzheimer y la ELA (210,284). Aunque solo dos de los genes NBIA juegan un papel directo en la homeostasis del hierro, el resto de los genes NBIA también están en estudio para dilucidar si controlan el metabolismo del hierro en el cerebro humano y si los altos niveles de hierro asociados a estas patologías contribuyen a la progresión de la neurodegeneración (**Figura C7**) (285).

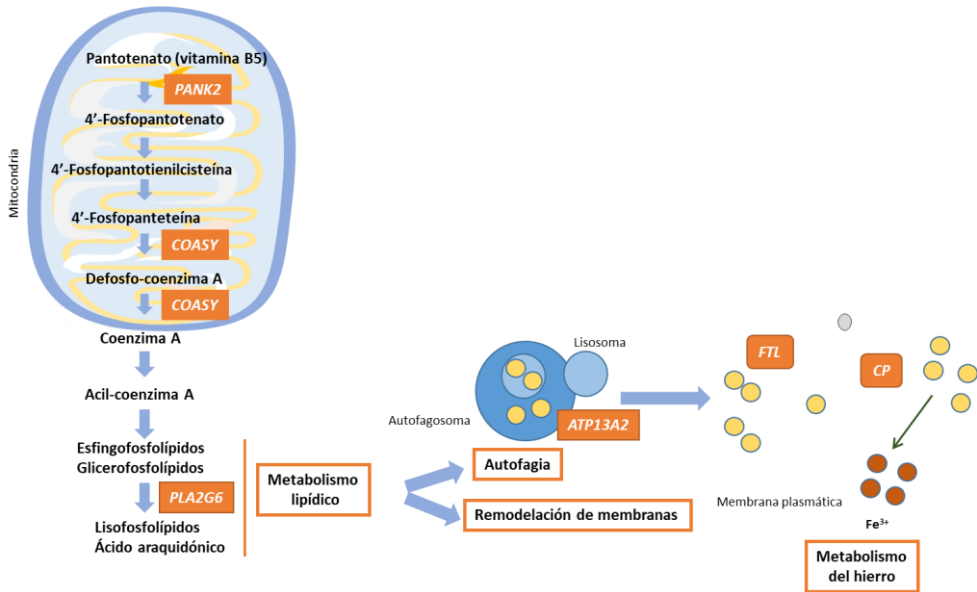


Figura C7. Localización celular de genes asociados a los síndromes NBIA y vías de moléculas afectadas: la síntesis de lípidos, la disfunción de los lisosomas y la acumulación de hierro. Figura adaptada de Hinajeros *et al.* 2020 (210).

Además de presentar una homeostasis anormal del hierro, se ha demostrado que el deterioro de la palmitoilación y el reciclaje del receptor de transferrina es común en los fibroblastos derivados de pacientes portadores de las distintas enfermedades NBIA, incluida PLAN (286). La desregulación del metabolismo del hierro y la alteración de la estructura de las crestas mitocondriales es una característica común en los subtipos de NBIA, lo que puede causar una deficiencia de energía determinada y una sobreproducción de ROS (210,286). Los altos niveles de ROS resultante de la disfunción mitocondrial y la acumulación de proteínas mal plegadas causan estrés en el ER, siendo este el responsable del plegamiento de proteínas y la modificación de proteínas. La acumulación de proteínas mal plegadas induce la respuesta de proteína desplegada (UPR, *unfolded protein response*), que protege a las neuronas contra la toxicidad provocada por estas mismas. Estos

eventos en cascada inducidos por el estrés del ER ya han sido descritos en la enfermedad de Parkinson como posibles vías desreguladas (287). Distintos estudios sobre PARK14 utilizando modelos animales de ratón y mosca con mutación en *PLA2G6* en posición D331Y han descrito la presencia de estrés en el ER. Utilizando moduladores de la UPR como la Azoramida, o restaurando el contacto entre mitocondria-ER mediante la introducción de la proteína C19orf12, han restaurado la función del ER y con ello, rescatado el fenotipo normal (260,274,288,289).

Las mitocondrias y su interacción con el ER juegan además un papel crucial en el metabolismo de los lípidos y en el proceso de autofagia. La autofagia es un proceso crucial responsable de la eliminación de proteínas agregadas u orgánulos dañados. La autofagia mitocondrial, denominada mitofagia, una degradación de forma selectiva las mitocondrias disfuncionales mantienen el recambio y la funcionalidad mitocondrial, protegiendo a las células del daño de la disfunción mitocondrial y la inducción de apoptosis (290,291).

Existen distintos estudios donde han analizado, tanto en modelos animales como celulares de PARK4, el deterioro de la mitofagia inducida por rotenona mediante los niveles de marcadores proteicos como Atg7, TOM20, LC3-I/II y p62. En ambos modelos, solo los controles son capaces de revertir la reducción de marcadores de mitofagia, al igual que potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la generación de ROS mitocondrial inducido por rotenona. Además, estos modelos de PARK14 no tienen capacidad para prevenir la peroxidación lipídica ni la liberación de citocromo c por parte de la mitocondria en respuesta al daño inducido por rotenona, sugiriendo un efecto neuroprotector de *PLA2G6* al mantener la función mitocondrial y prevenir la apoptosis (260,262).

2. Hipótesis y objetivos

Los modelos animales PLAN están ayudando a mejorar nuestro conocimiento de los mecanismos de enfermedad, sin embargo, las diferencias anatómicas, morfológicas, genéticas y bioquímicas dificultan su extrapolación a las condiciones humanas (292). Para obtener datos que representen lo más fielmente posible la fisiopatología de la enfermedad ha sido necesario la creación de modelos de PLAN humanizados, como la utilización de líneas celulares de neuroblastoma humano modificadas genéticamente, fibroblastos de los propios pacientes, neuronas inducidas o neuronas derivadas de iPSCs. Las hiPSCs son de gran utilidad para modelar enfermedades humanas. La obtención de células madre pluripotentes directamente de muestras de piel de pacientes, permitiría dilucidar y estudiar los posibles fenotipos específicos de los pacientes PLAN y otras NBIA mediante la creación de neuronas de la parte del SNC de interés, pudiendo analizar las posibles disfunciones desde las primeras etapas de la enfermedad. En los últimos años, su uso está siendo enfocado a la caracterización de biomarcadores para diagnóstico, descubrimiento de fármacos y terapia de reemplazo celular, demostrándose su utilidad en otras formas NBIA como PKAN, la más frecuente (289,293,294).

Sin embargo, en el caso de la enfermedad de PLAN, solo se ha descrito hasta ahora un estudio en el que se utilizan neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs de pacientes con PARK14. No se conoce ningún protocolo de diferenciación celular a partir de hiPSCs derivadas de muestras de pacientes PLAN con INAD/NAD, cuando un modelo celular humano derivado de muestras de pacientes posibilitaría el estudio de la fisiopatología de una manera más acertada al ser más próximo al mecanismo de enfermedad subyacente, y mucho más cuando este se deriva a células de Purkinje de cerebelo que están dañadas en los pacientes PLAN.

El objetivo general del Capítulo 2 de la presente tesis doctoral es desarrollar un protocolo de diferenciación cerebelar específico para pacientes PLAN a partir de hiPSCs que refleje de la manera más completa y cercana la fisiopatología de la enfermedad y sirva como modelo de enfermedad para desarrollar y evaluar fármacos que reviertan el fenotipo patológico de estos pacientes.

Los objetivos específicos son:

Objetivo 1 – Generación y caracterización molecular y funcional de cuatro líneas de hiPSCs reprogramadas a partir de fibroblastos dermales de pacientes y portadores PLAN.

Objetivo 2 – Generar precursores neuronales cerebelares en cultivo de las líneas hiPSCs generadas y caracterizar su desarrollo y morfología mediante RT-PCR e inmunofluorescencia.

Objetivo 3 – Generar CPCs maduras a partir de las líneas hiPSCs mediante la técnica de co-cultivo con neuronas granulares de ratón neonato y caracterizar su desarrollo y morfología mediante inmunofluorescencia y el estudio de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas neuronales.

Objetivo 4 – Caracterizar el fenotipo PLAN en los precursores neuronales cerebelares derivados de hiPSCs mediante distintas técnicas moleculares.

3. Resultados

Los materiales y métodos utilizados para la obtención de los siguientes resultados se describen en **E. Materiales y métodos** de este trabajo, así como las muestras biológicas utilizadas resumidas en la **Tabla E1** de **E. Materiales y métodos** en la página 244.

3.1 Generación y caracterización de las líneas hiPSCs generadas a partir de fibroblastos de portador y pacientes PLAN

3.1.1 Generación de líneas hiPSCs por reprogramación celular

Los fibroblastos derivados de muestras de piel de portador heterocigoto sano y pacientes PLAN se sometieron al protocolo de transducción y reprogramación mediante virus Sendai (SeV) resumido en la **Figura 3E** en **E. Materiales y Métodos**. Se cultivaron 48 horas antes de la transducción con SeV con medio de fibroblastos. Dependiendo de la línea celular, en torno al día 26 desde el inicio del protocolo de reprogramación, se observaron las primeras colonias bien definidas de células hiPSCs que se seleccionaron y cultivaron individualmente (selección clonal) durante las siguientes semanas sobre *feeders* o en condiciones *feeder-free* en Matrigel con medio mTeSR™1 (#05850. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) (**Figura C8**).

En los siguientes apartados de esta sección se exponen los resultados asociados a la caracterización de un clon por cada línea PLAN generada en ese capítulo.

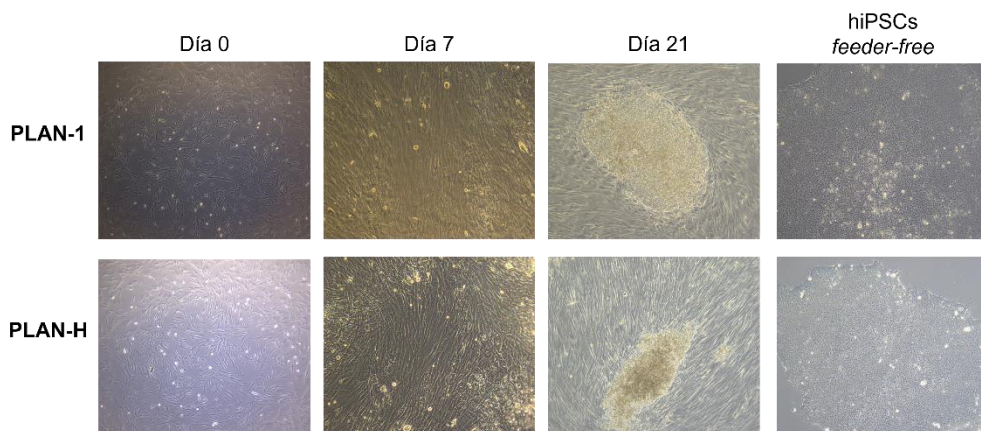


Figura C8 Imágenes representativas del proceso de reprogramación celular de fibroblastos **PLAN-1** y **PLAN-H** a hiPSCs. **Día 0:** Cultivo de fibroblastos en adherencia previo a la transducción. **Día 7:** fibroblastos ya transducidos son SeV donde se observan cambios morfológicos. **Día 21:** colonia de células pluripotentes cultivadas en *feeder*. **hiPSCs *feeder-free*:** cultivo celular de colonias de hiPSCs sobre Matrigel. Imágenes 10X.

3.1.2 Caracterización molecular y genética

3.1.2.1 Análisis de expresión de factores de reprogramación exógenos

El proceso de reprogramación celular mediante SeV, puede conllevar la acumulación de genoma viral que, aunque no se integra en el genoma celular, su presencia puede interferir en los análisis de pluripotencia y caracterización.

Para su eliminación, y dependiendo de cada línea, se realizaron en torno a 13 pases en condiciones de cultivo en *feeders* o *feeder free* en Matrigel hESC-qualified Matrix (#354277. Corning, NY, EE. UU.) con mTeSR™1 (#05850. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá). Además, durante el cultivo de alguna línea hiPSCs PLAN en fue necesaria la aplicación de un ciclo de incubación de 5 días a 39°C para eliminar algunos de los vectores termosensibles, como Klf4.

Para comprobar la eliminación completa de los SeV en el cultivo de las líneas hiPSCs, se analizó la expresión de los genes transducidos por los SeV durante la reprogramación por RT-PCR. El producto de esta PCR se corrió en un gel de agarosa al 2% (**Figura C9**), donde se puede observar la ausencia de bandas para los genes SeV para los clones de las líneas PLAN-1, PLAN-2, PLAN-3 y PLAN-H. Por lo tanto, estos resultados indican la eliminación SeV mediante la combinación de varios pases y/o ciclos a 39°C en las líneas hiPSCs reprogramadas.

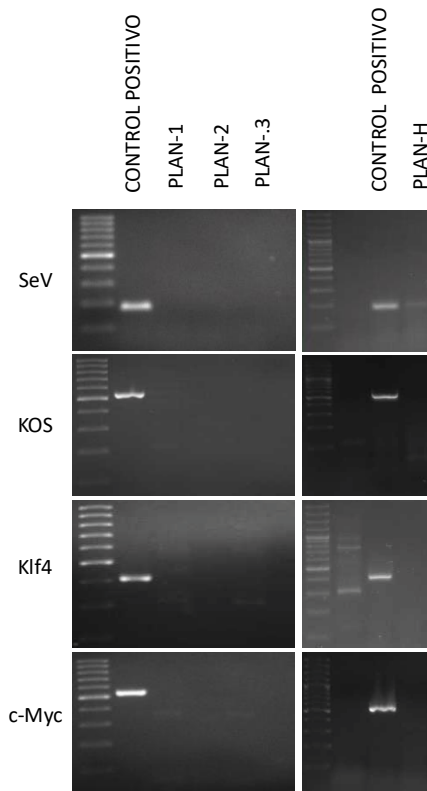


Figura C9 Eliminación de SeV en el proceso de reprogramación celular de líneas hiPSCs PLAN. Imágenes representativas de la amplificación de mRNA por RT-PCR de los genes que codifican por factores exógenos (Exo-c-myc, Exo-KOS, Exo-Klf4 y Exo-SeV) de reprogramación en: células control, PLAN-1, PLAN-2, PLAN-3 y PLAN-H. Como control positivo de amplificación se utilizó mRNA de células transducidas con SeV a día 7 del protocolo de reprogramación.

3.1.2.2 Análisis mutacional por secuenciación

Partiendo de DNA genómico de las líneas PLAN-1, PLAN-2, PLAN-3 y PLAN-H, se amplificaron por PCR distintos fragmentos del gen *PLA2G6* que contenían las mutaciones correspondientes de cada línea celular. Tras el proceso de reprogramación celular y eliminación de los SeV, era necesario comprobar si los clones de las líneas hiPSCs generadas mantenían las mutaciones originales en el gen *PLA2G6*, tanto en las líneas de pacientes como de portador y poder confirmar que las líneas celulares eran válidas para continuar con el proceso de caracterización y posterior utilización en el proceso de diferenciación celular.

En la **Figura C10** se observan los electroferogramas obtenidos en las cuatro muestras analizadas. Se puede comprobar que la línea generada de PLAN-1 posee el cambio c.2370T>G, la línea PLAN-2 mantiene los dos cambios descritos c.1010T>A y c.1057G>A, y que la línea PLAN-3 mantiene el cambio c.2356G>A tras la reprogramación celular. De igual manera, se analizó si el portador PLAN-H mantenía la mutación c.2370T>G en heterocigosis (**Figura C10**). En paralelo, y como control, se analizó la secuencia génica de la línea control en cada fragmento del gen de interés.

Por tanto, el análisis de secuenciación de DNA demuestra que se han reprogramado los fibroblastos originales de la pacientes y portador PLAN y que durante la reprogramación celular no se ha alterado la mutación que provoca la enfermedad.

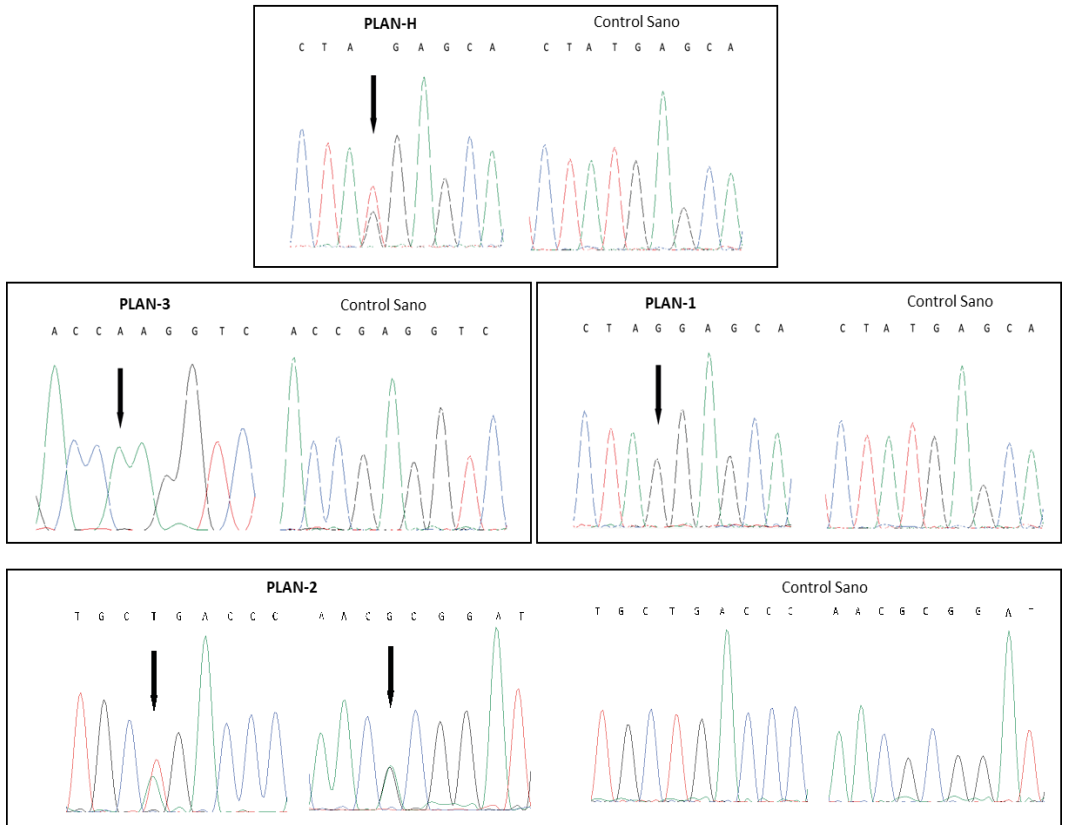


Figura C10 Secuenciación de DNA del fragmento con la mutación en PLA2G6 de células hiPSCs de donante sano (control) y de pacientes PLAN y portador PLAN después del proceso de reprogramación. Electroferograma obtenido de la secuenciación de DNA genómico de las hiPSCs PLAN-H (panel superior), PLAN-1 y PLAN-3, (paneles centrales) y PLAN-2 (panel inferior), comparados con la secuenciación de DNA genómico de hiPSCs de control sano.

3.1.2.3 Cariotipado

Tras el proceso de reprogramación celular era necesaria la evaluación integridad genómica de las líneas hiSPCs generadas. Para ello, se analizó el cariotipo de cada línea. Los resultados recogidos en la **Figura C11** muestran la obtención de cariotipos normales en todas las muestras, por tanto, los resultados indican que las líneas hiSPCs generadas se mantuvieron genéticamente estables a lo largo del proceso de reprogramación celular.

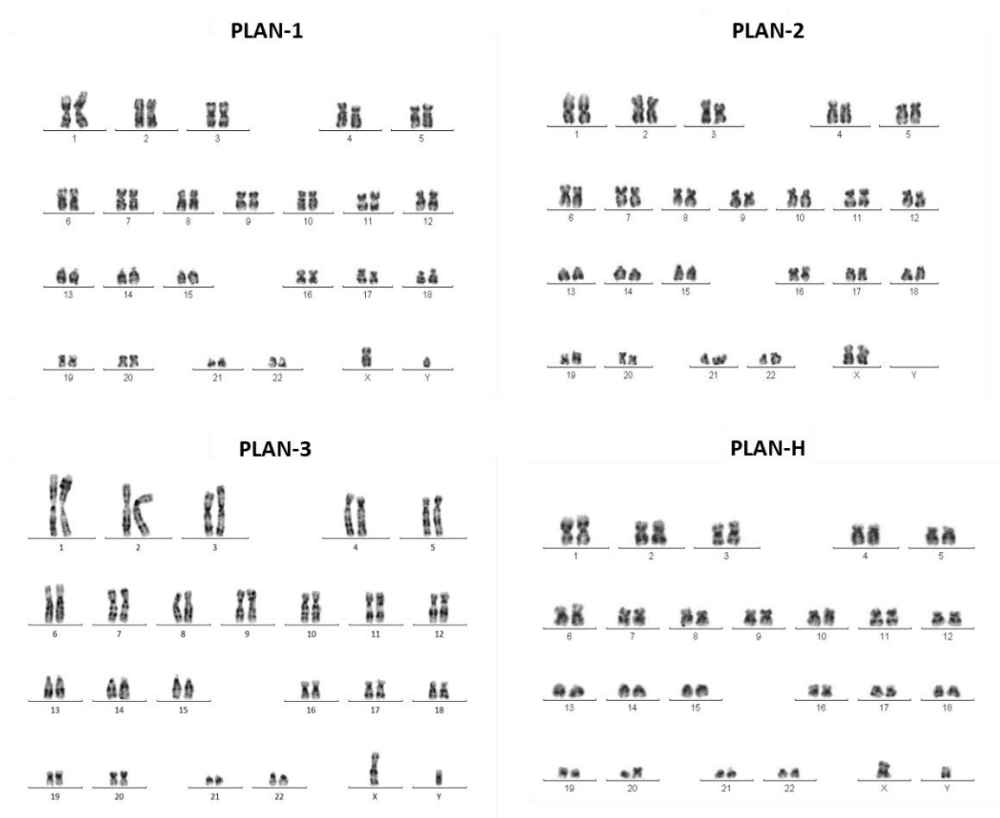


Figura C11 Imágenes del cariotipo obtenido en las líneas hiSPCs PLAN tras el proceso de reprogramación celular. Cariotipo obtenido tras la tinción de bandeado cromosómico de hiSPCs de PLAN-1, PLAN-2, (paneles superiores) y PLAN-3 y PLAN-H (paneles inferiores). PLAN-1 → 46, XY; PLAN-2 → 46, XX; PLAN-3 → 46, XY; PLAN-H → 46, XY.

3.1.2.4 Análisis de expresión de marcadores de pluripotencia

Tras el proceso de reprogramación celular y eliminación de SeV, era necesaria la comprobación de la expresión de los marcadores de pluripotencia. Para ello, se utilizaron tres técnicas complementarias:

A) PCR

Se analizó la expresión de distintos genes relacionados con la pluripotencia celular por PCR semicuantitativa, que son expresados de manera endógena por las hiPSCs y son los responsables del mantenimiento de la pluripotencia en el cultivo (180). En la **Figura C12**, se observa que en las cuatro líneas PLAN-1, PLAN-2, PLAN-3 y PLAN-H, la expresión endógena de genes que permiten el establecimiento y mantenimiento de la pluripotencia celular ha sido inducida tras el proceso de reprogramación celular.

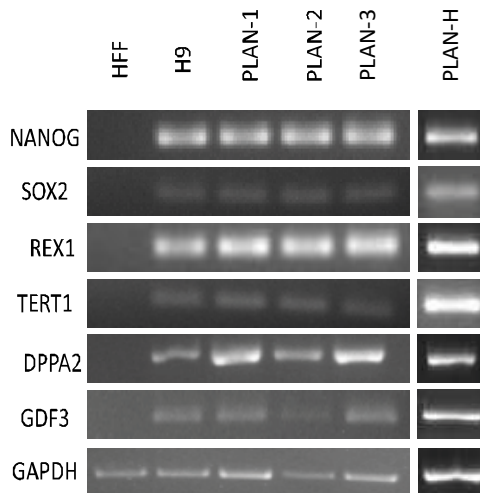


Figura C12 Expresión de los factores de pluripotencia endógenos en células hiPSCs de PLAN-1, PLAN-2, PLAN-3 y PLAN-H. Se han utilizado las células hESCs H9 como control positivo y fibroblastos dermales humanos como control negativo. Como control de la reacción de amplificación se analizó la expresión del gen constitutivo *GAPDH*.

B) Citometría de flujo

(180) Mediante citometría de flujo se analizó la presencia de marcadores de pluripotencia en las colonias de las líneas hiPSCs obtenidas después de la reprogramación (180). Los resultados obtenidos mostraron una alta presencia de ambos marcadores anteriormente nombrados en el cultivo de las líneas hiPSCs de PLAN-1, PLAN-2, PLAN-3 y PLAN-H. En el caso de las células hiPSCs marcadas con SSEA4, todas las líneas hiPSCs superaban la expresión en más del 95% en las células vivas (**Figura C13**). En el caso del marcaje de las líneas hiPSCs con TRA-1-60, el porcentaje de positividad se quedó en todas las líneas alrededor del 57% siendo, por tanto, la expresión menor de este marcador en las líneas generadas (**Figura C13**).

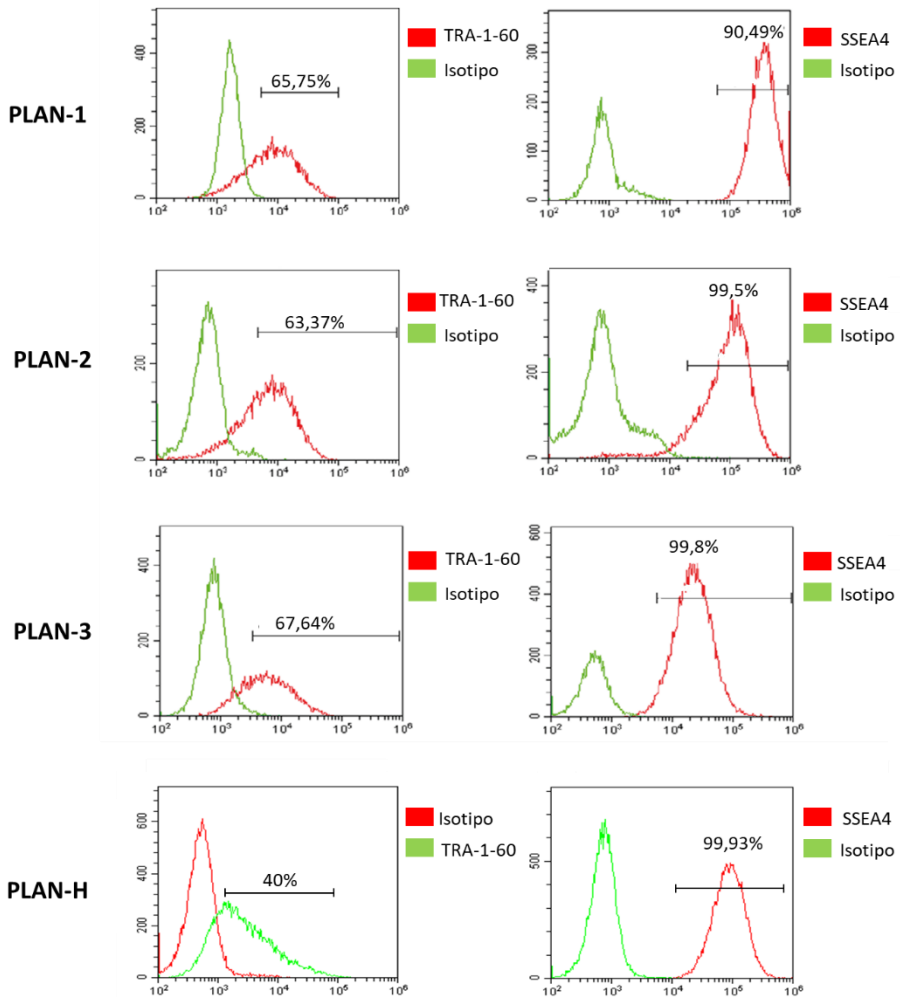


Figura C13 Análisis de citometría de marcadores de pluripotencia SSEA4, Tra1-60 en las células hiPSCs PLAN-1, PLAN-2, PLAN-3 y PLAN-H. A) Histogramas de hiPSCs PLAN-1 marcadas con SSEA4 y TRA1-61 y células PLAN-1 marcadas con el isotipo correspondiente a cada anticuerpo como control negativo. B) Histogramas de hiPSCs PLAN-2 marcadas con SSEA4 y TRA1-61 y células PLAN-1 marcadas con el isotipo correspondiente a cada anticuerpo como control negativo. C) Histogramas de hiPSCs PLAN-3 marcadas con SSEA4 y TRA1-61 y células PLAN-1 marcadas con el isotipo correspondiente a cada anticuerpo como control negativo. D) Histogramas de hiPSCs PLAN-H marcadas con SSEA4 y TRA1-61 y células PLAN-1 marcadas con el isotipo correspondiente a cada anticuerpo como control negativo.

C) Fosfatasa alcalina

El análisis de la tinción por fosfatasa alcalina en las líneas hiPSCs generadas como marcador de pluripotencia. (181), se recoge en la **Figura C14**. En esta se observa que en las cuatro líneas hiPSCs generadas, PLAN-1, PLAN-2, PLAN-3 y PLAN-H, los niveles de coloración rosa generados por la hidrólisis de fosfatos ésteres catalizados por la fosfatasa son altos, lo que indica una elevada actividad de la fosfatasa alcalina y por la correcta generación de hiPSCs.

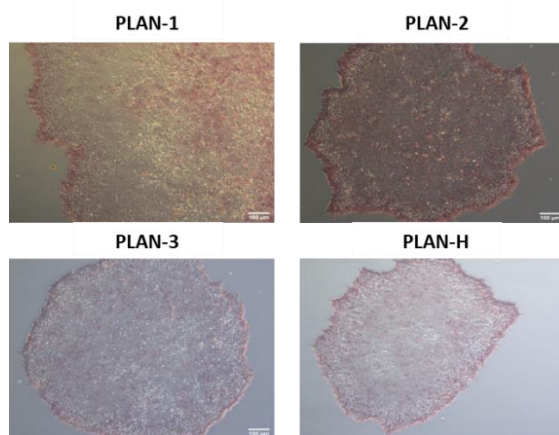


Figura C14 Tinción de fosfatasa alcalina en las células hiPSCs PLAN. PLAN-1, PLAN-2, (paneles superiores) y PLAN-3 y PLAN-H (paneles inferiores). En todas las imágenes la escala representa 100 μm.

3.1.3 Caracterización funcional

Una de las características principales de las células madre es la capacidad de generar células /tejidos pertenecientes a las tres capas germinales (mesodermo, endodermo y ectodermo), por lo que se analizó si líneas hiPSCs PLAN generadas compartían esta capacidad. Para evaluar esta característica se realizó un ensayo de inducción de EBs a partir del cultivo de cada una de las líneas hiPSCs generadas.

3.1.3.1 Formación de cuerpos embrionarios *in vitro*

Se analizó la expresión de proteínas asociadas a la formación de las tres capas germinales mediante la técnica de la formación de EBs, obtenidos por generación espontánea en esferoides de cada línea de hiPSCs PLAN. Posteriormente, y hasta día 21, las células de cada capa germinal migran en los pocillos en adherencia permitiendo su posterior análisis por inmunofluorescencia. Los anticuerpos analizados se muestran en la [Figura C15](#).

En las cuatro líneas hiPSCs PLAN Y PLAN-H generadas se detectó la presencia de proteínas asociadas a las tres capas germinales tales como la actina de músculo liso o SMA (asociada endodermo), α -fetoproteína o FOXA2 (asociadas a endodermo) y Tuj1 (asociadas a Ectodermo)(180).

Estos resultados indican que las cuatro líneas son capaces de generar cualquier tipo celular *in vitro*.

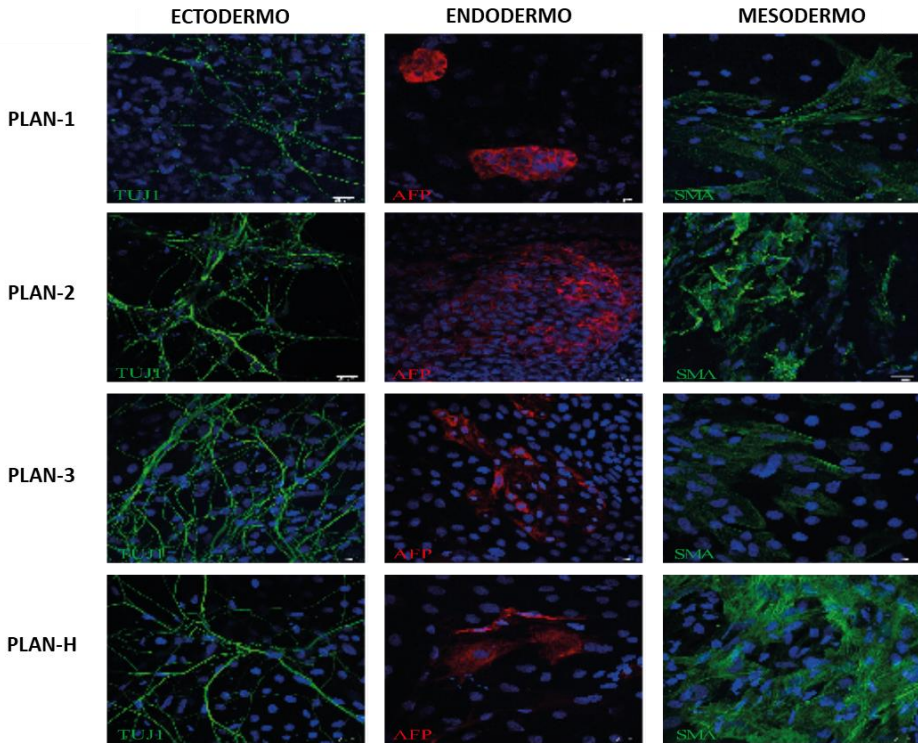


Figura C15 Imágenes de inmunofluorescencia representativas de marcadores de expresión proteica de las tres capas germinales asociadas a la formación de cuerpos embrionarios (EBs) *in vitro* a partir del cultivo de líneas hiPSCs PLAN. De arriba abajo: PLAN-1, PLAN-2, PLAN-3 y PLAN-H. De izquierda a derecha: β -III tubulina (Tuj1) asociada a ectodermo; α -fetoproteína (AFP) asociada a endodermo; Actina de músculo liso (SMA) asociada a mesodermo. En todas las imágenes, la escala representa 25 μ m.

3.2 Caracterización y validación de la generación de células precursoras de cerebelo y de neuronas de células de Purkinje de cerebelo maduras funcionales a partir de líneas hiPSCs

Para confirmar la correcta diferenciación neural/cerebelar de las líneas hiPSCs generadas de control, portador y pacientes PLAN, se analizó la expresión de los genes *OTX2*, *EN1*, *EN2*, *HOXA2* y *GBX2*, relacionados con la formación y regionalización del tubo neural, la aparición de precursores neuronales cerebelares, así como

marcadores específicos del desarrollo fenotípico de neuronas GABAérgicas y CPCs. Estos estudios se realizaron tanto por RT-PCR que permite la obtención de resultados precisos relacionados con pequeños cambios de expresión génica, como por ensayos de inmunocitoquímica/inmunofluorescencia para comprobar visualmente la formación de un fenotipo neuronal cerebelar mediante la detección de proteínas asociadas (**Figura C16**). Mediante RT-PCR se estudió el patrón de expresión temporal de mRNA de cada gen analizado en cada línea celular por separado, tomando como referencia para las comparaciones relativas de expresión de cada gen el día 0 de la diferenciación de cada una de ellas con el fin de investigar su expresión temporal de manera independiente.

La línea hiPSCs Control ha sido utilizada en conjunto para los experimentos y resultados asociados a la diferenciación neuronal y cerebelar tanto para el capítulo 1 y capítulo 2 de la presente tesis.

En las Figuras **B18**, **B20** y **B22**, correspondientes al “**B. CAPÍTULO 1: Ataxia espástica autosómica recesiva de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)**”, se recogen los resultados de expresión génica correspondientes a la diferenciación neuronal y cerebelar de la línea hiPSCs control. Además, en las figuras **B24** y **B26** correspondientes al “**B. CAPÍTULO 1: Ataxia espástica autosómica recesiva de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)**”, se recogen las imágenes de fluorescencia representativas de la expresión de proteínas específicas asociadas a la diferenciación neuronal y cerebelar en la línea hiPSCs control.

3.2.1 Expresión de genes relacionados con la organización del tubo neural y la regionalización durante el protocolo de diferenciación celular

En primer lugar, mediante RT-PCR, se analizó la expresión de genes relacionados con la pérdida de pluripotencialidad e inicio de la diferenciación neural como *OCT4* y *OTX2* respectivamente. En la **Figura C16** se muestra una rápida inhibición de *OCT4* y *OTX2* desde el inicio de la diferenciación neuronal, comprobándose así que durante la fase inicial de la diferenciación a neuroectodermo este no adquiría un carácter rostral.

A continuación, se estudió la expresión de genes relacionados con la regionalización del tubo neural hacia el rombencéfalo en estadios tempranos del desarrollo, como los genes *HOXA2* además de *GBX2*. En la **Figura C16** se muestra como *GBX2* se expresa en etapas tempranas del protocolo (día 10) del modelo generado por la diferenciación de las líneas hiPSCs, induciendo así la diferenciación neural cerebelar. Conforme avanza el protocolo de diferenciación, la expresión de *GBX2* va disminuyendo. Los datos de expresión temprana de estos genes, *HOXA2*, *EN1* y *EN2* en el proceso de diferenciación cerebelar se recogen en la **Figura C16**. En ella se observa cómo la expresión de estos genes, que asociados al desarrollo temprano del rombencéfalo y por tanto a la diferenciación cerebelar, aumenta su expresión en los primeros días del protocolo de diferenciación. Posteriormente la expresión disminuye en el cultivo conforme avanza el protocolo de diferenciación *in vitro* y, por ende, del desarrollo neural del cultivo de las líneas hiPSCs.

La presencia de altos niveles de expresión de estos genes durante las etapas tempranas en el cultivo de las líneas hiPSCs utilizando el protocolo de diferenciación cerebelar propuesto en este trabajo indicarían la correcta diferenciación hacia ciertos linajes celulares que posteriormente darán lugar a las

células cerebelo y, por lo tanto, adquiriendo las propiedades básicas específicas de dicho tejido.

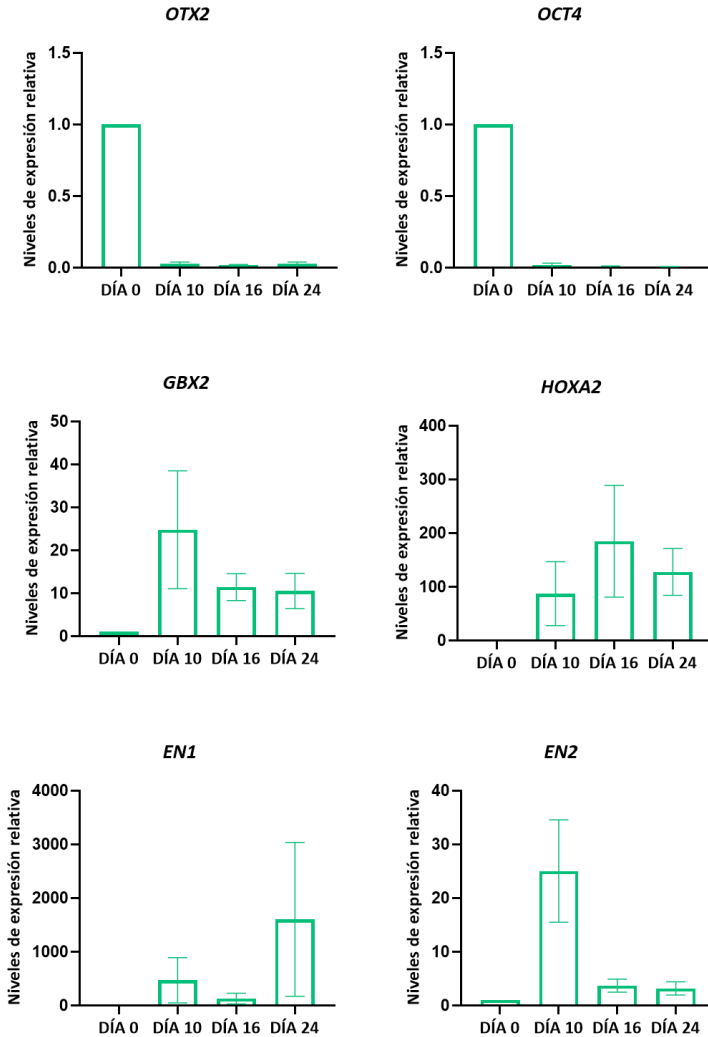


Figura C16 Análisis de expresión génica de marcadores de regionalización cerebelar durante la diferenciación neural *in vitro* de las hiPSCs PLAN-1. Mediante RT-PCR, se analizó la expresión de los genes *OTX2*, *EN1*, *EN2*, *HOXA2* y *GBX2* en los días 10-24 de diferenciación en comparación con hiPSCs indiferenciadas (*fold change* = 1). Los datos representan la expresión media por día \pm SEM en unidades relativas de cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (N=3)

3.2.2 Expresión de genes relacionados con el desarrollo cerebelar de neuronas GABAérgicas y células de Purkinje de cerebelo durante el protocolo de diferenciación celular

Una vez confirmada la regionalización posterior del cultivo de las líneas celulares hiPSCs en el proceso de diferenciación, se analizó la expresión de genes marcadores de precursores de CPCs durante el protocolo de diferenciación.

En la [Figura C17](#) se muestran los valores de expresión del gen *KIRREL2*, asociado a precursores muy tempranos de neuronas GABAérgicas cerebelares durante el desarrollo. La expresión de *KIRREL2* aumenta hasta alcanzar su pico máximo alrededor de los días 16-24 de la diferenciación de la línea hiPSCS PLAN-1, sugiriendo la aparición de marcadores de neuronas GABAérgicas de cerebelo en el cultivo.

De la misma manera, se analizó la expresión del gen *SKOR2* (o *CORL2*), marcador específico las células del linaje de las CPCs en desarrollo. En la [Figura C17](#) se muestran los valores asociados a la expresión génica obtenidos por RT-PCR de la línea hiPSCs del paciente PLAN-1, indicando que en estadios tempranos existe una ausencia de expresión durante los primeros días del protocolo de diferenciación, y que aumenta a la vez que avanza la maduración del cultivo (días 32-48), y disminuye la expresión de marcadores tempranos de CPCs como *KIRREL2*.

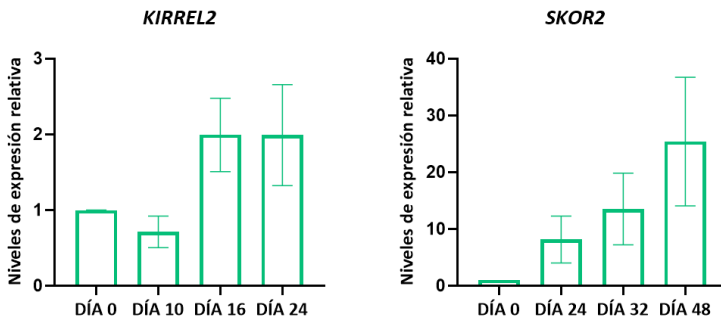


Figura C17 Análisis de expresión de los genes *KIRREL2* y *SKOR2* durante la diferenciación cerebelar de las hiPSCs PLAN-1. Análisis de la expresión de los genes marcadores tempranos y tardíos del desarrollo de CPCs se analizó mediante RT-PCR en los días 10-24 y 24-48 de diferenciación cerebelar *in vitro*, y en comparación con hiPSCs indiferenciadas (*fold change* = 1. Los datos representan la expresión media por día \pm SEM en unidades relativas de cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (N=3)

3.2.3 Expresión de genes relacionados con la maduración funcional de las neuronas GABAérgicas durante el protocolo de diferenciación celular

Tras el análisis de expresión de genes implicados en la regionalización neuronal y la adquisición de fenotipo cerebelar, se analizó la expresión de genes relacionados con la maduración neuronal.

Para ello, se analizó la expresión de los genes que codifican por la proteína glutamato descarboxilasa (*GAD1* o *GAD67*), y por la subunidad α -2 del receptor de ácido γ -aminobutírico (*GABRA2*) a diferentes días de diferenciación. En la **Figura C18**, se muestra la expresión de estos genes siguiendo un patrón temporal. La expresión de *GAD1*, asociado a la presencia de neuronas GABAérgicas, aumenta conforme avanza la diferenciación hasta día 48 en las células hiPSCs PLAN-1. En el caso *GABRA2*, el pico de expresión también se encuentra a los 48 días en hiPSCs PLAN-1, lo que indica la formación de sinapsis GABAérgicas conforme maduran las células en el cultivo.

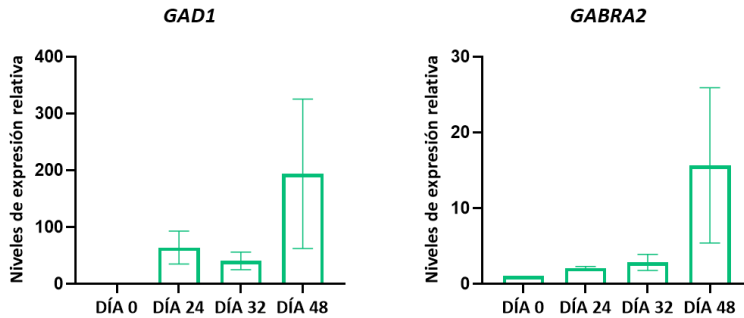


Figura C18 Análisis de expresión de los genes **GAD1** y **GABRA2** durante la diferenciación cerebelar de las hiPSCs PLAN-1. Análisis mediante RT-PCR la expresión de genes involucrados en la adquisición de fenotipo GABAérgico y desarrollo de células de Purkinje de cerebelo *in vitro* entre los días 10-24 y 24-48, y en comparación con hiPSCs indiferenciadas (*fold change* = 1. Los datos representan la expresión media por día \pm SEM en unidades relativas de cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (N=3)

3.2.4 Expresión de proteínas relacionadas con el desarrollo neuronal y cerebelar de neuronas GABAérgicas y células de Purkinje de cerebelo durante el protocolo de diferenciación celular

La imagen del día 4 del protocolo de diferenciación que se muestra en la [Figura C19](#), corresponde a la rápida formación del tubo neural (inducción neural) mediante la técnica de cultivo por esferoides de células en suspensión. Posteriormente los esferoides se cultivaron en dos dimensiones (2D) o pseudo-2D para favorecer la formación de estructuras celulares en el cultivo que permitieron la aparición de células del linaje neuronal/cerebelar con una morfología característica con una alta confluencia (imágenes días 10-24 de la [Figura C19](#)).

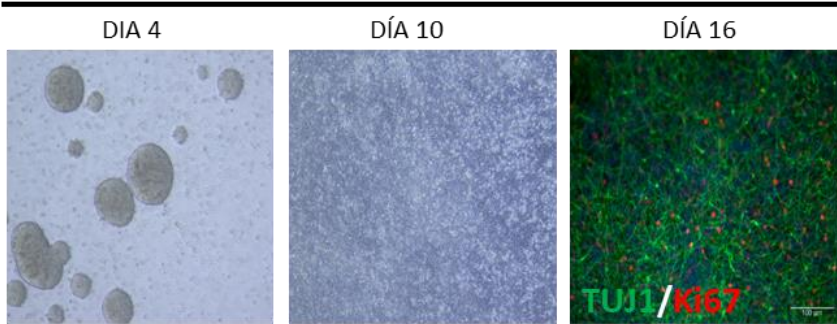
A día 16 del protocolo de diferenciación ([Figura C19](#)), mediante el marcaje con Tuj1, proteína de microtúbulos expresada en todas las neuronas, indica la presencia de células pertenecientes al linaje neuronal en el cultivo. El marcaje con la proteína Ki67 indica que el cultivo en diferenciación están presentes precursores neuronales en crecimiento y división en este punto del protocolo.

En la imagen correspondiente al día 24 del protocolo de diferenciación que se muestra en la **Figura C19**, se observa que muchas de las células expresan la proteína Lhx1, marcador temprano asociado a la formación de neuronas GABAérgicas.

A continuación, se analizó si a medida que el protocolo de diferenciación avanzaba en el tiempo, y en paralelo con el análisis de expresión génica, se iban formando precursores de CPCs. Para ello se marcaron las neuronas en cultivo con el marcador SKOR2 marcador temprano/medio de CPCs y a día 32 del protocolo de diferenciación. En la imagen correspondiente al día 32 de la **Figura C19** se muestran grupos de células que expresan el marcador SKOR2 en el cultivo en diferenciación de hiPSCS PLAN-1, confirmando la presencia en el cultivo de precursores neuronales de CPCs también por la técnica de inmunofluorescencia.

El cultivo se mantuvo hasta día 48 sin co-cultivo para demostrar que, con el paso del tiempo, los CCPs forman CPCs adultas. Mediante marcaje con *Purkinje Cell Protein-2* o PCP2, marcador habitualmente empleado para CPCs postmitóticas. En la imagen que corresponde al día 48 de la **Figura C19** se observan neuronas marcadas con PCP2, indicando que se obtuvieron marcadores de etapas tardías o maduras de CPCs derivadas de hiPSCs.

Inducción neural y diferenciación neuronal



Diferenciación a precursores cerebelares

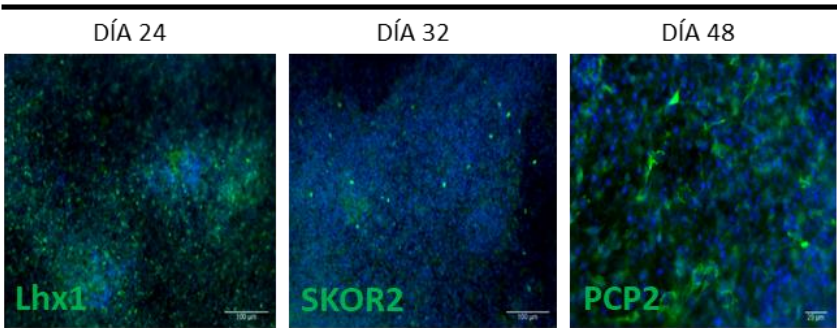


Figura C19 Imágenes representativas de la inducción neural y formación de células precursoras de cerebelo derivados de PLAN-1 durante del protocolo de diferenciación cerebelar. Día 4) Formación de esferoides para la inducción a neuroectodermo del cultivo de hiPSCs; Día 10) Inducción cerebelar en cultivo 2-D de los esferoides formados; Día 16) Marcaje por inmunofluorescencia de precursores neurales con Tuj1/ Ki67 a día 16; Día 24) Marcaje por inmunofluorescencia de progenitores de cerebelares de neuronas GABAérgicas a día 24 con Lhx1; Día 32) Marcaje por inmunofluorescencia de precursores de CPCs a día 32 con SKOR2; Día 48) Marcaje por inmunofluorescencia de CPCs a día 48 sin co-cultivo por PCP2. En todas las imágenes la escala representa 100 μ m, excepto en la imagen del día 48), que representa 25 μ m. Las imágenes correspondientes al día 4 y 10 representan representativas del cultivo a 10X.

A continuación, en el protocolo de diferenciación (detallado en la sección 2.5 de E. **Materiales y métodos** en la página 258), se realizó la técnica de co-cultivo, para mejorar la diferenciación y maduración de las células precursoras de CPCs y poder estudiar su desarrollo morfológico y función sináptica. Para su obtención, el día 30 del protocolo de diferenciación, la existencia de precursores de CPCs no maduras o postmitóticas, permitió su selección mediante marcaje con THY1 para co-cultivarlas con células granulares de ratón P4-7.

En la **Figura C20 A)**, las células calbindina positivas (CALB) derivadas de las hiPSCs de PLAN-1 a día 60 se observa como empiezan a migrar del conjunto de células sembrado en el co-cultivo y comienzan a tener una morfología bipolar. Posteriormente, en torno a los días 82-90 **Figura C20 B y C)**, el soma de las CPCs marcadas con calbindina desarrollaron un soma con forma ovalado típico de las CPC, además de aumentar su extensión y ramificación de las dendritas.

En la **Figura C20 D)** se muestra una imagen a punto final del experimento donde las CPCs de PLAN-1 en torno al día 130 crecieron en extensión y tamaño y presentaron múltiples ramificaciones, indicando el avance de la maduración del cultivo. Además, alrededor del día 120-130 empezaron a expresar marcadores de presencia de receptores GABA y de glutamato, como VGAT y VGLUT1, respectivamente (se muestran imágenes representativas de fluorescencia la **Figura C20 E) y F)**).

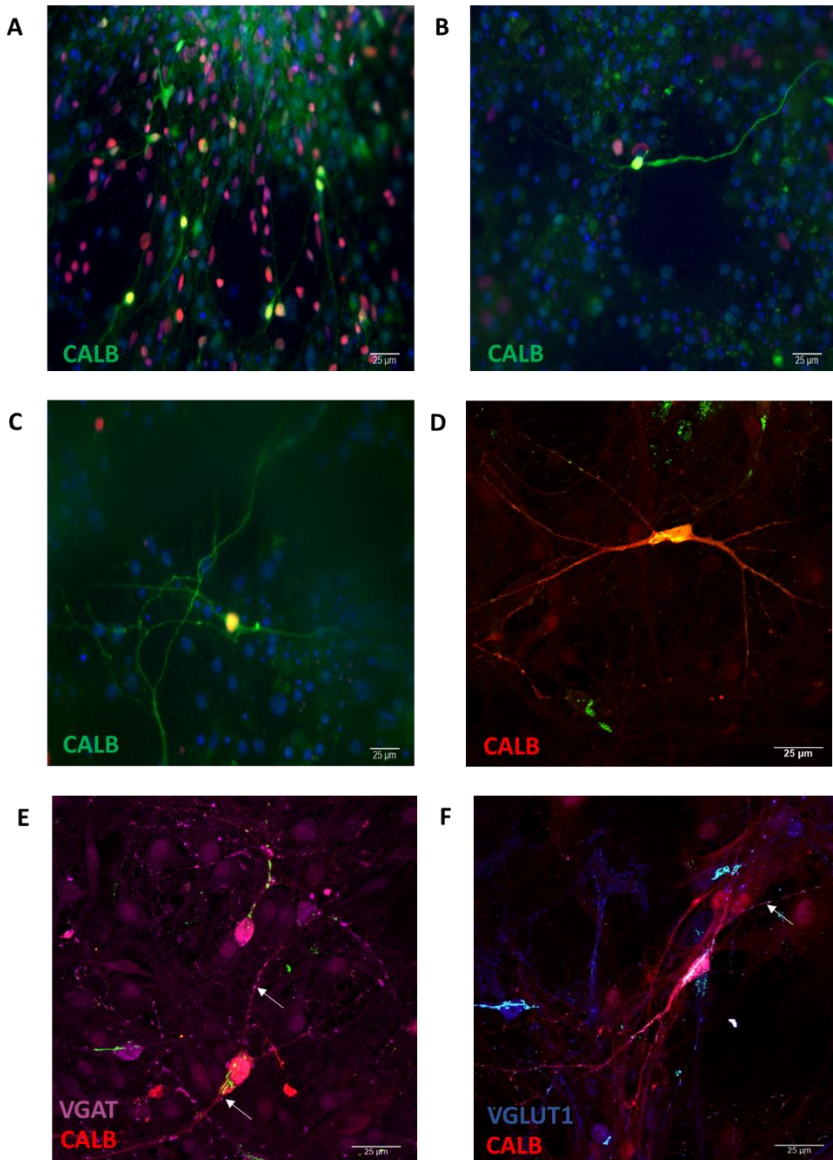


Figura C20 Desarrollo morfológico de células de Purkinje de cerebelo a partir de hiPSCs de PLAN-1 en co-cultivo con células granulares de ratón. Las imágenes se tomaron en los días **A)** 60, **B)** 82, **C)** 100 y **D)** 130 del protocolo de diferenciación. Marcaje por inmunofluorescencia: (marcador de Golgi humano (HuGolgi) en color verde), calbindina (CALB) en rojo, VGAT en color morado y VGLUT1 en color azul. El resto de las imágenes están marcadas con Marcador de núcleo humano (HuNu) en color rojo y CALB en color verde. En todas las imágenes la escala representa 25 µm.

3.3 Las células de Purkinje de cerebelo maduras derivadas de pacientes PLAN muestran alteraciones en la morfología celular, tamaño del soma, reducción del crecimiento neuronal y arborización y número de sinapsis alterado

Con el fin de analizar las diferencias morfológicas neuronales relacionadas con el desarrollo neuronal de las CPCs humanas derivadas de las líneas hiPSCs PLAN, (pacientes y portador) y control, estas se marcaron calbindina, marcador por excelencia de CPCs Previamente, los precursores de CPCs se seleccionaron con el marcador THY1 o CD90 y fueron co-cultivados con neuronas granulares de cerebelo ratón durante 130 días para su maduración, por lo que para diferenciar las CPCs humanas del resto de neuronas de ratón presentes en el cultivo, se utilizó el marcador específico humano del aparato de Golgi (HuGolgi). En la [Figura C21](#) se recogen imágenes representativas de las CPCs derivadas de hiPSCs PLAN, PLAN-H y control, donde se observan las diferentes morfologías neuronales.

Los resultados mostrados en la [Figura C22 A\)](#) indican que las CPCs derivadas de hiPSCs Control seleccionadas y marcadas con HuGolgi+/CALB+ en co-cultivo tienen un tamaño de soma significativamente con respecto a las líneas CPCs obtenidas de hiPSCs PLAN, no observando diferencias con respecto a PLAN-H. Además, no se observan diferencias significativas entre las líneas hiPSCs de pacientes PLAN ([Figura C22 A\)](#); Promedio \pm SEM; Control = $384,5 \pm 109,22$; PLAN-H = $267,8 \pm 138,00$; PLAN-1 = $209,7 \pm 87,22$; PLAN-2 = $258,33 \pm 88,08$; PLAN-3 = $218,76 \pm 89,5$).

En la [Figura C22](#) se muestran también los datos en relación con el análisis de la morfología y madurez neuronal. Se analizó el crecimiento dendrítico/neuronal de las CPCs de pacientes PLAN, PLAN-H y control, mediante análisis cuantitativo de imágenes utilizando el software Image J y el plugin Neuron J. Las CPCs derivadas de hiPSCs control seleccionadas y marcadas con HuGolgi+/CALB+ en co-cultivo mostraron que el crecimiento total (o complejidad neuronal) y el número de

ramificaciones secundarias es significativamente mayor en la línea control con respecto a las líneas PLAN y portador PLAN-H (Figura C22 B) y D).

El análisis muestra además que no existen diferencias significativas en el número de procesos primarios y de ramificaciones entre las líneas de pacientes PLAN, PLAN-H con respecto a las CPCs Control (Figura C22 C).

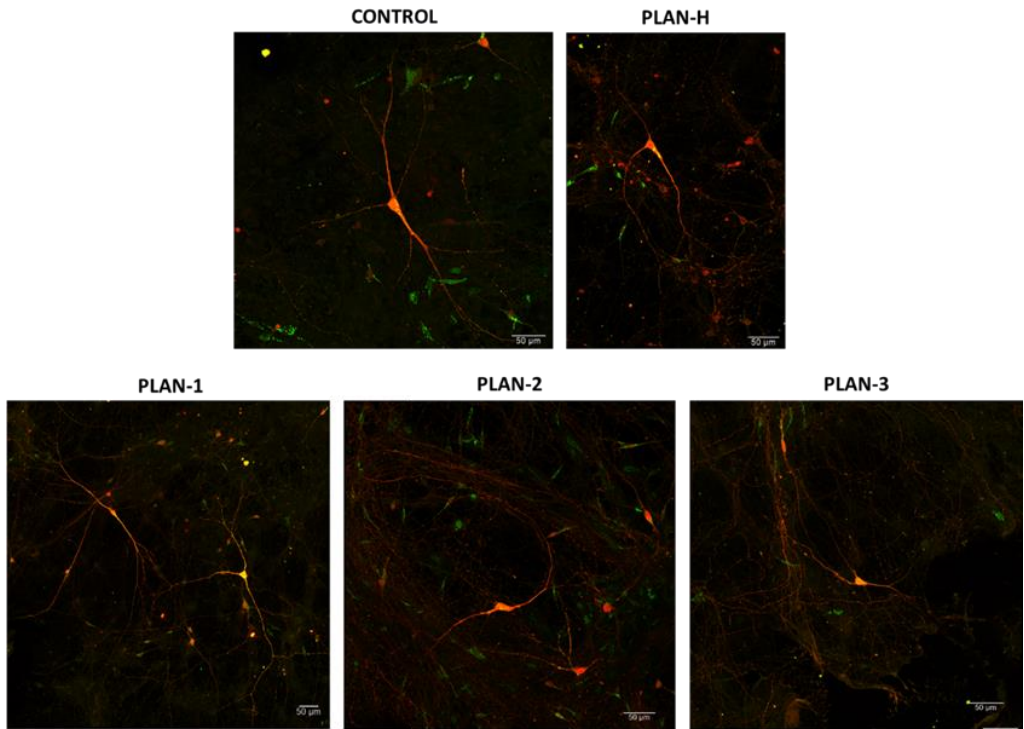


Figura C21 Imágenes representativas de células de Purkinje de cerebelo derivadas de las líneas hiPSCs control y PLAN. Las imágenes se tomaron en los días 130 del protocolo de diferenciación y se analizó la morfología neuronal. En todas las imágenes la escala representa 50 µm. Marcaje por inmunofluorescencia: Marcador de CPC calbindina (rojo); marcador de Golgi humano (HuGolgi) (verde).

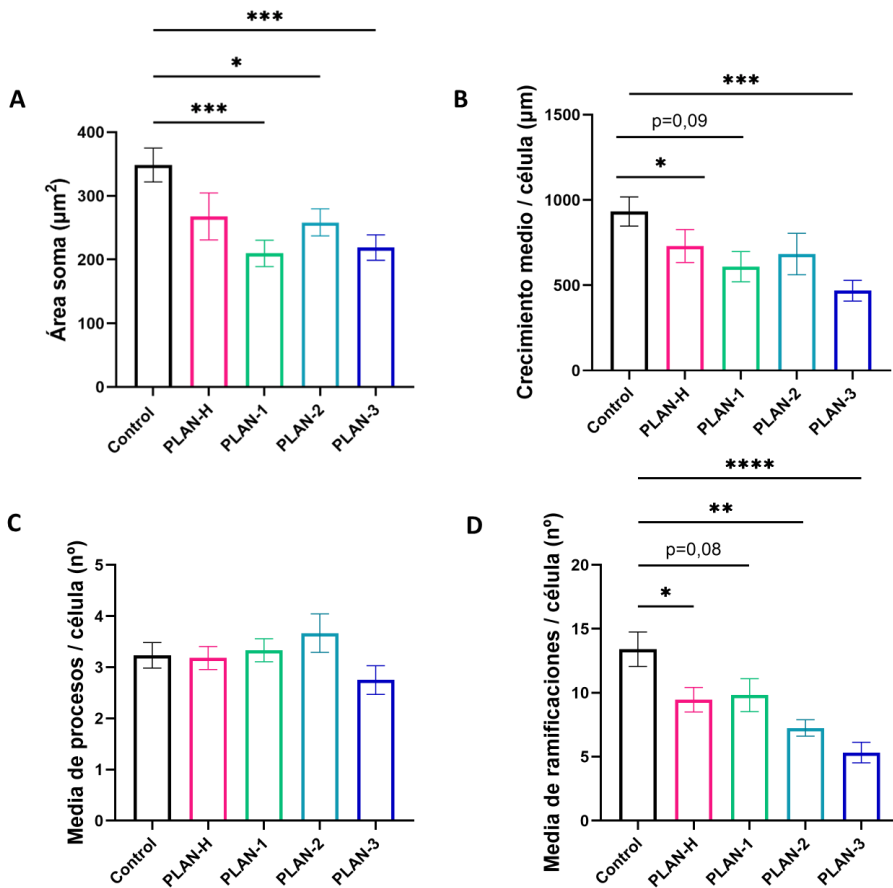


Figura C22 Análisis cuantitativo de la morfología y desarrollo de las células de Purkinje de cerebelo derivadas de las líneas hiPSCs control y PLAN. Comparación entre CPCs derivadas de las líneas hiPSCs control, PLAN-H, PLAN-1, PLAN-2 y PLAN-3 a día 130 del protocolo de diferenciación. **A)** Diferencias en área del soma de células de Purkinje de cerebelo derivadas de hiPSCs PLAN en co-cultivo *in vitro*. **B)** Análisis del crecimiento dendrítico total de las células de Purkinje de cerebelo. **C)** Número de neuritas primarias. **D)** Análisis del número de ramificaciones neurales totales por CPC humana. Los datos de la gráfica representan la media de cada análisis en cada línea \pm SEM. Datos determinados para al menos tres experimentos de diferenciación independientes con un total de 15-20 células/grupo. Los niveles de significancia (** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$; ns= no significativo) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

Por último, para determinar si las mutaciones en *PLA2G6* estaban asociadas con cambios en la sinapsis, se analizó si existían cambios en la cantidad del transportador de GABA en la membrana mediante el análisis de las vesículas sinápticas marcadas con VGAT, presente en neuronas GABAérgicas. Mediante el análisis cuantitativo de imágenes utilizando ImageJ se analizó la densidad de VGAT en las neuritas de CPCs derivadas de la diferenciación de hiPSCs PLAN y portador PLAN-H con respecto al control a día 130 día del protocolo y en co-cultivo.

En la **Figura C23 A)** se muestra que tanto las CPCs PLAN y PLAN-H presentan una menor densidad de puntos VGAT en las dendritas en comparación con las CPCs Control. Además, el número de vesículas sinápticas VGAT en el soma también es menor en las CPCs derivadas de hiPSCs PLAN-H y todas las líneas de pacientes PLAN en comparación con las CPCs Control (**Figura C23 B)**).

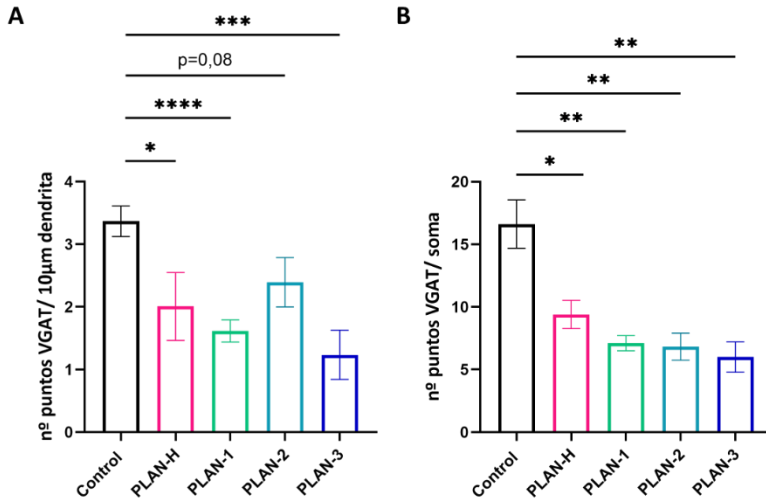


Figura C23. Expresión de VGAT en células de Purkinje de cerebelo derivadas de hiPSCs PLAN y control. A) Cuantificación de punteado VGAT en dendritas; **B)** Cuantificación de punteado VGAT en soma. Datos determinados por al menos tres experimentos de diferenciación independientes un total de 15-20 células por grupo. Los niveles de significancia (***) $P \leq 0,001$; (**) $P \leq 0,01$; (*) $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

3.4 Las células de Purkinje de cerebelo maduras derivadas de líneas hiPSCs de pacientes PLAN y portador PLAN muestran defectos en las propiedades electrofisiológicas

A punto final de la diferenciación, a día 130, se analizó si las mutaciones en *PLA2G6* afectaban a las propiedades funcionales electrofisiológicas básicas del modelo celular CPC PLAN además de a la morfología neuronal y conexiones sinápticas.

Las neuronas registradas se identificaron como CPCs en base a sus características morfológicas, como son el gran soma de forma poligonal con un núcleo grande, dendrita o dendritas principales que a su vez desarrollan un árbol dendrítico y una gran complejidad neuronal (tal y como se muestra en la figura E12 de E. Materiales y métodos). Además, se confirmó que todas las neuronas registradas y analizadas en esta tesis, presentaban un potencial de membrana en reposo estable y al menos un potencial de acción. Y que, además, no presentaban potenciales de acción espontáneos. Las neuronas que cumplieron estas características se registraron de 7 a 15 neuronas por grupo y dividieron según grupos de estudio: control, portador PLAN-H y pacientes PLAN (en conjunto PLAN-1, PLAN-2 y PLAN-3). Algunas de las células registradas se rellenaron con biocitina en el momento del registro y posteriormente se observó la morfología característica de CPC en cada una de ellas mediante visualización por inmunofluorescencia, y se confirmó que eran humanas al expresar el marcador HuGolgi (Figura C24).

Los registros electrofisiológicos de célula completa (*whole cell patch clamp*) se realizaron en CPCs humanas derivadas de células THY1+, que se co-cultivaron hasta día 130 aproximadamente, en presencia de bloqueadores sinápticos descritos en la sección de 2.26 en E. Materiales y métodos.

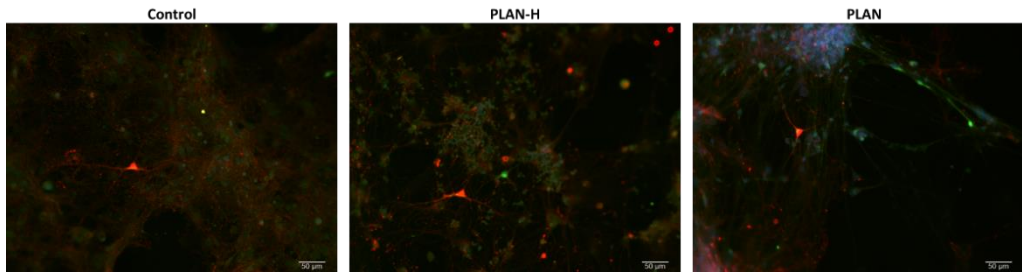


Figura C24 Imágenes representativas de células de Purkinje de cerebelo derivadas de hiPSCs control y PLAN registradas e inyectadas con biocitina. En todas las imágenes la escala representa 50 μm . Biocitina (rojo); marcador de Golgi humano (HuGolgi) (verde).

En la **Figura C25 A)** se muestran las respuestas en voltaje de dos neuronas representativas de PLAN-H y PLAN (en rosa y azul respectivamente), cada una correspondiente a un grupo de estudio frente al control (en negro), generadas mediante pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes. En cuanto al potencial de acción, se observó que tanto la amplitud del potencial de acción como la duración de estos estaba alterada en CPCs derivadas de hiPSCs PLAN y PLAN-H con respecto a las CPCs control, indicando una menor frecuencia y duración ante un mismo voltaje.

De la misma manera, se analizó el potencial de membrana en reposo (RPM, *Resting Membrane Potential*), calculado como la diferencia entre los potenciales intracelulares y extracelulares. En la **Figura C25 B)** se muestra cómo las CPCs derivadas de hiPSCs PLAN exhibieron un potencial de membrana en reposo más bajo en comparación con las células control, mostrando una hiperpolarización significativamente más alto cuando se compararon los grupos frente a las CPCs control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las CPCs de PLAN y PLAN-H.

Se analizó asimismo, la resistencia de membrana o de entrada (R_i , *input resistance*) en las CPCs derivadas de hiPSCs, que se midió mediante la inyección de pulsos cuadrados de corriente positivos y negativos en las CPCs. En la **Figura C25 C**) se recoge el análisis de R_i , donde se indica que los pacientes PLAN exhibieron una R_i mayor en comparación con las CPCs control. Sin embargo, no se observaron diferencias en R_i en PLAN-H con respecto las CPCs control, ni entre PLAN-H y los datos obtenidos del conjunto de CPCs de pacientes PLAN analizadas.

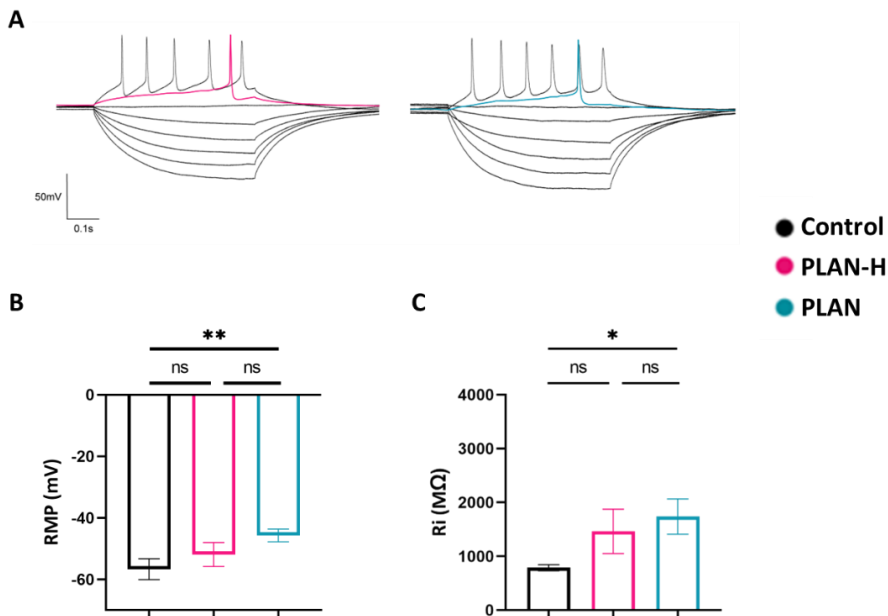


Figura C25 Análisis de las propiedades electrofisiológicas de las células de Purkinje de cerebelo derivadas de las líneas hiPSCs PLAN, PLAN-H y Control. **A**) Respuestas representativas en voltaje de células control (negro), PLAN-H (rosa) y PLAN (azul) a un paso de inyección de corriente de 100 ms y 10 pA que generan pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes **B**) Histograma donde se muestran los valores medios potencial de membrana de reposo y **C**) Histogramas donde se muestran los valores medios de la resistencia de membrana. Los niveles de significancia (** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$; ns= no significativo) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

3.5 Las mutaciones en el gen *PLA2G6* causan una deficiencia de la función mitocondrial en las células precursoras de cerebelo de pacientes PLAN

La actividad fosfolipasa de *PLA2G6* está asociada con la reparación y remodelación de membranas, incluida membrana mitocondrial y por lo tanto interviene en la correcta función mitocondrial, involucrada en los procesos esenciales de la función neuronal. La actividad de OXPHOS es esencial para la bioenergética celular y es necesaria para la capacidad mitocondrial de generar ATP.

Por lo tanto, para evaluar las consecuencias funcionales de las mutaciones de *PLA2G6* en la bioenergética celular, se llevó a cabo el ensayo *Sehorse XF Cell MitoStress* utilizando la tecnología *Seahorse Bioscience XFe 96 Extracellular Flux Analyzer*. Se midió simultáneamente la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) del sobrenadante celular, lo que permitió una cuantificación directa de la respiración mitocondrial y la glucólisis en condiciones basales y después de la inyección de distintos compuestos en el cultivo de CCPs a día 30 de protocolo sin co-cultivo. Los múltiples parámetros obtenidos proporcionaron una idea del mecanismo de la disfunción mitocondrial en células vivas.

En la [Figura C26](#) se muestra un esquema del análisis bioenergético mitocondrial, que se evaluó midiendo la tasa de consumo de oxígeno (OCR, *Oxygen Consumption Rate*) tanto en condiciones basales, como tras la administración de diferentes compuestos moduladores del metabolismo (oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A. Las mediciones se realizaron en condiciones basales seguidas de la adición secuencial de oligomicina (1,5 μM), FCCP (1 μM), rotenona y antimicina (0,5 μM).

En la **Figura C27** se recoge la información de los parámetros obtenidos en el estudio de la respiración mitocondrial. En primer lugar, se observa que la respiración basal (*basal respiration*) en las CCPs de pacientes PLAN y portador PLAN-H es menor que en las CCPs Control, mostrando así una menor demanda energética de las células en condiciones basales. De la misma manera, y después de la inyección del inhibidor del complejo V mitocondrial u oligomicina, se observa un menor consumo de oxígeno ligado a la respiración por producción de ATP (*ATP-linked respiration*) durante la respiración basal en las CCPs de PLAN-H y de pacientes PLAN respecto al Control. La inhibición del complejo V mitocondrial muestra también que la respiración restante no relacionada con la síntesis de ATP o fuga de protones (*proton leak*), se encuentra reducida significativamente en las CCPs de portador PLAN-H y pacientes PLAN con respecto a las CCPs control.

Para calcular los valores asociados a la respiración máxima tras la adición de oligomicina, así como la capacidad de reserva de la célula o neurona ante un aumento de demanda de ATP, se inyectó el desacoplante cianuro de carbonilo 4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). En la **Figura C27** se muestra una disminución significativa tanto de la máxima capacidad respiratoria (*maximal respiration*) como la capacidad de reserva respiratoria (*reserve capacity/spare respiratory capacity*) de las CCPs del portador PLAN-H y pacientes PLAN, indicando la una posible disfunción mitocondrial ante la necesidad de trabajo al máximo por parte de la mitocondria, además de la baja capacidad de respuesta de estas células para generar ATP en el caso de que aumentase la demanda.

Finalmente, al final del experimento se inyectó rotenona, que actúa como un inhibidor del complejo I mitocondrial, junto con antimicina A, que actúa como inhibidor del complejo III. La adición de estas sustancias buscó detener la transferencia de electrones mitocondriales, con el objetivo de obtener los valores

del consumo de oxígeno no asociado a los procesos mitocondriales. En la [Figura C27](#) se observa que los valores de OCR de las CCPs de pacientes PLAN y portador PLAN-H asociados a estos procesos sufren una disminución significativa hasta valores de 40 pmol/min/céls respecto a las CCPs control.

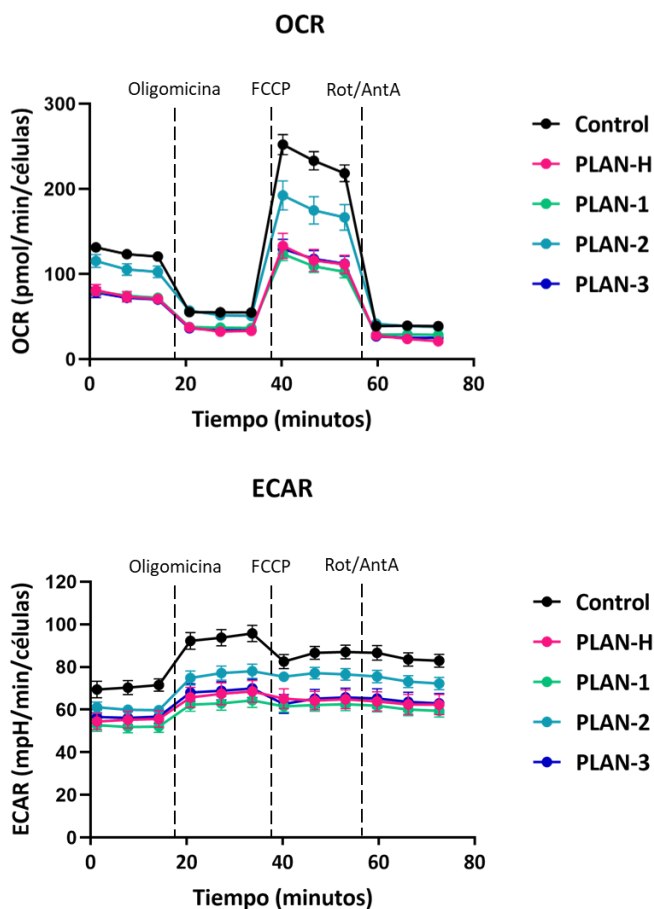


Figura C26 Perfil de mediciones de consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) asociado a la función mitocondrial y bioenergética celular por Seahorse XF96. Mediciones de OCR de las CCPs a día 30 de distintas líneas PLAN y Control en distintas condiciones y a la densidad de siembra óptima (60.000 células / pocillo) en una microplaca Seahorse XF96 de 96 pocillos con recubrimiento (poli-D-lisina/laminina). Cada punto de datos se presenta como media \pm SEM. Serie de inyecciones: (A) oligomicina (1,5 μ M); (B) FCCP (1 μ M); (C) rotenona/antimicina A (0,5 μ M).

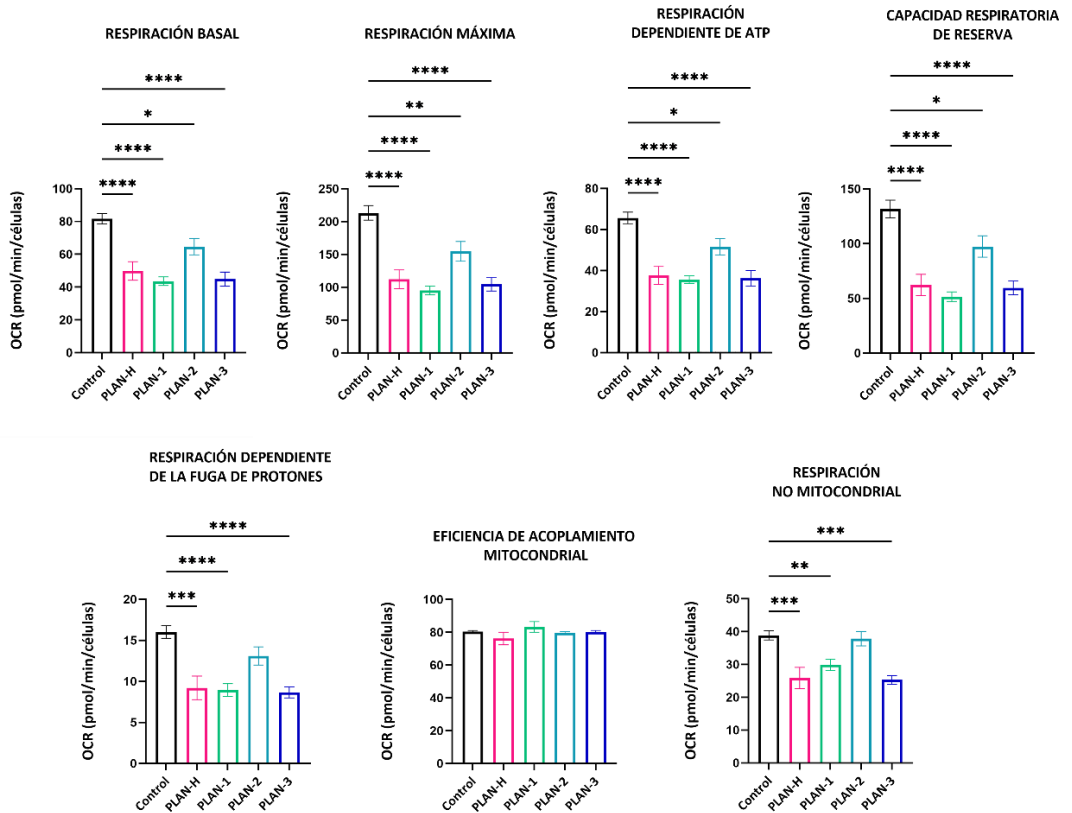


Figura C27 Parámetros de la función respiratoria en células precursoras de cerebelo derivadas de muestras PLAN usando el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe96. Se analizó la respiración basal, producción de ATP, respiración máxima, respiración ligada a ATP, eficiencia de acoplamiento, fuga de protones y la capacidad de reserva en CCPs control y pacientes y portador PLAN. El ensayo se realizó en condiciones basales y después de la adición de oligomicina (1,5 μ M), cianuro de carbonilo 4-trifluorometoxifenilhidrazona (1 FCCP) (μ M) y rotenona / antimicina A (0,5 μ M). La comparación entre los resultados de las CCPs control y los de pacientes PLAN y portador mostraron una función mitocondrial deteriorada. Los datos en cada gráfica representan la media \pm SEM, determinada por tres experimentos de diferenciación independientes y al menos 4 réplicas técnicas de cada uno de ellos. Los niveles de significancia (**** $P \leq 0,0001$; *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *one-way* ANOVA y el *post-hoc* Dunnet test.

La acidificación extracelular se debe al transporte de lactato al medio celular, lo que conlleva la salida de protones de las células cuando solo se les suministra glucosa 25 mM como sustrato energético. En este experimento, adicionalmente, se les ha suministrado a las células glutamina 200 mM y piruvato 100 mM. Por lo que, se evaluó de la misma manera la acidificación extracelular o ECAR (*Extracellular Acidification Rate*) como índice de la actividad glucolítica para poder obtener una imagen aproximada del metabolismo celular de las CCPs generadas en el modelo CPC PLAN.

Los datos mostrados en la **Figura C28** sugieren una menor actividad glucolítica en las CCPs PLAN y PLAN-H, debido a que los niveles de ECAR basales son más bajos en estas en comparación con las CCPs control.

A continuación, al inyectar oligomicina el aumento de la acidificación en el medio extracelular hace que la síntesis de ATP dependa fundamentalmente de la glucólisis. Como se aprecia en la **Figura C28**, el aumento de la acidificación es menor en los pacientes PLAN y portador PLAN-H que en las CCPs control tras la administración de oligomicina, pudiendo indicar una menor capacidad glucolítica de estas células.

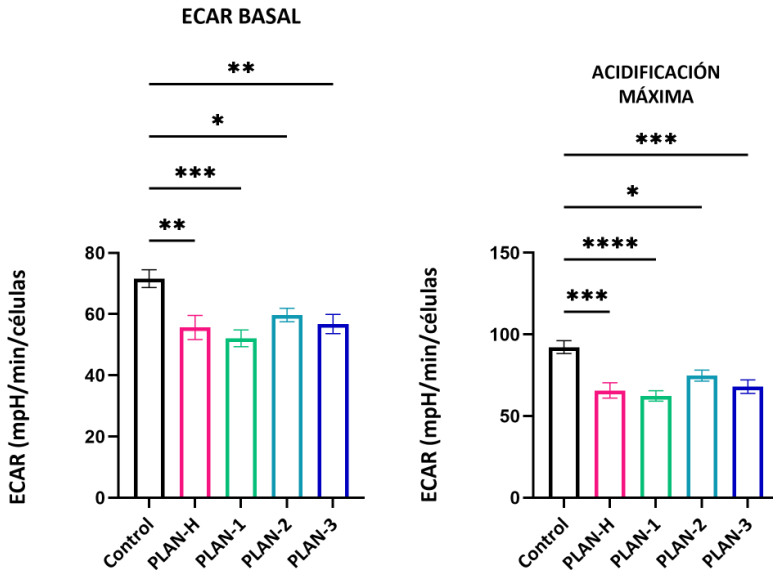


Figura C28 Análisis de la glucólisis basal y la capacidad glucolítica calculadas a partir del perfil de ECAR por Seahorse XF96. El ensayo se realizó en condiciones basales y después de la adición de oligomicina (1,5 μ M). La comparación entre los resultados de las CCPs control y los de pacientes PLAN y portador, excepto PLAN-3, mostraron una menor capacidad glucolítica. La comparación entre los resultados de las CCPs control y los de pacientes PLAN y portador mostraron una función mitocondrial deteriorada. Los datos en cada gráfica representan la media \pm SEM, determinada por tres experimentos de diferenciación independientes y al menos cuatro réplicas técnicas de cada uno de ellos. Los niveles de significancia (* $P < 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *one-way* ANOVA y el *post-hoc* Dunnet test.

3.6 Anomalías del potencial de la membrana mitocondrial y generación de ROS mitocondrial en las células precursoras de neuronas de cerebelo de pacientes PLAN

La posible afectación de la función mitocondrial se investigó además en CCPs a día 30 del protocolo de diferenciación en condiciones basales mediante la detección de ROS y el análisis potencial de membrana mitocondrial.

El principal tipo de ROS mitocondrial es el anión superóxido O_2^- producido sobre todo por los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. Este residuo se detectó fluorométricamente con la sonda MitoSOX[®] Red (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregón, EE. UU.), ya que no se oxida por otras especies reactivas como el H_2O_2 (183). La cuantificación de fluorescencia se realizó mediante imagen de células CCPs a día 30 en condiciones basales en un INCELL Analyzer controlando la temperatura y el CO_2 .

En la **Figura C29** se muestra como las CCPs de pacientes PLAN y portador PLAN-H resultaron tener un pequeño aumento no significativo en la generación de ROS mitocondrial en las células de pacientes cuando se comparan con las células control.

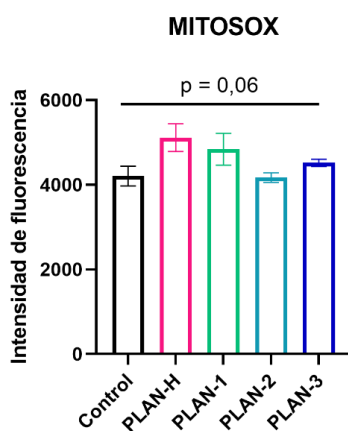


Figura C29 Detección de fluorescencia de ROS mitocondrial en células precursoras de cerebelo.

El estudio se realizó comparando las líneas de portador y pacientes PLAN con la línea control en condición basales usando la sonda MitoSOX Red (Molecular Probes, Invitrogen, OR, EE. UU.). Los resultados mostraron un ligero significativo en los niveles de ROS mitocondrial en las células de pacientes PLAN y portador. Los datos de la gráfica representan la media de fluorescencia \pm SEM en cada línea, determinada por tres experimentos de diferenciación independientes en al menos 300 células por línea. Los niveles de significancia se obtuvieron mediante el análisis estadístico *unpaired two-tailed t-test*.

En paralelo, y para analizar el potencial de membrana mitocondrial se analizó utilizando el reactivo Image-iT™ TMRM (*Tetramethylrhodamine*, #T668. Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) (183).

La **Figura C30** muestra una reducción no significativa de la señal de TMRM en las células de pacientes PLAN-1, y una disminución significativa en células de pacientes PLAN-2 y PLAN-3 indicando la disipación del potencial de membrana mitocondrial y por lo tanto, una posible disfunción mitocondrial.

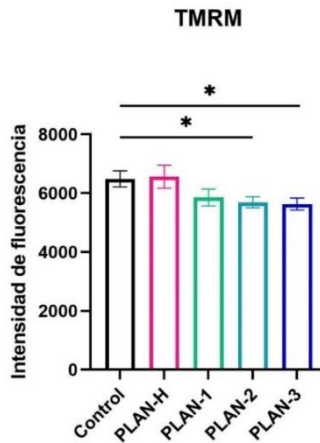


Figura C30 Detección de fluorescencia de TMRM asociada al potencial de membrana mitocondrial en células precursoras de cerebelo derivadas de hiPSCs PLAN. El estudio se realizó comparando las líneas de portador y pacientes PLAN con la línea control en condiciones basales. Los resultados mostraron una ligera disminución no significativa en los niveles de fluorescencia de TMRM en las células de pacientes PLAN con respecto al Control. Los datos de la gráfica representan la media de fluorescencia \pm SEM en cada línea, determinada por tres experimentos de diferenciación independientes en al menos 300 células por línea. Los niveles de significancia ($*P < 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico *unpaired, two-tailed t-test*.

3.7 Los niveles de peroxidación lipídica citosólica están aumentados en las células precursoras de neuronas de cerebelo de pacientes PLAN

Estudios previos sobre el papel de *PLA2G6* en la homeostasis redox y en la peroxidación lipídica han mostrado que mutaciones en este gen están asociadas con altos niveles de productos derivados de la peroxidación lipídica, mediante la disminución de la hidrólisis de PUFA-PL oxidados y aumentando el estrés oxidativo de la célula. Los lípidos son objeto diana de los ROS, cuya principal fuente de producción son las mitocondrias. Los PUFA de las membranas mitocondriales son los objetivos principales del ataque de ROS, por lo que pueden conducir a la peroxidación de estos y la generación de lípidos reactivos (264). Cuando los lípidos mitocondriales se oxidan, la integridad y la función de las mitocondrias pueden verse comprometidas y esto eventualmente puede conducir a una disfunción mitocondrial. En otros modelos de PLAN, en fibroblastos de pacientes y moscas KO, Kinghorn *et al.* (272) describieron que la falta de actividad fosfolipasa asociada a mutaciones en *PLA2G6* aumentaba significativamente los niveles de peroxidación lipídica. Los productos derivados de la descomposición de peróxidos originan especies inestables de ácidos grasos polinsaturados como el 4-HNE o malondialdehído (MDA), entre otros. Para detectar si los niveles de peroxidación lipídica en condiciones basales están aumentados en las CCPs derivados de hiPSCs de pacientes PLAN se realizó el ensayo de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (#10009055. Cayman chemicals, Ann Arbor, Michigan, EE. UU.).

El TBARS se une a las especies reactivas producidas por la peroxidación lipídica como el MDA, aunque no en exclusiva, generando un producto que en condiciones ácidas y de alta temperatura se mide a 530-540 nm. Aunque existe controversia acerca de la especificidad de MDA por el ensayo TBARS, sigue siendo el método más empleado para determinarlo. Los resultados presentados en la [Figura C31](#) indican un aumento significativo de los niveles de peroxidación lipídica en las CCPs

en PLAN-H y PLAN-1, mientras que en PLAN-2 y PLAN-3 se aprecia un ligero aumento no significativo comparado las CCPs control.

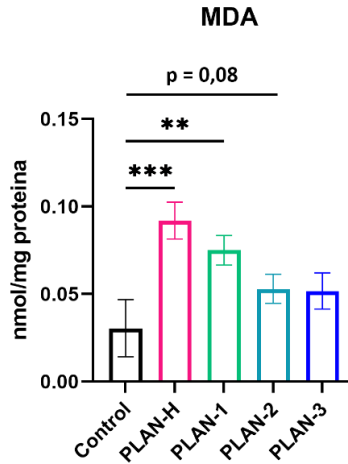


Figura C31 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en células precursoras de cerebello. El estudio se realizó comparando las líneas de portador y pacientes PLAN con la línea control en condición basales. Los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de MDA/TBARS en las células del portador PLAN-H y PLAN-1 y un ligero aumento no significativo en los pacientes PLAN-2 y PLAN-3, comparado al control. Los datos de la gráfica representan la media TBARS \pm SEM en cada línea, determinada por tres experimentos de diferenciación independientes en al menos tres réplicas técnicas por línea. Los niveles de significancia (** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *one-way* ANOVA y el *post-hoc* Dunnett test.

3.8 La expresión de genes relacionados con la homeostasis del hierro y la ferritinofagia está disminuida en las células precursoras de neuronas de cerebelo de pacientes PLAN

El hierro es un cofactor esencial para muchas proteínas involucradas en distintos procesos biológicos, como la síntesis de ADN, transporte de oxígeno celular o transporte de electrones para el correcto funcionamiento mitocondrial. En el SNC y en el desarrollo de este, el hierro es también esencial para procesos neuronales fundamentales como la mielinización, obtención de energía, metabolismo y desarrollo de los neurotransmisores. En pacientes PLAN, en un estado avanzado de la enfermedad, se observan depósitos de hierro en la sustancia negra y el *globus pallidus*, pudiendo ser causa o consecuencia de la falta de actividad de *PLA2G6*. En base a esta acumulación de hierro en los pacientes, se investigó si las principales vías de homeostasis del hierro, absorción, almacenaje y degradación en una etapa temprana de la enfermedad estaban alteradas mediante el análisis de la expresión de genes asociados al metabolismo del hierro en CCPs a día 30 por RT-PCR. En entornos acuosos, el hierro puede encontrarse en dos estados de oxidación estables: Fe^{2+} (ferroso) y Fe^{3+} (férrico); por ello, los estudios se han realizado en CCPs derivados de hiPSCs en condiciones basales y de exceso de citrato de amonio férrico (FAC, *Ferric Amonium Citrate*) en el medio celular durante el cultivo de las CCPs a día 30 y durante 72 horas.

El incremento en los niveles de hierro celular es debido a la sobreexpresión del transportador de absorción de hierro y metales divalentes asociada a la expresión del gen *DMT1* y del receptor de transferrina 1 en la membrana celular asociado a la expresión del gen *TFR1*. En condiciones de exceso de hierro, *TFR1* y *DMT1* reducen su expresión para disminuir la expresión de los receptores y frenar la entrada de hierro en la célula, mientras la proteína exportadora de hierro o ferroportina se sobreexpresa para eliminar el hierro al espacio extracelular. La expresión de *TFR1* tanto en las CCPs de pacientes PLAN y portador PLAN-H como en el control es

menor en condiciones de exceso de FAC, indicando una regulación normal en condiciones de exceso de FAC en el medio en comparación con la expresión en condiciones basales (**Figura C32**).

Una vez el hierro se encuentra dentro de la célula, este puede ser importado a la mitocondria, expulsado o almacenado en estructuras formadas por la proteína ferritina, manteniendo de manera segura los niveles de hierro intracelulares. La ferritina es la principal proteína de almacenamiento de hierro, y está formada por unidades de cadenas pesadas (*FTH1, Ferritin Heavy Chain 1*) y ligeras (*FTL, Ferritin Light Chain*). La isoforma *FTH* tiene actividad ferroxidasa, y es la más abundante en neuronas facilitando la movilización rápida del hierro, mientras que la *FTL* es más abundante en astrocitos y microglía, siendo importantes para el almacenamiento del hierro. Los niveles de expresión génica de *FTH* y *FTL*, en condiciones de exceso de FAC frente a condiciones basales, solo aumentan significativamente en las CCPs control; en cambio, en el resto de las CCPs de pacientes PLAN y portador no aumentan, pudiendo indicar un fallo en el almacenaje del hierro intracelular. Además, los niveles de *FTH* en condiciones basales indican una tendencia al alza en las CCPs de pacientes PLAN respecto al Control (**Figura C32**).

Cuando la concentración de hierro intracelular disminuye y/o se requiere para procesos metabólicos o bien cuando se elimina, *FTH* se une al receptor coactivador 4 (*NCOA4, Nuclear Receptor Coactivator 4*) que lo transporta al autofagosoma donde se fusiona con el lisosoma. Allí, la carga autofágica, incluida la ferritina, es degradada por las hidrolasas lisosomales y el hierro se libera al citoplasma haciéndolo biodisponible. La deficiencia de *NCOA4* está relacionada con la acumulación de transferrina y ferritina como consecuencia de un fallo en la ruta autofágica. En CCPs derivadas de pacientes PLAN y portador (**Figura C32**), los niveles de *NCOA4* no aumentan en condiciones de exceso de FAC respecto a los niveles basales, mientras que en el control la expresión de *NCOA4* sí aumenta

significativamente. Estos datos sugieren la presencia de una posible disfunción en el sistema de reciclaje de la ferritina o ferritinofagia en los pacientes PLAN y portador de FAC en etapas tempranas de la enfermedad.

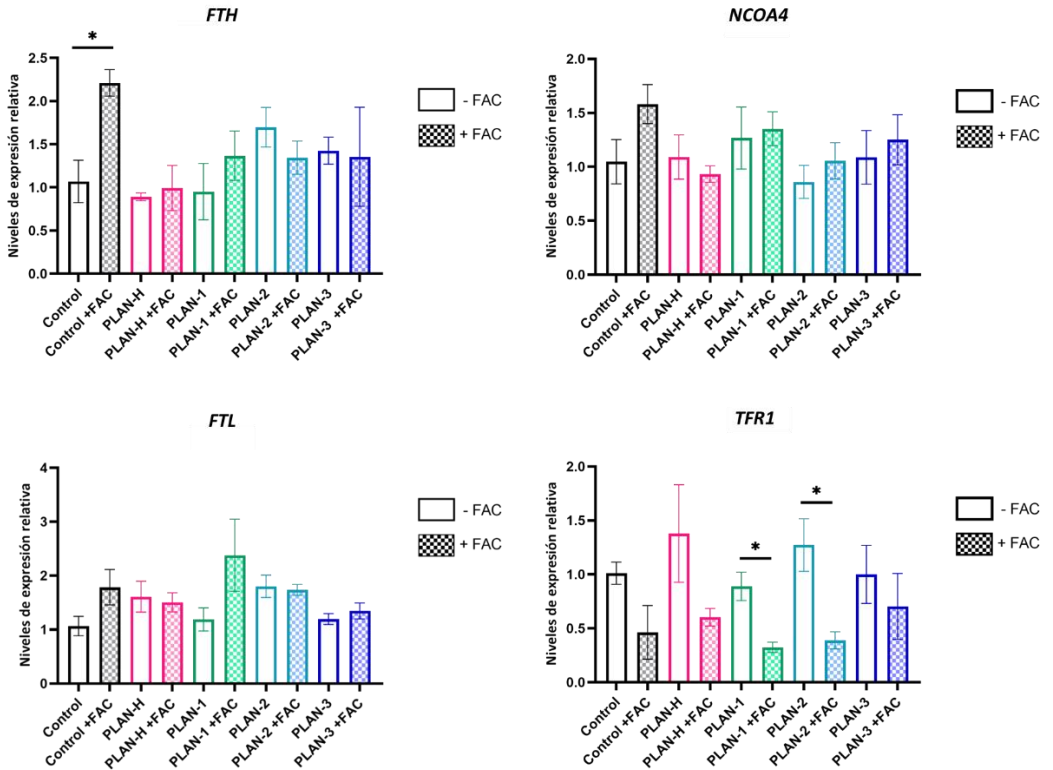


Figura C32 Niveles de expresión génica de genes asociados con el metabolismo del hierro en células precursoras de cerebelo. El estudio se realizó a día 30 de la diferenciación de las líneas hiPSCs control, PLAN-H, PLAN-1, PLAN-2 y PLAN-3 en condiciones de alta cantidad de FAC en el cultivo en comparación con niveles basales (*fold change* = 1) por RT-PCR. Los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de *FTH*, *FTL* y *NCOA4* en las células control respecto a sí mismas en tratamiento con FAC, mientras que en el resto de las muestras no se observa ese aumento. Se observa una disminución de expresión de *TFR1* en todas las líneas respecto a sí mismas en tratamiento con FAC. Los datos de la gráfica representan la media de expresión de cada gen \pm SEM en cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Datos determinados por tres experimentos de diferenciación independientes y al menos tres réplicas técnicas por línea. Los niveles de significancia (* $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

3.9 La expresión de proteínas relacionadas con el sistema de reciclaje mediado por autofagia muestra disfunción en las células precursoras de neuronas de cerebelo de pacientes PLAN

Durante la evolución del proceso patológico asociado a PLAN se forman estructuras TVS que contienen, dependiendo del caso, ubiquitina, cuerpos de Lewy, α -Syn o restos de membranas mitocondriales, que sugieren fallos en el sistema de reciclaje de estructuras celulares(250–252). Para evaluar si mutaciones en *PLA2G6* están asociadas con el proceso de degradación mediado por autofagia en el modelo CPC aquí descrito, se ha analizado la expresión de proteínas involucradas en la vía autofágica mediante WB. Para discernir el papel de *PLA2G6* en la autofagia, las CCPs control, portador PLAN-H y pacientes PLAN se cultivaron en condiciones basales y con bafilomicina A1 (BafA1), un inhibidor de la bomba ATPasa lisosomal que inhibe la fusión del autofagosoma al lisosoma provocando la acumulación de los marcadores autofágicos que se hubieran degradado en el periodo de tiempo de actuación del inhibidor (167).

Los análisis se realizaron con y sin tratamiento con BafA1. A día 30 se obtuvieron los extractos solubles de las CCPs y se analizaron los niveles de P62/SQSTM1 y LC3II. Al bloquear la degradación lisosomal con el inhibidor de la v-ATPasa BafA1 durante 4 h, se observó un incremento de los marcadores autofágicos de p62 y LC3II solo en el control y en el portador (**Figura C33**). Esta medida permitió confirmar la existencia de un flujo autofágico eficaz en CCPs control y portador PLAN-H. Además, el no aumento de los marcadores con BafA1 respecto a la condición basal se podría atribuir a una mayor inducción de autofagia o a un bloqueo de la degradación por el lisosoma.

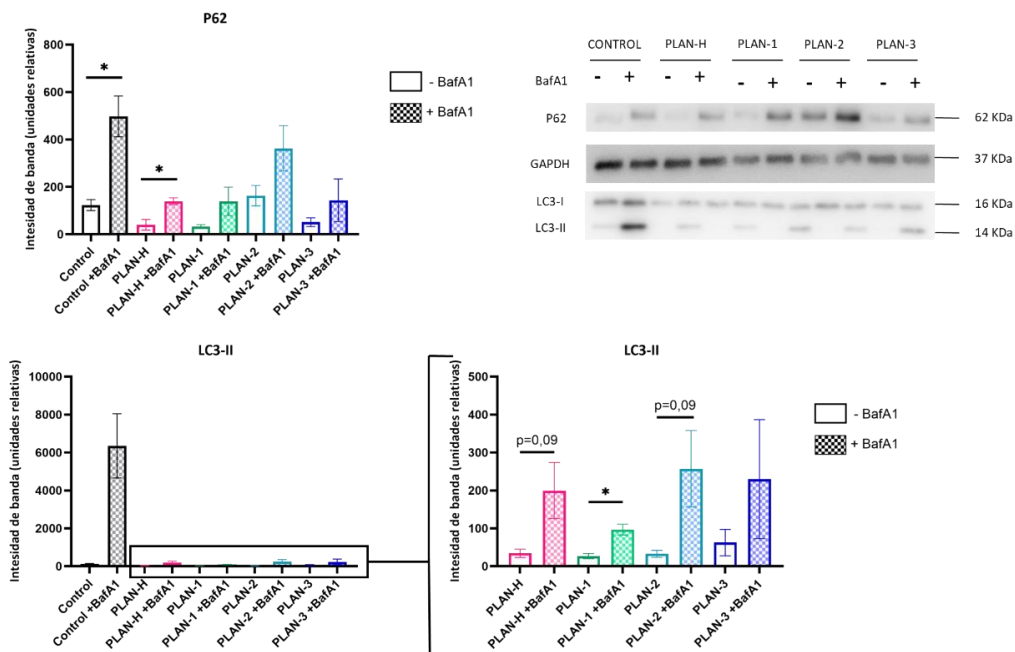


Figura C33 Análisis de los niveles de expresión proteica de proteínas asociados con la autofagia en células precursoras de cerebelo. El estudio se realizó a día 30 de la diferenciación de las líneas hiPSCs Control, PLAN-H, PLAN-1, PLAN-2 y PLAN-3 en presencia de bafilomicina A1 (BafA1) en comparación con niveles basales por western blot (WB). Los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de LC3II y p62 en las células control y PLAN-H con respecto a sí mismas en tratamiento con BafA1, mientras que, en el resto de las muestras, aunque se observa un ligero aumento, este no es significativo. Los datos de la gráfica representan la media de expresión de cada gen \pm SEM en cada línea, determinada por tres experimentos de diferenciación independientes. Los niveles de significancia ($*P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

3.10 La expresión de genes relacionados con la ferroptosis está alterada en las células precursoras de neuronas de cerebelo de pacientes PLAN

La ferroptosis es un tipo de muerte celular programada por los niveles desregulados de hierro, tioles y lípidos en la célula, contribuyendo a la formación y acumulación de lípidos peroxidados reactivos. iPLA2 β es una fosfolipasa independiente de calcio que es capaz de metabolizar los lípidos peroxidados pudiendo contribuir a eliminar o disminuir la señal de muerte celular. Para estudiar el proceso de ferroptosis durante el desarrollo de la enfermedad PLAN, se analizó la expresión de genes asociados por RT-PCR en las CCPs en condiciones basales.

A día 30 del protocolo se obtuvo el RNA de las CCPs y se analizaron los niveles de expresión de los genes *ACSL4*, *LPCAT* y *PEBP1*. *ACSL4* se encarga de esterificar los ácidos grasos de cadena larga como el ácido araquidónico-CoA (AA-CoA) y el ácido adrenico-CoA (AdA-CoA) y los convierte en ácidos grasos de cadena larga acilados que, posteriormente la lisofosfatidilcolina aciltransferasa 3 (*LPCAT3*) cataliza y promueve su incorporación a las membranas celulares. Estos ácidos grasos de cadena larga acilados son objeto de genes como *PEPB1*, que junto con *LOX-15* promueven la ferroptosis mediante la formación de lípidos peroxidados.

Los resultados de expresión de los genes *ACSL4* y *LPCAT3* en las CCPs de pacientes PLAN y portador indican una disminución de expresión respecto al control, mientras que *PEBP1* se encuentra aumentado en pacientes PLAN con respecto al control, aunque de forma no significativa (**Figura C34**).

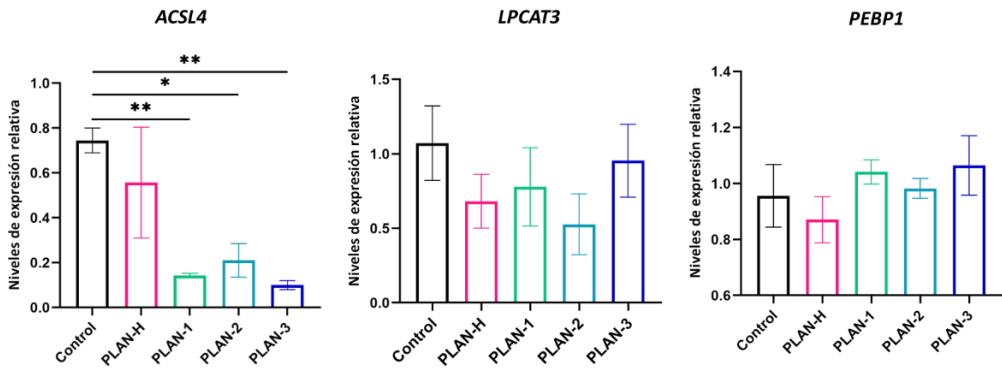


Figura C34 Expresión de genes asociados al metabolismo lipídico y ferroptosis en células precursoras de cerebelo. El estudio se realizó a día 30 de la diferenciación de las líneas hiPSCs Control, PLAN-H, PLAN-1, PLAN-2 y PLAN-3 en condiciones basales (*fold change* = 1) por RT-PCR. Los datos de la gráfica representan la media de expresión de cada gen \pm SEM en cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Datos determinados por tres experimentos de diferenciación independientes y al menos tres réplicas técnicas por línea. Los niveles de significancia (** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

Los resultados mostrados en la **Figura C35** muestran un aumento de la expresión de *GPX4* en las CCPs de pacientes PLAN en comparación con las células control, pero no en las CCPs de PLAN-H. También se analizó la expresión del gen *SCL7A11*, transportador de cisteína/glutamato que se encarga de suministrar cisteína para la reacción GSH-GSSG metabolizada por GPX4. Los resultados de expresión de este transportador en CCPs de pacientes PLAN muestran una reducción con respecto a las células control, siendo significativa en PLAN-1 y PLAN-3 (**Figura C35**). En conclusión, los resultados de expresión génica de *SLC7A11* y *GPX4* en pacientes PLAN respecto al control indican una desregulación en el mecanismo de detoxificación/tratamiento de lípidos peroxidados por parte del sistema de la GPX4.

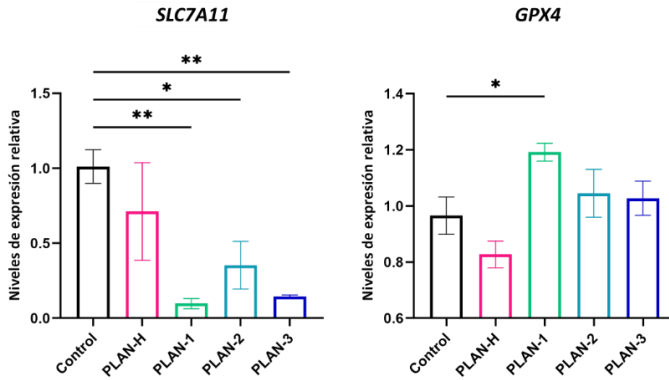


Figura C35 Expresión de genes asociados con el metabolismo del hierro en células precursoras de cerebelo. El estudio se realizó a día 30 de la diferenciación de las líneas hiPSCs Control, PLAN-H, PLAN-1, PLAN-2 y PLAN-3 en condiciones de alta cantidad de FAC en el cultivo en comparación con niveles basales ($fold\ change = 1$) por RT-PCR. Los datos de la gráfica representan la media de expresión de cada gen \pm SEM en cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Datos determinados por tres experimentos de diferenciación independientes y al menos tres réplicas técnicas por línea. Los niveles de significancia (** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

Sin embargo, el sistema GPX4/GSH-GGSG no es el único sistema regulador que evita la ferroptosis. Recientemente, se ha descrito que la proteína efectora de ferroptosis 1 (FSP1) como una nueva coenzima Q10 oxidorreductasa (CoQ10) que protege a las células de la ferroptosis de manera independiente del glutatión (GSH). Para analizar si en las células de pacientes PLAN el sistema anti-ferroptótico por la vía de la FSP1 estaba desregulado, se analizó la expresión del gen que codifica por la proteína FSP1 en condiciones basales. Los resultados muestran una reducción significativa de la expresión de *FSP1* tanto en células de pacientes PLAN (PLAN-1, PLAN-2, PLAN-3) como en células de portador (PLAN-H) con respecto al control, en etapas tempranas de la diferenciación *in vitro* y, por tanto, del desarrollo de la enfermedad (Figura C36).

A continuación, se estudió la expresión de otros genes propuestos como protectores frente a la señal de ferroptosis y estrés oxidativo como son HMOX1 (hemo oxigenasa 1), NQO1 (NAD(P)H deshidrogenasa 1), y FSP1.

HMOX1 es inducida en respuesta al estrés celular que regula la homeostasis y reciclaje del hierro celular, pudiendo contribuir a la acumulación de iones ferrosos. Tanto NQO1 como FSP1 son regulados por la expresión del factor 2 relacionado con *NFR2*. Los hallazgos revelan muestran que los niveles de expresión de *NFR2* solo aumentan en las células de portador PLAN-H y en el paciente PLAN-2, mientras que en los pacientes PLAN-1 y PLAN-3 la expresión es similar a la del control (**Figura C36**).

Los resultados de expresión de *NQO1*, al contrario de lo que ocurre con la expresión de *FSP1*, aumenta en todas las líneas respecto al Control, siendo más acusados en las células de portador PLAN-H y en el paciente PLAN-2. Con respecto a la expresión de *HMOX*, los resultados no muestran variación significativa en ninguna de las líneas PLAN en estudio respecto a las células control.

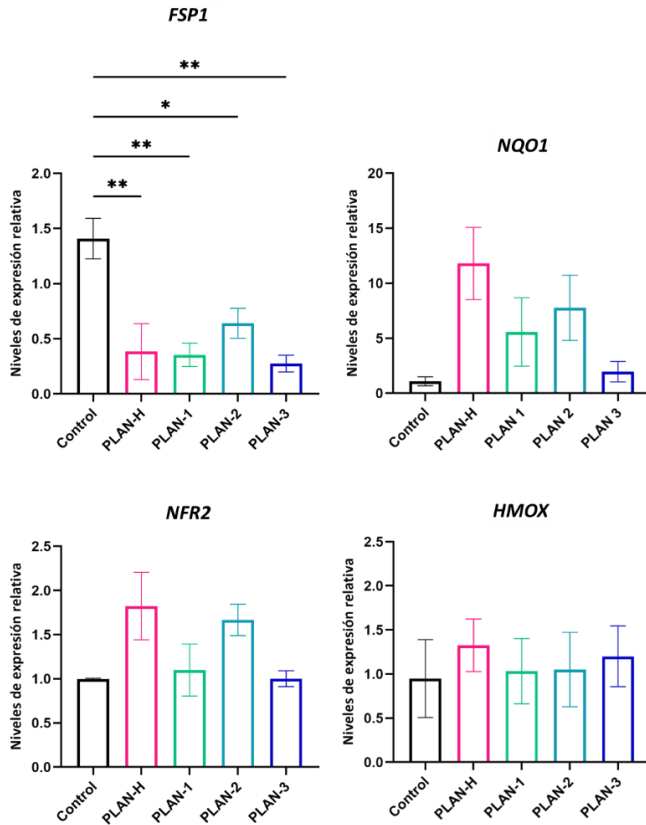


Figure C36 Expresión de genes implicados en respuesta a estrés oxidativo y en células precursoras de cerebelo. El estudio se realizó a día 30 de la diferenciación de las líneas hiPSCs Control, PLAN-H, PLAN-1, PLAN-2 y PLAN-3 en condiciones basales (*fold change*=1) por RT-PCR. Los datos de la gráfica representan la media de expresión de cada gen \pm SEM en cada línea tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Datos determinados por tres experimentos de diferenciación independientes y al menos tres réplicas técnicas por línea. Los niveles de significancia (** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$) se obtuvieron mediante el análisis estadístico por la prueba *unpaired, two-tailed t-test*.

4. Discusión

La neurodegeneración asociada a fosfolipasa A2 (PLAN) es una enfermedad rara neurodegenerativa infantil devastadora que cursa con atrofia de cerebelo severa y para la que actualmente solo se dispone de tratamientos sintomáticos (1-3), si bien dos ensayos clínicos empleando D-PUFAs y desipramina (focalizándose en PARK14) se han realizado sin resultados publicados hasta el momento (295,296). Además de proponer el reemplazo genético, los últimos estudios apoyan la utilización de vitamina E como tratamiento antioxidante en pacientes PLAN (278,297). La degeneración del cerebelo asociada a PLAN sigue siendo poco conocida, en parte debido a la existencia de pocos modelos animales y celulares adecuados. Sin embargo, estos modelos animales sí reproducen en gran parte los síntomas de la enfermedad y han iniciado el estudio de las posibles vías moleculares afectadas, lo que ha permitido diseñar experimentos que demuestran la relación directa de la alteración genética con los síntomas de PLAN (251,252,260,289).

En el capítulo 2 de la presente tesis, se ha diseñado un modelo celular de enfermedad para estudiar la patología PLAN (CPC PLAN), utilizando un protocolo de diferenciación neuronal basado en la generación de **células precursoras de cerebelo (CCPs)** y **células de Purkinje de cerebelo (CPCs)** a partir de hiPSCs de pacientes y portadores sanos PLAN. Obtener información sobre el desarrollo cerebeloso temprano y los posibles mecanismos moleculares patológicos provocados por la deficiencia de *PLA2G6* es clave para el desarrollo de terapias.

Las líneas hiPSCs se han originado mediante la tecnología de reprogramación no integradora basada en la sobre expresión factores de reprogramación importantes en el desarrollo en las células somáticas *in vitro*, que permiten revertir el fenotipo diferenciado hacia un fenotipo embrionario con la potencialidad de originar la mayoría de las células del organismo, y entre ellas, neuronas (18,19). Las líneas

hiPSCs obtenidas tenían características de células pluripotentes, una capacidad proliferativa ilimitada y un potencial para diferenciarse a cualquier tipo además de contener la mutación inicial que las caracterizaba. Este carácter pluripotente de las líneas hiPSCs se demostró por distintas técnicas moleculares, comprobando que estaban presentes marcadores específicos (180).

En colaboración con Sundberg y cols. (87), se desarrolló el modelo CPC PLAN utilizando un protocolo de diferenciación cerebelosa existente, con algunas modificaciones que dan lugar a neuronas que expresan genes específicos de cerebro posterior/rombencéfalo como durante la inducción y regionalización celular *in vivo*.

En etapas tempranas del neurodesarrollo, una regulación ascendente de *GBX2*, factor de transcripción que define la barrera del mesencéfalo o cerebro medio, junto con la bajada de expresión de *OTX2*, sirven para dar lugar a la especificación del límite entre el mesencéfalo/rombencéfalo y para permitir el inicio del desarrollo del cerebelo *in vivo*. Las células hiPSCs sometidas a diferenciación neuronal mostraron una regulación a la baja de los factores de pluripotencia. Posteriormente, se detectó una regulación ascendente temprana de *GBX2* y un descenso de los valores de *OTX2*, mostrando una adquisición casi uniforme de un destino neuronal en el cerebro posterior. El aumento de expresión de distintos tipos de genes en las células en diferenciación como *EN1*, *EN2* y *HOXA2* indicaron que el proceso de diferenciación neuronal mostraba fuertes paralelismos entre el modelo diferenciado *in vitro* y el desarrollo del cerebelo fetal humano. Además, los marcadores *KIRREL2* y *SKOR2* también se expresaron en las células en diferenciación, apoyando la presencia en el cultivo de marcadores tempranos de CPCs al igual que en rombencéfalo fetal. También se observó la expresión de marcadores GABAérgicos como *GABRA2* y *GAD1/GAD67* en el cultivo, cruciales

para la neurotransmisión de del ácido γ -aminobutírico (GABA) en el SNC y las CPCs. Estos resultados sugieren la presencia de neuronas GABAérgicas como las CPCs con origen en el rombencéfalo. Además, los cultivos de CCPs de todas las líneas hiPSCs expresaron una variedad de marcadores neuronales inespecíficos como Tuj1 o específicos de CPCs como LHX1, SKOR2 y PCP2.

Las CPCs generadas parecían haber alcanzado cierta madurez 130 días después del inicio del protocolo de diferenciación neuronal y tras el co-cultivo con neuronas granulares de cerebelo de ratón, pues expresaban el marcador de CPCs adultas calbindina y el marcador presináptico VGAT. Mediante este protocolo, las CPCs manifestaron cambios morfológicos a lo largo del tiempo pasando por una morfología primaria bipolar y ramificaciones cortas, conforme describió Ramón y Cajal a la que denominó “fase de corpúsculo fusiforme” (186) para posteriormente aumentar la ramificación y extensión de las dendritas, lo que indicó un aumento en la maduración neuronal del cultivo (72). El soma celular desarrolló también una forma ovalada típica de las CPCs.

Todas las CPCs derivadas de las líneas hiPSCs además de expresar el marcador de VGAT, manifestaron potenciales de acción tras la inyección de una corriente despolarizante directa en el soma neuronal. Estos potenciales de acción de carácter repetitivo en las CPCs generadas, confirmó el fenotipo neuronal y funcional del modelo.

Las propiedades electrofisiológicas, y por tanto la funcionalidad neuronal, están asociadas además con el crecimiento de neuritas y/o un mayor número de canales iónicos situados en la membrana plasmática durante el proceso de maduración neuronal (187). El patrón de arborización o de complejidad dendrítica, el tamaño del soma y el patrón de disparo de las CPCs obtenidas reveló un estado

relativamente inmaduro después de 4 meses y medio de diferenciación, pues se parecían a CPCs humanas de fetos de aproximadamente 18 semanas (72,188). La falta de maduración igualmente podría deberse a la falta de entradas sinápticas de células granulares, que en humanos es 20 veces mayor en humanos que en ratones. Además, otra posible razón del estado inmaduro de las CPCs obtenidas en este modelo podría ser por el hecho de que se las células se cultivan *in vitro* durante 4 meses, mientras que en el organismo humano vivo las CPCs maduran durante un período de aproximadamente de 2 a 3 años (189,190).

En este trabajo también se proporciona la evidencia de que las CPCs PLAN sufren alteraciones en la morfología neuronal y en el desarrollo sináptico a punto final del ensayo, probablemente consecuencia de las alteraciones moleculares y metabólicas que se discuten a continuación. La mayoría de las CPCs PLAN estaban afectadas en su capacidad para disparar potenciales de acción de manera repetitiva en respuesta a la inyección de corriente despolarizante, y una resistencia de membrana y potencial de membrana en reposos menos negativos que el observado en las CPCs controles. Estos defectos pueden derivar de la incapacidad de las CCPs para madurar en neuronas funcionales o de una disipación de energía dependiente de gradientes iónicos transmembrana, que en condiciones normales aseguran el flujo apropiado de corrientes iónicas a través de los canales de la membrana (94,95). Este mismo fenotipo se observa en otros modelos neuronales de NBIA basados en hiPSCs de pacientes. En PKAN las neuronas tampoco son capaces de presentar potenciales de acción repetitivos, situación que se revierte al tratar a estas células con coenzima A (CoA) (298). Sin embargo, en otras formas NBIA como NF, presentan una correcta funcionalidad eléctrica sugiriendo al menos, que las neuronas derivadas de pacientes con NF no muestran abiertamente un patrón electrofisiológico aberrante (294).

La acumulación de hierro en el cerebro como rasgo característico de las NBIA no está presente en todos los pacientes, como ocurre con muchos casos PLAN. Esta acumulación anormal de hierro lleva a plantear la hipótesis de que podría ser la consecuencia de un defecto metabólico subyacente secundario en ocasiones, dado que solo dos de los genes causantes se han asociado directamente con mutaciones en las proteínas conocidas del metabolismo del hierro, incluidas CP (ceruloplasmina) y FTL (212).

La respuesta homeostática de la proteína reguladora de entrada de hierro en las células, TfR1, parece en gran medida normal en todas las CCPs en las condiciones diseñadas en el presente estudio, tanto de pacientes como de portador PLAN. Sin embargo, la expresión alterada de FTH y FTL en las CCPs de PLAN y portador sano, sugiere que puede existir una disregulación en la capacidad de almacenaje del hierro en la célula. El hierro se almacena en la ferritina durante los períodos de exceso de hierro y se libera durante los períodos de demanda de hierro. La liberación de hierro de la ferritina está regulada a través de un tipo de autofagia selectiva denominada ferritinofagia, que a su vez mediada por NCOA4. Cuando NCOA4 se une a la ferritina, esta se transporta al lisosoma donde se degrada y el hierro pasa al lisosoma, que se podrá liberar para que lo use la célula o bien podrá ser expulsado (299). La tendencia de una menor expresión de NCOA4 en condiciones de exposición a hierro observada en los cultivos de CCPs PLAN y portador sano refuerza la teoría de que en la patología PLAN tanto la capacidad de almacenaje como la eliminación y/o liberación del hierro es deficiente. Estos resultados son compatibles con los estudios publicados de otras formas NBIA como PKAN, en los que, tras suplementación con hierro, los niveles de expresión de las ferritinas aumentaron y los de TfR1 disminuyeron, pero en menor medida en los pacientes en comparación con los controles (300). Sin embargo, se han detectado grandes cantidades a nivel proteico de TfR1 en muchas de las formas NBIA incluso

después de exposición a altas cantidades de hierro. En líneas celulares NBIA (fibroblastos con mutaciones en *PANK2*, *CRAT*, *C19orf12* y *PLA2G6*), se demostró que la falta de palmitoilación de TfR1 conduce a la desregulación de la endocitosis mediada por TfR1 y, por lo tanto, aumentaría su presencia en la célula y la ingesta de hierro celular (286).

Además, en este trabajo se analizaron los niveles de proteínas autofágicas con el fin de analizar la posible implicación de *PLA2G6* en reciclaje celular general. Mientras que las CCPs de la línea control y portador sano PLAN-H presentaban un comportamiento normal de activación y respuesta de la vía autofágica y reciclaje por la vía lisosomal, en las CCPs derivadas de pacientes PLAN también se apreciaba ese efecto, pero con menor diferencia y no de forma significativa. Otros datos recientes en modelos de enfermedad de otras formas NBIA igualmente han mostrado niveles elevados de hierro, alteraciones su homeostasis y además disfunción lisosomal (301,302). Acompañando a ese defecto en el flujo autofágico, la acumulación de agregados positivos para ubiquitina tanto en las neuronas como en los axones acompañan a la patología de MPAN (*mitochondrial membrane protein-associated neurodegeneration*, debida a mutaciones en *C19ORF12*) (302). En el caso de *ATP13A2*, se ha descrito que su disfunción puede afectar el flujo endo-lisosomal y de autofagia, resultando en la acumulación de proteínas insolubles y mitocondrias dañadas, lo que lleva a la apoptosis y la neuroinflamación (303). La acumulación de TVS en las neuronas previa degeneración de membrana, rotura axonal y desencadenamiento de neuroinflamación se ha descrito en modelos *PLA2G6* (256). Los datos expuestos en el presente trabajo sugieren que *PLA2G6* puede no ser esencial para la formación de autofagosomas, pero sí para la fusión del autofagosoma con el lisosoma, y por lo tanto para el reciclaje y eliminación de orgánulos dañados además del hierro en la célula. Además, en conjunto con los datos recogidos en la bibliografía podría indicar que tanto *PLA2G6*

como las otras formas NBIA presentan un reciclaje anormal por la vía endolisosomal como mecanismo de enfermedad y que contribuiría fuertemente a la fisiopatología (274,304,305).

La mitocondria está también relacionada con la homeostasis del hierro en la célula, además de desempeñar un papel esencial en el metabolismo energético mediante la utilización de los iones de hierro intracelular. Como se ha determinado previamente en otros modelos de enfermedad PLAN, los resultados aquí expuestos confirman por primera vez en CCPs humanas de hiPSCs de pacientes y portadores PLAN, la presencia de un estado oxidativo alterado en condiciones basales y el deterioro de las funciones mitocondriales mediante el ensayo de MitoStress en un analizador de flujo XFe96. Se ha demostrado que las CCPs tanto de pacientes como portador sano PLAN tienen valores reducidos de los parámetros más importantes de la función mitocondrial como la respiración basal, respiración máxima, respiración ligada a la producción de ATP y la capacidad de respuesta (306,307). Distintos estudios también describen que la disfunción mitocondrial es una característica en otras formas NBIA y que, podría preceder a la acumulación de hierro y ser la base de la progresión de este conjunto de enfermedades. Varios son los genes NBIA que están directamente asociados con las mitocondrias como *PANK2*, *COASY*, y *C19ORF12*, lo que demuestra el papel esencial de estos orgánulos en el proceso patológico, al menos en estas formas NBIA (210,308), y al igual que ocurre en otros muchos trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y ataxias, entre otras (309–311).

Por otro lado, también en el presente trabajo se ha demostrado que las mutaciones en *PLA2G6* están asociadas con niveles ligeramente elevados de ROS en las primeras etapas de la enfermedad, tanto en CCPs de los pacientes PLAN como del portador sano, acompañados de una bajada del potencial de membrana

mitocondrial solo en los pacientes. Las ROS juegan un papel importante en la señalización celular y en niveles anormalmente altos son perjudiciales para las células y podrían conducir a la muerte celular (199). Además, otras características que indican disfunción mitocondrial como la alteración del potencial de la membrana mitocondrial, la morfología mitocondrial y la disminución de los niveles de ATP presentes en modelos celulares y animales de estos pacientes PLAN (254,260,272). Esto sugiere un deterioro global de estos orgánulos pudiendo conducir a un fallo energético en la célula. Por lo tanto, dado que la producción de energía mitocondrial es indispensable para el mantenimiento de la homeostasis neuronal, es probable que la falta de suministro de energía adecuada a las células contribuya a la progresión de la enfermedad.

Los niveles elevados de ROS reaccionan con los lípidos de las membranas, oxidándolos, provocando así la peroxidación lipídica (263,264,312). Este aumento de la peroxidación lipídica podría ser causada por la ausencia de la actividad de la iPLA2 β y su función como fosfolipasa, que escinde preferentemente los lípidos oxidados para mantener la homeostasis redox (275,276). En este trabajo, se ha descrito que las mutaciones en *PLA2G6* están asociadas con el aumento de los niveles de peroxidación lipídica en las CCPs de pacientes PLAN y portador sano y a la disminución del potencial de membrana solo en pacientes PLAN. De igual manera, se sabe que la peroxidación de lípidos induce daño mitocondrial y llevaría a una disminución en la función de la cadena respiratoria oxidativa, una reducción del potencial de membrana y a niveles elevados de ROS. Por lo tanto, *PLA2G6* podría ejercer a la vez un papel importante en la función mitocondrial y el mantenimiento del potencial de membrana, bien mediante la protección de la membrana mitocondrial de la peroxidación lipídica de sus PUFAs causada por los niveles de ROS provocados por la propia respiración mitocondrial y/o por la interacción directa con la mitocondria. Los niveles de peroxidación lipídica

analizados en este trabajo se han realizado mediante la técnica de análisis TBARS. Aunque esta técnica ha recibido críticas por parte de investigadores por su baja especificidad (313), los resultados van en concordancia con lo descrito en otros modelos animales y celulares de PLAN (272,278).

La disfunción mitocondrial está asociada al metabolismo lipídico y es una fuente potencial de ROS. De hecho, las ROS se han visto implicadas en una variedad de procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) que también están relacionados con fallos en la dinámica mitocondrial. El aumento de la generación de ROS y de los niveles de peroxidación lipídica se muestra en muchas formas NBIA además de PLAN, como PKAN, MPAN, CoPAN, NF y CP. Todas estas formas comparten la disfunción mitocondrial y la peroxidación lipídica como vías principales de muerte celular. Sin embargo, en las formas NBIA, solo los genes *PLA2G6* y *FA2H* son los que están directamente relacionados con la síntesis de fosfolípidos de membrana y, por tanto, en el metabolismo lipídico (210).

En este trabajo se ha descrito que en las CCPs PLAN y portador sano PLAN-H del modelo CPC generado, los niveles de expresión de genes asociados al mecanismo de peroxidación lipídica están alterados. La expresión de *ASCL4* y *LPCAT3* disminuye en CCPs de pacientes PLAN. Estos genes son los encargados de codificar proteínas que metabolizan y esterifican los ácidos grasos que contienen PUFAs como la fosfatidiletanolamina (PE) (AA-PE) /adrenoil (AdA)-PE que contiene ácido araquidónico (AA). *ASCL4* y *LPCAT3* promueven la peroxidación lipídica por la vía enzimática y su inhibición contrarresta la acumulación de sustratos de la peroxidación lipídica en las células (314). Además, la expresión de *PEBP1*, cofactor que funciona con las lipoxigenasas (LOX) que metabolizan los precursores de lípidos peroxidados, también disminuye su expresión en las CCPs de pacientes PLAN. En un

estudio sobre el efecto de la ausencia de *PLA2G6* sobre la peroxidación lipídica en el trofoblasto, se ha descrito que *PLA2G6* puede actuar junto con *LPCAT3* (275) para convertir las señales proferroptóticas en fosfolípidos de membrana “sanos”. Esto sugiere que ya en etapas tempranas, en CCPs de PLAN, podría existir un mecanismo, por el cual la célula intentaría no promover la metabolización de los PUFAs para favorecer la protección frente a la peroxidación lipídica en los pacientes con deficiencias en *PLA2G6*.

Cuando en la célula los mecanismos homeostáticos para controlar los niveles de peroxidación lipídica y de hierro fallan y/o están desregulados, se activa un tipo de muerte celular dependiente de hierro denominada ferroptosis. La ferroptosis está causada por una desregulación de la homeostasis redox del microambiente intracelular que se caracteriza por acumulación excesiva de hidroperóxidos de lípidos letales resultantes de la reacción del hierro tisular con los PUFAs esterificados, especialmente los PUFA n-6 como el ácido araquidónico. Se desconoce el mecanismo exacto de la muerte celular por ferroptosis, pero una hipótesis es que el daño de los lípidos conduce a la destrucción de la membrana plasmática (265,315).

Distintos estudios establecen que, en la regulación de la ferroptosis, intervendrían también GPX4, la vía del mevalonato o la vía Nrf2 (o NFE2L22018), entre otros factores como vías de detoxificación (281,295). La disminución de la expresión de *SLC7A11* y el aumento de expresión significativo de *GPX4* en CCPs de pacientes PLAN en estudio, sugiere una desregulación en el sistema detox de la glutatión. GPX4 neutraliza las especies oxidadas formando alcoholes lipídicos no tóxicos. Para cumplir con su función necesita interactuar con la GSH, que se activa por la cisteína que es transportada de fuera a dentro de las células por el transportador *SLC7A11* (316,317). Sin embargo, la eliminación del gen *PLA2G6* no es suficiente para inducir la ferroptosis en condiciones normales, a menos que la vía GPX4

también esté alterada. Los bajos niveles de GSH y GPX4 descritos en otras formas NBIA, como PKAN o NF, sugiere que el mecanismo de detoxificación por GSH-GPX4 está dañado y en conjunto, con la falta de función de las proteínas por las que codifican los genes NBIA, incluido *PLA2G6*, provocarían un aumento de vulnerabilidad al daño celular provocado por la peroxidación lipídica y otros agentes reactivos (275,293,294). Datos parecidos se han descrito también en enfermedades como la ataxia de Friedrich. La inhibición de GPX4, el aumento de la peroxidación lipídica, la acumulación de hierro y una disfunción mitocondrial asociada, han llevado a identificar a la ferroptosis como un mecanismo importante de muerte celular en este tipo de ataxia (318,319). De hecho, han realizado distintos ensayos clínicos en FRDA basados en agentes farmacológicos como el RT001 (D-PUFA) (como en INAD) y la vatiquinona, que actúan mediando la corrección en la remodelación de membranas (de lípidos), pudiendo contribuir a la inhibición de la muerte celular por ferroptosis, entre otros. (320,321)

FSP1, proteína anteriormente conocida como AIFM2 (factor de inducción de apoptosis mitocondrial 2), y en concreto, la vía NADPH-FSP1-CoQ10, está considerado un supresor de ferroptosis independiente de GPX4 (322,323). Por primera vez en un modelo de PLAN basado en CCPs derivadas de líneas hiPSCs de pacientes PLAN se ha visto los niveles de expresión de *FSP1* estaban disminuidos tanto en las CCPs de pacientes PLAN. La N-miristoilación de la FSP1 provoca su reclutamiento hacia la membrana plasmática donde funciona reduciendo a la coenzima Q10 (CoQ10) y genera un antioxidante lipofílico que atrapa radicales que detienen la propagación de los peróxidos lipídicos (322). La falta de FSP1 generaría la falta de regeneración de la CoQ10 por medio del NAD(P)H, y por tanto perdiendo la capacidad reductora. Además, como la CoQ10 se autooxida fácilmente y tiene una dinámica deficiente dentro de la bicapa lipídica, se ha visto que la utilización de agentes antioxidantes podría contribuir a la protección contra la ferroptosis

observada por FSP1-CoQ10 (323). Esto podría explicar por qué la utilización de agentes antioxidantes lipofílicos como pueden ser los D-PUFA y la vitamina E en modelos PLAN, disminuye la autooxidación de los PUFAs y por tanto de sus compuestos reactivos, lípidos peroxidados. Sin embargo, el aumento de la expresión de HMOX-1 acompañado de la translocación intracelular de Nrf2 y la inducción de NQO1 como efecto antioxidante, sí que tiene lugar en las CCPs de pacientes PLAN (324,325). Sin embargo, ni el aumento de la expresión de otras ubiquinonas como NQO1 podrían suplir la falta de expresión de FSP1 en pacientes PLAN, como se sostiene en este trabajo.

En conclusión, para suprimir la peroxidación de fosfolípidos y la ferroptosis, además de otras vías detoxificación como GPX4, existe la vía FSP1-CoQ10-NAD(P), que, sin embargo, parece estar dañada en la patología PLAN. No obstante, la pérdida de función de esta vía podría suplirse mediante la utilización de agentes antioxidantes que podrían ser capaces de revertir los eventos patológicos descritos (210,272,278). La deficiencia de vitamina E se ha relacionado con la disfunción de GPX4 (326). De hecho, la suplementación con vitamina E mejora los síntomas y previene el progreso en la mayoría de los pacientes con AVED, que también presentan niveles elevados de peroxidación lipídica y estrés oxidativo, lo que podría iniciar el mecanismo de muerte neuronal por ferroptosis (327,328). A pesar del éxito en los estudios en modelos PLAN de los antioxidantes convencionales como la vitamina E, estos también se han probado en estudios clínicos de otras enfermedades que cursan con similares problemas metabólicos como la enfermedad de Parkinson o Alzheimer, sin embargo, no se han demostrado beneficios concluyentes (272,278,329,330). Se necesitan más estudios para dilucidar por completo los mecanismos fisiopatológicos asociados a la vía FSP1-CoQ10-NAD(P)H y evaluar la utilidad potencial otros antioxidantes sintéticos y/o convencionales como la vitamina E en la terapia PLAN.

Estudios recientes han sugerido la asociación entre ferroptosis en células neuronales y distintos trastornos neurológicos y neurodegenerativos, los accidentes cerebrovasculares isquémicos y hemorrágicos, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer. Normalmente están acompañados de peroxidación lipídica, disfunción mitocondrial y desregulación de GPX4. Además, se ha demostrado que los inhibidores ferroptóticos, como las ferrostatinas-1 y las lipoxstatinas-1, podrían mejorar la pérdida neuronal protegen las neuronas (331,332).

El alto contenido en PUFAs, colesterol y otros ácidos grasos del SNC le hace especialmente vulnerable al desajuste redox generado por los altos contenidos de ROS por el mal funcionamiento mitocondrial en conjunto con la susceptibilidad a la peroxidación lipídica. En la mitocondria, además, el lípido mayoritario en las mitocondrias humanas es la cardiolipina, un PUFA n-6 esterificado muy susceptible a la peroxidación lipídica (333,334). Todas las formas NBIA cursan con disfunción mitocondrial y desregulación de la homeostasis redox por acumulación de ROS mitocondrial, que serían capaces de oxidar la cardiolipina mitocondrial entre otros PUFAs (210). La disponibilidad de hierro libre celular por el desajuste de la homeostasis del hierro ya sea por fallos en la entrada, almacenamiento y/o reciclaje, o por la liberación desde las mitocondrias dañadas, hace a la ferroptosis la mejor candidata para promover la neurodegeneración y muerte neuronal en las NBIA. Por todo ello, sería interesante analizar si la muerte celular en las neuronas NBIA se debe a la activación de la ferroptosis y, si la optimización y el desarrollo de inhibidores de ferroptosis junto con antioxidantes podría ser un enfoque terapéutico para PLAN y otras formas NBIA, además de otras enfermedades neurodegenerativas.

En este trabajo se ha observado además una variabilidad de resultados genotipo-dependiente, sobre todo en lo que se refiere al portador sano PLAN-H. Estos cambios, en la mayoría de los casos en concordancia con los observados en células de pacientes PLAN, podrían explicarse en parte por la naturaleza de las mutaciones *PLA2G6*. El portador sano PLAN-H es heterocigoto para una mutación de codón de parada prematura (p.Y790X), que conduce a la completa ausencia de actividad de la proteína producida por el alelo mutado. Al menos en este sistema, la haploinsuficiencia es suficiente para mostrar ciertas alteraciones igualmente descritas en las líneas de los pacientes. Adicionalmente, en tanto que un alelo en el portador sano PLAN-H produce proteína iPLA2 β funcional, existirían mecanismos compensatorios en el individuo que subsanen los fallos causados por la proteína mutada, haciendo posible una correcta actividad final neuronal. Estudios recientes hablan sobre un mecanismo durante el cual las mutaciones que causan la degradación del mRNA mutante desencadenan la modulación de los genes de adaptación que podrían compensar la pérdida de función de la proteína codificada por el gen mutado (205,206). Sería interesante ahondar en este tipo de procesos que podrían tener algunos portadores sanos en enfermedades autosómicas recesivas, ya que podrían arrojar luz sobre los mecanismos de compensación y ser útiles para el estudio y desarrollo de terapias de estas enfermedades.

En el modelo CPC PLAN, los hallazgos sugieren que existen varias funciones que están dañadas desde las primeras etapas del desarrollo del cerebelo y que pueden contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Las alteraciones observadas en la presente tesis y en trabajos anteriores pueden ser causadas por un efecto primario de la pérdida de *PLA2G6* principalmente, y/o por defectos secundarios debido al proceso neurodegenerativo. Las CPCs derivadas de pacientes PLAN brindan la oportunidad de investigar directamente los mecanismos de enfermedad de manera individual, genotipo-dependiente, por lo que este modelo representa una

herramienta eficaz para identificar posibles dianas terapéuticas y diseñar fármacos que permitan revertir las alteraciones detectadas directamente en neuronas humanas PLAN.

D. Conclusiones / Conclusions

Conclusiones

1. Las ocho líneas hiPSCs generadas a partir de la reprogramación de fibroblastos de portadores y pacientes PLAN y ARSACS presentan capacidad de diferenciación a las tres capas germinales *in vitro*, así como el carácter de pluripotencia, cariotipo normal y mantenimiento de las mutaciones en los genes *PLA2G6* y *SACS* correspondientes.
2. Los nuevos modelos de PLAN y ARSACS de células de Purkinje de cerebelo (CPCs) y células precursoras de cerebelo (CCPs) *in vitro* expresan marcadores propios de células de Purkinje y vesículas sinápticas, además de adquirir una morfología neuronal compleja compatible con las CPCs humanas y propiedades electrofisiológicas concretas, que se encuentran alteradas en el modelo de pacientes PLAN y ARSACS.
3. Los modelos celulares de CPC PLAN y ARSACS humanos cursan con anomalías descritas en el fenotipo clínico descritos en los pacientes y, por tanto, replican la fisiopatología propia de la patología por lo que es útil para el estudio del mecanismo de enfermedad subyacente y de nuevos tratamientos farmacológicos.
4. Las CCPs de pacientes PLAN y ARSACS muestran disfunción mitocondrial, acumulación de especies reactivas de oxígeno y pérdida de potencial de membrana, lo que contribuye a la disfunción de la homeostasis redox en las neuronas y promueve el deterioro neuronal. Anomalías en la dinámica mitocondrial se conocen en muchas enfermedades neurodegenerativas, y también, en PLAN y ARSACS.

5. En CPCs de pacientes ARSACS se ha descrito la agregación de neurofilamentos no fosforilados genotipo-dependiente. Además, En CCPs de pacientes ARSACS se ha establecido el funcionamiento anómalo de la regulación de la homeostasis del citoesqueleto y el reciclaje neuronal por la vía autofágica-lisosomal, lo que, en conjunto podrían provocar la disfunción mitocondrial y activación de la muerte celular neuronas de pacientes ARSACS, destacando el papel en la proteostasis de SACS frente a estos eventos neurodegenerativos.
6. Los niveles de peroxidación lipídica están aumentados en CCPs de pacientes PLAN, siendo esta una característica del proceso patológico descrita en muy diferentes modelos celulares y animales de la enfermedad, lo que subraya cómo el nuevo modelo celular humano generado replica su fisiopatología.
7. En CCPs de pacientes PLAN se ha establecido el funcionamiento anómalo de procesos tales como la ferritinofagia y el reciclaje neuronal por la vía autofágica-lisosomal, lo que, en conjunto con la presencia de lípidos peroxidados, podría provocar la activación de la muerte celular por ferroptosis en neuronas de pacientes PLAN, destacando el papel protector de *PLA2G6* frente a estos eventos neurodegenerativos.
8. En CCPs de pacientes PLAN, la expresión disminuida de *FSP1*, implicada en la ruta NADH-FSP1-CoQ10 y supresor de la ferroptosis, señala esta como una vía diana para una posible intervención terapéutica que detendría la propagación de peróxidos lipídicos, aspecto crucial para lograr la cura de los pacientes PLAN.

Conclusions

1. The eight hiPSCs lines generated from the reprogramming of fibroblasts from PLAN and ARSACS carriers and patients present differentiation capacity to the three germ layers in vitro, as well as the character of pluripotency, normal karyotype, and maintenance of the corresponding *PLA2G6* and *SACS* gene mutations.
2. The new PLAN and ARSACS cerebellar Purkinje cells (CPCs) and cerebellar precursor cells (CCPs) models in vitro express Purkinje cell markers and synaptic vesicles and acquire a complex neuronal morphology compatible with human CPCs and specific electrophysiological properties, which are altered in the PLAN and ARSACS patient's model.
3. The human PLAN and ARSACS CPC human cell models show abnormalities described in the patients' clinical phenotype and, therefore, replicate the pathophysiology of the diseases, which is why it is useful for the study of the underlying disease mechanism and new drug treatments.
4. PLAN and ARSACS patient's CCPs show mitochondrial dysfunction, accumulation of reactive oxygen species, and loss of membrane potential, which contributes to dysfunction of redox homeostasis in neurons and promotes neuronal deterioration. Abnormalities in mitochondrial dynamics are known in many neurodegenerative diseases, as well as in PLAN and ARSACS diseases.
5. Genotype-dependent aggregation of non-phosphorylated neurofilaments has been described in ARSACS patient's CPCs. In addition, in ARSACS patient's CCPs, the abnormal functioning of the regulation of cytoskeleton homeostasis and neuronal recycling by the autophagic-lysosomal pathway has been established, which, together, could cause mitochondrial dysfunction and activation of cell death neurons of ARSACS patients, highlighting the role in *SACS* proteostasis against these neurodegenerative events.

6. Lipid peroxidation levels are increased in PLAN patient's CCPs, this being a characteristic of the pathological process described in very different cell and animal models of the disease, which underlines how the new human cell model generated replicates its pathophysiology.

7. In PLAN patient's CCPs, the abnormal functioning of processes such as ferritinophagy and neuronal recycling through the autophagic-lysosomal pathway has been established, which, together with the presence of peroxidized lipids could cause the activation of cell death by ferroptosis in PLAN patient neurons, highlighting the protective role of PLA2G6 against these neurodegenerative events.

8. In PLAN patient's CCPs, the decreased expression of FSP1, involved in the NADH-FSP1-CoQ10 pathway and suppressor of ferroptosis, indicates this pathway as a target for a possible therapeutic intervention that would stop the spread of lipid peroxides, a crucial aspect to achieve the cure of PLAN patients.

E. Materiales y métodos

1. Materiales

1.1 Materiales y equipamiento

El equipamiento, reactivos y material utilizado se indica a lo largo del desarrollo de este trabajo, excepto los cebadores o *primers* diseñados y los anticuerpos utilizados que se especifican en la [Tabla F1](#), [F2](#) y [F3](#) en [F Anexos](#).

1.2 Muestras humanas

Las muestras de piel de dos portadores sanos y dos pacientes ARSACS que portan mutaciones en el gen *SACS* (NM_014363.5) se obtuvieron en el Servicio de Neuropediatría del Hospital Universitario La Paz (Madrid, España) y en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario Doce de Octubre (Madrid, España), donde se supervisan a estos pacientes. Uno de los pacientes con ARSACS diagnosticado en el Hospital Universitario de la Paz es portador de las siguientes mutaciones: c.9938 delC (p.G3313Qfs*11) y c.11374C > T (p.R3792*) en heterocigosis compuesta. El primer portador sano portaba la mutación en c.11374C > T (p.R3792X) en heterocigosis y la muestra también fue obtenida por el Hospital Universitario de la Paz. El segundo paciente ARSACS fue diagnosticado en el Hospital Universitario Doce de Octubre y es portador de las variantes: c.826C>T (p.R276C) y c.3904C>T (p.P1302S) en heterocigosis compuesta, y mientras que el segundo portador sano porta la mutación en c.826 C >T (p.R276C) en heterocigosis.

Las muestras de piel de un portador sano y tres pacientes PLAN que portan mutaciones en el gen *PLA2G6* (NM_003560.4) se obtuvieron en el Servicio de Neurología Pediátrica del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona, España), en el Servicio de Neurología Pediátrica del Hospital Universitario San Pedro de Alcántara (Cáceres, España) y en la Unidad de Trastornos del Movimiento del

Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona, España). Los pacientes PLAN son portadores de los siguientes cambios deletéreos: c.2370T>G (p.Y790X) en homocigosis, c.1027G>A (p.A70T) y c.1010T>A (p.L70Q) en heterocigosis compuesta, y c.2356G>A (p.E786K) en homocigosis. Por último, se incluye la muestra de un individuo sano portador en heterocigosis de la mutación c.2370T>G (p.Y790X).

Tabla E1. Líneas celulares de fibroblastos dermales: origen e información genética y clínica.

Líneas	Edad*	Sexo	Genotipo	Diagnóstico
Control (ATCC CRL-2429™)	4	M	-	Control sano
ARSACS-H1	29	F	c.11374C > T (p.R3792X) mutación en heterocigosis	Portador sano (madre de ARSACS-1)
ARSACS-1	14	M	c.9938delC (p. G3313Qfs*11) y c.11374C > T (p.R3792*) mutación en heterocigosis compuesta	ARSACS
ARSACS-2	37	F	c.826 C >T (p.R276C) mutation in heterozygosis	Portador sano (hermana de ARSACS-2)
ARSACS-H2	37	F	c.826 C >T (p.R276C) y c.3904 C >T (p.P1302S) mutación en heterocigosis compuesta	ARSACS
PLAN-H	30	M	c.2370 T >G (p.Y790X) mutación en heterocigosis	Portador Sano (padre de PLAN-1)
PLAN-1	5	M	c.2370 T >G (p.Y790X) mutación en homocigosis	PLAN
PLAN-2	5	F	c.1027G>A (p. L337Q) y c.1010T>A (p.L343Q) mutación en heterocigosis compuesta	PLAN
PLAN-3	5	M	c.2356G>A (p. Glu786Lys) mutación en homocigosis	PLAN

*Edad del paciente en el momento de ser biopsiado.

La presente investigación fue autorizada por los CEIm (Comité Ético de Investigación con medicamentos) de cada uno de los hospitales que participan en este trabajo, y cada uno de los pacientes o de los tutores de los pacientes dieron su consentimiento para el estudio.

La generación de líneas humanas pluripotentes inducidas (hiPSCs) fue aprobada por el Comité Asesor para la Donación y Uso de Tejidos Humanos y Células del Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad (España) bajo la normativa de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica que expone en sus artículos 34.1-2 y 35.1 las condiciones en las que debe realizarse la investigación o experimentación con muestras biológicas de naturaleza humana.

2. Métodos

2.1 Cultivo celular

Todo el trabajo de cultivo celular se llevó a cabo en una campana de flujo microbiológico de clase II en condiciones estériles. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%. Se utilizaron en total nueve líneas primarias de fibroblastos dermales, nueve líneas hiPSCs, una línea hESCs (H9) y cultivo primario de neuronas granulares cerebelares de ratón C57/BL6.

2.1.1 Biopsia por punch cutáneo y cultivo de fibroblastos humanos de origen dérmico

Las biopsias de pacientes o fibroblastos de PLAN y ARSACS y portadores sanos de ambas enfermedades se obtuvieron según se recoge en la [Tabla E1](#). Para el sujeto control, los fibroblastos procedentes de la casa comercial ATCC (Manassas, Virginia, EE. UU.), se obtuvieron del Banco de Líneas de nodo Valencia ([Tabla E1](#)). Cada biopsia (5-6 mm) se diseccionó en cinco o seis fragmentos o explantes de igual tamaño, que se transfirieron a una placa de 60 mm. La epidermis y el pelo se eliminaron con un bisturí para obtener la dermis lo más pura y limpia posible. Los

fragmentos de dermis se marcaron a la placa usando una hoja de bisturí para crear la rugosidad de la superficie en la placa de cultivo. Las biopsias se dejaron secar durante aproximadamente 20 minutos para mejorar adherencia a la placa. Cuando los fragmentos estuvieron un poco secos, por ende, unidos a la placa, se agregaron cuidadosamente 4 mL de medio de crecimiento de fibroblastos.

Las placas se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante aproximadamente cuatro semanas. Durante este periodo se observó en primer lugar el crecimiento de algunos queratinocitos alrededor de los fragmentos de dermis, ocasionado por la posible presencia de epidermis en el cultivo, posteriormente los fibroblastos migraron de los explantes de dermis y colonizaron la placa de cultivo. El medio de cultivo se cambió una vez por semana con cuidado para no levantar los explantes de piel de la placa de cultivo. El medio de cultivo de fibroblastos se preparó con medio DMEM-HighGlucose (#11960. Invitrogen™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) suplementado con suero bovino fetal o *Fetal serum bovine* (FBS) al 20% (#10270-106. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), que fue previamente inactivado a 56°C durante 20 min y congelado, piruvato de sodio 1 mM (#S8638. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), Glutamax 1X (#35050-038. Invitrogen™. Waltham, Massachusetts EE. UU.) y Penicilina/Estreptomicina 1X o *Penicilin/Streptomycin* (P/S) (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.).

Cuando la confluencia de los fibroblastos fue aproximadamente del 80% de la placa, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato o *Phosphate-buffered saline* 1X (PBS) (#BE17-516F. Lonza. Basel, Switzerland) y se levantaron para efectuar un pase celular usando Tryple Select 1X (#12563-011. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) a un nuevo flask T25 (#156367. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.). La concentración de FBS

(#10270-106. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) se bajó al 10% en el medio de cultivo original previamente indicado. El pase de los fibroblastos se hizo a una proporción de 1:3 cuando las células alcanzaron una confluencia del 80-90%, siendo este caso una o dos veces por semana.

2.1.2 Fibroblastos alimentadores humanos o *feeders*

Los fibroblastos humanos sanos (Control) se obtuvieron cultivando fibroblastos dermales de la casa comercial ATCC (#CRL-2429. Manassas, Virginia, EE. UU.). Se descongelaron y se cultivaron en varios flask T175 (#159910. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), realizando pases de cultivos a una confluencia óptima con medio de cultivo de fibroblastos compuesto de DMEM-HighGlucose (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts USA #11960) suplementado con *FBS* al 10% (#10270-106. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU), piruvato de sodio 1 mM (Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU #S8638), Glutamax 1X (#35050-038. Invitrogen™, Waltham, Massachusetts EE. UU) y *P/S* 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EEUU).

Los fibroblastos se levantaron y disgregaron enzimáticamente con Tryple Select 1X (#12563-011. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.). A continuación se depositaron en un tubo de 50 mL y se irradiaron a 45 Gy para su inactivación mitótica en las instalaciones de radiación del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, España).

Los fibroblastos irradiados o *human feeder fibroblasts* (HFF) se cultivaron posteriormente en *flask* T175 (#159910. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) en medio Basal-IMDM (#21980-032. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) suplementado con 10% *FBS* (# 10270-106. Gibco by Life

Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) Glutamax 1X (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts USA # 35050-038) y P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) para su expansión y posterior congelación.

Cada dos días de cultivo de los *HFF*, el medio se recogió y se congeló a -20°C para su posterior utilización en el proceso de reprogramación de los fibroblastos a hiPSCs.

2.1.3 Células humanas pluripotentes inducidas (hiPSCs)

Las hiPSCs se cultivaron en medio mTeSR™1 (#05850. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) a 37°C y 5% de CO₂ en placas de 6 pocillos (#140675. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) recubiertos con Matrigel hESC-qualified Matrix (#354277. Corning, NY, EE. UU.) diluido 1:30 en DMEM/F-12 GlutaMAX™ supplement (#11559726. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), o Geltrex™ without LDEV (#A1413301. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) diluido 1:50 en DMEM/F-12 GlutaMAX™ supplement (#11559726. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) en condiciones sin *feeder*.

Los pocillos recubiertos con Matrigel hESC-qualified Matrix (#354277. Corning, NY, EE. UU.) se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, posteriormente se retiró y se añadió el medio mTeSR™1 (#05850. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) atemperado antes de añadir las células. Las placas con Matrigel hESC-qualified Matrix (#354277. Corning, NY, EE. UU.) se pueden preparar como máximo siete días antes de realizar el pase celular y almacenar a 4°C durante una semana.

El día de uso se debe atemperar a temperatura ambiente al menos 1 hora antes de la siembra de las células.

El medio se cambió diariamente y las células se pasaron cuando las colonias eran grandes y entraban contacto con otras colonias, mediante pases enzimáticos usando Dispase (#07923. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá). Cuando la morfología no era la adecuada o había más de un 5% de diferenciación celular en el pocillo, el pase se realizó manualmente cortando las colonias en pequeños cuadrados, raspando el pocillo con una punta de pipeta y dividiendo en pocillos nuevos. Los pases se hicieron cada 4-7 días, repartiendo las células en una proporción que dependía de la confluencia y la velocidad de crecimiento de cada línea celular (desde 1: 3 hasta 1:20).

Las células que se estaban diferenciando, basándose en cambios en la morfología, se eliminaron manualmente día a día usando una punta de pipeta bajo un microscopio dentro de la campana de cultivo celular.

2.2 Criopreservación y descongelación

Todo tipo de células utilizadas en este trabajo, independientemente del tipo de separación, obtención o cultivo, se recogieron en un tubo cónico de 15 mL que contenía 3 mL de DMEM/F12 GlutaMAX™ supplement (#11559726. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) y se centrifugaron 5 minutos a 200xg. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de FBS (#10270-106. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) inactivado con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (#D2650. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) para congelar las células. Los viales se colocaron en un recipiente congelador *Mr. Frosty* (#15-350-50. ThermoFisher™. Waltham, Massachusetts EE. UU.) y se

congelaron a -80°C durante la noche. Los viales con células se transfirieron a nitrógeno líquido al día siguiente.

La descongelación celular, independientemente del tipo celular, se hizo en un baño con agua miliQ estéril a 37°C DMEM/F-12 GlutaMAX™ supplement (#11559726. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) durante 1 o 2 minutos. Pasado este tiempo y cuando todavía se ve un poco de FBS (#10270-106. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) congelado, se recogieron las células del tubo de descongelación y se depositaron gota a gota en un tubo de 15 mL que contenía 9 mL de DMEM/F12 a 37°C . A continuación, se centrifugaron las células 5 minutos a 200xg, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en el medio celular de interés con Y-27632 a $10\ \mu\text{M}$ (#72302. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá).

2.3 Aislamiento y cultivo neuronas granulares de cerebelo de ratón postnatal

Las neuronas granulares de ratón se obtuvieron del cerebelo las crías postnatales de ratones entre los días 4-7, cuando el número de progenitores de neuronas granulares en el desarrollo alcanza su punto máximo. Se extrajeron los cerebelos de ratones crías de tipo salvaje o *wild type* (WT) C57BL/6J, bajo los protocolos normativos y éticos, y se mantuvieron en frío en una solución de HBSS sin calcio y magnesio 1x (HBSS- Ca^{2+} - Mg^{2+}) (#88284. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) suplementada con D-Glucosa 30 mM (#G7021. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.). Posteriormente, se retiraron las meninges y se disgregaron en pequeños fragmentos de cerebelo, depositados en la solución antes mencionada hasta su digestión enzimática. Se necesitaron un total de cerebelos de 7-8 crías de ratones

para cultivar una placa completa de 24 pocillos y conseguir la confluencia necesaria para estudio (5 millones/cerebelo a 1,8 millones/pocillo aprox.).

Para obtener neuronas granulares individualizadas se utilizó una solución de disgregación enzimática, compuesta por *Earle's Balanced Salt Solution 1X (EBSS)* (#E7510. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), D-Glucosa al 30% (#G7021. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), 0,25% NaHCO_3 (#S5761. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), EDTA 1,1 mM (#E6511. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), L-Cisteína clorhidrato monohidrato 5.5mM (#6852. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y H_2O destilada, pH 6,2. La solución se filtró por un filtro de 0,22 μM (#431222. Corning, NY, EE. UU.) y se pudo almacenar a 4°C hasta el tiempo máximo de una semana.

A la solución de disgregación se añadió una solución de Papaína (#LS003124. Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EE. UU.) a una concentración final de 20U/mL, que se activó después de 30 minutos a 37°C y antes de su uso. Después de la activación de la solución con papaína, esta se filtró y se le añadió DNase I (#1010415900. Roche, Basilea, Suiza) al 0,05%.

La solución de disgregación enzimática se añadió a los fragmentos de cerebelo en una placa de 60 mm, donde se sometieron a trituración mecánica, y se incubaron durante 10-15 minutos a 37°C y 5% CO_2 . Pasado este tiempo de disgregación enzimática, se utilizó (como ayuda) la disgregación mecánica mediante una pipeta p1000 previamente recubierta con FBS (#10270-106. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) para disminuir la adherencia de las células a la pared de la pipeta. La solución enzimática se inactivó con una solución de HBSS- Ca^{2+} - Mg^{2+} 1X (#88284. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con glucosa 30 mM (#G7021. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), P/S (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), FBS al 10% (#10270-106. Gibco by Life

Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) y DNase I al 0,05%. Las células (y fragmentos de tejido) obtenidas se centrifugaron 5 minutos a 200xg. A continuación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* celular en una solución de HBSS-Ca²⁺ Mg²⁺ 1X (#88284. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con D-glucosa 30 mM (#G7021. Sigma, St. Louis, Missouri, EEU), P/S 1x (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) FBS al 10% (#10270-106. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), y posteriormente se centrifugó de nuevo 5 minutos a 200xg para lavar las células de posibles restos de tejido sin disgregar y/o sangre. El sobrenadante se retiró de nuevo y el *pellet* celular se resuspendió en medio de co-cultivo compuesto por medio Neurobasal-A (#11540366. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), N2 *supplement* 1x (#17502048. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), B27-A *supplement* 1x (#12587010. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), Suero bobino fetal o Bovin *serum albumin* (BSA) al 1% (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), Factor neurotrófico derivado del cerebro o *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) a 10 ng/mL (#450-02. Peprotech by ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), 3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt 30 μM (T3) (#T6397. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), laminina a 2 ng/mL (#L2020. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) e Y-27632 a 10 μM (#72302. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), manteniendo este último reactivo en el medio durante dos días después de la siembra en placa para inhibir la muerte celular.

Las neuronas granulares de cerebelo obtenidas se filtraron por una malla de 40 μm y se sembraron en cubreobjetos de vidrio estériles de 13 mm de espesor (#631-0149P. VWR, Radnor, Pensilvania, EE. UU.) recubiertos con matrices de Poli-D-lisina/laminina preparados previamente, a una densidad de 1.000.000 células/cm².

Los cubreobjetos de vidrio se lavaron con etanol al 70% durante una noche y luego se lavaron con H₂O destilada varias veces en agitación, posteriormente se secaron durante la noche en la campana de flujo laminar para asegurar la evaporación. Finalmente, se esterilizaron en autoclave para mejorar la hidrofilia de las superficies y mejorar la adherencia de las células para el cultivo a largo plazo.

Se colocaron los cubreobjetos de vidrio estériles en una placa de plástico de 24 pocillos (#142475. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EEUU) y se recubrieron con 200 μL/cm² a 50 μm/mL de *Poly-D-Lysine (PDL)* (#A3890401. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) en *PBS 1X* y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, seguido de dos lavados con H₂O miliQ estéril. La laminina (#L2020. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) se disolvió en una solución en frío de HBSS con Calcio y Magnesio 1x (HBSS+Ca²⁺+Mg²⁺) (#14025092 ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) o con DMEM/F-12 GlutaMAX™ *supplement* (#11559726. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) estéril a una concentración de 10 μM/mL y 200 μL/cm². A continuación, se incubó durante un mínimo de 2 horas hasta un máximo de una noche a 37°C y 5% CO₂. Antes de la siembra celular, los pocillos se lavaron con DPBS-Ca²⁺-Mg²⁺ 1X (#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.).

Al cultivo primario de neuronas granulares de ratón se añadió *Cytosine β-D-arabino-furanoside hydrochloride (AraC)* a 4 μM (#C6645. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y factor de crecimiento básico de fibroblastos o *basic Fibroblast growth Factor (bFGF)* (#13256-029. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) a una concentración de 5 ng/mL durante las dos primeras semanas de cultivo para inhibir la proliferación de astrocitos y mejorar la supervivencia de las células

granulares de ratón, respectivamente. Los cambios de medio se hicieron cada dos días, cambiando solo la mitad o un tercio del medio.

2.4 Reprogramación de fibroblastos humanos y generación de líneas hiPSCs

Las líneas hiPSCs derivadas de fibroblastos dérmicos de pacientes PLAN, ARSACS y portadores sanos se generaron mediante tecnología de reprogramación no integrativa utilizando el kit comercial *CytoTune®-iPS 2.0 Reprogramming kit* (#A16517. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.). Este kit ese compone de vectores basados en una forma modificada no transmisible del Virus Sendai (*SeV*) que incluye los cuatro factores de Yamanaka *Oct 3/4*, *c-Myc*, *Sox2*, *Klf4*. Contiene un vector, KOS, que expresa tres de estos genes en tándem (*Klf4*, *Oct3/4* y *SOX2*), mientras que hay dos viales adicionales que solo contienen *c-Myc* o *Klf4* (Tabla E2).

Tabla E2. Factores de reprogramación del Virus Sendai *CytoTune®-iPS 2.0 Reprogramming kit*

CytoTune®Sendai Vector	Factor	GenBank ID
CytoTune® KOS	Human Klf4	BC029923.1
	Human Oct3/4	NM_002701.4
	Human SOX2	NM_003106.2
CytoTune® hc-Myc	Human c-Myc	K02276.1
CytoTune® hKlf4	Human Klf4	BC029923.1

Dos días antes del día de la transducción con los SeV, se sembraron los diferentes fibroblastos humanos en varias placas de 6 pocillos en medio HDF y a diferentes confluencias para obtener alrededor de 200.000 - 300.000 células/pocillo el día de la transducción o día 0 (Figura E2). Las células se transdujeron usando vectores en la multiplicidad de infección (*MOI*) apropiada en medio HFF compuesto por medio

Basal-IMDM suplementado con 10% FBS (#10270-106. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), Glutamax 1X (#35050-038. Invitrogen™. Waltham, Massachusetts EE. UU.) y P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.). Se incubaron durante la noche a 37°C y 5% CO₂.

Para calcular el volumen adecuado de virus para transducir los fibroblastos y contando que el MOI depende del kit (consultar certificado de análisis Lote L2120016), se siguió la siguiente fórmula que se muestra en la [Figura E1](#).

$$\text{Volume of virus } (\mu\text{L}) = \frac{\text{MOI (CIU/cell)} \times \text{number of cells}}{\text{Titer of virus (CIU/mL)} \times 10^{-3} (\mu\text{L/mL})}$$

Figura E1. Fórmula para el cálculo de volumen de virus necesario para la transducción. MOI: *Multiplicity of infection* (número de partículas víricas/célula); Título de los virus: número de partículas víricas/mL.

El medio HFF se cambió 24 horas después para eliminar el exceso de vectores virales. Posteriormente, se cambió cada dos días hasta que en el día 7 del protocolo se transfirieron los fibroblastos transducidos a placas con *feeder*, separándolos y cultivándolos en varias placas a distintas confluencias para obtener colonias individuales más adelante en el tiempo del protocolo ([Figura E2](#)). En el día 8 del protocolo, el medio HFF se cambió a medio DMEM KnockOut™ (#10829018. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), con suero KnockOut™ al 20% (#10828028. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), Glutamax 2 mM (#35050-038. Invitrogen™. Waltham, Massachusetts EE. UU.), MEM-NNAA 0,1 mM (#11140050. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), 2-*mercaptoethanol* 0,23 mM (#31350-010. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), 10 ng/mL *bFGF* (#13256-029. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) y P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.). Las células se cultivaron en este medio durante los días 8 al 18 del protocolo.

El día 18 el medio se cambió a un medio condicionado compuesto al 50:50 de dos medios distintos: 50% de medio DMEM KnockOut™ (#10829018. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) al 20% de suero KnockOut™ (#10828028. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), Glutamax 2 mM, (#35050-038. Invitrogen™. Waltham, Massachusetts USA), 0,1 mM aminoácidos no esenciales (MEM-NNEE) (#11140050. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) 0.23 mM *2-mercaptoethanol* (#31350-010. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), y *P/S* 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), y el otro 50% del medio condicionado compuesto por medio HFF de recogido de *feeder* (HFF) cultivados, añadiendo al medio completo 10 ng/mL de *bFGF* (#13256-029. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.). Estas condiciones se mantuvieron hasta los días 24-30 del protocolo ([Figura E2](#)).

De tres a cuatro semanas después de la transducción, las mejores colonias de hiPSCs son en su mayoría lo suficientemente grandes y, con una buena morfología, se transfirieron mediante una selección clonal o de colonia única a un pocillo con *feeder* o sin *feeder* y matrigel.

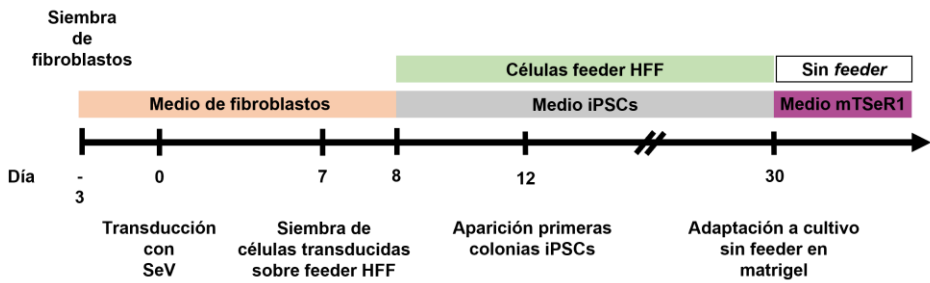


Figura E2. Protocolo de reprogramación celular del *CytoTune®-iPS 2.0 Reprogramming kit*

2.5 Diferenciación *in vitro* de las líneas hiPSCs a precursores cerebelares y células de Purkinje de cerebelo

La diferenciación de células de Purkinje de cerebelo o *cerebelar Purkinje cell* (CPC) a partir de hiPSCs se realizó mediante el uso del protocolo descrito previamente por Sundberg, M. *et al* 2018, con algunas modificaciones. (La [Figura E3](#) esquematiza el proceso de diferenciación de las células cerebelosas de Purkinje).

Las líneas hiPSCs se cultivaron en una placa de 6 pocillos en Geltrex™ LDEV-Free (#A1413301. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) al menos durante 5 días antes del inicio de la diferenciación por inducción neural. Para inducir la diferenciación neural, las colonias de hiPSCs se disociaron en pequeños fragmentos utilizando el reactivo de disociación Versenne Solution 1X (#15040066. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) durante 5-10 minutos a 37°C y 5% CO₂. Los pequeños fragmentos de colonias hiPSCs se sembraron en placas de 6 pocillos de baja adherencia o *ultra low attachment* (ULA) (#3471. Corning, NY, EE. UU.) o T75 ULA (#3814. Corning, NY, EE. UU.) con medio de inducción neural compuesto por: DMEM/F-12 GlutaMAX™ supplement (#11559726. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), N2 supplement 1X (#17502048. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), B27-A supplement 1X (#12587010. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), heparina a 2 µg/mL (#H3149-10KU. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE. UU.), Nicotinamida 10 mM (#N3376. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE. UU.), *Noggin* 50 ng/mL (#120-10C. Peprotech by ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), SB-431542 10 µM (#72234. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), Y-27632 10 µM (#72302. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), CHIR99021 1.7 µM (#72052. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá). En el día 2 del protocolo de diferenciación, la concentración de *Noggin* se aumentó a 100 ng/mL y se eliminó Y-27632 (#72302. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) del medio de cultivo. En el día 4 de

diferenciación, se añadió FGF8b a 100 ng/mL (#100-21. Peprotech by ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) al medio y se eliminó la nicotinamida. El medio se cambió los días 6 y 8. En el día 10, los esferoides formados durante los primeros días del protocolo en los *flask* o placas *ULA* se disgregaron en trozos pequeños y se sembraron en placas recubiertas con PDL (50 µm/mL) y laminina (10 µm/mL) en una alta confluencia, utilizando el medio de inducción neural compuesto por DMEM/F-12 GlutaMAX™ *supplement* (#11559726. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), N2 *supplement* 1x (#17502048. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), B27-A *supplement* 1x (#12587010. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), *Noggin* 100 ng/mL (#120-10C. Peprotech by ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), SB-431542 10 µM (#72234. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), CHIR99021 1.7 µM (#72052. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), *FGF8b* 100 ng/mL (#100-21. Peprotech by ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) y *bFGF* 10 ng/mL (#13256-029. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.). Se añadió también Y-27632 10 µM (#72302. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) para mejorar la supervivencia celular y se eliminó 24 horas después.

Desde el día 12 y hasta los días 30-48, las células precursoras cerebelares formados se cultivaron en medio Neurobasal-A (#11540366. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), B27-A *supplement* 1X (#12587010. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), N2 *supplement* 1X (#17502048. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), BDNF 10 ng/mL (#450-02. Peprotech by ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) y T3 30 µM (#T6397. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.). Las CCPs se pueden congelar en los días 28-32 y descongelar antes de la selección por *FACS*.

Siguiendo el protocolo de diferenciación, entre los días 28-34, las CCPs se disgregaron en células individuales mediante digestión enzimática con ACCUTASE™ (#07922. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) y luego se marcaron con el anticuerpo APC-anti-human CD90 (THY1-APC) (#328114. Biolegend, San Diego, California, EE. UU.) para seleccionar los precursores de CPCs por separación celular con el equipo FACSAria III (BD Bioscience, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.). Las células THY1⁺ se cultivaron en placas de placa de 6 o 24 pocillos *ULA* para asegurar la formación de pequeños agregados celulares durante 2-7 días en medio Neurobasal-A (#11540366. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), B27-A *supplement* 1X (#12587010. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), N2 *supplement* 1x, BDNF 10 ng/mL (#450-02. Peprotech by ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), T3 30 μM (#T6397. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), bFGF 10 ng/mL (#13256-029. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), FGF8b 100 ng/mL (#100-21. Peprotech by ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) y CHIR99021 1,7 μM (#72052. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá). Se añadió Y-27632 10 μM (#72302. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) para mejorar la supervivencia celular y se eliminó 48 horas después para no alterar los agregados.

A partir de día 2 y hasta el día 7 como máximo, los agregados celulares THY1⁺ se trataron con medio de siembra con Y-27632 10 μM (#72302. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) durante 30 minutos, antes de la disociación mecánica para obtener agregados de menor tamaño para el co-cultivo con las células granulares de ratón sembradas, previamente, 3 o 4 días antes. Los fragmentos pequeños de células humanas THY1⁺ se colocaron en la parte superior de los pocillos con células granulares cerebelares de ratón sembradas. Se mantuvo el bFGF (#13256-029. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) a una concentración de 5 ng/mL e Y-27632 a 10 μM (#72302. StemCell Technologies,

Vancouver, Canadá) en el medio durante dos días después de la siembra en placa para inhibir la muerte celular y mejorar la supervivencia celular. Las células de co-cultivo se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ y la mitad del volumen del medio fue cambiando cada 2 días hasta el día 130 aproximadamente.

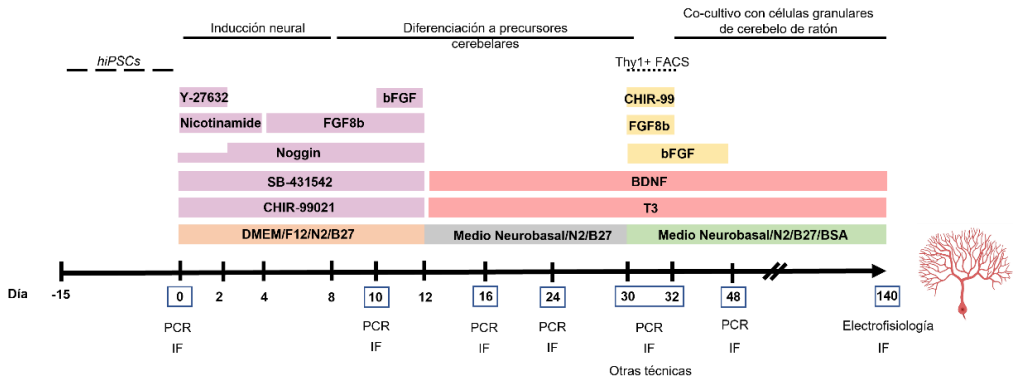


Figura E3. Representación esquemática del protocolo de diferenciación *in vitro* de células de Purkinje de cerebelo a partir de hiPSCs.

2.6 Selección celular por clasificación celular activada por fluorescencia o Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) selection

Las placas de cultivo de CCPs se lavaron con un volumen apropiado de DPBS-Ca²⁺-Mg²⁺ (#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), se añadió ACCUTASE™ (#07922. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) a temperatura ambiente a los pocillos y se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% durante 15 minutos. Cada 5 minutos se controló el desprendimiento de células. Una vez que las células se habían desprendido de la superficie de la placa, se añadió DPBS-Ca²⁺-Mg²⁺ 1X (#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) y BSA al 1% (1 mL por 1 mL de ACCUTASE™ (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) para inactivar la ACCUTASE™, recogiendo la mezcla en un tubo de centrifuga

estéril de 15 mL. Con una pipeta de 5 mL, se pipetearon suavemente las células hacia arriba y hacia abajo varias veces para su completa disgregación. Las placas se lavaron con DPBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} (#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) y BSA al 1% (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) para asegurar la recolección completa de las células. A continuación, los tubos de 15 mL con la mezcla de células y ACCUTASE™ (#07922. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) se centrifugaron durante 5 minutos a 1600 rpm y se eliminó el sobrenadante para eliminar ACCUTASE™. Las células, situadas en el fondo del tubo, se resuspendieron en $500 \mu\text{l}/4\text{-}5 \cdot 10^6$ células con DPBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} 1X (#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), BSA 1% (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y EDTA 1 mM (#E6511. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y se añadieron $5 \mu\text{l}$ de anticuerpo THY1-APC (#328114. Biolegend, San Diego, California, EE. UU.) por millón de células.

Las células se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en completa oscuridad y en movimiento. Pasado el tiempo y para lavar las células, se agregaron 5 mL de DPBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} 1X (#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), BSA al 1% (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y EDTA 1 mM (#E6511. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) a cada tubo de 15 mL que contenían células con y sin anticuerpo y se centrifugaron 5 min a 200xg. Los sobrenadantes se descartaron y las células se resuspendieron en $600 \mu\text{L}$ de tampón FACS compuesto por DPBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} 1X (#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), BSA al 1% (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ de DNase I (#1010415900. Roche, Basilea, Suiza).

Las células se filtraron por una malla estéril o *cell strainer* de 40 μM (#45352340. Cultek, Madrid, España) y se colocaron en hielo con papel de aluminio hasta que se separaron con el equipo FACS-Aria III (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, EE. UU.) utilizando una boquilla de 100 μM y una presión de vaina de PSI 20 a baja presión.

Se seleccionaron células de un tamaño determinado, positivas para THY1 en el canal APC e individualizadas, como se muestra en la **Figura E4**. Previo a la separación celular se añadió yoduro de propidio (#P3566.ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) para descartar las células muertas.

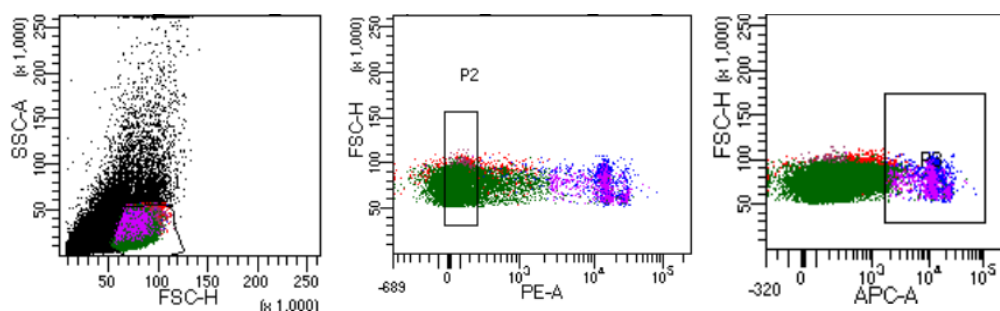


Figura E4 Diagramas de dispersión representativos del análisis de FACS a día 30 de la diferenciación CPC. A) Selección de células por tamaño (Gating FSC/SCC) B) Selección de células vivas por marcaje con yoduro de propidio de las células seleccionadas por tamaño. C) Selección de células vivas y THY1⁺ en el canal APC.

Las células vivas individuales THY1⁺ se recogieron en hielo y en medio Neurobasal-A (#11540366. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) suplementado con B27-A *supplement* 1X (#12587010. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), BSA al 1% (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE.

UU.). Para eliminar el medio de recolección, las células se centrifugaron a 2800 rpm durante 5 minutos y se sembraron en placas *ULA* en medio en Neurobasal-A (#11540366. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), B27-A *supplement* 1X (#12587010. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), N2 *supplement* 1x, BDNF 10 ng/mL (#450-02. Peprotech by ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), T3 30 μM (#T6397. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), *bFGF* 10 ng/mL (#13256-029. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), FGF8b 100 ng/mL (#100-21. Peprotech by ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) y CHIR99021 1.7 μM (#72052. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá). Se mantuvieron en ese medio de 2 a 7 días *in vitro* antes del co-cultivo.

2.7 Extracción de RNA

Se aisló RNA de fibroblastos, de líneas hiPSCs y de CCPs en distintas condiciones de cultivo y diferentes puntos en los protocolos de diferenciación. El RNA se extrajo y se purificó de acuerdo con las instrucciones del fabricante del mini kit Qiagen RNeasy (#74104. Qiagen, Manchester, Reino Unido). También se realizó un tratamiento adicional con DNasa para reducir y/o eliminar totalmente la presencia de DNA contaminante en la muestra (#79254. Qiagen, Manchester, Reino Unido). La cuantificación se realizó utilizando el NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.). Si la síntesis de DNA copia (o cDNA) no se realizaba de inmediato, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.8 Transcripción inversa o síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó utilizando dos kits diferentes según la disponibilidad del producto.

Para el kit de transcripción inversa QuantiTect (#205311. Qiagen, Manchester, Reino Unido), se preparó un total de 150 ng - 1µM de RNA total aislado en un volumen final 12 µL con agua libre de DNA/RNAasa. Se añadieron 2 µL de tampón de eliminación de DNAg 7x para una eliminación eficaz del DNA genómico. A continuación, la mezcla se calentó a 42°C durante 2 minutos usando el equipo de PCR Thermocycler Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems™ Foster City, California, EE. UU.) e inmediatamente se enfrió a 4°C y posteriormente en hielo.

Se agregaron 6 µL de la *Master Mix* de transcripción inversa (que contiene 5x Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix y Quantiscript® Reverse Transcriptase) a la muestra para la transcripción inversa y se llevó a cabo la reacción utilizando el termociclador con las siguientes condiciones: 15 minutos a 42°C para activar la reacción, 3 minutos a 95°C para inactivar la reacción y después se mantuvo a 4°C.

La reacción se realizó utilizando el equipo de PCR Thermocycler Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Foster City, California, EE. UU.) e inmediatamente se enfrió en hielo. Se añadieron 10,4 µL de la mezcla de transcripción inversa (que contiene tampón RT 10x, MgCl₂ 25 mM, mezcla de dNTPs 10 mM, inhibidor de RNasa 20U/mL, Multiscribe RT 50 U/mL, Random Hexamers 50 µM) a la muestra para realizar la transcripción inversa utilizando el termociclador con las siguientes condiciones: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 37°C, 5 minutos a 95°C y a 4°C infinito.

Si las muestras no se utilizaban inmediatamente se almacenaban a -20°C hasta su uso.

2.9 PCR y RT-PCR

2.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa

El cDNA se sintetizó utilizando 1 µg de RNA total con el kit de transcripción inversa QuantiTect (#205311. Qiagen, Manchester, Reino Unido) en un volumen de 10-20 µl, según el experimento. El cDNA o DNA sin diluir se usó para la reacción en cadena de la polimerasa o *polymerase reaction chain* (PCR) con MyTaq DNA polimerase Kit (#BIO-21105. Bioline GmbH, Luckenwalde, Alemania).

Para la detección del virus Sendai, se amplificaron 250 ng de cDNA de cada muestra en una reacción de 20 µL que contenía 0,5 µL de cada *primer* de PCR a 10 µM, 4 µL de tampón de PCR 5x y 0,5 µL de DNA Taq polimerasa. La amplificación se realizó a 95°C durante 30 segundos, 35 ciclos de 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguido de una extensión a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Para la detección de marcadores de pluripotencia y/o puesta a punto de los *primers* diseñados, se amplificaron 150 ng de cDNA de cada muestra en una reacción de 10 µL que contenía 0.25 µL de cada primer de PCR a 10 µM, 2 µL de tampón de PCR 5x y 0,25 µL de DNA Taq polimerase. La amplificación se realizó a 94°C durante 30 segundos, 35 ciclos de 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguido de una extensión de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se testaron con electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Para detectar las mutaciones de interés, se amplificaron 50-100 ng de DNA de cada muestra en una reacción de 20 µL que contenía 0,5 µL de cada cebador de PCR a 10 µM, 4 µL de tampón de PCR 5x y 0,5 µL de DNA Taq polimerase. La activación de la polimerasa se realizó a 95°C durante 30 segundos, seguido de 35 ciclos de X°C

durante 30 segundos (dependiendo la temperatura que cada pareja de *primers*) para la amplificación y 72°C durante 30 segundos, y seguido de una extensión a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%.

2.9.2 PCR cuantitativa a tiempo real o RT-PCR

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron con el reactivo Roche Diagnostics *Fast Esencial DNA Green Master* (#06402712001. Roche Diagnostics, Manheim, Alemania) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadió *DNA green master* a las muestras de cDNA (diluido 1:4) junto con H₂O libre de DNA/RNAsa y los *primers* de cada gen en estudio (**Tabla F1** de Anexos).

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en placas de 96 o 384 pocillos, en un volumen final de 10 µl y empleando la mezcla de reacción por muestra mostrada en la **Tabla E3**. El programa empleado en el LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) se indica en la **Tabla E4**.

Tabla E3 Reactivos utilizados para la mezcla de reacción de RT-PCR

Reactivo	Volumen (µl)
Syber Green	5
Forward primer 10 µM	0,5
	0,5
	3,25
cDNA	0,75 (1,5 ng aprox)

Tabla E4 Programa empleado para realizar RT-PCR.

Fases	Temperatura (°C)	Ramp (°C/s)	Tiempo	N.º de ciclos
Pre-incubación o activación	95	4,4	10 min	1
Amplificación	95	4,4	10 s	40
	60	2,2	10 s	
	72	4,4	10 s	
Melting	95	4,4	10 s	1
	65	2,2	1 min	
	97	0,1	1 s	
Conservación	4	/	∞	/

Como control de la reacción de amplificación se analizó la expresión del gen constitutivo *GAPDH*, mostrando una expresión invariable y necesario para obtener una cuantificación relativa. Se utilizó además como control positivo de la expresión de genes de pluripotencia por parte de las líneas hiPSCs generadas mRNA de la línea celular embrionaria humana H9, y como control negativo a la expresión de genes de pluripotencia, se utilizó mRNA de una línea de fibroblastos humanos control.

2.10 Inmunocitoquímica / Inmunofluorescencia

Las células, CCPs o CPCs derivadas de hiPSCs, se fijaron con PFA 4% (#50-980-488. Fisher by (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, EE. UU.) durante 15 minutos a temperatura ambiente y después, se lavaron 3 veces con PBS 1X (#18912014. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.). Para la inmunocitoquímica, las células fijadas se incubaron 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente con la solución bloqueo que contenía BSA al 5% (#B6917. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) en PBS 1X (#18912014. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) y 0.1% Triton X-100 para permeabilizarlas.

Posteriormente, las células se incubaron con el/los anticuerpos primarios en solución de bloqueo compuesto por BSA al 1% (#B6917. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) en PBS 1X (#18912014. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) y 0.1% Triton X-100 durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron 3 veces con tampón de bloqueo al 1% de BSA (#B6917. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y se incubaron con el anticuerpo secundario AlexaFluor apropiado (Life Technologies by Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.) en tampón de bloqueo compuesto por BSA al 1% (#B6917. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) en PBS 1X (#18912014. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, USA) y 0.1% Triton X-100 a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de tres lavados con PBS 1X (#18912014. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), los núcleos se tiñeron con DAPI a una dilución 1:500 en PBS 1X (#18912014. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) durante 10 minutos. Después de dos lavados con PBS 1X (#18912014. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), los cubreobjetos donde se encuentran las células fijadas se montan en una porta con el medio de montaje Fluorsave (#34-578-920ML. Fisher by Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.) o Mowiol (#81381. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), según disponibilidad. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se especifican en las [Tablas F1 y F2](#) de Anexos.

2.11 Microscopía

Las imágenes de fluorescencia de pluripotencia de las hiPSCs y de los CCPs descritas en la sección de resultados de [B. CAPÍTULO 1](#) y [C. CAPÍTULO 2](#) se realizaron con un microscopio Leica DMI8 manual con una cámara Leica DFC 700 GT y software LAS X.

Las imágenes de morfología de las colonias hiPSCs y las tomadas en el ensayo de la fosfatasa alcalina descritos en resultados en los capítulos 1 y 2 se realizaron en con un microscopio Zeiss.

Las imágenes de fluorescencia de los EBs y de las CPCs maduras humanas correspondientes al co-cultivo se realizaron en un microscopio confocal Leica TCS-SP8 equipado con 4 líneas láser para excitación de fluorescencia (405 nm, 488 nm, 561 nm y 638 nm) y 4 detectores con software LAS X. Posteriormente las imágenes se procesaron con el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij>).

2.12 Análisis de imagen

Las CPCs maduras humanas se diferenciaron a partir de líneas hiPSCs Control y de pacientes y heterocigotos PLAN y ARSACS durante 30 días. Posteriormente se co-cultivaron con neuronas granulares de ratón para su maduración hasta día 130, se fijaron y se prepararon para su análisis por inmunofluorescencia.

Se capturaron imágenes con el microscopio confocal Leica SP8 indicado en la sección 2.11 de **E. Materiales y métodos**, para analizar de forma cuantitativa distintos parámetros en dichas células con el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij>).

- Análisis del tamaño del soma y el diámetro de la dendrita principal:

El tamaño del soma neuronal y el diámetro de la dendrita principal fueron analizados utilizando el software Image J en imágenes 63x tomadas a CPCs marcadas con Calbindina-d28K, que marca todo el cuerpo celular y axonal/dendrítico, y TGN46, marcador exclusivo del aparato de Golgi humano.

- **Análisis del crecimiento neuronal:**

Se analizaron los siguientes parámetros asociados al desarrollo neuronal de las CPCs:

- Crecimiento neuronal total o *mean total outgrowth*.
- Media del número total de procesos primarios o *mean processes*
- Media de número total de ramificaciones o *mean branches*.

Para analizar dichos parámetros, las CPCs se marcaron con marcadas con Calbindina-d28K, que marca todo el cuerpo celular y axonal/dendrítico, y TGN46, marcador exclusivo del aparato de Golgi humano y se tomaron imágenes en 2-4 canales dependiendo de las condiciones, de 5-7 series z de cada línea celular con incrementos de 1 μm con un objetivo de 63x en el microscopio Leica SP8 descrito en el apartado **2.11.** de **E. Materiales y métodos** de este trabajo.

Para el análisis mediante el software Image J, se utilizaron las proyecciones máximas de las imágenes tomadas comprimidas por el software LasX de Leica. A continuación, con Image J, se juntaron los distintos canales en un proyecto Z, se escalaron y se convirtieron imágenes 8-bit para su análisis por NeuronJ (<http://www.imagescience.org/meijering/software/neuronj/>), complemento de ImageJ para facilitar el seguimiento y la cuantificación de estructuras de imágenes. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2661008/>)

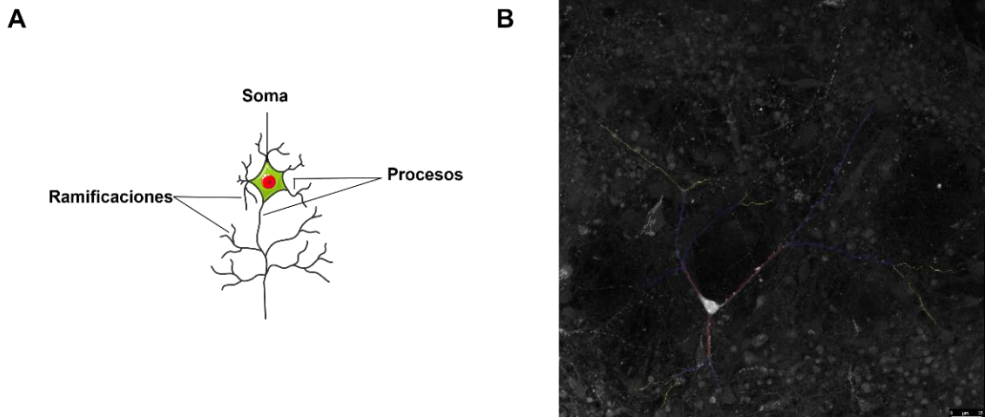


Figura E5. Imagen representativa del análisis morfológico de una célula Purkinje ce cerebelo derivada de hiPSCs a día 130. **A)** Esquema en dibujo de los procesos o neuritas primarias, ramificaciones y soma en una neurona. **B)** Estructuras neuronales dibujadas con NeuronJ.

- Análisis de marcadores sinápticos:

Para cuantificar los marcadores presinápticos y postsinápticos, se realizó un análisis cuantitativo de imágenes utilizando el software Imagen J. Se seleccionaron las CPCs humanas marcadas con Calbindina-d28k y TGN46 humano, además de VGAT como marcador de vesículas presinápticas. Se tomaron imágenes en cuatro canales manteniendo el tiempo de exposición para la captura de imágenes, en series de 7-10 series z de cada línea celular con incrementos de 1 μm con un objetivo de 63x en el microscopio confocal Leica SP8 descrito en la sección 2.11 de **E. Materiales y métodos** de este trabajo.

Se generó una proyección Z máxima colapsada de imágenes para cada canal dentro de una serie z. Para los puntos presinápticos y postsinápticos, las proyecciones máximas se convirtieron a escala de grises y se utilizaron canales de marcadores individuales para definir los umbrales. Las imágenes de umbral se combinaron luego con el canal Calbindina-d28k para cuantificar la densidad de puntos.

2.13 Extracción de DNA genómico

Para realizar la extracción de DNA genómico se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (#69504. Qiagen, Manchester, Reino Unido) y se siguió el protocolo “*Purification of Total DNA From Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol)*”. La cuantificación se realizó utilizando el NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.14 Secuenciación de mutaciones

Se extrajo DNA genómico de los fibroblastos y de las líneas hiPSCS generadas de pacientes y portadores PLAN y ARSACS usando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (#69504. Qiagen, Manchester, Reino Unido). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en termocicladores Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EE. UU.). El programa de PCR general empleado se describe en la [Tabla E5](#), variando las temperaturas de hibridación en función del amplicón. Los *primers* utilizados para la amplificación y secuenciación directa de los sitios específicos de las mutaciones analizadas se encuentran indicados en la [Tabla F3](#) de [F. Anexos.](#)

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL, siguiendo unas condiciones de PCR estándar, indicadas en la [Tabla F3](#), usando el kit MyTaq DNA polimerase Kit (#BIO-21105. Biorline GmbH, Luckenwalde, Alemania). Los productos de PCR se visualizaron empleando Redsafe Nucleic Acid Staining Solution 20000X (#21141. Intron Biotechnology, Corea del Sur), en geles de agarosa al 1%, preparados con TAE 1% (Tris, acetato, EDTA y H₂O) y agarosa de baja EEO (#804500. Condalab, Madrid, España).

La secuenciación Sanger de los productos de PCR se realizó en el Servicio de Genómica y Genética del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, España),

en el analizador genético 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, California, EE. UU.). Los electroferogramas obtenidos se analizaron con el software libre Chromas versión 2.5 y, empleando la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), comparando las secuencias obtenidas con las de referencia del genoma (<https://grch37.ensembl.org/>) para identificar las mutaciones.

Tabla E5. Programa empleado para realizar RT-PCR.

Fases	Temperatura (°C)	Tiempo	N.º de ciclos
Pre-incubación o activación	95	2 min	1
Amplificación	95	30 s	35
	X	30 s	
	72	30 s	
Elongación	72	10 minutos	1
Conservación	4	∞	/

2.15 Análisis de la huella genética o *fingerprinting*

Se extrajo DNA genómico de los fibroblastos y de las líneas hiPSCS generadas pacientes y portadores PLAN y ARSACS usando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (#69504, Qiagen, Manchester, Reino Unido) en presencia de 1,78 mg/mL de RNasa A (Roche #10154105103). El análisis de *fingerprinting* se llevó a cabo con un equipo Abi PRISM 3130 Genetic Analyzer using GeneMapper (Thermo Fisher, California, EE. UU) por el Biobanco de Sistema Sanitario Público (Granada, España). Se analizaron 5 marcadores microsátélites (*D19S572*, *D2S159*, *D14S972*, *D8S601* y *D9S1853*), comparando la muestra de origen (fibroblastos) y la línea hiPSCs generada correspondiente.

Los datos obtenidos del estudio de la huella genética no se exponen públicamente en este trabajo debido a la ley de protección de datos.

2.16 Análisis de cariotipo

El cariotipo de los fibroblastos de pacientes y portadores PLAN y ARSACS y de las hiPSCs generadas correspondientes se realizó por la técnica de Bando G con una resolución de banda de 440-550. Al menos 30-40 metafases se analizaron por muestra por el Servicio de Biobanco del Sistema Sanitario Público Andaluz (Granada, España) o por el Grupo de Genética Traslacional del Hospital Universitari i Politècnic la Fe (Valencia, España), dependiendo de la disponibilidad del servicio.

Para llevar a cabo este análisis, las células hiPSCs se cultivaron en condiciones de cultivo *feeder-free* sobre Corning Matrigel hESC-qualified Matrix (#354277. Corning, NY, EE. UU.) con mTeSR1 (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) durante 3 o 4 días. Cuando la confluencia del cultivo de hiPSCs o fibroblastos alcanzó el 70%, se enviaron al servicio de análisis en cultivo o en suspensión y a temperatura ambiente, habiendo pasado previamente por una incubación de 16 horas a 10 ng/ μ L con PBS KaryoMAX™ Colcemid™ (#15212012. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) para parar el ciclo celular de las células en metafase, impidiendo la formación del uso mitótico durante la mitosis, y para que los cromosomas se puedan separar y visualizar para el estudio del cariotipo.

Se utiliza la técnica del bando G porque permite definir y estudiar cada cromosoma por su patrón de bandas característico y visualizar las anomalías cromosómicas más importantes al microscopio óptico.

Se recibieron los informes del Biobanco del Servicio (Granada) y de la Unidad de Genética/ Grupo de Investigación Traslacional en Genética del Hospital Universitario la Fe (Valencia) en los que se muestra el resultado de la tinción con Giemsa de las bandas de los cromosomas de una de las 40 metafases analizadas.

2.17 Ensayo de diferenciación *in vitro* de cuerpos embrioides

Para analizar la capacidad de diferenciación de las líneas hiPSCs generadas, se realizó el ensayo de diferenciación *in vitro* de las hiPSCs a EBs. Para ello, se partió de una placa por línea de 6 pocillos de hiPSCs confluentes (90-95%) en cultivo *feeder-free* y se levantaron con Versene Solution 1X (#15040066. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) para cultivarse en suspensión sobre placas de 6 pocillos *ULA* en medio mTeSR™1 (#05850. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) con Y-27632 a 10 µM (#72302. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) durante las primeras 24 horas y aumentar la viabilidad de los EBs.

Pasadas las primeras 24 horas se cambió el medio a medio hiPSCs con KSR al 10% y sin *bFGF* (#13256-029. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.). Cada dos días se cambió el medio hasta que el día 7 de cultivo en *ULA*, los EBs formados se rompieron en fragmentos medianos y pasaron a cultivar sobre cubreobjetos de vidrio estériles de 13 mm recubiertos previamente por gelatina al 0,1% (# G2500. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) durante 15 días más para favorecer la diferenciación espontánea y migración de las células por el pocillo. Pasados los 15 días de cultivo en adherencia, y a 21 días del protocolo general, las células se fijaron y se marcaron con anticuerpos específicos para detectar la formación y presencia de las tres capas germinales, mesodermo, endodermo y ectodermo como se indica en la sección 2.17 de E. **Materiales y métodos** del presente trabajo.

Las preparaciones fueron analizadas por imagen de fluorescencia mediante un microscopio Confocal Leica SP8. Los anticuerpos utilizados se recogen en la [Tabla F1 y F2](#) en [F. Anexos](#).

2.18 Tinción por Fosfatasa Alcalina

La fosfatasa alcalina o *alkaline phosphatase* (AP) es una enzima con actividad hidrolasa que se encarga de desfosforilar proteínas, nucleótidos y alcaloides en condiciones alcalinas. La AP se expresa en niveles altos en las células madre pluripotentes donde regula la proliferación y autorenovación de las células pluripotentes, por lo que es considerado un marcador de dichas células (181). Esta tinción se utilizó para caracterizar el estado indiferenciado y característica de potencial de autorrenovación de las líneas hiPSCs generadas en el presente trabajo.

Para ello se utilizó el kit StemAb™ Alkaline Phosphatase Staining Kit II (#00-0055. Stemgent™ by Reprocell, Glasgow, Reino Unido) siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial por el cual las células hiPSCs cultivadas en condiciones *feeder-free* durante al menos 5 días, se lavaron con PBS suplementado con Tween®20 (#P1379. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) (PBS-T) y se fijaron con una solución fijadora específica del kit durante 3-5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró la solución fijadora, se volvieron a lavar con PBS-T y se añadió la solución de sustrato AP, dejándolas incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 5-15 minutos.

Las hiPSCs indiferenciadas fijadas con el kit de tinción AP serian moradas, mientras que las células diferenciadas incoloras.

2.19 Detección de contaminación por micoplasma

La presencia de micoplasma en el cultivo de hiPSCs se analizó periódicamente midiendo la actividad enzimática de ciertas enzimas micoplasmáticas en el medio de cultivo habiendo pasado al menos 24 horas de cultivo de las hiPSCs y en ningún caso se detectó la presencia de contaminación.

Para analizar si había contaminación por micoplasma en los cultivos, se utilizó el kit MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit (#LT07-710. Lonza, Basilea, Suiza) y se siguió el protocolo establecido por la casa comercial. Si en el cultivo había presencia de enzimas micoplasmáticas, éstas reaccionarían con el sustrato de MycoAlert™ PLUS, que cataliza la conversión de ADP a ATP por acción de una luciferasa y emitiendo una señal de bioluminiscencia.

Se hicieron dos medidas en el espectrofotómetro (PERKIN ELMER WALLAC VICTOR 2 Spectrophotometer, Waltham, Massachusetts EE. UU.) para detectar el posible aumento de bioluminiscencia usando el protocolo descrito en la [Figura E6](#), una medida A antes de la adición del sustrato, una segunda medida B después de la adición del sustrato. Se analizó el ratio de las lecturas A/B de las muestras correspondientes a las hiPSCs con respecto al ratio de lectura de un control positivo MycoAlert™ Positive Control (#LT07-518. Lonza, Basilea, Suiza) y con respecto al control negativo, siendo este MycoAlert™ PLUS Assay Buffer. Si las enzimas de micoplasma no están presentes, la lectura B no muestra ningún aumento con respecto a la lectura A puesto que no hay aumento de ATP en el medio al no haber lisado el micoplasma las células y no haber ATP presente en el medio.

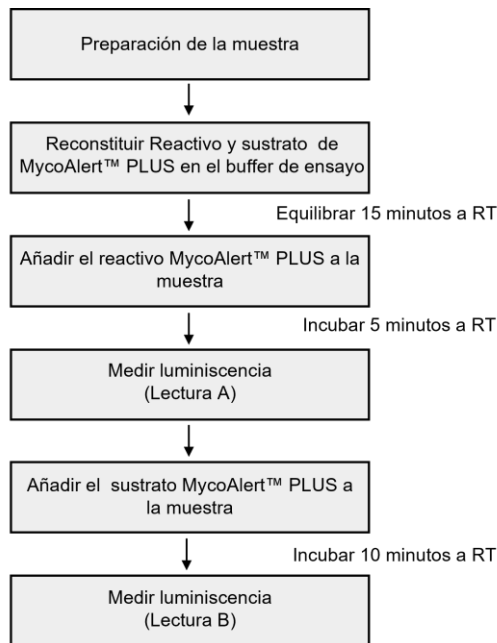


Figura E6. Protocolo de detección de Micoplasma.

2.20 Análisis de imagen por Incell Analyzer

El potencial de membrana mitocondrial se analizó a través del Reactivo Image-iT™ TMRM (*Tetramethylrhodamine*) (#T668, Invitrogen™, Waltham, Massachusetts EE. UU.). El TMRM penetra en las células y se acumula en las mitocondrias activas con potenciales de membrana intactos generando una señal fluorescente que es cuantificable, lo que permitió evaluar el grado de polarización de la membrana mitocondrial, a más señal fluorescente más polarizada.

Para analizar el potencial de membrana mitocondrial en precursores cerebelares derivados de las distintas líneas hiPSCs generadas en este trabajo, se sembraron 20.000 células por pocillo a día 30 en placa multipocillos p96 (#161093, ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) y se cultivaron durante 72

horas. Pasadas las 72 horas, se retiró el medio y se incubaron con Tetramethylrhodamine (TMRM) (#T668. Invitrogen™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) a 5 nM y *Mitotracker Deep Red* a 100 nM (#M22426. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) en medio de cultivo durante 30 minutos a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, las células se lavaron con *PBS 1X* (#BE17-516F. Lonza. Basilea, Suiza) y se añadió de nuevo medio de cultivo con *TMRM* a 2 nM (#T668. Invitrogen™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), *Mitotracker Deep Red* (#M22426. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) a 100 nM y Hoechst 33342 a 2 µg/mL, y se incubaron durante 10 minutos a 37°C y 5% CO₂. Las imágenes se tomaron mediante el equipo IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare. GE Healthcare, Chicago, Illinois, EE. UU.) en condiciones de temperatura de 37°C y 5% CO₂.

Se realizaron imágenes de fluorescencia TMRM de células positivas para *Mitotracker Deep Red* (#M22426. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) para comparar el potencial relativo de membrana mitocondrial con la masa mitocondrial total. Se analizó un mínimo de 300 neuronas para cada línea en al menos tres experimentos independientes de diferenciación *neuronal*. La utilización de *Mitotracker Deep Red* (#M22426. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) y Hoechst 33342 se utilizó para normalizar a la masa mitocondrial y el número de células.

Para analizar la presencia de especies reactivas de oxígeno o *reactive oxygen species* (ROS) en las mitocondrias de precursores cerebelares derivados de las distintas líneas hiPSCs PLAN y ARSACS generadas, se sembraron 20.000 células por pocillo a día 30 en placa multipocillos p96 (#161093. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) y se cultivaron durante 72 horas. Pasadas éstas, se retiró el medio y se incubaron con la sonda *MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator for live-cell imaging* (#M36008. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts

EE. UU.) a 500 nM y *MitoTracker™ Green FM* a 150 nM (#M7514. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) en medio de cultivo durante media hora a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X (#BE17-516F. Lonza. Basilea, Suiza) y se añadió HBSS+Ca²⁺+Mg²⁺ (#14025092 ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con *MitoSOX* (#M36008. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), *MitoTracker™ Green FM* (#M7514. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) a 100 nM y Hoechst 33342 a 2 µg/mL, y se incubaron durante 10 minutos a 37°C y 5% CO₂. Las imágenes se hicieron con el equipo IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EE. UU.) a 37°C y 5% CO₂.

Se tomaron imágenes de fluorescencia *MitoSOX™ Red* (#M36008. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) de células positivas para *MitoTracker™ Green FM* (#M7514. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) para cuantificar la cantidad de ROS solo en las mitocondrias de los precursores cerebelares. Se analizó un mínimo de 300 neuronas para cada línea en al menos tres experimentos independientes de diferenciación neuronal.

2.21 Análisis de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico

Para analizar los niveles de peroxidación lipídica en precursores cerebelares de pacientes PLAN con respecto a portadores y controles, se utilizó el método de detección de sustancias reactivas o *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) con ácido tiobarbitúrico (TBA). El ácido tiobarbitúrico reacciona con especies derivadas de la peroxidación lipídica como el MDA, aunque no en exclusiva, reaccionando también con otras TBARS.

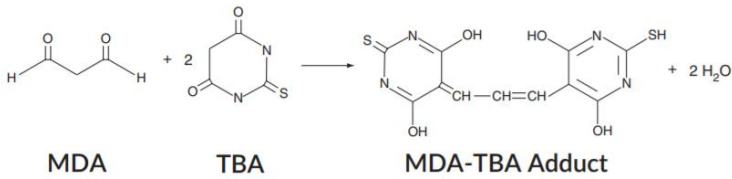


Figura E7 Reacción de malondialdehído (MDA) con ácido tiobarbitúrico (TBA).

A los precursores cerebelares a día 30 sembrados en placa de multipocillo p24 se les retiró el medio y se lavó con PBS 1X (#BE17-516F. Lonza. Basilea, Suiza) en frío y se añadió 40ul/pocillo de *RIPA Lysis Buffer System* (#sc-24948. Santa Cruz Biotech. Dallas, Texas, EE. UU.). Las muestras se centrifugaron a 1600 g durante 10 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se congeló a menos -80°C hasta su uso para el ensayo TBARS. La muestra es estable al menos un mes a -80°C.

Para realizar el ensayo se utilizó el *TBARS assay kit* (#10009055. Cayman chemicals, Ann Arbor, Michigan, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del comerciante con algunas modificaciones. En primer lugar, se preparó una curva patrón a partir de una solución estándar de MDA a 500 μM con H_2O miliQ para obtener una concentración final de 125 μM (Tabla E6). A la curva estándar se le añadió SDS y reactivo colorante, se agitó y se hirvió a 100°C durante 1 hora. El tratamiento de las muestras fue el mismo que el de la curva patrón. Todos los reactivos fueron atemperados previamente durante 1-2 horas a temperatura ambiente.

Tabla E6. Curva patrón MDA TBARS *assay kit*.

Concentración MDA (μM)	Tubo	Solución MDA estándar (μl)	H ₂ O (μl)
0	A	0	100
0.0625	B	0.5	99.5
0.125	C	1	99
0.25	D	2	98
0.5	E	4	96
1	F	8	92
2.5	G	20	80
5	H	40	60

Tras calentar 1 hora las muestras y la curva patrón a 100°C, la reacción se paró poniendo los viales en hielo durante 10 minutos. A continuación, la curva patrón y las muestras se centrifugaron 10 minutos a 1600 g a 4°C, se recogieron los sobrenadantes y se dejaron a temperatura ambiente para eliminar la posible turbidez presente, siendo estables un máximo de 30 minutos a temperatura ambiente. Se cargaron 150 μL por duplicado y por pocillo en una placa multipocillo de 96 las muestras correspondientes a la curva patrón y las muestras de interés y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (PERKIN ELMER WALLAC VICTOR 2 Spectrophotometer, Waltham, Massachusetts EE. UU.) a 530 nm de excitación - 550nm de emisión.

A los datos obtenidos se les restó el valor de fluorescencia del punto de la recta patrón correspondiente a 0 mM de MDA para corregir la absorbancia. Los datos de absorbancia corregida de la curva de patrón se representaron gráficamente para obtener la ecuación de la recta de regresión que se utilizó para extrapolar los resultados de los valores obtenidos para las muestras de interés expresados en nmol/mL. Estos datos se extrapolaron a los mg/mL de proteína anteriormente cuantificados.

2.22 Determinación del consumo de oxígeno: Respiración mitocondrial y bioenergética celular

Esta metodología se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Agustín Lahoz de la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión (UBYMP) del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (Valencia, España).

La determinación de la tasa de consumo de oxígeno u *Oxygen Consumption Rate* (OCR) como indicador de la respiración mitocondrial, y la acidificación del medio extracelular o *Extracellular Acidification Rate* (ECAR) como indicador de glucólisis celular, se evaluó mediante el uso de un analizador de flujo extracelular o Seahorse XFe96 Analyzer (Seahorse Bioscience, Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.).

Con el fin de estudiar la función mitocondrial en los precursores cerebelares generados a partir de las líneas hiPSCs de PLAN y ARSACS y sus correspondientes portadores, se utilizó el Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (#103015-100. Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.), bajo las indicaciones del fabricante, que permite medir de manera directa el OCR mediante el uso de moduladores de la cadena de transporte de electrones (CTE) de manera secuencial. Este ensayo permitió medir múltiples parámetros que dan una idea del mecanismo de la disfunción mitocondrial en células vivas como la respiración mitocondrial, la respiración ligada a la producción de ATP, la fuga de protones, la capacidad respiratoria de reserva, la capacidad máxima respiratoria y la respiración no-mitocondrial.

Para ello, siguiendo las instrucciones detalladas en la **Figura E9**, se sembraron los precursores a día 30 del protocolo de diferenciación en placas multipocillos p96 (*cell culture miniplates 96 wells Seahorse XFp Agilent, Santa Clara, California, EE.*

UU.) especiales que contienen biosensores fluorescentes (O_2 y pH) a una confluencia de 60.000 células/pocillo. Durante 72 horas, se cultivaron en 80 μ L de medio Neurobasal-A (#11540366 Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, USA), N2 supplement 1x (#17502048. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), B27-A supplement 1X (#12587010. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), 1% BSA (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), BDNF a 10 ng/mL (#450-02. Peprotech by ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), 30 μ M T3 (#T6397. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y bFGF a 10 ng/mL (#13256-029. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) para favorecer el asentamiento del cultivo y el crecimiento celular. Se añadió Y-27632 a 10 μ M (#72302. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) durante las primeras 24 horas, después se cambió la mitad del medio y a las 48 horas la otra mitad del medio sin Y-27632.

Pasadas 72 horas y 1 hora antes del ensayo, se retiró completamente el medio y se lavaron los pocillos añadiendo 200 μ L/pocillo de medio *Seahorse XF DMEM assay* (#103575-100. Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.) suplementado con glucosa (#103577-100. Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.), glutamina (#103579-100. Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.), y piruvato (#103578-100. Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.), a concentraciones finales de 10 mM, 2 mM y 1 mM respectivamente. A continuación, se añadieron 180 μ L/pocillo de medio DMEM XF suplementado y se incubó 1 hora en estufa a 37°C sin CO_2 .

Para realizar el ensayo es necesario que los sensores de cada pocillo se hidraten con la solución de calibración, por lo que entre 6-23h horas antes del ensayo, se añadieron 200 μ L de Seahorse XF Calibrant Solution (#100840-000. Agilent, Santa Clara, California, EE. UU.) a la placa inferior del cartucho. A continuación, el cartucho (placa superior verde) que contiene las sondas fluorescentes, se colocó

con mucho cuidado y sin hacer burbujas, como se indica en la **Figura E9**. Se deja en estufa a 37°C sin CO₂ ni ventiladores toda la noche. Al día siguiente, y una hora antes del ensayo, el cartucho se sacó de la estufa y se cargaron los cuatro puertos de inyección (A-D) con los inhibidores correspondientes, dejando el orificio central libre por donde se introdujo la sonda con la fibra óptica, tal y como se describe en la **Figura E9**. Todos los puertos de inyección que se utilizaron estuvieron llenos en todos los pocillos, habiendo o no células, para evitar que se inyectase aire en los pocillos. Los volúmenes de inyección fueron: 20 µL para el puerto A, 22 µL para el puerto B, 25 µL para el puerto C y 28 µL para el puerto D. Los inhibidores que se cargaron en los distintos puertos fueron los siguientes:

- Puerto A: Inhibidor de la ATP sintasa o complejo V de la cadena de electrones (oligomicina) a 1.5 µM.
- Puerto B: Desacoplante de la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria (carbonilo cianuro-4 (trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP)) a 1 µM.
- Puerto C: Inhibidores del complejo I y III de la cadena respiratoria respectivamente (Rotenona/Antimicina A) a 0,5 µM.
- Puerto D: Seahorse XF DMEM assay suplementado.

Antes de realizar las medidas de oxígeno en las células de interés, se llevó a cabo la calibración de O₂ y pH de los biosensores del cartucho, con los puertos cargados y en la solución de calibración. A continuación, el cartucho se retiró de la solución de calibración y se introdujo en la placa con las células sembradas para realizar el ensayo, como se indica en la **Figura E9**.

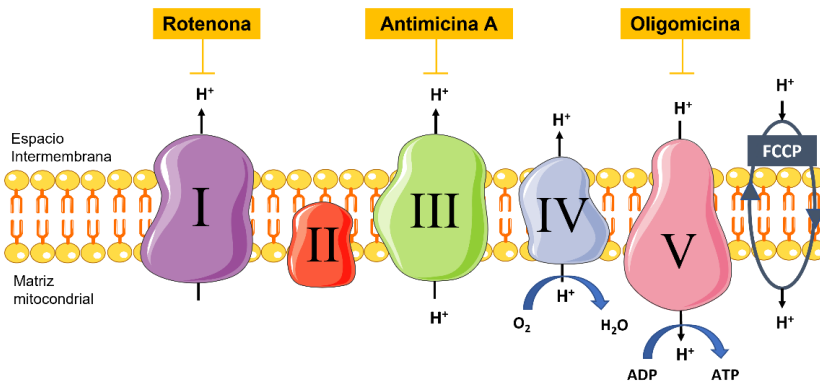


Figura E8. Representación gráfica de la inhibición de los complejos de la cadena de transporte de electrones. Efecto de los reactivos inyectados a lo largo de la determinación de la respiración celular. Figura realizada utilizando elementos de SMART (Servier Medical Art), Creative Commons.

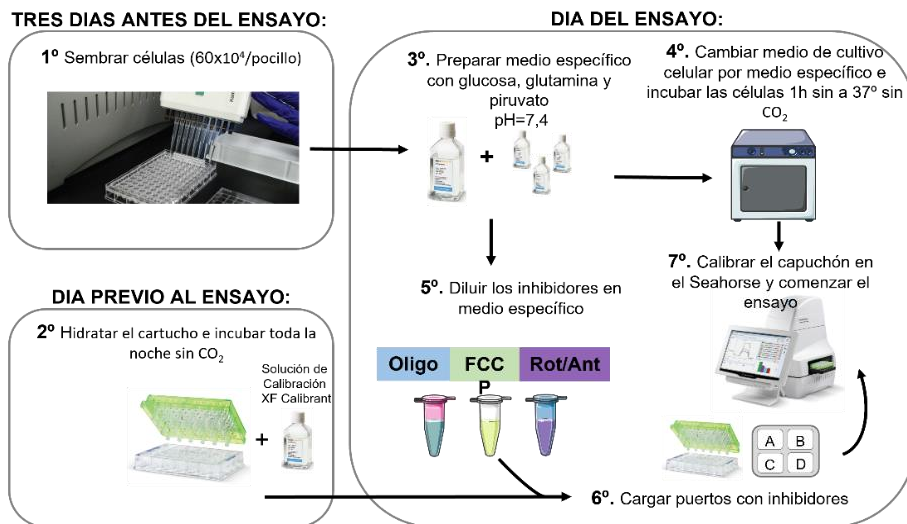


Figura E9 Representación esquemática del flujo de trabajo seguido en la realización del ensayo de respiración mitocondrial con Seahorse XFp. Cel: célula. Rot/Ant: rotenona/antimicina. Oligo: oligomicina. Figura realizada utilizando elementos de SMART (Servier Medical Art), Creative Commons.

Los datos de consumo de oxígeno obtenidos de cada pocillo se corrigieron por fluorescencia total obtenida por marcaje de núcleos con Hoechst 33342 a 2 $\mu\text{g/mL}$, y se expresan como pmoles de oxígeno consumido por minuto (**Figura E10**). A partir de los valores obtenidos (**Figura E10**), se calculan los siguientes parámetros mediante la aplicación de las ecuaciones recogidas en la **Tabla E7**.

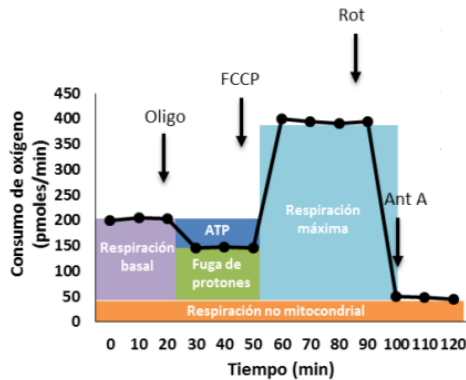


Figura E10 Medición a tiempo real de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) tras la inyección, de Oligo, FCCP y de Rot/Ant con el fin de calcular los diferentes parámetros. Ejemplo ilustrativo del perfil de consumo de oxígeno de una línea celular tras la inyección de los 4 compuestos: oligomicina 6 μM (Oligo), FCCP 2 μM (FCCP), rotenona 1 μM (Rot) y antomicina 1 μM (Ant A). Figura obtenida de Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.

Tabla E7 Parámetros y cálculos realizados a partir de los datos adquiridos tras llevar a cabo el protocolo Cell Mito Stress Test del Seahorse XFP. Tabla obtenida de Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.

<i>Cell Mito Stress Test Kit</i>	
<i>PARÁMETRO</i>	<i>ECUACIÓN</i>
O ₂ no-mitocondrial	tasa de OCR mínima después de inyectar Rot/Ant
Respiración Basal	(última medida de OCR antes de inyectar Oligo) - (consumo de oxígeno NO-mitocondrial)
Respiración máxima	(tasa de OCR máxima después de inyectar FCCP) - (consumo de oxígeno NO-mitocondrial)
H ⁺ Leak	(tasa de OCR mínima después de inyectar FCCP) - (consumo de oxígeno NO-mitocondrial)
Producción de ATP	(última medida de OCR antes de inyectar Oligo) - (tasa de OCR mínima después de inyectar Oligo)
Capacidad respiratoria	(respiración máxima) - (respiración basal)

OCR: Tasa de consumo de oxígeno. Rot/Ant: rotenona/antimicina. Oligo: oligomicina

El equipo Seahorse XFe96 Analyzer también es capaz de medir la acidificación del medio provocada por la liberación de protones al medio extracelular derivados de la conversión de glucosa a piruvato (glucolisis) y de la obtención de energía a través de la cadena de transporte de electrones y del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (**Figura E11**).

Sin embargo, aunque el experimento llevado a cabo para estudiar la función mitocondrial con el Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit generó datos que permitieron analizar el ECAR basal de los CCPs de pacientes y portadores PLAN y ARSACS respecto al control a día 30 del protocolo, estos son solo aproximados debido a la adición de glutamina al inicio del ensayo.

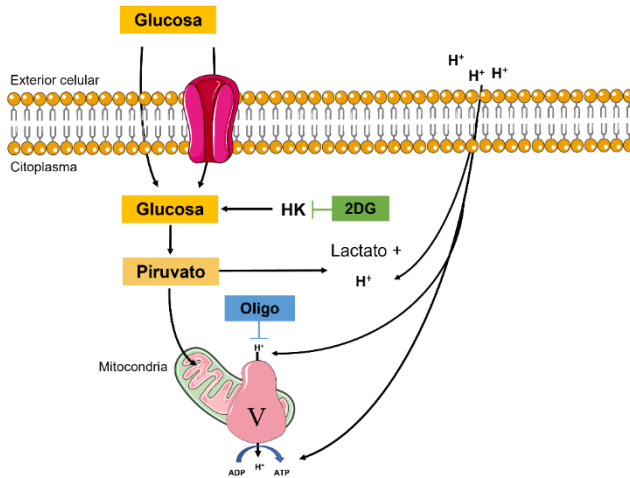


Figura E11. Representación gráfica de como los inhibidores modulan la acidificación del medio extracelular. Figura realizada utilizando elementos de SMART (Servier Medical Art), Creative Commons.

Los datos de acidificación máxima se obtuvieron con los datos generados tras la adición de la oligomicina (y previos a la adición de FCCP), inhibiendo la función mitocondrial y forzando a la célula a obtener toda su energía a través del proceso glucolítico. Los valores exactos asociados a la glucólisis no pudieron obtenerse en este experimento por la adición de piruvato al medio celular al inicio del protocolo, enmascarando así la producción de la propia célula.

Los datos de liberación de protones obtenidos de cada pocillo se corrigieron por fluorescencia total obtenida por marcaje de núcleos con Hoechst 33342 a 2 µg/mL, lo que permitió medir la acidificación extracelular expresada en unidades de mili-pH por minuto. Cada una de las líneas testadas se estudiaron por cuadruplicado o quintuplicado (replica técnica) en tres diferenciaciones neuronales distintas. El análisis de todos los datos obtenidos se realizó utilizando el software Wave (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.).

2.23 Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas de los precursores cerebelares, se retiró el medio de cultivo y se lavaron con *PBS* 1X frío (#BE17-516F. Lonza. Basilea, Suiza). A continuación, se añadió *RIPA Lysis Buffer System* (#sc-24948. Santa Cruz Biotech. Dallas, Texas, EE. UU.) a baja temperatura directamente a la placa de cultivo o pocillo de interés para lisar las células, con ayuda de una punta de pipeta p1000 o rascador. La mezcla se recogió en un tubo de polipropileno y se dejó en hielo 30 minutos. Cada 10 minutos las muestras fueron agitadas en vortex durante 15 segundos. Pasados los 30 minutos las muestras se sonicaron en un baño sonicador durante 30 segundos, 3 veces y con descansos de 30 segundos. Posteriormente las muestras se centrifugaron 10 minutos a 4C a 12.000 rpm y se recogió el sobrenadante.

La concentración de las proteínas extraídas se determinó por el método colorimétrico del reactivo Bradford (#B6916. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se pipetearon 5 μL de una curva estándar de BSA (#B6917. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) (puntos desde 0 a 2mg/mL) y 5 μL de la muestra (diluida o no) en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añadieron 200 μL del Reactivo de Bradford por pocillo. Después de 10 minutos de incubación se leyó la absorbancia con un lector de placas a una longitud de onda de 595 nm. Las concentraciones de proteínas se calcularon basándose en la ecuación de la recta patrón y la absorbancia media de los duplicados de las muestras.

2.24 Western blot

Para la identificación y cuantificación de proteínas presentes en las muestras, se utilizó la técnica conocida como Western blot (WB), que permite la unión específica de antígeno de proteína-anticuerpo, atendiendo al peso molecular de las proteínas.

Las proteínas extraídas de las muestras en estudio (10-20 μg de proteína por carril/muestra) se mezclaron con tampón de carga 4X (con DTT) y se incubaron 5 minutos a 95°C para desnaturalizar las proteínas. A continuación, las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones reductoras en geles desnaturalizantes de poliácridamida del 10% al 15% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó en el sistema Criterion™ Cell (BioRad, Hercules, California, EE. UU.) conectándolo a la fuente PowerPac™ Basic Power Supply (BioRad, Hercules, California, EE. UU.), donde se le aplicó una corriente de 90V durante media hora hasta superar el gel concentrador y después se aplicó una corriente de 100V durante hora y media a 4 horas aproximadamente, dependiendo del porcentaje del gel de poliácridamida. A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (#1620177. BioRad, Hercules, California, EE. UU.) en el sistema húmedo convencional Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.) en un tampón de transferencia que contenía Tris 25 mM pH 8.8, glicina 150 mM, metanol 20% (vol/vol) y agua destilada. La transferencia se realizó a 4°C durante toda la noche y a 30 V.

Finalizada la transferencia, se bloqueó la membrana durante 1 hora y a temperatura ambiente en una solución de TBS-Tween 1X (#P1379. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) (TBS-T) con leche en polvo desnatada al 5% o BSA al 5% (#B6917. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.). Una vez bloqueada la membrana, se retiró la solución de bloqueo y se añadió el correspondiente anticuerpo primario (**Tabla F1** en **F. Anexos**), diluido en solución de bloqueo y se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se retiró el anticuerpo y se realizaron tres lavados

rápidos con TBS-T y otros tres de 10 minutos cada uno, todo ello en agitación y a temperatura ambiente.

Después de lavar para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios correspondiente conjugados con peroxidasa (complejo HRP) (**Tabla F2 en F. Anexos**) y diluidos en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se retiró el anticuerpo secundario y se lavó la membrana con tres lavados rápidos con TBS-T 1X, tres de 10 minutos cada uno y un cuarto lavado de 10 minutos con TBS 1X, todo ello en agitación y a temperatura ambiente. Finalmente se procedió a la inmunodetección de los complejos mediante el kit de revelado *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific, Wilmington, Reino Unido), originando un producto quimioluminiscente por la reacción del sustrato del kit de revelado con el complejo HRP conjugado al anticuerpo secundario. Este producto quimioluminiscente correspondiente a la proteína en estudio es detectado el sistema de revelador *Alliance Q9 Advanced* (UVITEQ, Cambridge, Reino Unido).

Los resultados se cuantificaron mediante densitometría utilizando el software ImageJ.

2.25 Citometría de flujo

Las placas de cultivo que contenían hiPSCs se lavaron con un volumen apropiado de DPBS-Ca²⁺-Mg²⁺ 1X (#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.), se añadió ACCUTASE™ (#07922. StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) y se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% durante 5 minutos. Una vez que las células se empiezan a desprender de la superficie de la placa, se añadió DPBS-Ca²⁺-Mg²⁺ 1X (#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE.UU.) con P/S 1X

(#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) y BSA al 1% (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) para inactivar ACCUTASE™, recogiendo la mezcla en un tubo de centrifuga estéril de 15 mL. Se pipetearon suavemente las células hacia arriba y hacia abajo varias veces para su completa disgregación en células individuales. Las placas se lavaron con DPBS-Ca²⁺-Mg²⁺ 1X (#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) y BSA al 1% (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) para asegurar la recolección completa de las células. A continuación, los tubos de 15 mL con la mezcla de células y ACCUTASE™ se centrifugaron durante 5 minutos a 200xg para eliminar la ACCUTASE™ con el sobrenadante. Las células, situadas en el fondo del tubo, se resuspendieron en 200 μ l/4x10⁴ células con DPBS-Ca²⁺-Mg²⁺ 1X (#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE.UU.), BSA al 1% (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y EDTA 1 mM, y se añadieron los anticuerpos primarios conjugados a fluoróforo a distintas diluciones. Se prepararon también tubos de 400 μ l/2x10⁴ células con el isotipo correspondiente a cada anticuerpo y tubos con células sin marcar. Los anticuerpos primarios e isotipos se recogen en la **Tabla F1** en **F. Anexos**.

Las células se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en completa oscuridad y en movimiento. Pasado el tiempo y para lavar las células, se agregaron 5 mL de DPBS-Ca²⁺-Mg²⁺ 1X (#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), BSA al 1% (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y EDTA 1 mM a cada tubo de 15 mL que contenían células con y sin anticuerpo y se centrifugaron 5 min a 200xg. Los sobrenadantes se descartaron y las células se resuspendieron en 400 μ l de tampón FACS compuesto por DPBS-Ca²⁺-Mg²⁺ 1X

(#14190144. ThermoFisher™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) con P/S 1X (#15140-163. Gibco by Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), BSA al 1% (#10735094001. Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y 25 µg/mL de DNase I (#1010415900. Roche, Basilea, Suiza).

El marcaje celular por los anticuerpos, isotipo y controles negativos se analizaron en el Citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter. Brea, California, EE. UU.) y los datos fueron analizados con el software CytExpert 2.0.

2.26 Análisis electrofisiológico neuronal: *Whole-cell Patch clamp*

Esta metodología y el análisis de los datos obtenidos se llevaron a cabo en colaboración con el laboratorio de Plasticidad Neuronal de la Dra. Isabel del Pino en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, España).

- Metodología y fundamento

Todos los registros de *patch-clamp* de esta tesis se realizaron en modo de célula entera (*whole-cell patch-clamp*), que permite registrar el comportamiento eléctrico de la membrana de una única neurona gracias al establecimiento de comunicación directa entre el citoplasma de dicha neurona y el líquido que se encuentra en el interior de la micropipeta.

Los registros de *whole-cell patch-clamp* se realizaron a temperatura ambiente (25°C) y 95 días después de que las células humanas THY1⁺ seleccionadas de los precursores cerebelares fueran plaqueadas en el cultivo de células granulares de ratón en cubreobjetos de borosilicato recubiertos de poli-D-lisina/laminina (día 130 del protocolo de diferenciación en la [Figura E4](#)). Los registros se obtuvieron un

Axopatch-1D amplifier (Molecular Devices) y se digitalizaron con un DigiData 1200 (Molecular Devices). Los resultados analizados *offline* usando un software específico.

Se realizó *patch-clamp* visual con un microscopio conectado a una cámara que permitió elegir visualmente aquellas neuronas de Purkinje para registrar, identificadas en el co-cultivo por su morfología distintiva de células grandes con somas ovas y muchas neuritas, que además presentaban un tono brillante y uniforme (Figura E12). Para hacer el registro se situó la micropipeta encima de una de las células y se realizó un sello de alta resistencia ($G\Omega$) entre la membrana celular y la pipeta de vidrio borosilicato en cuyo interior se encuentra el electrodo de plata clorada (electrodo de *patch clamp*). Se aplicó una ligera presión negativa para que se romper la membrana celular y quedase el electrodo dentro de la célula. Además del electrodo de *patch clamp* que contacta con el interior celular, el electrodo de referencia (también de plata clorada) se sumerge en el flujo de la solución externa de la cámara donde se encuentran las células, permitiendo medir así la diferencia de potencial a ambos lados de la membrana.

Se utilizaron capilares de vidrio (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts EE. UU.) para construir las micropipetas de *patch clamp* que acoplan al electrodo de *patch clamp*. Estas se estiran y se parten por la mitad en dos gracias a un estirador de pipetas (puller) horizontal. Posteriormente, las micropipetas se rellenaron con la solución interna compuesta por K-gluconate 150 mM, KCl 3 mM, HEPES 10 mM, EGTA 0.5 mM, MgATP 3 mM, GTP 0,5 mM, phosphocreatine-tris₂ 5 mM y phosphocreatine-Na₂ 5 mM.

Para registrar y estudiar las propiedades de la membrana se utilizó una solución de registro externa, ajustada a pH 7.2 con NaOH, compuesta por 125 mM NaCl, 26

mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, y glucosa 25 mM (pH 7.3, 310 de osmolaridad) y equilibrada con 95% O₂ y 5% CO₂.

Durante los experimentos, se burbujearon las soluciones con gas carbógeno con el fin de mantener la correcta oxigenación de las células en cultivo y un pH aproximado a 7,2.

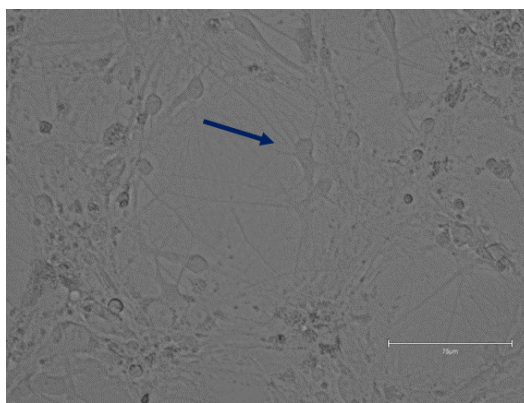


Figura E12 Imágen representativa de campo claro de una células de Purkinje de cerebelo derivadas de hiPSCs para la realización de patch clamp. (Flecha azul). La barra de error representa 75 μ m.

Las drogas que se utilizaron en los experimentos se prepararon con antelación como soluciones stock concentradas para alterar lo menos posible la composición del líquido extracelular al añadir las. Se utilizaron las siguientes drogas: CNQX a 10 μ M (#115066-14-3. Calbiochem by Merck Millipore. Burlington, Massachusetts EE. UU.), D (-)-AP-5 a 10 μ M (#A8054. Sigma - Aldrich, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y SR-95531 a 30 μ M (#S106. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE. UU.) para bloquear los receptores AMPA, NMDA y GABA, respectivamente.

- Medición de propiedades intrínsecas

Los registros electrofisiológicos en *whole cell patch clamp* se realizaron utilizando varios protocolos de fijación de voltaje o *voltage-clamp* y de fijación de corriente o *current-clamp*. Los protocolos de registro fueron:

- Protocolo de *voltage-clamp* con el potencial de membrana fijado en -60 mV, ya que es aproximadamente el potencial de reposo de las neuronas.
- Protocolos de *current-clamp* dejando el potencial de membrana sin fijar por lo que la célula permanece en su potencial de membrana en reposo, y experimentos en los que ha fijado manualmente el potencial de membrana a -60 mV.
- Protocolos de *current-clamp* intensidad-voltaje (IV) en los que se aplicaron distintas intensidades de corriente durante un segundo en intervalos de X pA para observar el patrón de disparos de potenciales de acción.

La aplicación de estos protocolos permitió obtener parámetros asociados a las propiedades básicas de la membrana celular neuronal.

Se registraron múltiples diferenciaciones de CPC (n = 2-4) del mismo control y líneas de pacientes y portadores a la misma edad en cultivo (130 días), los datos se agruparon (todos los pacientes juntos y todos los portadores juntos) y analizaron frente a los datos obtenidos de las células control. Los datos de los controles se compartieron para los resultados de las propiedades intrínsecas de los dos capítulos de esta tesis.

2.27 Análisis estadístico

Los resultados estadísticos se expresaron en media \pm SEM (error estándar de la media). Las medias fueron comparadas mediante la prueba estadística *one-way* ANOVA o *two-sample* t-test dependiendo de los factores considerados para cada experimento, descritos en el la sección de resultados de **B. Capítulo 1** y **C. Capítulo 2**. Las diferencias entre las medias fueron consideradas significativas cuando el valor $p < 0,05$. Previamente, a los datos obtenidos se les realizaron las pruebas de normalidad de Shapiro Wilks o Anderson-Darling y la prueba de Levene para probar la igualdad de varianzas entre grupos.

En todos los ensayos, los datos analizados provienen de al menos 3 diferenciaciones neuronales *in vitro* ($n=3$). El tamaño muestral utilizado en cada ensayo y las pruebas estadísticas correspondientes, se indican en la sección **E. Materiales y métodos** y/o en resultados de **B. Capítulo 1** y **C. Capítulo 2** del presente trabajo, según orden de aparici

F. Anexos

Tabla F1 Lista de anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia, inmunodetección de proteínas de western blot y detección de proteínas de membrana por citometría y/o FACS.

Anticuerpo	Huésped	Dilución	Referencia y casa comercial
Human nuclei	Ratón	1:400	#MAB1281 Chemicon/Millipore
Calbindin	Conejo	1:400	#AB1778 Chemicon/Millipore
KI67	Ratón	1:400	#AB15580 Abcam
LHX1	Ratón	1:400	Jessell Lab
PCP2	Conejo	1:400	#M202 Takara
SKOR2	Conejo	1:400	#PA046206 Sigma-Aldrich
Nanog	Conejo	1:400	#4903 Cell Signaling Technology
oct-04	Conejo	1:400	#2840 Cell Signaling Technology
SSEA4	Ratón	1:400	#60062PE.1 STEMCELL Technologies
SSEA4	Conejo	1:400	# 560.073 BD Biosciences
Tra-1-60	Ratón	1:400	#60064PE.1 STEMCELL Technologies
SMA	Ratón	1:400	#A5228 Sigma-Aldrich
Tuj1	Conejo	1:400	#MO15013 Neuromics
FoxA2	Cabra	1:400	#AF2400 R&D
α -1-Fetoprotein (α -FP)	Conejo	1:400	#A0008 Agilent Cat
Calbindin	Conejo	1:400	#AB108404 Abcam
p62/SQSTM1	Conejo	1:400	#PM045 MBL Internacional
LC3B	Conejo	1:400	#4445 Cell Signaling Technology
SMI-32	Ratón	1:400	#801701 Biolegend
Human Golgi (TGN46)	Oveja	1:400	#AHP500G Biorad
VGAT	Ratón	1:400	#sc-393373 Santa Cruz Biotechnology
DAPI	/	1:400	#10236276001 Roche
Hoechst 33342	/	1:400	#H3570 ThermoFisher
APC-THY1 (CD90)	Ratón	1:400	#5E10 Biolegend
Mouse IgG3 kappa-PE	Ratón	1:400	#60073PE STEMCELL Technologies
Mouse IgM kappa-PE	Ratón	1:400	#555.584 BD Biosciences

Tabla F2 Lista de anticuerpos secundarios utilizados para inmunofluorescencia, inmunodetección de proteínas de western blot.

Anticuerpo	Huésped	Dilución	Referencia y casa comercial
Anti-mouse Alexa Fluor™ 488	Cabra	1:400	#A11001 Invitrogen
Anti-rabbit Alexa Fluor™ 594	Cabra	1:400	#A11012 Invitrogen
Anti-mouse Alexa Fluor™ 594	Cabra	1:400	#A11003 Invitrogen
Anti-sheep Alexa Fluor™ 488	Cabra	1:400	#A11014 Invitrogen
Anti-goat Alexa Fluor™ 488	Oveja	1:400	#A11055 Invitrogen
Anti-mouse Alexa Fluor™ 405	Burro	1:400	#AB175659 Abcam
Anti-rabbit HRP	Burro	/	#sc-2313 Santa Cruz Biotechnology
Anti-mouse-HRP	Cabra	/	#12-349 Sigma-Aldrich
Streptavidin, Alexa Fluor™ 555 conjugate	/	1:400	#S21381 Invitrogen

Tabla F3 Lista de primers humanos específicos para RT-PCR.

Gen	Secuencia <i>primer</i> (5'-3')
<i>GAPDH F</i>	CAGCCTCAAGATCATCAGCA
<i>GAPDH R</i>	TGTGGTCATGAGTCCCTCCA
<i>OTX2 F</i>	ACAAGTGGCCAATCACTCC
<i>OTX2 R</i>	GAGGTGGACAAGGGATCTGA
<i>EN1 F</i>	GAGCGCAGGGCACCAAATA
<i>EN1 R</i>	CGAGTCAGTTTTGACCACGG
<i>EN2 F</i>	GGCGTGGGTCTACTGTACG
<i>EN2 R</i>	TACCTGTTGGTCTGGAACCTCG
<i>HOXA2 F</i>	CGTCGCTCGCTGAGTGCCTG
<i>HOXA2 R</i>	TGTCGAGTGTGAAAGCGTCGAGG
<i>GBX2 F</i>	GACGAGTCAAAGGTGGAAGAC
<i>GBX2 R</i>	GATTGTCATCCGAGCTGTAGTC
<i>GABRA2 F</i>	CAGAGAATCTGTGCCTGCAA
<i>GABRA2 R</i>	CATAAGCCACTTTGGGGAGA
<i>GAD1 F</i>	CAGCCTGCCTATTTCAAAG
<i>GAD1 R</i>	AAATCCAGCTCACGGTTTTG
<i>GPX4 F</i>	GTTTTCCGCCAAGGACATC
<i>GPX4 R</i>	CTTCGGTCTTGCCTCACTG
<i>SLC7A11 F</i>	GTTGCCCTTTCCCTCTATTCT
<i>SLC7A11 R</i>	CCGACATTATTCTAAACCACCT
<i>PEBP1 F</i>	GCAGGAAGGATCCCAAATA
<i>PEBP1 R</i>	ACATAATCGGAGAGGACTGTG
<i>LPCAT3 F</i>	CAGGGAGAGCTGATTGACATA
<i>LPCAT3 R</i>	TGTGTAGCCCACTAGGTAGAA
<i>ACSL4 F</i>	AGGGATATGATGCACCTCTTT
<i>ACSL4 R</i>	ATCGGTGTGTCTGAGGAGATA
<i>NCOA4 F</i>	CCTGGGCAATCTGAAGTG
<i>NCOA4 R</i>	TCTGCACACCTCCTCTACCTTA
<i>TFR1 F</i>	TGAAGAGAAAGTTGTCGGAGA

<i>TFR1 R</i>	AGCCTCACGAGGGACATA
<i>FTL F</i>	GAGAAAAAGCTGAACCAGGC
<i>FTL R</i>	GAGTCTCCAGGAAGTCACAGA
<i>FTH F</i>	AGTGCCGTTGTTCAGTTC
<i>FTH R</i>	AGACAGCCACACCTTAGTAT
<i>GAPDH F</i>	ATCGTGGAAGGACTCATGACCACA
<i>GAPDH R</i>	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
<i>OCT4 F</i>	AAGCCCTCATTTCCACCAGG
<i>OCT4 R</i>	CTTGGAAGCTTAGCCAGGTC
<i>GDF3 F</i>	CTTATGCTACGTAAAGGAGCTGGG
<i>GDF3 R</i>	GTGCCAACCCAGGTCCCGGAAGTT
<i>DDPA2 F</i>	CCGTCCCCGCAATCTCCTTCCATC
<i>DDPA2 R</i>	ATGATGCCAACATGGCTCCCGGTG
<i>TERT F</i>	TGGCTGCGTGGTGAAGTTCG
<i>TERT R</i>	GCGGTTGAAGGTGAGACTGG
<i>REX1 F</i>	CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT
<i>REX1 R</i>	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA
<i>SOX2 F</i>	TCACATGTCCCAGCACTACC
<i>SOX2 R</i>	CCCATTTCCCTCGTTTTTCT
<i>NANOG F</i>	CCAAATTCTCCTGCCAGTGAC
<i>NANOG R</i>	CACGTGGTTTCAAACAAGAAA
<i>CDK5 F</i>	CTGAAGCACAAGAACATCG
<i>CDK5 R</i>	AGTAGCTGGAAGAGGAATGAC
<i>CK2 F</i>	GTATGAGATTCTGAAGGCC
<i>CK2 R</i>	CTCAGGACCTTTGAAGTATCG
<i>CK1-α F</i>	CACATTCTGCCATTAAGGG
<i>CK1-α R</i>	CAAATACCTCAACCGACAAG
<i>MAP2K F</i>	GTCTGTCTACTGTGGTGATCTG
<i>MAP2K R</i>	CAACAGCATTGGTACTTGG
<i>GSK3-β F</i>	GCCTAACCCAGTCATCTTGCT
<i>GSK3-β R</i>	TGCCAGTGTCTTCATATCC

<i>HMOX F</i>	AACTTTCAGAAGGGCCAGGT
<i>HMOX R</i>	GTAGACAGGGGCGAAGACTG
<i>NFR2 F</i>	TGATTCTGACTCCGGCAT
<i>NFR2 R</i>	GCCAAGTAGTGTGTCTCCATAG
<i>NQO1 F</i>	GCAGCGGCTTTGAAGAAG
<i>NQO1 R</i>	CAGAACAGACTCGGCAGGA
<i>FSP1 F</i>	CCTTGAGGGACTTTGTGGT
<i>FSP1 R</i>	ATAGTCGGTGGCAGACATTAG
<i>SeV F</i>	GGATCACTAGGTGATATCGAGC
<i>SeV R</i>	ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC
<i>c-MYC F</i>	TAACTGACTAGCAGGCTTGTCG
<i>c-MYC R</i>	TCCACATACAGTCTGGATGATGATG
<i>KOS F</i>	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC
<i>KOS R</i>	ACCTTGACAATCCTGATGTGG
<i>Klf4 R</i>	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC
<i>Klf4 F</i>	AATGTATCGAAGGTGCTCAA
<i>SACS-EXON 8 F</i>	TTGGCCACATGAATCAGG
<i>SACS-EXON 8 R</i>	CCCACACTGTTACACACCA
<i>SACS-EXON 10 F</i>	CTCTGTAATCTCTGTGCACC
<i>SACS-EXON 10 R</i>	GTCCTGACTGCTCAAATCC
<i>PLAG2G6-EXON 6 F</i>	ATCCCAGTACCTGTAGGCCT
<i>PLAG2G6-EXON 6 R</i>	AGCAGCTGACGATAGGAGG
<i>PLAG2G6-EXON 16 F</i>	GGCACTGCTGAGACCTCT
<i>PLAG2G6-EXON 16 R</i>	GCCTGGTCTATGGACTCAGA
<i>SACS-EXON 10_2 F</i>	GCAGAACATCTCCTTCAGGA
<i>SACS-EXON 10_2 R</i>	CCGCTATGTAAGCATTGGAAA
<i>SACS-EXON 10_3 F</i>	TGTTAACCTGGATCCTCCTC
<i>SACS-EXON 10_3 R</i>	GAACAACCTGGTGAATGTGC

G. Summary

ABSTRACT

Human patient-derived induced pluripotent stem cells (hiPSCs) provide an unprecedented opportunity to recapitulate disease pathogenicity without the need for genetic manipulation and creation of gene targeted animal models. New technologies with hiPSCs are being developed to make human neurons and have the potential to improve our understanding underlying mechanisms of neurological diseases and development. Cerebellar atrophy is a condition associated with neurodegenerative diseases such as Charlevoix-Saguenay's Recessive Spastic Ataxia (ARSACS) and *PLA2G6*-Associated Neurodegeneration (PLAN). ARSACS is an early onset neurodegenerative disorder caused by mutations in the *SACS* gene, characterized with atrophy in superior cerebellum. PLAN, a NBIA (Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation) form due to mutations in *PLA2G6*, is a neuroaxonal dystrophy, which presents cerebellar ataxia. Our aim was to generate a cerebellar Purkinje cell (CPC) model that will be used as models to investigate the cerebellar neurodegeneration to achieve a rationale therapy. We have developed a differentiation protocol using fibroblasts reprogrammed using Sendai virus to hiPSCs, from ARSACS and PLAN patients. We have successfully generated a functional CPC model from hiPSCs according to the protocol described by Shahin's group [Mol Psychiatry 2018; 23: 2167-83] for each patient's line. We have characterized this new models, CPC PLAN and CPC ARSACS by investigating the expression of genes and proteins involved in iron metabolism, lipid peroxidation, ferroptosis, and autophagy in PLAN patients and cytoskeleton, proteasome, and autophagy markers in ARSACS patients.

In PLAN patients the findings showed an impaired ferritinophagy due to the ferritin and NCOA alterations among other altered markers, as well as an increased of lipid peroxidation levels, and altered gene antioxidant and ferroptosis gene expression altered, so that ferroptosis, iron metabolism and autophagy may be impaired and could contribute to neuronal death.

In ARSACS patients the findings showed an autophagy pathway dysfunction and regulatory assembly and disassembly gene expression altered. Moreover, in mature ARSACS and healthy carriers CPCs we observed neurofilaments accumulations genotype-dependent, as patient and animal's models showed previously as a principal characteristic of ARSACS disease.

We also analyzed mitochondrial respiration and bioenergetics using a Seahorse XFe96 analyzer to confirm that the mitochondrial function was altered in both diseases. Finally, we examined the electrophysiological properties by whole cell patch clamp recordings on patients and control mature CPCs and neuronal morphology. The observed mitochondrial dysfunction and the abnormal electrophysiological properties of CPC's patients carrying *PLA2G6* and *SACS* mutations in heterozygosis and homozygosis indicate that normal expression of *PLA2G6* and *SACS* is important for the development and functionality of the human CPCs. These results show that the CPC PLAN and CPC ARSACS model faithfully reproduces the underlying pathophysiology and, therefore, is suitable for drug screening and the achievement of rational therapy for this disease in the near future.

INTRODUCTION

Rare diseases affect around 8% of the European Union population, with 5,000-8,000 people suffering from them. In Europe, a disease is considered rare when it affects at least 5 out every 10,000 people. 95% of the rare diseases registered in Orphanet (www.orpha.net) do not fulfil this criterion, since 84.5% of them has a prevalence of 1 out of every 100,000 people or even less, which makes them utterly rare. Most rare diseases lie in genetics and, therefore, tend to be chronic. Patients suffering these illnesses usually present with either motor, sensorial or intellectual impairment, the symptoms of which appear during their childhood or adolescence. Additionally, around 94% of rare diseases lack specific treatments and the therapies applied are merely palliative. This problematic is based on the great effort that is required to develop new therapies and drugs applied to rare diseases. According to the European Reference Network for Rare Neurological Diseases (ERN-RND), more than a million and a half people in the European Union suffer from a neurological rare disease even though, unfortunately, getting the right diagnosis can take years.

During the last few years, the unceasingly growing scientific production has allowed researchers to stablish the molecular basis underlying neurological and neurodegenerative pathologies. To do so, models of these illnesses are being used as tools to shed light on the molecular and cellular mechanisms of their pathogenesis which, in turn, facilitate the development of new therapeutical drugs.

Nonetheless, creating models of neurological and/or neurodegenerative disorders is a very complicated challenge because of the complexity of the human nervous system and its properties. Animal models, primary cell cultures, and immortalized cell lines have contributed to the understanding of neurological diseases. Lately, models based on induced pluripotent stem cells (iPSCs) have been gaining popularity due to their ability to replicate patients' physiopathology.

Using pluripotent stem cells, including both human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), from healthy and diseased patients has led to the creation of *in vitro* models that are essential to study the development of the human brain and its associated disorders. Above all, these models have been used in pathologies for which researchers lack animal models. In 2007, the laboratories led by Dr Yamanaka and Dr Thomson discovered (each of them working on their own) how to use somatic cells to generate hiPSCs. To do so, they used a technology based on the introduction of several transcription factors (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, LIN28, NANOG) in different combinations and concentrations in order to overexpress them and reprogramme the original somatic cell. Their capacity of renovation, pluripotency, and differentiation has allowed the generation of different neuronal cell populations with specific phenotypes of specific illnesses, which makes them a useful tool to study these diseases. This accounted for a new method for generating specific pluripotent stem cells from patients with a particular illness. For instance, this technology has been successfully used to study several neurodegenerative rare diseases such as Rett syndrome, Friedreich's ataxia (FRDA) and Dravet syndrome. Researchers have differentiated hiPSCs generated from dermal cells coming from the very patients to different neuronal types in two-dimension (2D) systems. This has helped to establish the different cellular characteristics associated with the different diseases.

Even though these models are physiologically simpler than animal models, as this technology is further developed, our ability to increase the complexity of the neuronal circuitry and replicate the human one becomes greater. The 2D and 3D cellular models based on the use of hiPSCs are a source of essential tools for the field of neurological modelling and the study of the processes underlying an illness by replicating with accuracy the physiopathology of the patients. At the same time, these kind of cell cultures are more relevant for the study of human physiology

than the traditional cell cultures based on primary immortalized cell lines of both human and non-human origin. A combination of different approaches using hiPSCs and animal models would increase our opportunities for gaining knowledge of the human brain complex physiology.

Human pluripotent stem cells-based protocols that allow us to establish appropriate and relevant models of neuronal disorders require to include certain patterns. Firstly, the cells used must have a high capacity of differentiation regarding number of cells, specialization, and regionality, which allows the study of a specific region of interest in the nervous system. Secondly, cells need to exhibit a mature phenotype with characteristics and properties as similar to the ones from *in vivo* cells as possible. To do so, we need to either correct by genome editing genetic changes in cells from patients that play an important role in the pathology studied or introduce them in healthy cells. Finally, cells must exhibit a robust pathological phenotype that can be studied *in vitro* and modified using different therapeutic approaches.

Developing protocols to create models of neurological or neurodegenerative diseases require that we take into account that neural development is a complex process regulated by different factors. In fact, although many studies in animal models have revealed many of the mechanisms associated with neural development, the intricacies of this process are far from being completely elucidated at a cellular and molecular level.

The discovery of a protocol to cultivate embryonic stem cells (ESCs) had a great impact on the differentiation of pluripotent stem cells to neural cells *in vitro*. The first studies that did this used cell cultures of aggregated mouse embryonic stem cells (mESCs) that created embryoid bodies (EBs), which are spontaneously formed. These EBs used several inductive factors such as retinoic acid as a method of differentiation, making cells express a myriad of phenotypes normally associated with neurons. However, these methods were very sensitive and tended to vary in between experiments. This is why Studer and colleagues developed a quick and efficient method for the neural induction of pluripotent stem cells by using SMAD (dSMADi) in 2009. This is currently the most used method in all the neural differentiation protocols. They also used inhibitors of the BMP and the Activin/Nodal pathways such as Moggin and SB434542 respectively, which

demonstrated that dSMADi signaling is the minimal requirement to induce neural specification during embryogenesis in mammals. Nonetheless, unless the neural progenitors derived from pluripotent stem cells receive signals of casualization, they spontaneously choose the rostral forebrain as destination, according to Nieuwkoop's activation and transformation model. This model suggests that ectodermic cells are induced to have a neural identity in the forebrain ("activation") and then, they adopt posterior destinations forming the midbrain, the hindbrain, and the spinal cord ("transformation"). In pluripotent stem cells-based neuronal models, including methods that use EBs and dSMADi, differentiated cells adopt forebrain specifications by default, which demonstrates the activation step in Nieuwkoop's model. Even though some neuronal models based on pluripotent stem cells also can imitate the step of transformation thanks to molecular signals that shape developmental patterns. For instance, forebrain neural progenitors treated with moderate levels retinoic acid acquire a midbrain/hindbrain identity. Nevertheless, high concentrations of retinoic acid make cells acquire a phenotype of spinal cord stem cell.

Whenever cerebellum cells need to be obtained by pluripotent stem cells differentiation, a treatment with dSMADi is not sufficient, since the fibroblast growth factor 8b (FGF8b) is also required. During the embryonic development, the cerebellum emerges from the dorsal region of the rostral hindbrain (rhombomere 1), and it is dependent of the formation and function of the isthmic organizer. FGF8b is produced and secreted by the very isthmic organizer, which increases Wnt1 expression. These two factors are part of an automatic positive feedback required for the expression of other cerebellar transcriptional factors such as *En1/2*, *Pax2/5/8*, *Otx2* y *Gbx2*. Apart from FGF8b signaling, the isthmic organizer also needs the molecular signaling of *Sonic Hedgehog* (SHH) and members of the transforming growth factor (TGF- β). The morphogenic activity of the isthmic organizer is like this as consequence of the specific temporospatial expression of molecular signals that regulate the specification and the structural development of the neuroepithelial territories of both the midbrain and the cerebellum. A decreasing gradient of FGF8b in the isthmus alar plate and the rhombomere 1 is essential to preserve cell survival and the promote the development of the cerebellar tissue

The first protocols developed for the *in vitro* imitation of the cerebellar embryonic development were based on mESCs cell cultures and the use of extracellular signals implicated in the induction of the early neural tube pattern and the cerebellar region, followed by morphogenetic bone protein factors, mitogens, and neurotrophins, which induce cellular regionalization and specification. In these studies, cell cultures of different cerebellar cells such as cerebellar Purkinje cells (CPCs) cultured in monolayer or suspension. However, the efficiency of CPCs production was quite low. Thanks to these first studies based on mESCs it was possible to develop protocols that used human pluripotent stem cells that little by little were improved. In fact, there were ambitious studies that aimed to increase the number of cerebellar cells derived from hESCs by the treatment with several molecules to imitate a posterior cerebellar pattern, already described in mESCs. In 2010, Erceg *et al.* managed to design a protocol in which they induced hESCs differentiation to progenitor cells of the midbrain/hindbrain and, posteriorly, to cerebellar lineage cells. They obtained human cerebellar Purkinje cells and increased the efficiency from low to moderate.

In 2015, hESCs were firstly cultivated in suspension to favor aggregates self-formation and differentiate them into 3D tissues spatially ensembled and containing multiple cell types. This imitates the cerebellar tissular organization by the differentiation to neuroectoderm and the posterior *in vitro* formation of the isthmus organizer in cell cultures by using FGF2 and insulin as caudalising factors. This was the first time that anybody described *in vitro* the self-formed 3D cerebellar tissue, named cerebellar organoids, which were closer to the endogenous development program. These organoids were posteriorly co-cultivated with mouse cells, concretely external granule layer (EGL) cells derived from the embryonic rhombic lip to promote Purkinje cells maturation. After a while, the hESCs-derived cerebellar Purkinje cells obtained developed the characteristic morphology of the cerebellar Purkinje cells, including elaborated dendritic branches and spines, which were GRID2 receptor for glutamate-positive specific of Purkinje cells, and their diameter was similar to the one of a human fetal Purkinje cell. Nonetheless, there are other studies that suggested that neither the co-culture of the precursors of the Purkinje cells generated using the caudalising factors FGF2 and insulin or the use of precursors of embryonic granular cells from mice, nor using rat brain slices is ideal to induce the maturation and the correct

functionality of Purkinje cells *in vitro*, although they can induce the right morphology and an adequate protein expression profile.

In 2018, Sundberg *et al.* used a more directed differentiation approach more by the design of a protocol based on the induction of the neural differentiation through the dual inhibition of the SMAD pathway in presence of nicotinamide, which improves the neural compromise of the stem cells during development. To casualize the *in vitro* cell culture and promote the differentiation of the resulting cerebellar lineage of neuroepithelial cells, they used several growth factors and small molecules that are crucial for the right cerebellar development during the embryo stage *in vivo*. The protocol was based on the activation of the WNT pathway signaling by using the CHIR-99021 molecule, to generate a gradient that follows the specific rostral-caudal and direct the differentiation of the hiPSCs. After neural differentiation and the initial rostral-caudal pattern, the use of FGF8b and bFGF induced the development of the edges of the midbrain/hindbrain *in vitro*, promoting the posterior specification of the neuronal precursors towards the cerebellum. The resulting cerebellar precursor cells gradually expressed markers associated to hindbrain neural progenitors such as EN1/2 and GBX2 and to Purkinje cells such as PTF1a, KIRREL2 and SKOR2 during the different differentiation times. Posteriorly in the protocol, in between the day 24 and the day 48 of differentiation, GABAergic and specific Purkinje cells markers such as PCP2 were detected. To induce Purkinje cells precursors maturation and obtain functional adult cells, they co-cultivated the population of hiPSCs-derived Purkinje cell precursors, previously enriched, with granular cerebellar cells from mice, but this time during the postnatal stage (P4-7). The enrichment was managed by using a previously used method to purify mouse Purkinje cells from primary cerebellar cell cultures that was based on the selection of cells expressing the THY1 marker instead of the KIRREL2 used in other hESCs-based protocols until that moment. In this case, the hiPSCs-derived cerebellar Purkinje cells in co-culture also acquired a typical cerebellar Purkinje cells morphology, that is bipolar neurons with short ramifications around the 54-60 days of protocol, that posteriorly increased in size and number. Around the 83-90 days of protocol the cellular soma developed an oval shape which is typical from cerebellar Purkinje cells. Around the 100-140 days of protocol the mature cerebellar Purkinje cells presented a very ramified structure/morphology and expressed late Purkinje cell markers such as PCP2 and

Calbindin, in addition to pre and postsynaptic markers, which indicated synapsis and therefore the functionality of the cerebellar Purkinje cells.

The presence of glial cells and other neuronal types as well as cell to cell communication facilitates the maturation and differentiation of the cells to neurons, which regulates the synaptic development and connectivity through the release of glutamate and ATP, among other molecules with synaptic activity, to the medium. Thereby, the aforementioned protocols have used the co-culture technique to favor the maturation of cerebellar precursor cells and, concretely, Purkinje cells precursors, to be able to study their electrophysiological characteristics *in vitro*.

When a neuron differentiates and matures, it increases its neuronal complexity through dendritic growth and the expression of ionic channels such as sodium and potassium channels. Even if the use of immunofluorescence has allowed researchers to find the presence of essential neuronal markers and the dendritic development in neurons derived from pluripotent stem cells, the observation of electrophysiological parameters has demonstrated highly immature states. In the last few years, some studies have investigated the evolution of the electrophysiological properties of the mESCs-derived neurons during their maturation/development from progenitors in mice or rats either *in vivo* or *in vitro*, and they have compared them to the results obtained from hiPSCs-derived neurons, although these studies have not been completely replicated. The parameters associated with electrophysiological properties of a neuron and with neuronal maturation are the presence of action potentials, sodium-potassium currents, membrane resistance and membrane resting potential, as well as spontaneous electric activity.

The electrophysiological properties of the pluripotent stem cells-derived CPCs differentiated have been analyzed, among others, with the whole cell patch clamp technique, which is based on the application of an electric pulse of a concrete voltage and the registration on the variations in the membrane potential. Cerebellar Purkinje cells derived from either hiPSCs or hESCs presented the electrophysiological properties of Purkinje cells of other species such as repetitive action potential characteristic of neurons after the injection of a current, they had the ability of depolarize and repolarize, in addition to present spontaneous

inhibitory and excitatory signals. Purkinje precursor cells have been co-cultured with slices of human fetal cerebellum, resulting in Purkinje cells electrophysiologically active, which demonstrated the need of interactions not only with granular neurons but also glial cells, in addition to specific human factors for an adequate maturation. However, the use of human fetal cerebellum slices faces, in addition to availability issues, several ethical problems.

Until now, in order to get a mature pluripotent stem cell-derived Purkinje and granular cell phenotype, no matter mESCs, hESCs or hiPSCs, researchers needed to work under very specific conditions when performing the co-cultures or by the transplant of differentiated cells in cerebellum from mice. Therefore, obtaining mature pluripotent stem cell-derived cerebellar neurons in a long-term cell culture and their maturation without co-cultures of mouse cells/tissue remains a challenge. In spite of the demonstrated capacity of the pluripotent stem cell-derived neurons for maturing and becoming functional cerebellar neurons using the co-culture technique, this still has some limitations *per se*. Feeder cells introduce an extra level of variability inherent to the process, which shows how important it is to better understand the factors that promote their maturation. Furthermore, another limitation for the greatest part of the cerebellar hiPSCs or hESCs-derived neurons, as for human neurons in general, is the lack of transcriptomic signatures that allow to identify the specific types of neurons in a more rigorous way and to be able to compare their development among species.

In the last two years, several studies have developed protocols based on the improvement of the aforementioned issues with the aim of elucidating new methods of obtention, differentiation, and maturation of cerebellar cells from hiPSCs. In spite of the newest advances in the field, there are different challenges that we must overcome to optimally generate iPSCs-based neuronal models and Purkinje cell obtention in order to generate cells and tissues *in vitro*. This requires a precise understanding of the complex molecular events during the development of each neuronal subtype, the specific markers that allow their identification and the characterization of the generated cells. In this sense, future studies should focus on the identification of additional signaling molecules to make *in vitro* cells completely imitate the maturing processes that occur within the development of the human cerebellum. Thus, currently, there are hiPSCs-based technologies that

produce neural cells and tissues, which allow the development of new approaches to research developmental mechanisms and human cerebellum illnesses.

Finally, the obtention of efficient and reproducible cerebellar cellular models is highly important to elucidate the molecular basis of rare diseases that present with degeneration and cerebellar dysfunction. This would also increase the chances of finding new drugs with the ability of correcting the pathological phenotypes detected in each disease. The most directed and complex approaches will allow the study of the molecular mechanisms that underlay the cerebellar ataxias and the development of new therapies.

One of the two rare diseases that have been studied in the present thesis is the autosomal-recessive ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) (OMIM: 270550). It was firstly described in 1978 thanks to a genetic study carried out in the Charlevoix-Saguenay region placed in Quebec (Canada). This disorder is mainly characterized for presenting with progressive cerebellar ataxia and spinal cord degeneration, caused by the degeneration of the Purkinje cells from the cerebellum. Altogether this provokes neuromuscular disorders, pyramidal syndrome, and peripheric neuropathy. Even though this illness was firstly thought to be endemic from Quebec (Canada), new cases were later registered in more than 20 other countries. Its incidence and prevalence worldwide are unknown, although at the beginning its incidence in Quebec was estimated to be of 1 out of every 2,000 cases. However, it was not very frequent in countries with described cases such as Turkey, Japan, the Netherlands, Italy, Belgium, France, and Spain among other.

In patients from the Quebec region ARSACS symptomatology is triggered when children are in between 12 and 18 months old, whereas in patients from other regions there is a wider range that goes from late childhood to adolescence (some cases start even during early adulthood). The greatest part of ARSACS patients show a slow and progressive course of the disease. During their childhood years they start to have trouble with walking when associated with spasticity, whereas during the adolescence they show a neuropathy, which leads to the lack of reflexes in the Achilles tendon, distal muscular dystrophia, and important sensorial alterations. These patients also suffer from a loss of muscular tissue (amyotrophy) and language deterioration. A characteristic that is present in ARSACS patients from Quebec, but not in patients from other countries, is retina hypermyelination,

which is not accompanied by sight loss. Other initial clinical symptoms include dysarthria, associated to cerebellar dysfunction, nystagmus, and pyramidal syndrome, which are characterized by fast reflexes in the knee tendons and Babinski signs.

Its diagnosis is based on patients' genetics, in addition to the detection of atrophy in the superior cerebellar vermis by nuclear magnetic resonance. In the process, experts' study medical profiles from patients with the disease that can be compatible and their association with pathogenic biallelic variants within the *SACS* gene.

For ARSACS patients there is no efficacious therapy since the treatment is just for the symptoms and its main aim is to control spasticity and muscular contractions. Physical activity and physiotherapy have been proposed as rehabilitation strategies focusing on the symptomatology of the disease. Additionally, there are therapies based on drugs such as Baclofen, which can help to control spasticity and muscular contraction in an early stage. This drug blocks synaptic reflexes and its use as a therapeutic agent to treat cerebellar ataxias is widespread.

ARSACS is caused by mutations in the *SACS* gene. This gene can be found in (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SACS> accessed 21st de April 2022) and had 145,075 bases. It is formed of 17 exons, 9 of which are coding. Exon number 10 is the longest exon in modern vertebrates and contains 11,487 base pairs. Since genetic tests are key to diagnose ARSACS patients, the effort of many researchers has led to the discovery of more than 200 pathogenic mutations in the *SACS* gene associated with medical profiles compatible with ARSACS disease. Apart from the original mutations detected in the Quebec region, more mutations in the *SACS* gene associated with patients with ARSACS medical profiles have been detected.

The first mutation ever described in Spain was in 2005. This study described a new variant in homozygosity, c.7848C>T (p.R2556C), present in two patients that were siblings. These patients presented a medical profile very similar to the patients from the Quebec region, since they showed cerebellar atrophy in the superior part of the vermis, and spinal cord atrophy, although there was no retina hypermyelination. Another variant affects a preserved residue of the protein

(R2556) that codifies this gene, which also confirmed its role in the disease. The genetic study described two new mutations in heterozygosis comprised in the *SACS* gene (p.R276C and p.P1302S), studied in the present thesis.

The *SACS* gene codifies for the SACSINA protein, which comprises 4,579 amino acids and has a molecular weight of 520 kDa (UniProt: Q9JC8). It is organized in several domains that could have several functions and/or cooperate between them or in different pathways. The SACSINA protein has 5 domains that are located from the N-terminal part of the protein to the C-terminal one in the following way: *Ubiquitin-like domain* (Ubl), three large SACSINA internal repeats (SIRPT1/SIRPT2/SIRPT3 or SRR), xeroderma pigmentosum C-binding domain (XPCB), J-domain (DNAJ) and the *Higher Eukaryotes and Prokaryotes of a Nucleotide-binding domain* (HEPN) domain.

The SACSIN protein expression was firstly detected in a predominant a heterogeneous way in rodent brain tissue, although also in testicles. Thereby, SACSIN is located in the soma participating in neuronal processes, including dendrites and axons. Regarding the subcellular distribution of the protein, SACSIN can be mainly found homogeneously all around the cytoplasm and/or sometimes in the outside of mitochondria, suggesting that it might play a role in mitochondrial regulation. The richest part of the brain in SACSIN is the cerebellum, concretely Purkinje cells, located by the molecular layer, show the greatest levels of *SACS* gene expression and SACSIN protein. SACSIN is considered a molecular chaperone involved in protein quality control, mitochondrial web dynamics, and neurofilaments homeostasis. However, the pathological molecular mechanisms that underlay the neurodegeneration of mutate SACSIN-containing neurons are not clear yet.

In order to determine the role played by *SACS* gene-associated mutations and the resulting lack of expression and/or activity of the SACSIN protein in ARSACS, new animal and models have been generated. These models have been obtained by either the deletion of the *SACS* gene, genetic modifications in this very gene with the purpose of create a deficit in the SACSIN protein, or the use of dermal fibroblasts from the very ARSACS patients.

Since chaperons are proteins that play a pivotal molecular role keeping the protein homeostasis within the cell by correctly folding proteins, one of the first things to be analyzed was if *SACS* gene mutations could be interfering in this process. Nonetheless, in the ARSACS models currently available, there is no record of either an increase in ubiquitinated proteins or the presence of other molecular chaperons that could be counteracting the lack of function of the SACSIN protein, which suggests that the ubiquitin-proteasome system is not being affected in this pathology. However, there is evidence of alteration in the autophagy-lysosome pathway.

ARSACS models indicate the SACSIN is located in mitochondria and that the cytoskeleton, concretely neurofilaments (NFs), play an important role in the regulation of the morphology and motility of neuronal mitochondria. It has also been discovered that this protein is aggregated in the CPCs, motor neurons of ARSACS mice, and neurofilaments of fibroblasts that come from ARSACS patients. Models also confirmed that the elimination of the SACSIN protein provoked a deficit in mitochondrial transport (morphology and frequency of movement), although previous to these findings we already knew that these aggregates or NFs bundles in axons from motor neurons cultivated from ARSACS mice. The length of mitochondria is also increased by the recruitment of the fission protein Drp1, described in ARSACS models, which contribute to the ARSACS phenotype. These morphological alterations in the mitochondrial webs are accompanied of alterations of the oxidative phosphorylation and the increase of oxidative stress by the increase in the number of reactive oxygen species (ROS). These data indicate that mutations in the *SACS* gene intervene in the cytoskeleton homeostasis through intermediate filaments and in the mitochondrial function, both being phenotypic aspects that are not mutually exclusive since the cytoskeleton is very important in the regulation of mitochondrial dynamism.

In the last few years, the study of the omics sciences such as proteomics, metabolomics, and transcriptomics, has helped us understand the mechanisms of the ARSACS disease. Proteomic studies of ARSACS cellular models from patients have described new possible functions for the SACSIN protein in several biological processes such as neuroinflammation, synaptogenesis, and cellular absorption. Furthermore, a great number of non-described hyperphosphorylated proteins have

been identified. This analysis suggests that the most repetitive proteins found were associated with focal adherence, which include integrin signaling, “cellular matrix adherence”, and “cadherin unions”. Some of these data have been confirmed with the molecular analysis of both human and mice ARSACS cellular models. Therefore, data suggest that SACSIN could be playing a crucial role in cellular adhesion, which is important since focal adherences within the brain are fundamental for the structural remodeling that occurs during the growth of the axon and the formation and maintenance of the synapses. Moreover, a deficit of proteins involved in signaling pathways such as microtubular organization and protein trafficking, which at the same time are regulated by chaperones, has been described. This suggests that the interaction between chaperones and SACSIN can be especially critical and that it is not present in ARSACS patients. However, the same authors uphold that more studies are needed to corroborate the deterioration of the specific biological function/pathway, in either the specific cell type affected in ARSACS such as Purkinje cells or *in vivo* (animal models).

The second rare disease studied in the present thesis is *PLA2G6*-associated neurodegeneration (PLAN) (OMIM: 610217). It is a neurodegenerative rare disease that is comprised in the group of illnesses called neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA), which have a prevalence of 1-3 out of every 1,000,000. NBIA patients usually present iron deposits in the brain, mainly in the globus pallidus and the substantia nigra. They are characterized by showing complex disorders related to movement extrapyramidal dysfunction, dystonia, parkinsonism, and choreoathetosis. Other common clinical symptoms are cognitive deterioration and psychiatric disorders. There are ten genes that classically provoke NBIA. However, due to the high number of patients suspected to suffer NBIA without a genetic diagnosis, it is possible that there are other genes implicated in this type of pathologies. The genetic heterogeneity and the mistakes made by the corresponding proteins indicate that these mechanisms underlying the NBIA forms are very different. Moreover, the abnormal accumulation of iron in the brain present in many of these patients might be caused by a primary molecular default or be the consequence of a secondary metabolic default.

PLAN is the second most common form of NBIA and represents approximately the 15% of the patients. PLAN comprises three different phenotypes: (1) Classic

infantile neuroaxonal dystrophy (INAD); (2) Atypic neuroaxonal dystrophy; and (3) *PLA2G6*-related dystonia-parkinsonism (PARK14). INAD with more than 150 described cases is the most common one in the PLAN phenotype (terminology that has been proposed and that includes all the phenotypes associated and that from now on PLAN cases).

The clinic symptomatology is quite similar among patients that suffer from PLAN disorders. The classic form of the disease starts at very early ages, between the six months old and the three years old. Generally, children that suffer from PLAN are healthy when they are born, and they have a normal neurological development until the first motor symptoms are shown. The progression of the disease is quick and is characterized by a progressive motor deterioration that can cause truncal hypotonia at the beginning and, later, spastic quadriparesis with pyramidal signs. Cerebellar atrophy is the most common and early sign in the magnetic nuclear resonance of PLAN patients. These patients show a quick progression of the cerebellar atrophy, which affects the cerebellar vermis and the hemispheres. Cerebellar gliosis is also observed in many cases, although it is not present in every patient. In the late stages of the disease, imaging techniques of nuclear magnetic resonance show that iron is accumulated in the globus pallidum and the substantia nigra. However, the presence of iron aggregates varies in location and presence in PLAN patients.

For these patients the treatment is merely symptomatic or palliative. It includes a pharmacological treatment for dystonia, spasticity, and convulsions, always supported by a physiotherapeutic treatment. Clinical trials (www.clinicaltrials.gov) mainly focus on the use of deuterated polyunsaturated fatty acids, which could help the patients with their locomotor issues and impaired biochemical functions.

The association of the *PLA2G6* gene with the PLAN disease was firstly described in 2006 in a study of 44 mutations in patients. Most of them were amino acid substitutions, and the 85% were amino acids very preserved in vertebrates. The *PLA2G6* gene is in the chromosome 22 (chr22:38,111,495-38,214,778 (GRCh38/hg38)) and has 103,284 base pairs and it is composed of 17 exons. The sequencing of the exome has described around 200 different mutations of many types in the *PLA2G6* gene, including complex mutations. Since PLAN is caused by biallelic mutations, the mechanism of the disease is expected to consist in a loss of

function. However, there is no observed evident correlation between the PLAN genotype and the phenotype. Most of PLAN patients with an onset of the disease during their youth or adulthood years and/or a less aggressive PARK14-compatible phenotype have amino acid changes that do not alter the catalytic activity.

The *PLA2G6* gene codifies for the VI calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2/iPLA2 VIA-2/iPLA2 β), which has 806 amino acids and plays a role in the hydrolysis of ester bonds in the sn-2 position of membrane phospholipids, and the resulting release of free fatty acids such as the docosahexaenoic acid and the arachidonic acid, and 2-phospholipids that in turn act as second messengers in several signaling pathways. Classically, iPLA2 β main function is remodeling cellular membranes by its action in lipids metabolism. In the last few years, this process has been especially interesting to remove peroxidized lipids from membranes. iPLA2 β also play a role in inflammation signaling, immune response, chemotaxis, and oxidative stress. Additionally, iPLA2 β participates in cell proliferation, cellular death, and signal transduction and, therefore, it could have an impact on different illnesses.

Since iPLA2 β has multiple isoforms in humans, each transcript has a unique tissular distribution, that is, its expression depends on the tissue-specific genetic regulation. However, it is widely distributed in all human tissues (<http://www.proteinatlas.org>). iPLA2 β is expressed in higher rates in the adult mammal brains. In adult monkeys, the greatest levels of the expression of iPLA2 β can be found in the brain cortex, the hippocampus, the cerebellum, and the brainstem, and it is less expressed in the thalamus and the hypothalamus. Within these tissues, iPLA2 β is mainly expressed in the nuclear envelope from neurons, dendritic spines, and axon terminals, whereas it is hardly expressed in myelinated axons, dendrites with a great diameter, glial cells, and endothelial cells. In the rat brain, iPLA2 β is highly expressed in Purkinje, granular and deep cerebellar cells nuclei. In a cellular level, iPLA2 β is distributed in the cytosol and within mitochondria, although it can also be found in a more variable way in the nucleus, Golgi apparatus, and endoplasmic reticulum (ER) from mammal cells. Some iPLA2 β variants are associated with the plasmatic membrane, mitochondria, ER, and the nuclear envelope.

In the last few years, different cell and animal models of PLAN disease have been designed to shed light on the physiology of the illness. Mouse models gather some of the neuropathological characteristics described in PLAN patients, including progressive axonal degeneration, cerebellar atrophy, and accumulation of spheroids containing either tubulovesicular structures (TVS) or the remains of membranous organelles. Nonetheless, the most characteristic symptoms of PLAN patients such as motor deficit, although they appear in a slow progressive way, are evident in during the adulthood in mice. Moreover, at the endpoint of some of the models did not present with iron accumulations in the basal ganglia. The life expectancy of mice which serve as model for *Pla2g6*, although it was significantly shorter that wildtype animals or healthy controls, was longer than 2 years.

In spite of the lack of understanding about PLAN disease, it seems that lipidic peroxidation plays a pivotal role in the illness, and that is why the latest research focuses on that pathway. The loss of activity of iPLA2 β leads to high rates of lipid peroxidation and mitochondria dysfunction, including defects in the mitochondrial membrane, and high levels of cytoplasmatic and mitochondrial ROS. This was not only described in animal models but also in human cellular models such as fibroblasts from patients, cell lines such as SH-SY5Y or direct reprogramming-induced patients' fibroblasts. Iron metabolism deregulation and structurally altered mitochondrial crests is also a common characteristic of the different subtypes od NBIA, which can cause a deficiency of energy and ROS overproduction. The resulting high levels of ROS cause stress to the ER, which is responsible for protein folding and modification. The accumulation of misfolded proteins induces the unfolded protein response, which protects neurons against the toxicity of those very proteins. Several studies of PARK14 which used mice and fly models with a mutation in the *Pla2g6* gene in the position D331Y have described the presence of stress in the ER. Using of UPR modulators such as the Azoramide or reinstating the contact between mitochondria and ER by introducing the C19orf12 molecule some researchers have managed to reinstate the ER function and, with it, rescue a normal phenotype.

During the last few years, research has contributed to elucidate the pathogenic mechanisms of the PLAN and ARSACS spectrum. Therefore, little by little we are starting to understand the physiopathology of these disease. The continuous

development of protocols based on animals to model ARSACS and PLAN diseases allows us to discover different dysfunctional biological processes that might be the centre of research of future investigations and possible pharmacological targets. However, even though animal models help us improve our knowledge of the mechanisms of the illnesses, the anatomic, morphological, genetic, and biochemical differences make it difficult to extrapolate to human conditions. Thus, obtaining data that represent the physiopathology of the diseases in a very reliable way creates the need to develop human-based models. Other models used were humanized PLAN and ARSACS models such as genetically modified human neuroblastoma cell lines, patients' fibroblasts, and iPSCs-derived neurons.

hiPSCs cells open new ways of modelling neurological illnesses, concretely neurovegetative rare diseases. The obtention of pluripotent stem cells directly from patients' skin samples allows us to study the illness at an individual level, which helps us elucidate and observe the possible patient-specific phenotypes. They also allow us to imitate in a more precise way the conditions of the illnesses from the very first stages of human development and with them we get rid of ethical problems derived from the use of hESCs or human tissue.

hiPSCs-derived neuronal cells have been generated from samples extracted from patients with different kinds of ataxia. However, in the concrete case of the ARSACS disease there is no described protocol of cellular differentiation using hiPSCs derived from patients with this illness that has as aim the creation of cerebellar Purkinje cells for their study. In the case of the PLAN disease, there is only one study that has used hiPSCs-derived dopaminergic neurons, even though it was to study the PARK14 phenotype. There is no described protocol for cellular differentiation from hiPSCs derived from samples taken from INAD/NAD patients.

The development of a model using hiPSCs-derived cerebellar Purkinje cells for ARSACS and PLAN patients that reflects in a more complete and close approach the physiopathology of the diseases and that is useful as a model for the disease to develop and test drugs that revert to a healthy phenotype in these patients is the common objective when studying both diseases in the present doctoral thesis.

Different experiments based on the generation and molecular and functional characterization of eight lines of reprogrammed hiPSCs from dermal fibroblasts of

patients diagnosed with ARSACS and PLAN, have been carried out to design a CPC model.

METHODS

First of all, to design the CPC model, there were different experiments have been carried out based on the generation and molecular and functional characterization of eight lines of hiPSCs reprogrammed from dermal fibroblasts of patients and carriers of ARSACS and PLAN diagnosed.

These cells have originated from the cell reprogramming of fibroblasts from the skin of patients and carriers. Fibroblasts were obtained from skin biopsies of healthy PLAN and ARSACS patients and carriers. While, for the control subject, the fibroblasts from the commercial house ATCC (Manassas, Virginia, USA), were obtained from the Valencia node Lines Bank.

These cells have been originated by reprogramming skin fibroblasts from patients. These cells have been induced *in vitro* with the technology of non-integrative reprogramming protocol based on the expression of reprogramming factors that are important during development (OCT3/4, SOX2, C-MYC y KLF4). These factors revert the differentiated phenotype to an embryonic phenotype with the potential of originating most of the cells in the organism, and, among them, neurons. After this process and depending on the cell line, between days 20-26 of the reprogramming protocol, the first well-defined colonies of hiPSCs were observed, which were selected and cultured individually during the following weeks. Two clones per line were selected which, after verifying the elimination of the SeV by means of the RT-PCR study of the expression of the transduced genes, were characterized molecularly and functionally.

The hiPSCs cell lines obtained have the characteristic of pluripotent cells, that is an unlimited proliferative ability, the potential to differentiate to any other cell type, and they contain the initial mutation and karyotype that characterized them. The pluripotency of the hiPSCs lines was demonstrated by different molecular biology techniques such as immunohistochemistry, cytometry, RT-PCR and alkaline phosphatase assay, verifying how specific markers were present. It was also

demonstrated, by immunofluorescence, that the generated hiPSCs lines could express proteins associated with the formation of the three germ layers (mesoderm, endoderm, and ectoderm) by means of the EBs formation technique.

The 4 hiPSCs PLAN lines that have been generated and characterized belonging to PLAN patients and a healthy carrier had the following genotype: The PLAN-1 patient is a homozygous carrier of a mutation at position c.2370 T >G (p.Y790X) that causes a stop codon; the second PLAN-2 patient is compound heterozygous with mutations at positions c.1027G>A (p.A70T) and c.1010T>A (p.L70Q); and the third patient PLAN-3 has a homozygous mutation at position c.2356G>A (p. Glu786Lys). Finally, the healthy PLAN-H carrier carried the mutation at position c.2370 T >G (p.Y790X) in heterozygosis.

The 4 hiPSCs ARSACS lines that have been generated and characterized belonging to two ARSACS patients and two healthy carriers had the following genotype: The ARSACS-1 patient is a compound heterozygote carrier of a mutation at the positions c.9938delC (p. G3313Qfs*11) and c.11374C > T (p.R3792*) which causes a stop codon; the second ARSACS-2 patient is compound heterozygote with mutations at positions c.826 C >T (p.R276C) y c.3904 C >T (p.P1302S); and healthy carrier ARSACS-H1 has a heterozygote mutation at the position c.11374C > T (p.R3792X); and the other healthy carrier named ARSACS-H2 carried the mutation at position c.826 C >T (p.R276C) in heterozygosis.

Next, cerebellar precursor cells were generated in in vitro culture from the generated hiPSCs lines, and their neuronal development was characterized using different techniques.

The generation of the CPC PLAN and ARSACS model was carried out in collaboration with the team of Prof. Sahin, which was first developed in Sundberg et al. 2015, A CPC model to study tuberous sclerosis complex with patient-derived hiPSCs. From each of these eight hiPSCs lines plus the control line, the PLAN and ARSACS CPC model was generated following the original protocol with some modifications compared to the original protocol.

Using a neurogenic medium that was made up of a wide range of factors that promote neural induction by dSMADi, caudalization, and tissue regionalization to the cerebellum, hiPSCs developed morphological and molecular characteristics

typical of cerebellar neurons. To confirm the correct neural/cerebellar differentiation of the hiPSCs lines generated from control, carriers, and PLAN and ARSACS patients, different gene expression pattern was analyzed by RT-PCR. These genes were *OTX2*, *EN1*, *EN2*, *HOXA2* and *GBX2* genes, they are related to the formation and regionalization of the neural tube, the formation of cerebellar precursor cells, as well as specific markers of the phenotypic development of GABAergic neurons and Purkinje cells like. One at a time, and during the beginning of the differentiation to the caudal neuroectoderm, it was found that the culture did not acquire a rostral character. For this, the levels of gene expression of *OCT4* and *OTX2* were studied by means of RT-PCR

Cerebellar development and cerebellar Purkinje cell differentiation are regulated by *GBX2* expression, previously described in different animal models. In the CPC PLAN and ARSACS model, cerebellar induction was detected around day 10 of differentiation protocol as result of regionalization by the addition of FGF8b. Together with the factors CHIR-99021 and bFGF, this factors cocktail induces the midbrain/hindbrain boundary *in vivo* and *in vivo. vitro*, as previously was described in this work. As well as the protocol described by Sundberg. *et al* 2015, cerebellar progenitors obtained between days 10 and 32 gradually expressed Purkinje cell, cerebellar, and hindbrain progenitor markers such as *EN1/2*, *GBX2*, *KIRREL2*, and *SKOR2* over time. Between days 24 and 48 of differentiation, GABAergic phenotype markers and Purkinje cell markers such as *GABRA2*, *GAD1* and *PCP2* were detected.

To enrich the population of Purkinje cells, instead of selecting cells for the KIRELL2 marker (as cerebellar neurons differentiation protocols had described previously), Purkinje cell precursors were selected by selection of Thy1-positive cells using FACS sorting. This selection allowed obtaining a greater number of mature Purkinje cells after co-culture with P4-P7 mouse cerebellar granule neurons up to approximately 130 days. With this protocol, the cerebellar Purkinje cells manifested morphological changes over time, passing through a primary bipolar morphology and short branches, in addition to expressing specific markers of CPCs such as Calbindin and PCP2. As the differentiation protocol progressed, all the PLAN and ARSACS CPCs and their corresponding healthy carriers, as well as those of the control, increased the branching and extension of the dendrites, and the cell soma also developed an oval shape typical of Purkinje cells, which together with the

expression of synaptic markers indicated an increase in the neuronal maturation of the culture.

It was observed that the action potentials observed after the injection of a direct depolarizing current in the neuronal soma showed responses of repetitive action potentials in all ARSACS and PLAN patient CPCs. The study of intrinsic electrophysiological properties was achieved due to the whole cell patch clamp technique, that allowed to confirm the phenotype and neuronal functionality of the models.

Once the cellular models CPC PLAN and CPC ARSACS were obtained, the cerebellar precursors and the cerebellar Purkinje cells in *in vitro* culture generated from the hiPSCs lines were used to characterize the presence of the phenotype described in both diseases and explore into the mechanisms of disease through different techniques such as analysis of expression of genes and proteins associated with different pathological pathways, studies of mitochondrial functionality, as well as the study of some electrophysiological properties.

RESULTS AND DISCUSSION CHAPTER 1

Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) is a rare neurodegenerative disease with autosomal recessive inheritance and early onset that presents progressive cerebellar dysfunction (1). It is characterized by peripheral neuropathy, cerebellar Purkinje cell degeneration and spinal cord degeneration. ARSACS is caused by mutations in the *SACS* gene, which codes for the protein SACSIN. Although ARSACS was first described in 1978 and defined as endemic in the French-Canadian region of Quebec, the cases have subsequently been identified in more than 20 countries, with more than 200 different mutations (2). The available treatment is symptomatic in order to mitigate the symptoms of the disease and improve the patient's life quality. Therefore, it is necessary to discover the role of *SACS* in ARSACS pathology to achieve a therapy for these patients.

Purkinje cell death and cerebellar degeneration associated with ARSACS remains poorly understood, in part due to a lack of suitable animal and cellular models.

However, the animal ARSACS disease models described do largely reproduce the symptoms of the disease and have initiated the study of the possible molecular pathways affected, which has made it possible to design experiments that demonstrate the direct relationship between the genetic alteration and the symptoms from ARSACS (9-14).

As described in chapter 1 of this thesis, a cellular disease model has been designed to study ARSACS pathology (CPC ARSACS), using a neuronal differentiation protocol based on the generation of cerebellar precursor cells (CCPs) and cerebellar Purkinje cells (CPCs) derived from ARSACS patients and healthy carriers hiPSCs. Getting information about early cerebellar development and the possible pathological molecular mechanisms caused by *SACS* deficiency is key to the development of therapies.

The hiPSCs lines have originated from the cell reprogramming of skin fibroblasts from ARSACS patients and carriers. This process has been carried out using non-integrative reprogramming technology based on the overexpression of reprogramming factors that are important in development in somatic cells in vitro, which allow the differentiated phenotype to be reversed towards an embryonic phenotype with the potential to originate most of the cells of the organism, and among them, neurons (18,19). The reprogrammed hiPSCs lines had pluripotent cell characteristics, an unlimited proliferative capacity and the potential to differentiate into any cell type, in addition to containing the initial mutation that characterized them. This pluripotent character of the hiPSCs lines was demonstrated by different molecular techniques, checking how specific markers were present (20).

In order to obtain the CPC PLAN model, we used a pre-existing protocol of cerebellar differentiation with some modifications in collaboration with Sundberg and colleagues (87). Thanks to this model we obtained neurons that expressed specific genes from the posterior part of the brain/hindbrain during cellular induction and regionalization.

In early neurodevelopment stages, the upregulation of *GBX2* gene levels, a transcription factor that defines the midbrain barrier, together with the downregulation of *OTX2*, serves to specify the midbrain/hindbrain boundary (MHB) and allow initiation of cerebellar development in vivo. Neuronally differentiated

hiPSCs showed downregulation of pluripotency factors and subsequently early *GBX2* upregulation and decreased *OTX2* levels were detected, indicating nearly uniform acquisition of a neuronal fate as in the hindbrain. The increased gene expression of different types of genes in the differentiating cells such as *EN1*, *EN2* and *HOXA2* indicated that the neuronal differentiation process showed strong similarities between the *in vitro* differentiated model and human fetal cerebellum neurodevelopment. In addition, *KIRREL2* and *SKOR2* markers were also expressed in the differentiating cells that indicate the presence of early Purkinje cell markers in culture *in vitro* as well as in *in vivo* fetal hindbrain. GABAergic markers expression such as *GABRA2* and *GAD1/GAD67*, which are crucial for gamma-aminobutyric acid (GABA) neurotransmission in the CNS and Purkinje cells, were also observed in culture. These results suggest that GABAergic neurons were present such as Purkinje cells originating from the hindbrain zone. In addition, cerebellar precursor cell cultures derived from all hiPSCs lines expressed a wide range of non-specific neuronal markers such as Tuj1 or cerebellar Purkinje cell-specific markers such as LHX1, SKOR2, and PCP2.

The generated CPCs seemed to have reached a certain maturity 130 days after neuronal differentiation protocol and co-culture with mouse cerebellar granule neurons, as they expressed the adult Purkinje cell marker Calbindin and the presynaptic marker VGAT. Through this protocol, CPCs manifested morphological changes over time, passing through a primary bipolar morphology and short ramifications (186) to subsequently they increase the branching and extension of the dendrites, which indicated an increase neuronal culture maturation (72). The soma also developed an oval shape typical of cerebellar Purkinje cells.

All the CPCs derived from the hiPSCs lines, in addition to expressing the VGAT marker, also manifested action potentials after the injection of a direct depolarizing current in the neuronal soma. These repetitive action potentials in the generated cerebellar Purkinje cells confirmed the neuronal and functional phenotype of the model.

Electrophysiological properties, and therefore neuronal functionality, are also associated with neurite outgrowth and/or an increased number of ion channels located in the plasma membrane during the process of neuronal maturation (187). The pattern of arborization or dendritic complexity, the size of the soma and the

firing pattern of the obtained CPCs revealed a relatively immature state after 4 and a half months of differentiation, as they resembled fetal human cerebellar Purkinje cells (72,188). The lack of maturation could also be due to a lack of granule cell synaptic inputs, which in humans is 20 times higher in humans than in mice. In addition, another possible reason for the immature state of the CPCs obtained in this model could be due to the fact that the cells are cultured *in vitro* for 4 months, while in the living human organism the mature CPCs for a period of approximately 2 months. at 3 years (189,190).

This work also provides evidence that ARSACS CPCs suffer alterations in neuronal morphology, and in synaptic development at the end point of the assay, probably as a consequence of the molecular and metabolic alterations discussed below. Most ARSACS cerebellar cells precursors were impaired in their ability to fire action potentials repetitively in response to depolarizing current injection, and less negative resting membrane potential and membrane resistance than that observed in control CPCs (94, 95). These defects may derive from the inability of cerebellar cells precursors to mature into functional neurons or from energy dissipation dependent on transmembrane ion gradients, which under normal conditions ensure the proper flow of ion currents through membrane channels. These data may be in agreement with published data from ARSACS animal models, where at high current injection amplitudes, CPCs fired at significantly reduced frequencies compared to control cells in the anterior cerebellum, and prior to motor dysfunction (146,150). However, the relationship between specific alterations in the firing pattern and motor symptoms is not yet clear, since there is a great variety of different ionic and synaptic mechanisms in CPCs that behave abnormally, giving rise to different types of ataxia disorders (191). Therefore, a more in-depth study of the electrophysiological properties of the ARSACS cerebellar Purkinje cells would be necessary to delve into their functional capacity.

The CPC ARSACS model presented in this work is the first model based on the use of hiPSCs derived from patients with ARSACS that recapitulates the accumulation of NFH in neuronal cells. Between 45%-80% of the CPCs of ARSACS patients and between 12%-25% of ARSACS-H carriers present neurofilament bundles or accumulations. The study published by Benoit *et al.* 2018 proposed that each functional domain of SACSIN operated individually in the dynamics of NFs and

acting in different pathways functions in the regulation of assembly/dissassembly and maturation (135). This accumulation of NFs in the somatodendritic zone of the soma of CPCs is associated with a spatial disorganization and an increase in the diameter of the main dendrite in ARSACS. This phenotype has already been described in ARSACS animal models, where the accumulation of NFH in the CPCs of the superior cerebellar vermis, the thickening of the main dendrite and the disorganization of the dendritic tree precede neuronal death. The difference in the percentage of cells with accumulations of NFH found in the CPC ARSACS model, not only among patients but also among carriers, could indicate a residual activity of some subunit of SACSIN, which, depending on the type of domain with residual function, would contribute differently to the pathophysiology of the disease in ARSACS patients, or the existence of compensation mechanisms in the case of healthy carriers (141,192). ARSACS shares clinical and histopathological similarities with neurodegenerative diseases such as Alexander disease (AxD) and giant axonal neuropathy (GAN). Both present with ataxia, dysarthria, and nystagmus, probably due to the loss of white matter. At the cellular level, they also present interruption of the intermediate filaments and mitochondrial dysmotility and dysfunction (193,194).

In addition to providing evidence that ARSACS CPCs at the endpoint of the protocol exhibit the main cytoskeleton-associated feature of the ARSACS phenotype, the rest of the ARSACS specific pathological phenotypes can also be observed at developmental stages in cell culture specifically in CPCs.

The dysregulation of the dynamics of the cytoskeleton and consequently the alteration of its structure is related directly to mutations that code for its proteins or for secondary proteins that regulate them, such as chaperones, kinases, and keratins among others (169,184,185). The gene expression levels of the *CDK5* and *MAP2K* genes, responsible for the neurofilament-neurofilament association and the inhibition of neurofilament proteolysis, were increased in the cerebellar precursor cells of both patients and healthy carriers, although not in all patients. cases significantly. In addition, the expression levels of genes associated with promoting axonal transport and restricting associations between neurofilaments in axonal neurites were also increased in the case of *CK1 α* and significantly in the cerebellar precursor cells of ARSACS patients. This same behavior did not occur

with expression by *GSK3 β* , which also prevents NFs-NFs interaction not only in axonal neurites but also in the soma. Different neurodegenerative diseases present important alterations in the neuronal cytoskeleton and are not directly due to mutations in proteins related to actin, microtubules or neurofilament proteins, but affect the disease progression. For example, collapses in tubulin acetylation in CMT have been associated with mutations in the *HSPB1* gene encoding heat shock protein 27 (*HSP27*) (170). Therefore, in the present study it is established that it is possible that from early stages of cerebellar development, *SACSIN* could mediate the decrease in the expression of genes associated with the assembly of intermediate filaments and promote their proteolysis (195). In addition, the cellular mechanism mediated by *CK1 α* and *GSK3 β* in cells deficient in *SACSIN* is not sufficient to compensate for the loss of function and the grouping of intermediate filaments.

Changes in the distribution of neurofilaments can affect mitochondrial transport through axonal transport and it can interfere with their function and with the development of the pathology of the disease (196). As in other ARSACS disease models, the results reported here confirm, for the first time in human cerebellar cells precursors from hiPSCs from ARSACS patients and carriers, the presence of an altered oxidative state under basal conditions and impaired mitochondrial functions by the Mito stress assay. in an XFe96 flow analyzer. CCPs from both patients and one of the healthy ARSACS carriers have been shown to have reduced values of the most important parameters of mitochondrial function such as basal respiration, maximal respiration, respiration linked to ATP production, and responsiveness. Mutations in *INF2*, related to CMT, deregulate actin-dependent processes, which interferes with myelination and mitochondrial dynamics (197). Likewise, GFAP accumulation in GAN causes mitochondrial dysmotility (196,198). In motor neurons of the *SACS* KO mouse model, reduction in mitochondrial dynamics and morphological changes have also been described, however, the accumulation of neurofilaments precedes changes in mitochondrial dynamics, which suggests that *SACSIN* acts from early stages of disease on cytoskeleton homeostasis (161).

On the other hand, also in the present work it has been shown that mutations in *SACS* are associated with elevated levels of reactive oxygen species (ROS) in the early stages of the disease in CCPs of ARSACS patients, accompanied by a decrease

in the potential of mitochondrial membrane. ROS play an important role in cell signaling and at abnormally high levels are detrimental to cells and could lead to cell death (199). In addition, other features indicating mitochondrial dysfunction such as altered mitochondrial membrane potential, mitochondrial morphology, and decreased ATP levels present in ARSACS cell and animal models. In addition, it has been described that the deregulation of cytoskeleton homeostasis would cause a decrease in mitochondrial dynamics or traffic, which, together with the poor localization of DRP1 in the cytoplasm, would cause dysfunctional hyperfused mitochondria to accumulate (161,178). This suggests a global deterioration of these organelles that can lead to an energy failure in the cell. This phenotype has also been observed in other neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, where the hyperphosphorylation of the Tau protein causes a decrease in mitochondria trafficking throughout the cytoskeleton and the consequent accumulation of mitochondria around the MTOC and a reduction in mitochondrial fission by lack of DRP1 localization (200-202). Therefore, since mitochondrial energy production is indispensable for the maintenance of neuronal homeostasis, it is likely that the lack of adequate energy supply in ARSACS cells contributes to disease progression.

Through interaction with the proteasome or through the autophagic pathway, HSPs are also able to control the homeostasis of intermediate filaments, promoting their degradation (203,204). Given the chaperone function of SACSIN, the possible involvement of autophagy dysfunction in neurodegeneration induced by SACS mutations has been studied. In cerebellar cell precursors from ARSACS patients and carriers, when using the BafA1 lysosomal inhibitor, there was no increase in the marker for autophagosome formation (protein LC3II) nor in the fusion marker for autophagolysosomal p62. This could indicate an interruption in autophagic flow and accumulation of damaged organelles such as mitochondria, which could release ROS and proapoptotic factors, contributing to neuronal degeneration and death and to the pathophysiology of ARSACS (168). The deterioration of autophagy and/or mitophagy has been involved in the loss of neurons in multiple neurodegenerative diseases that present with dysfunction in the cytoskeleton as the main characteristic such as GAN or CMT, in addition to ARSACS (77,85,196). The presence of the UbL, DNAJ and XPCB domains of SACSIN indicate its interaction with the ubiquitin-proteasome system. However, as in previous studies, it has been observed that the CCPs derived from ARSACS patients and carriers seem to inhibit

the proteasome efficiently. In diseases such as GAN, it is also described that the lack of Gigaxonin protein would inhibit degradation by the proteasome, since it encodes for a Ube3A protein and is associated with the accumulation of intermediate filaments due to its dysfunction. It has been described that its overexpression could stop or even reverse the progression of the disease, even at low concentrations, by disaggregating intermediate filaments (197). The accumulation of aggregated intermediate filaments and the accumulation of dysfunctional mitochondria could be a result of abnormal autophagic clearance or flux in ARSACS pathology.

In this study, a genotype-dependent variability of results has also been observed, especially with regard to the healthy ARSACS-H2 carrier and among ARSACS patients. These changes could be explained by the nature of the mutations in the *SACS* gene, and the need for the existence of compensation mechanisms in the case of the ARSACS-H2 carrier. A mechanism has recently been described by which mutations causing degradation of mutant mRNA trigger modulation of adaptation genes that could compensate for loss of function of the protein encoded by the mutated gene (205,206). However, the mRNA degradation caused by mutations in *SACS* described by Longo *et al.* 2022 (141), could interrupt translation upstream in the mRNA of the healthy copy, which would lead to the presence of the phenotype in healthy carriers (207). In fact, it has been described in fibroblast cell lines from healthy ARSACS carriers that the reduction of the *SACSIN* protein causes the accumulation of intermediate filaments, although not to the level that occurs in fibroblasts from ARSACS patients (87). It would be interesting to delve into the complementary mechanisms that some healthy carriers could have in autosomal recessive diseases, since they could shed light on compensation mechanisms and be useful for the study and development of therapies for diseases such as ARSACS.

The association between HSPs and other inherited neuropathies such as GAN or CMT makes chaperone proteins as a potential therapeutic target. Pathways are currently being studied and drugs based on heat shock proteins regulation are being developed for use as therapies in ARSACS (135,178). Upregulation of heat shock proteins (HSPs) could facilitate unpackaging and/or removal by the proteasome or by autophagy. Furthermore, it could also be informative to identify

compounds that promote the survival of ARSACS neurons in the face of oxidative stress and mitochondrial dysfunction.

In summary, the hiPSCs derived human cerebellar-specific neuronal model for the study of ARSACS has been established for the first time. The ARSACS CPC model offers the opportunity to delve into the study of the first dysfunctional molecular defects, both in human cells of the developing cerebellum and in adult cerebellar Purkinje cells, which have been described in this work and in other ARSACS models of disease and patients. The CPCs derived from ARSACS patients allow direct investigation of disease mechanisms in an individual, genotype-dependent manner, so this model represents an effective tool to identify possible therapeutic targets and design drugs that allow reversing the alterations detected directly in human ARSACS neurons.

RESULTS AND DISCUSION CHAPTER 2

PLA2G6-associated neurodegeneration (PLAN) is a devastating neurodegenerative rare disease that mainly affects children and presents with severe cerebellar atrophy. Currently, there are only treatments to palliate the symptoms (1-3), nonetheless, two clinical trials based on the use of D-PUFAs and desipramine (focusing on PARK14) are being carried out at the moment and their results are yet to be published (295). In addition to the gene replacement therapy, the latest studies propose the use of Vitamin E as an antioxidant treatment in patients with PLAN (278,296). PLAN-associated cerebellar degeneration remains unknown partially due to the lack of adequate animal and cellular models. However, the existing animal models for PLAN disease do reproduce, in broad terms, the symptomatology of the disease and, thanks to them, researchers have started to study the molecular pathways that might be affected. These studies have led to new experimental designs which demonstrate the direct implication of the genetic alterations studied and PLAN symptoms (251-254,260,289).

As shown in chapter 2, in the present thesis we have design a cellular model that replicates PLAN disease (CPC PLAN), by using a protocol of neuronal differentiation based on the generation of cerebellar cells precursors (CCPs) and cerebellar Purkinje cells (CPCs) from patients' hiPSCs and healthy PLAN carriers. Obtaining

information about the early development of the cerebellum and the possible molecular mechanisms of the pathology derived from a *PLA2G6* deficiency is crucial to develop new therapies.

hiPSCs lines have been originated by reprogramming skin fibroblasts from patients and PLAN carriers. This process has been carried out by using non-integrating reprogramming based on the overexpression of reprogramming factors essential for the development of somatic cells *in vitro*, which can revert the differentiated phenotype towards an embryonic phenotype with potential to originate most of the cells within an organism and, among them, neurons (18,19). The obtained hiPSCs had the characteristics of pluripotent cells, an unlimited proliferative capacity, and the potential to differentiate to any other cellular type, in addition to possessing the mutation characteristic of the disease. The pluripotency of the hiPSCs lines was demonstrated by different molecular techniques by assessing the presence of specific molecular markers (20)

In order to obtain the CPC PLAN model, we used a pre-existing protocol of cerebellar differentiation with some modifications in collaboration with Sundberg and colleagues (87). Thanks to this model we obtained neurons that expressed specific genes from the posterior part of the brain/hindbrain during cellular induction and regionalization.

In early stages of the neurodevelopmental process, there is an ascending *GBX2* regulation, a transcriptional factor that defines the limit between the midbrain and the hindbrain alongside a downregulation in the expression of *OTX2*. Altogether, the modulation of these factors allows the beginning of cerebellar development *in vivo*. hiPSCs cells differentiated into neurons showed a downregulation of pluripotency factors. Posteriorly, we detected an early upregulation of *GBX2* and a downregulation of *OTX2*, which indicated a uniform regulation a neuronal destination in the posterior brain. The increase in the expression of the different gene types in differentiating cells such as *EN1*, *EN2*, and *HOXA2* indicated that the neuronal differentiation process showed parallelism between the model *in vitro* and the development of a fetal human cerebellum. The markers *KIRREL2* and *SKOR2* are also expressed in the differentiating cells which indicates the presence of *in vitro* markers for early Purkinje cells like in the fetal hindbrain. GABAergic markers such as *GABRA2* and *GAD1/GAD67*, essential for GABA neurotransmission

in the CNS and Purkinje cells, were also observed in the cell culture. These results suggest that GABAergic neurons such as Purkinje cells with a hindbrain origin were present. Moreover, the cultures for cerebellar precursor cells coming from hiPSCs lines expressed both several nonspecific neuronal markers such as Tuj1 and specific markers of cerebellar Purkinje cells such as LHX1, SKOR2, and PCP2.

The generated cerebellar Purkinje cells reached certain maturity after 130 days after the beginning of the neuronal differentiation protocol and after the coculture with cerebellar granular neurons from mice since they expressed calbindin, which is a marker of adult Purkinje cells, and the presynaptic marker VGAT. By using this protocol, cerebellar Purkinje cells showed morphological changes through time. Concretely, they went from a bipolar primary morphology and short ramifications, as described by Ramón y Cajal as fusiform corpuscular phase (186), to posteriorly increase the ramifications and the extension of their dendrites, which indicated an increase in neuronal maturity of the cells in the culture (72). The cellular soma also developed an oval shape typical from Purkinje cells. Every hiPSCs-derived CPCs express the VGAT marker and show action potentials after the introduction of a direct depolarizing current in the neuronal soma. Repetitive action potentials in the generated CPCs, confirmed the neuronal phenotype and the functionality of the model.

Electrophysiological properties, and the neuronal functionality are associated with the growth of neurites and/or a bigger number of ionic channels places on the plasmatic membrane during the process of neuronal maturation (187). The patten of arborization or dendritic complexity, the size of the soma, and the firing pattern of the obtained CPCs revealed a state relatively immature after 4 and half months of differentiation, since they were like human CPCs from 18 months old fetus (72,190). The lack of maturation could also be caused by the lack of synaptic entries from granular cells, which in humans is 20 times bigger than in mice. Additionally, another possibility for the immature state of the obtained CPCs in this model lays on the fact that cells are cultivated *in vitro* for four months, whereas in the living human organism cerebellar Purkinje cells mature during a period of from two to three years (189,190).

We also provide evidence that PLAN cerebellar Purkinje cells suffer alterations in neuronal morphology and in the synaptic development, being those alterations due

to molecular and metabolic changes. Most of PLAN cerebellar Purkinje cells had the capacity to fire repetitive action potentials in response to a depolarizing current. They also had a membrane resistance and resting potential less negative than the ones observed in control cerebellar Purkinje cells. These defects could derive from the inability of the CPCs to mature into functional neurons or from a dissipation of energy dependent on transmembrane ionic gradients which in normal conditions ensure the appropriate flux of ionic currents through the channels in the membrane (94,95). Patients' hiPSCs-based NBIA neuronal models also show this very phenotype. In PKAN, neurons cannot develop repetitive action potentials, which can be reversed when treating these cells with coenzyme A (CoA) (297). However, in other forms of NBIA such as NF, neurons show a correct electric functionality which suggests that at least NF patients-derived neurons do not openly show an aberrant electrophysiology (294).

The accumulation of iron in the brain as a characteristic feature of NBIA is not present in all the patients as it happens in PLAN. This abnormal accumulation of iron makes us wonder that sometimes it could be consequence of an underlying secondary metabolic defect, since only two genes implicated have been directly associated with mutations in proteins related to iron metabolism, including CP (ceruloplasmin) and FTL (light chain ferritin) (212).

The homeostatic response of the protein that regulates the entrance of iron into the cell, TfR1, seems to be normal in all cerebellar Purkinje cells in the designed conditions. However, the altered expression of FTH and FTL in PLAN and healthy carriers cerebellar Purkinje cells suggests that there can be a deregulation in the capacity of iron storage within the cell. Iron is stored in ferritin during periods of iron excess, and it is released in iron-demanding periods. The release of iron from ferritin is regulated through a kind of selective autophagy called ferritinophagy, which, at the same time, is regulated by the nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4). When NCOA4 binds ferritin, it is transported to the lysosome where it is degraded and where the iron is kept waiting to be released to be used by the cell (298). The tendency to a lower NCOA4 expression when exposed to iron as observed in PLAN and healthy carriers cerebellar Purkinje cells cultures supports the theory that in the PLAN pathology the capacity to both remove or release iron is deficient. These results are compatible with the studies published for other NBIA

forms such as PKAN, in which, after iron supplementation, the levels of expression of ferritins increased and the ones of TfR1 decreased (299). Nonetheless, big quantities of protein TfR1 have been detected in many forms of NBIA even after the exposition to iron. The lack of TfR1 leads to endocytosis deregulation in NBIA cell lines (fibroblasts with mutations in *PANK2*, *CRAT*, *C19ORF12*, and *PLA2G6*) and, therefore, there is an increase of it in the cell and of cellular iron uptake (286).

Furthermore, in the present thesis we measured the levels of autophagic proteins with the aim of analyzing the possible implication of *PLA2G6* in the general cellular recycling. Control line cerebellar Purkinje cells and healthy PLAN-H carriers presented a normal activation behavior, autophagic pathway response, and lysosomal pathway-dependent recycling, whereas PLAN patients' cerebellar Purkinje cells these effects were not significant. Other recent data from models of other forms of NBIA also showed high iron levels, alteration in its homeostasis and lysosomal disfunction (300). Ubiquitin-positive aggregates accumulation in neurons and axon also accompany the MPAN pathology (301). The dysfunction of ATP13A2 can affect the endo-lysosomal flux and autophagia, which results in the accumulation of insoluble proteins and damaged mitochondria, leading to apoptosis and neuroinflammation (302). The accumulation of TVS in the neurons before membrane degeneration, axonal break, and the development of neuroinflammation has been described in *PLA2G6* models (256). The exposed data in the present thesis suggest that *PLA2G6* might not be essential to the formation of autophagosomes, although it is necessary for the fusion of the autophagosome and the lysosome, and, therefore, for the recycling and removal of damaged organelles and iron within the cell. Altogether these data and the data gathered in the literature might indicate that PLAN and other forms of NBIA present with an abnormal recycling through the endo-lysosomal pathway as a disease mechanism which contributes to the physiopathology (274,303,304).

Mitochondria are also related to iron homeostasis in the cell and plays a crucial role in energy metabolism using intracellular iron ions. As previously determined in other PLAN disease models, the results herein exposed confirm that for the first time in patients' hiPSCs-derived human cerebellar Purkinje cells

As has been previously determined in other PLAN disease models, the results presented here confirmed for the first time in human cerebellar cell precursors

from hiPSCs from PLAN patients and carriers, the presence of an altered oxidative state in basal conditions and the deterioration of mitochondrial functions by Mitostress assay on an XFe96 flow analyzer. Cerebellar cell precursors from both patients and healthy PLAN carriers have been shown to have reduced values of the most important parameters of mitochondrial function such as basal respiration, maximal respiration, respiration linked to ATP production, and responsiveness (305,306). Different studies also describe that mitochondrial dysfunction is a characteristic in other forms of NBIA and that it could precede iron accumulation and be the basis for the progression of this set of diseases. There are several NBIA genes that are directly associated with mitochondria, such as *PANK2*, *COASY*, and *C19ORF12*, which demonstrates the essential role of these organs in triggering the pathological process, at least in these NBIA forms (210,307). But as in many other neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and ataxia, among others (308-310).

On the other hand, also in the present work it has been shown that the simultaneous in *PLA2G6* are associated with slightly elevated levels of ROS in the early stages of the disease, both in cerebellar cell precursors of PLAN patients and of the healthy carrier, accompanied by a decrease in mitochondrial membrane potential only in patients. ROS play an important role in cell signaling and at abnormally high levels are detrimental to cells and could lead to cell death (199). In addition, other characteristics that indicate mitochondrial dysfunction such as the presence of the mitochondrial membrane potential, the mitochondrial morphology and the decrease in ATP levels present in cells and animals of these PLAN model patients (254,260,272). This suggests a global deterioration of these organs that can lead to an energetic failure in the cell. Therefore, since mitochondrial energy production is indispensable for the maintenance of neuronal homeostasis, it is likely that the lack of adequate energy supply to cells contributes to disease progression.

High levels of ROS species react with membrane lipids, oxidizing them, thus causing lipid peroxidation (263,264,311). This increased lipid peroxidation may be possible due to the absence of iPLA2 β activity and its function as a phospholipase, which preferentially cleaves oxidized lipids to maintain redox homeostasis (275,276). In this work, it has been described those reactions in *PLA2G6* are associated with

increased levels of lipid peroxidation in the cerebellar cell precursors of PLAN patients and healthy carriers, and with a decrease in membrane potential only in PLAN patients. Similarly, it is known that lipid peroxidation induces mitochondrial damage and would lead to a decrease in the function of the oxidative respiratory chain, a reduction in membrane potential and elevated levels of ROS. Therefore, *PLA2G6* could exert both an important role in mitochondrial function and membrane potential maintenance either by protecting the mitochondrial membrane from lipid peroxidation of its PUFAs caused by ROS levels triggered by the own mitochondrial respiration and/or by direct interaction with the mitochondria. The levels of lipid peroxidation analyzed in this work have been carried out using the TBARS analysis technique. Although this technique has been criticized by researchers for its low specificity (312), the results are consistent with what has been described in other animal and cellular models of PLAN disease (262,272,278).

Mitochondrial dysfunction is associated with lipid metabolism and is a potential source of ROS. In fact, ROS have been implicated in a variety of neurodegenerative processes such as Parkinson's disease or amyotrophic lateral sclerosis (ALS), which are also related to mitochondria. Increased ROS generation and lipid peroxidation levels are also shown in many forms of NBIA other than PLAN, such as PKAN, MPAN, and CoPAN, neuroferritinopathy (NF), and aceruloplasminemia (CP). All these forms share mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation as the main pathways of cell death. However, in the NBIA forms, only the *PLA2G6* and *FA2H* genes are the ones that are directly related to the synthesis of membrane phospholipids and, therefore, in lipid metabolism (210).

In this work, it has been described that in PLAN CCPs and healthy PLAN-H carriers of the generated CPC model, the expression levels of genes associated with the lipid peroxidation mechanism are altered. The expression of *ASCL4* and *LPCAT3* decreases in cerebellar cell precursors from PLAN patients. These genes are responsible for encoding proteins that metabolize and esterify PUFA-containing fatty acids such as phosphatidylethanolamine (PE) (AA-PE)/adrenoyl (AdA)-PE containing arachidonic acid (AA). *ASCL4* and *LPCAT3* promote lipid peroxidation by the enzymatic pathway and their inhibition of *ASCL4* and *LPCAT3* counteracts the accumulation of substrates for lipid peroxidation in cells (313). In addition, the

expression of PEBP1, a cofactor that works with lipoxygenases (LOX) that metabolize peroxidized lipid precursors, also decreases its expression in the CCPs of PLAN patients. In a study on the effect of the absence of *PLA2G6* on lipid peroxidation in the trophoblast, it has been described that *PLA2G6* can act together with *LPCAT3* (275) to convert the pro ferroptotic signals into "healthy" membrane phospholipids. This suggests that already in early stages, in PLAN CCPs, there could be a mechanism by which the cell would try not to promote the metabolism of PUFAs to favor protection against lipid peroxidation in patients with *PLA2G6* deficiencies.

When homeostatic mechanisms to control iron and lipid peroxidation levels in the cell fail and/or are dysregulated in the cell, a type of programmed cell death called ferroptosis is activated. Ferroptosis is an iron-dependent regulated cell death pathway caused by a dysregulation of redox homeostasis of the intracellular microenvironment that is characterized by excessive accumulation of lethal lipid hydroperoxides resulting from the reaction of tissue iron with esterified PUFAs, especially n-PUFAs, -6 as arachidonic acid. The exact mechanism of ferroptotic cell death is unknown, but one hypothesis is that lipid damage leads to destruction of the plasma membrane (265,314).

Different studies establish that, in the regulation of ferroptosis, glutathione peroxidase (GPX4), the mevalonate pathway or the Nrf2 pathway (or NFE2L22018) are also involved, among other factors such as detoxification pathways (281,282). The decrease in the expression of *SLC7A11* and the significant increase in the expression of *GPX4* in CCPs from PLAN patients under study suggest a deregulation in the glutathione detox system. *GPX4* neutralizes the oxidized species forming non-toxic lipid alcohols. To fulfill its function, it needs to interact with GSH, which is activated by cysteine that is transported from outside to inside the cells by the transporter *SLC7A11* (315,316). However, deletion of the *PLA2G6* gene is not sufficient to induce ferroptosis under normal conditions, unless the *GPX4* pathway is also altered. The low levels of GSH and *GPX4* described in other NBIA forms, such as *PKAN* or *NF*, suggest that the detoxification mechanism by GSH-*GPX4* is impaired and in conjunction with the lack of function of the proteins encoded by the NBIA genes, including *PLA2G6*, would cause an increase in vulnerability to cell damage caused by lipid peroxidation and other reactive agents (275,293,294). Similar data

have also been described in diseases such as Friedrich's ataxia. GPX4 inhibition, increased lipid peroxidation, iron accumulation, and associated mitochondrial dysfunction have led to the identification of ferroptosis as an important mechanism of cell death in this type of ataxia (317,318). In fact, they have carried out different clinical trials in FRDA based on pharmacological agents such as RT001 (D-PUFA) and vatiquinone, which act by mediating lipid remodeling and could be take part in the inhibition of cell death by ferroptosis, among others (319,320).

FSP1, a protein previously known as AIFM2 (mitochondrial apoptosis inducing factor 2), and specifically, the NADH-FSP1-CoQ10 pathway, is considered a GPX4-independent suppressor of ferroptosis (321,322). For the first time in a PLAN disease model based on CCPs derived from hiPSCs lines from PLAN patients, FSP1 expression levels were both decreased in CCPs from PLAN patients. The N-myristoylation of FSP1 causes its recruitment to the plasma membrane where it works by reducing coenzyme Q10 (CoQ10) and generates a lipophilic antioxidant that traps radicals that stop the propagation of lipid peroxides (321). The lack of FSP1 would generate the lack of regeneration of CoQ10 through NAD(P)H, and therefore losing the reducing capacity. In addition, as CoQ10 is easily autoxidized and has poor dynamics within the lipid bilayer, it has been shown that the use of antioxidant agents could contribute to the protection against ferroptosis observed by FSP1-CoQ10 (322). This could explain why the use of lipophilic antioxidant agents such as D-PUFAs and vitamin E (α -tocopherol) in PLAN models decreases the autoxidation of PUFAs and therefore of their reactive compounds, peroxidized lipids. However, the increased expression of HMOX-1 accompanied by the intracellular translocation of Nrf2 and the induction of NQO1 as an antioxidant effect does occur in the CCPs of PLAN patients (323,324). But not even the increase in the expression of other ubiquinones such as NQO1 could be able to alleviate the lack of the effect of FSP1 in PLAN patients, as is maintained in this work.

In conclusion, to suppress phospholipid peroxidation and ferroptosis, in addition to other detoxification pathways such as GPX4, there is the FSP1-CoQ10-NAD(P) pathway, which however appears to be impaired in PLAN pathology. However, the loss of function of this pathway could be replaced by the use of antioxidant agents that could be capable of reversing the pathological events described (210,272,278). Vitamin E deficiency has been linked to GPX4 dysfunction (325). In fact, vitamin E

supplementation improves symptoms and prevents progression in most patients with ataxia with vitamin E deficiency (AVED), who also have elevated levels of lipid peroxidation and oxidative stress, which could initiate the mechanism of neuronal death by ferroptosis (326,327). Despite the success in studies in PLAN models of conventional antioxidants such as vitamin E, these have also been tested in clinical studies of other diseases that present similar metabolic problems such as Parkinson's or Alzheimer's disease, however, they have not been demonstrated conclusive benefits (272,278,328,329). More studies are needed to fully elucidate the pathophysiological mechanisms associated with the FSP1-CoQ10-NAD(P)H pathway and to assess the potential usefulness of other synthetic and/or conventional antioxidants such as vitamin E in PLAN therapy.

Recent studies have suggested that the existence of ferroptosis in neuronal cells is associated with different neurological and neurodegenerative disorders, ischemic and hemorrhagic cerebrovascular accidents, Parkinson's, or Alzheimer's disease. They are also normally accompanied by lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction, and GPX4 dysregulation. Furthermore, it has been shown that ferroptotic inhibitors, such as ferrostatins-1 and liproxstatins-1, could improve neuronal loss and protect neurons (330,331).

The high content of PUFA, cholesterol and other fatty acids in the central nervous system makes it especially vulnerable to redox imbalance generated by high ROS content due to mitochondrial malfunction in conjunction with susceptibility to lipid peroxidation. Furthermore, in the mitochondria, the main lipid in human mitochondria is cardiolipin, an n-6 esterified PUFA that is highly susceptible to lipid peroxidation (332,333). All NBIA forms present with mitochondrial dysfunction and deregulation of redox homeostasis due to accumulation of mitochondrial ROS, which would be capable of oxidizing mitochondrial cardiolipin among other PUFAs (210). In addition, the availability of cellular free iron due to the imbalance of iron homeostasis, either due to failures in entry, storage and/or recycling, or due to release from damaged mitochondria, makes ferroptosis the best candidate to promote neurodegeneration and neuronal death in NBIA (334). Therefore, it would be interesting to analyze if cell death in NBIA neurons is due to the activation of ferroptosis and if the optimization and development of ferroptosis

inhibitors in conjunction with antioxidants could be a potential approach to disease for NBIA, PLAN and other neurodegenerative disorders.

In this work, a genotype-dependent variability of results has also been observed, especially in what refers to the healthy PLAN-H carrier. These changes, many times more related to following the same course of pathology as the data in PLAN patients, could be explained by the nature of *PLA2G6* mutations, and the need for the existence of compensation mechanisms in carriers of PLAN disease. -H intervene in the correct final neuronal functionality. Recent studies talk about a mechanism during which the mutations that cause the degradation of the mutant mRNA trigger the modulation of adaptation genes that could compensate for the loss of function of the protein that the mutated gene encodes (205,206). It would be interesting to delve into this type of mechanisms that some healthy carriers could have in autosomal recessive diseases, since they could shed light on compensation mechanisms and be useful for the study and development of therapies for these diseases.

In the CPC PLAN model, the findings suggest that there are several functions that are impaired early in cerebellar development and that may contribute to the pathogenesis of the disease. The alterations observed in this thesis and in previous works may be caused by a primary effect of the loss of *PLA2G6* and/or by secondary defects due to the neurodegenerative process. The cerebellar Purkinje cells derived from PLAN patients offer the opportunity to directly investigate the mechanisms of disease in an individual, genotype-dependent manner, so this model represents an effective tool to identify possible therapeutic targets and design drugs that allow reversing the alterations detected directly in human neurons. PLAN.

CONCLUSIONS

1. The eight hiPSC lines generated by reprogramming of fibroblasts obtained from PLAN and ARSACS patients and healthy carriers present high differentiation capacity *in vitro* to the three germ layers. The generated cells are pluripotent, have normal karyotype, and maintain of the corresponding *PLA2G6* and *SACS* gene mutations.

2. The new PLAN and ARSACS cerebellar Purkinje cells (CPCs) and cerebellar precursor cells (CCPs) models *in vitro* express Purkinje cell markers and synaptic vesicles and acquire a complex neuronal morphology compatible with human CPCs and specific electrophysiological properties, which are altered in the PLAN and ARSACS patient's model.
3. The human PLAN and ARSACS CPC cell models show abnormalities described in the patients' clinical phenotype and, therefore, replicate the pathophysiology of the diseases, which is why it is useful for the study of the underlying disease mechanism and new drug treatments.
4. PLAN and ARSACS patient's CCPs show mitochondrial dysfunction, accumulation of reactive oxygen species, and loss of membrane potential, which contributes to dysfunction of redox homeostasis in neurons and promotes neuronal deterioration. Abnormalities in mitochondrial dynamics are known in many neurodegenerative diseases, as well as in PLAN and ARSACS diseases.
5. Genotype-dependent aggregation of non-phosphorylated neurofilaments has been described in ARSACS patient's CPCs. In addition, in ARSACS patient's CCPs, the abnormal functioning of the regulation of cytoskeleton homeostasis and neuronal recycling by the autophagic-lysosomal pathway has been established, which, together, could cause mitochondrial dysfunction and activation of cell death neurons of ARSACS patients, highlighting the role in SACS proteostasis against these neurodegenerative events.
6. Lipid peroxidation levels are increased in PLAN patient's CCPs, this being a characteristic of the pathological process described in very different cell and animal models of the disease, which underlines how the new human cell model generated replicates its pathophysiology.
7. In PLAN patient's CCPs, the abnormal functioning of processes such as ferritinophagy and neuronal recycling through the autophagic-lysosomal

pathway has been established, which together with the presence of peroxidized lipids could cause the activation of cell death by ferroptosis in PLAN patient neurons, highlighting the protective role of PLA2G6 against these neurodegenerative events.

8. In PLAN patient's CCPs, the decreased expression of FSP1, involved in the NADH-FSP1-CoQ10 pathway and suppressor of ferroptosis, indicates this pathway as a target for a possible therapeutic intervention that would stop the spread of lipid peroxides, a crucial aspect to achieve the cure of PLAN patients.

H. Abreviaturas

4-HNE: *4-hydroxy-2-nonenal*

Aa: aminoácidos (*aminoacids*)

AA: Ácido araquidónico

ACSL4: miembro 4 de la familia de cadena larga de la acil-CoA sintetasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPA: *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

AP: Anteroposterior

AraC: *Cytosine β-D-arabinofuranoside hydrochloride*

ARN: ácido ribonucleico (ribonucleic acid)

mRNA: ARN mensajero

ARSACS: *Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay*

AVED: ataxia por deficiencia de vitamina E

BafA1: Bafilomicina A1

BMP: Bone morphogenetic protein

bp: pares de bases

BSA: albúmina de suero bovina (*bovine serum albumin*)

CCPs: células precursoras de cerebelo (*cerebellar cell precursors*)

Cdk5: Cyclin dependent kinase 5

cDNA: DNA copia

CP: acerulopasminemia

CPCs: Células de Purkinje de cerebelo (*Cerebellar Purkinje cells*)

CoQ10: Coenzima Q10

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTP: desoxirribonucleótidos

D-PUFA: ácidos grasos poliinsaturados deuterados

dSMADi: inhibición dual de la vía SMAD

DV: Dorsoventral

ECAR: *extracellular acidification rate*

EDTA: EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (*ethylene diamine tetra acetate*)

EGL: *external granule layer*

ENMG: electroneuromiografía

ELA: *Esclerosis lateral amiotrófica*

ER: Retículo Endoplasmático (*Endoplasmatic reticulum*)

FACS: clasificación de células activada por fluorescencia (*Fluorescence-activated Cell Sorting*)

FCCP: *carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*

FRDA: ataxia de Friedrich (*Fiedrich's Ataxia*)

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factor)

GABA: ácido g-aminobutírico

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HBSS: Hanks' Balanced Salt solution

HDF: *Human dermal fibroblast*

hESCs: células madre embrionarias humanas (*Human embryonic stem cells*)

HFF: *Human feeder fibroblast*

hiPSCs: Células pluripotentes inducidas humanas (*human induced pluripotent stem cells*)

HuGolgi: Golgi humano

HuNu: Núcleo humano

HRS: *Heat shock response*

HSP: Proteínas de choque térmico (*Heat shock protein*)

IsO: Organizador ístmico (*Isthmic organizer*)

KD: Knock-down

KO: Knock-out

LPCAT3: lisofosfatidilcolina aciltransferasa 3

MDA: malondialdehído

mESCs: *murine embryonic stem cells*

MHB: *mesoderm-hindbrain boundary*

MTOC: centro de organización de los microtúbulos (microtubule-organizing center)

NBIA: Neurodegeneración por acumulación de hierro (Neuron brain iron accumulation)

NMDA: N-methyl-D-aspartate receptor

NF: Neuroferritinopatía (*neuroferritinopathy*)

NFs: Neurofilamentos (Neurofilaments)

NFH: Neurofilamentos de cadena pesada

NFL: Neurofilamentos de cadena ligera

NFM: Neurofilamentos de peso medio

OCR: *oxygen consumption rate*

PBS: tampón fosfato salino

PE: Fosfatidiletanolamina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

P/S: Penicilina/Streptomina

PCP2: *Purkinje cell protein 2*

PFA: paraformaldehído

PLAN: *PLA2G6-Associated Neurodegeneration*

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

Ri: Resistencia de membrana (*input resistance*)

RMP: potencial de membrana en reposo (*Resting membrane potential*)

RMN: resonancia magnética nuclear

RNA: *ribonucleic acid*

ROS: especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)

RT-PCR: *Real time P polymerase chain reaction*)

SeV: Virus Sendai

SHH: *Sonic Hedgehog*

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

SPG: *Spastic Paraplegia*

TBARS: Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

TGF- β : *Transforming Growth Factor-beta*

TEM: *transmission electronic microscopy*

TEMED: Tetrametiletiléndiamina

TMRM: *Tetramethylrhodamine*

UPS: Sistema Ubiquitina-Proteasoma

WB: Western Blot

WT: ratón silvestre (*wild type*)

I. Bibliografía

1. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *European Journal of Human Genetics*. 2020 Feb 1;28(2):165–73.
2. Richter T, Nestler-Parr S, Babela R, Khan ZM, Tesoro T, Molsen E, et al. Rare Disease Terminology and Definitions-A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value in Health*. 2015 Sep 1;18(6):906–14.
3. Pogue RE, Cavalcanti DP, Shanker S, Andrade R v., Aguiar LR, de Carvalho JL, et al. Rare genetic diseases: update on diagnosis, treatment and online resources. Vol. 23, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2018. p. 187–95.
4. Austin CP, Cutillo CM, Lau LPL, Jonker AH, Rath A, Julkowska D, et al. Future of Rare Diseases Research 2017–2027: An IRDiRC Perspective. Vol. 11, *Clinical and Translational Science*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 21–7.
5. Anderson RH, Francis KR. Modeling rare diseases with induced pluripotent stem cell technology. Vol. 40, *Molecular and Cellular Probes*. Academic Press; 2018. p. 52–9.
6. Leung C, Jia Z. Mouse genetic models of human brain disorders. Vol. 7, *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A.; 2016.
7. McGraw CM, Ward CS, Samaco RC. Genetic rodent models of brain disorders: Perspectives on experimental approaches and therapeutic strategies. Vol. 175, *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*. Blackwell Publishing Inc.; 2017. p. 368–79.
8. Nair RR, Corrochano S, Gasco S, Tibbit C, Thompson D, Maduro C, et al. Uses for humanised mouse models in precision medicine for neurodegenerative disease. Vol. 30, *Mammalian Genome*. Springer New York LLC; 2019. p. 173–91.
9. Tan GA, Furber KL, Thangaraj MP, Sobchishin LR, Doucette JR, Nazarali AJ. Organotypic Cultures from the Adult CNS: A Novel Model to Study Demyelination and Remyelination Ex Vivo. *Cell Mol Neurobiol*. 2018 Jan 1;38(1):317–28.

10. Azzarelli R, Oleari R, Lettieri A, Andre' V, Cariboni A. In vitro, ex vivo and in vivo techniques to study neuronal migration in the developing cerebral cortex. Vol. 7, Brain Sciences. MDPI AG; 2017.
11. Slanzi A, Iannoto G, Rossi B, Zenaro E, Constantin G. In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. Vol. 8, Frontiers in Cell and Developmental Biology. Frontiers Media S.A.; 2020.
12. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. Vol. 12, Molecular Neurodegeneration. BioMed Central Ltd.; 2017. p. 1–11.
13. Ferrari E, Cardinale A, Picconi B, Gardoni F. From cell lines to pluripotent stem cells for modelling Parkinson's Disease. Vol. 340, Journal of Neuroscience Methods. Elsevier B.V.; 2020.
14. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, WaknitzMassachusetts Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. Science (1979) [Internet]. 1998 Nov 6;282(5391):1145–7. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.282.5391.1145>
15. Aubry L, Bugi A, Lefort N, Rousseau F, Peschanski M, Perrier AL. Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats [Internet]. 2008. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0808488105
16. Ilic D, Ogilvie C. Concise Review: Human Embryonic Stem Cells—What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? Vol. 35, Stem Cells. Wiley-Blackwell; 2017. p. 17–25.
17. Hovatta O, Stojkovic M, Nogueira M, Varela-Nieto I. European scientific, ethical, and legal issues on human stem cell research and regenerative medicine. Vol. 28, Stem cells (Dayton, Ohio). 2010. p. 1005–7.
18. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell. 2007 Nov 30;131(5):861–72.
19. Yu J, VodyanikMassachusetts Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells [Internet]. Available from: <https://www.science.org>

20. Revilla A, González C, Iriondo A, Fernández B, Prieto C, Marín C, et al. Current advances in the generation of human iPS cells: implications in cell-based regenerative medicine. Vol. 10, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. John Wiley and Sons Ltd; 2016. p. 893–907.
21. Amenduni M, de Filippis R, Cheung AYL, Disciglio V, Epistolato MC, Ariani F, et al. IPS cells to model CDKL5-related disorders. *European Journal of Human Genetics*. 2011 Dec;19(12):1246–55.
22. Crombie DE, Pera MF, Delatycki MB, Pébay A. Using human pluripotent stem cells to study Friedreich ataxia cardiomyopathy. Vol. 212, *International Journal of Cardiology*. Elsevier Ireland Ltd; 2016. p. 37–43.
23. Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, et al. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells [Internet]. 2013. Available from: <http://www.molecularbrain.com/content/6/1/19>
24. LancasterMassachusetts Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2014 Jan 1;9(10):2329–40.
25. LancasterMassachusetts Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013;501(7467):373–9.
26. Amin ND, Paşca SP. Building Models of Brain Disorders with Three-Dimensional Organoids. Vol. 100, *Neuron*. Cell Press; 2018. p. 389–405.
27. di Marco A, Vignone D, Gonzalez Paz O, Fini I, Battista MR, Cellucci A, et al. Establishment of an in Vitro Human Blood-Brain Barrier Model Derived from Induced Pluripotent Stem Cells and Comparison to a Porcine Cell-Based System. *Cells*. 2020 Apr 16;9(4).
28. Faustino Martins JM, Fischer C, Urzi A, Vidal R, Kunz S, Ruffault PL, et al. Self-Organizing 3D Human Trunk Neuromuscular Organoids. *Cell Stem Cell*. 2020 Feb 6;26(2):172-186.e6.
29. SelleckMassachusetts Bronner-Fraser M. Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development* [Internet]. 1995 Feb 1;121(2):525–38. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/121/2/525/38743/Origins-of-the-avian-neural-crest-the-role-of>

30. Pegoraro C, Monsoro-Burq AH. Signaling and transcriptional regulation in neural crest specification and migration: Lessons from xenopus embryos. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013;2(2):247–59.
31. Mizuseki K, Kishi M, Matsui M, Nakanishi S, Sasai Y. Xenopus Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development* [Internet]. 1998 Feb 15;125(4):579–87. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/125/4/579/40080/Xenopus-Zic-related-1-and-Sox-2-two-factors>
32. Gatto CL, Broadie K. Drosophila modeling of heritable neurodevelopmental disorders. Vol. 21, *Current Opinion in Neurobiology.* 2011. p. 834–41.
33. Kiecker C, Bates T, Bell E. Molecular specification of germ layers in vertebrate embryos. Vol. 73, *Cellular and Molecular Life Sciences.* Birkhauser Verlag AG; 2016. p. 923–47.
34. Harland R, Gerhart J. FORMATION AND FUNCTION OF SPEMANN'S ORGANIZER [Internet]. Vol. 13, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997. Available from: www.annualreviews.org
35. de Robertis EM. Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos [Internet]. Available from: <http://www.xenbase.org/>
36. Joubin K, Stern CD. Molecular Interactions Continuously Define the Organizer during the Cell Movements of Gastrulation define the organizer (including gene expression and in-ducing signals) move with a distinct population HH 4, lateral cells no longer move into the node, and. Vol. 98, *Cell.* 1999.
37. Nakamura H, Katahira T, Matsunaga E, Sato T. Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development. Vol. 49, *Brain Research Reviews.* 2005. p. 120–6.
38. Smith WC, Knecht AK, Wu M, Harland RM. Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing Xenopus mesoderm. *Nature* [Internet]. 1993 Feb;361(6412):547–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/361547a0>
39. Knecht AK, Harland RM. Mechanisms of dorsal-ventral patterning in noggin-induced neural tissue. *Development* [Internet]. 1997 Jun 15;124(12):2477–88. Available from:

- <https://journals.biologists.com/dev/article/124/12/2477/39386/Mechanisms-of-dorsal-ventral-patterning-in-noggin>
40. Hemmati-Brivanlou A, Kelly OG, Melton DA. Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* [Internet]. 1994 Apr;77(2):283–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867494903204>
 41. Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert D, Gont LK, de Robertis EM. *Xenopus* chordin: A Novel Dorsalizing Factor Activated by Organizer-Specific Homeobox Genes. 1994.
 42. Delaune E, Lemaire P, Kodjabachian L. Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development*. 2005 Jan;132(2):299–310.
 43. Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* [Internet]. 1995 Jul;376(6538):331–3. Available from: <http://www.nature.com/articles/376331a0>
 44. Bayramov A v., Eroshkin FM, Martynova NY, Ermakova G v., Solovieva EA, Zaraisky AG. Novel functions of Noggin proteins: Inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling. *Development*. 2011 Dec 15;138(24):5345–56.
 45. Jia S, Wu D, Xing C, Meng A. Smad2/3 activities are required for induction and patterning of the neuroectoderm in zebrafish. *Dev Biol*. 2009 Sep 15;333(2):273–84.
 46. Muñoz-Sanjuán I, Brivanlou AH. Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2002 Apr;3(4):271–80. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrn786>
 47. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic Stem Cells Express Neuronal Properties in Vitro. *Dev Biol* [Internet]. 1995 Apr;168(2):342–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160685710858>
 48. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2001 Dec 1;19(12):1134–40. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt1201-1134>

49. Zhou JM, Chu JX, Chen XJ. An improved protocol that induces human embryonic stem cells to differentiate into neural cells in vitro. *Cell Biol Int*. 2008 Jan;32(1):80–5.
50. Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*. 2009 Mar;27(3):275–80.
51. Imaizumi K, Okano H. Modeling neurodevelopment in a dish with pluripotent stem cells. *Dev Growth Differ*. 2021 Jan 1;63(1):18–25.
52. Lumsden A, Krumlauf R. Patterning the Vertebrate Neuraxis [Internet]. Available from: <https://www.science.org>
53. Chambers SM, Qi Y, Mica Y, Lee G, Zhang XJ, Niu L, et al. Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nat Biotechnol*. 2012 Jul;30(7):715–20.
54. Nieuwkoop PD. Activation and organization of the central nervous system in amphibians. Part I. Induction and activation. *Journal of Experimental Zoology* [Internet]. 1952 Jun;120(1):1–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jez.1401200102>
55. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed Differentiation of Embryonic Stem Cells into Motor Neurons characteristic of specific classes of neurons, for example, mid-brain dopaminergic neurons (Kawasaki et al., 2000; Lee et al., 2000). Despite these advances, the extent to which [Internet]. Vol. 110, *Cell*. 2002. Available from: <http://www.cell.com/cgi/content/full/110/3/385/DC1>
56. Nieuwkoop PD, Nigtevecht G v. Neural Activation and Transformation in Explants of Competent Ectoderm under the Influence of Fragments of Anterior Notochord in Urodeles.
57. Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Katayama T, Nozaki S, Kawasaki H, et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* [Internet]. 2005 Mar 6;8(3):288–96. Available from: <http://www.nature.com/articles/nn1402>
58. Irioka T, Watanabe K, Mizusawa H, Mizuseki K, Sasai Y. Distinct effects of caudalizing factors on regional specification of embryonic stem cell-derived

- neural precursors. *Developmental Brain Research*. 2005 Jan 1;154(1):63–70.
59. Dady A, Davidson L, Halley PA, Storey KG. Human spinal cord in vitro differentiation pace is initially maintained in heterologous embryonic environments. *Elife*. 2022 Feb 21;11.
 60. Mcgrew LL, Lai CJ, Moon RT. RAPID COMMUNICATION Specification of the Anteroposterior Neural Axis through Synergistic Interaction of the Wnt Signaling Cascade with noggin and follistatin. Vol. 172, *DEVELOPMENTAL BIOLOGY*. 1995.
 61. Gibbs HC, Chang-Gonzalez A, Hwang W, Yeh AT, Lekven AC. Midbrain-hindbrain boundary morphogenesis: At the intersection of wnt and Fgf signaling. Vol. 11, *Frontiers in Neuroanatomy*. Frontiers Media S.A.; 2017.
 62. Rifes P, Isaksson M, Rathore GS, Aldrin-Kirk P, Møller OK, Barzaghi G, et al. Modeling neural tube development by differentiation of human embryonic stem cells in a microfluidic WNT gradient. *Nat Biotechnol*. 2020 Nov 1;38(11):1265–73.
 63. Harada H, Sato T, Nakamura H. Fgf8 signaling for development of the midbrain and hindbrain. Vol. 58, *Development Growth and Differentiation*. Blackwell Publishing; 2016. p. 437–45.
 64. Zhao Q, Kho A, Marie Kenney A, Yuk D in, Kohane I, Rowitch DH. Identification of genes expressed with temporal-spatial restriction to developing cerebellar neuron precursors by a functional genomic approach [Internet]. 2002. Available from: www.chip.org/khosonic.txt
 65. Farkas LM, Dünker N, Roussa E, Unsicker K, Kriegstein K. Transforming Growth Factor- α s Are Essential for the Development of Midbrain Dopaminergic Neurons In Vitro and In Vivo. 2003.
 66. Lowenstein ED, Cui K, Hernandez-Miranda LR. Regulation of early cerebellar development. *FEBS Journal*. John Wiley and Sons Inc; 2022.
 67. Su HL, Muguruma K, Matsuo-Takasaki M, Kengaku M, Watanabe K, Sasai Y. Generation of cerebellar neuron precursors from embryonic stem cells. *Dev Biol*. 2006 Feb 15;290(2):287–96.

68. Salero E, Hatten ME. Differentiation of ES cells into cerebellar neurons [Internet]. 2007. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0610879104
69. Leto K, Arancillo M, Becker EBE, Buffo A, Chiang C, Ding B, et al. Consensus Paper: Cerebellar Development. Vol. 15, *Cerebellum*. Springer New York LLC; 2016. p. 789–828.
70. Tomomura M, Rice DS, Morgan JI, Yuzaki M. Purification of Purkinje cells by fluorescence-activated cell sorting from transgenic mice that express green fluorescent protein. *European Journal of Neuroscience*. 2001;14(1):57–63.
71. Muguruma K, Nishiyama A, Ono Y, Miyawaki H, Mizuhara E, Hori S, et al. Ontogeny-recapitulating generation and tissue integration of ES cell-derived Purkinje cells. *Nat Neurosci*. 2010 Oct;13(10):1171–80.
72. de Luca A, Vassallo S, Benitez-Temino B, Menichetti G, Rossi F, Buffo A. Distinct modes of neuritic growth in Purkinje neurons at different developmental stages: Axonal morphogenesis and cellular regulatory mechanisms. *PLoS One*. 2009 Aug 31;4(8).
73. Mizuhara E, Minaki Y, Nakatani T, Kumai M, Inoue T, Muguruma K, et al. Purkinje cells originate from cerebellar ventricular zone progenitors positive for Neph3 and E-cadherin. *Dev Biol*. 2010 Feb 15;338(2):202–14.
74. Minaki Y, Nakatani T, Mizuhara E, Inoue T, Ono Y. Identification of a novel transcriptional corepressor, Corl2, as a cerebellar Purkinje cell-selective marker. *Gene Expression Patterns*. 2008 Jul;8(6):418–23.
75. Vandaele S, Nordquist DT, Feddersen RM, Tretjakoff I, Peterson AC, Orr HT. Purkinje cell protein-2 regulatory regions and transgene expression in cerebellar compartments. 1991.
76. Baptista CA, Hatten ME, Blazeski R, Mason CA. Cell-Cell Interactions Influence Survival and Differentiation of Purified Purkinje Cells In Vitro. Vol. 12, *Neuron*. 1994.
77. Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, Hashimoto K, Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep*. 2015 Feb 3;10(4):537–50.

78. Wang S, Wang B, Pan N, Fu L, Wang C, Song G, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells to mature functional Purkinje neurons. *Sci Rep.* 2015;5.
79. Nayler S, Agarwal D, Curion F, Bowden R, Becker EBE. High-resolution transcriptional landscape of xeno-free human induced pluripotent stem cell-derived cerebellar organoids. *Sci Rep.* 2021 Dec 1;11(1).
80. Silva TP, Bekman EP, Fernandes TG, Vaz SH, Rodrigues CAV, Diogo MM, et al. Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cerebellar Neurons in the Absence of Co-culture. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Feb 14;8.
81. Haramoto Y, Takahashi S, Oshima T, Onuma Y, Ito Y, Asashima M. Insulin-like factor regulates neural induction through an IGF1 receptor-independent mechanism. *Sci Rep.* 2015 Jun 26;5.
82. Hsueh H, Pan W, Kastin AJ. Fibroblast growth factor 19 entry into brain. *Fluids Barriers CNS.* 2013 Nov 1;10(1).
83. Hagihara K, Zhang EE, Ke YH, Liu G, Liu JJ, Rao Y, et al. Shp2 acts downstream of SDF-1 α /CXCR4 in guiding granule cell migration during cerebellar development. *Dev Biol.* 2009 Oct 1;334(1):276–84.
84. Lapham LW, Markesbery WR. Human Fetal Cerebellar Cortex: Organization and Maturation of Cells in vitro. *Science* (1979) [Internet]. 1971 Aug 27;173(3999):829–32. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.173.3999.829>
85. Erceg S, Ronaghi M, Zipancic I, Lainez S, Roselló G, Xiong C, et al. *Stem Cells and Development.* 2010.
86. Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO. Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium. *Stem Cells Transl Med.* 2013 May 1;2(5):384–93.
87. Sundberg M, Tochitsky I, Buchholz DE, Winden K, Kujala V, Kapur K, et al. Purkinje cells derived from TSC patients display hypoexcitability and synaptic deficits associated with reduced FMRP levels and reversed by rapamycin. *Mol Psychiatry.* 2018 Nov 1;23(11):2167–83.

88. Heuer H, Mason CA. Development/Plasticity/Repair Thyroid Hormone Induces Cerebellar Purkinje Cell Dendritic Development via the Thyroid Hormone Receptor 1. 2003.
89. Fields KL, Currie, S. ' And ' D N, Duttons GR. DEVELOPMENT OF THY-I ANTIGEN ON CEREBELLAR NEURONS IN CULTURE'. Vol. 2. 1982.
90. Hirai H, Launey T. The Regulatory Connection between the Activity of Granule Cell NMDA Receptors and Dendritic Differentiation of Cerebellar Purkinje Cells. 2000.
91. Gruel DL, Franklin CL. Morphological and Physiological Differentiation of Purkinje Neurons in Cultures of Rat Cerebellum. Vol. 7, The Journal of Neuroscience. 1987.
92. Shin E, Palmer MJ, Li M, Fricker RA. GABAergic Neurons from Mouse Embryonic Stem Cells Possess Functional Properties of Striatal Neurons In Vitro, and Develop into Striatal Neurons In Vivo in a Mouse Model of Huntington's Disease. Stem Cell Rev Rep. 2012 Jun;8(2):513–31.
93. Risner-Janiczek JR, Ungless Massachusetts Li M. Electrophysiological properties of embryonic stem cell-derived neurons. PLoS One. 2011 Aug 26;6(8).
94. Prè D, Nestor MW, Sproul AA, Jacob S, Koppensteiner P, Chinchalongporn V, et al. A time course analysis of the electrophysiological properties of neurons differentiated from human induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). PLoS One. 2014 Jul 29;9(7).
95. Gunhanlar N, Shpak G, van der Kroeg M, Gouty-Colomer LA, Munshi ST, Lendemeijer B, et al. A simplified protocol for differentiation of electrophysiologically mature neuronal networks from human induced pluripotent stem cells. Mol Psychiatry. 2018 May 1;23(5):1336–44.
96. Hedegaard A, Monzón-Sandoval J, Newey SE, Whiteley ES, Webber C, Akerman CJ. Pro-maturational Effects of Human iPSC-Derived Cortical Astrocytes upon iPSC-Derived Cortical Neurons. Stem Cell Reports. 2020 Jul 14;15(1):38–51.
97. Buchholz DE, Carroll TS, Kocabas A, Zhu X, Behesti H, Faust PL, et al. Novel genetic features of human and mouse Purkinje cell differentiation defined by comparative transcriptomics. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2000102117

98. Bardy C, van den Hurk M, Eames T, Marchand C, Hernandez R v., Kellogg M, et al. Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 May 19;112(20):E2725–34.
99. Bouchard JP, Barbeau A, Bouchard R, Bouchard RW. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Can J Neurol Sci* [Internet]. 1978 Feb;5(1):61–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/647499>
100. Heyer E. Genetic consequences of differential demographic behaviour in the Saguenay region, Québec. *Am J Phys Anthropol* [Internet]. 1995 Sep;98(1):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8579187>
101. O'Brien E, Jorde LB, Rönnlöf B, Fellman JO, Eriksson AW. Founder effect and genetic disease in Sottunga, Finland. *Am J Phys Anthropol* [Internet]. 1988 Nov;77(3):335–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3067585>
102. Labuda D, Harding T, Milot E, Vézina H. The effective family size of immigrant founders predicts their long-term demographic outcome: From Québec settlers to their 20th-century descendants. Achilli A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2022 May 4;17(5):e0266079. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0266079>
103. Gomez CM. ARSACS goes global. Vol. 62, *Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2004. p. 10–1.
104. Prodi E, Grisoli M, Panzeri M, Minati L, Fattori F, Erbetta A, et al. Supratentorial and pontine MRI abnormalities characterize recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. A comprehensive study of an Italian series. *Eur J Neurol*. 2013 Jan;20(1):138–46.
105. Baets J, Deconinck T, Smets MK, Goossens D, van den Bergh P, Dahan K, et al. Mutations in SACS cause atypical and late-onset forms of ARSACS [Internet]. 2010. Available from: <http://www.vibgeneticservicefacility.be/>
106. Duquette A, Brais B, Bouchard JP, Mathieu J. Clinical presentation and early evolution of spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Movement Disorders*. 2013 Dec;28(14):2011–4.

107. Synofzik M, Soehn AS, Gburek-Augustat J, Schicks J, Karle KN, Schüle R, et al. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay (ARSACS): Expanding the genetic, clinical and imaging spectrum. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8(1).
108. Pilliod J, Moutton S, Lavie J, Maurat E, Hubert C, Bellance N, et al. New practical definitions for the diagnosis of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Ann Neurol.* 2015 Dec 1;78(6):871–86.
109. Habibzadeh P, Tabatabaei Z, Inaloo S, Nashatizadeh MM, Synofzik M, Ostovan VR, et al. Case Report: Expanding the Genetic and Phenotypic Spectrum of Autosomal Recessive Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Front Genet.* 2020 Dec 22;11.
110. Vermeer S, Meijer RPP, Pijl BJ, Timmermans J, Cruysberg JRM, Bos MM, et al. ARSACS in the Dutch population: A frequent cause of early-onset cerebellar ataxia. *Neurogenetics.* 2008 Jul;9(3):207–14.
111. Pablo LE, Garcia-Martin E, Gazulla J, Larrosa JM, Ferreras A, Santorelli FM, et al. Retinal nerve fiber hypertrophy in ataxia of Charlevoix-Saguenay patients [Internet]. 2011. Available from: <http://www.molvis.org/molvis/v17/a204>
112. Parkinson MH, Bartmann AP, Clayton LMS, Nethisinghe S, Pfundt R, Paul Chapple J, et al. Optical coherence tomography in autosomal recessive spastic ataxia of charlevoix-Saguenay. *Brain.* 2018 Apr 1;141(4):989–99.
113. Borruat FX, Holder GE, Bremner F. Inner retinal dysfunction in the autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Front Neurol.* 2017 Oct 12;8(OCT).
114. Ricca I, Tessa A, Trovato R, Bacci GM, Santorelli FM. Docosahexaenoic acid in ARSACS: Observations in two patients. *BMC Neurol.* 2020 May 28;20(1).
115. Dupré N, Bouchard JP, Brais B, Rouleau GA. Hereditary ataxia, spastic paraparesis and neuropathy in the French-Canadian population. Vol. 33, *Canadian Journal of Neurological Sciences.* Canadian Journal of Neurological Sciences; 2006. p. 149–57.
116. Gerwig M, Krüger S, Kreuz FR, Kreis S, Gizewski ER, Timmann D. Characteristic mri and fundoscopic findings help diagnose arsacs outside quebec. Vol. 75, *Neurology.* 2010. p. 2133.

117. Martin MH, Bouchard JP, Sylvain M, St-Onge O, Truchon S. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay: A report of MR imaging in 5 patients. *American Journal of Neuroradiology*. 2007 Sep;28(8):1606–8.
118. Anheim M, Fleury M, Monga B, Laugel V, Chaigne D, Rodier G, et al. Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: Implications for clinical management. *Neurogenetics*. 2010 Feb;11(1):1–12.
119. van de Warrenburg BPC, van Gaalen J, Boesch S, Burgunder JM, Dürr A, Giunti P, et al. EFNS/ENS Consensus on the diagnosis and management of chronic ataxias in adulthood. *Eur J Neurol*. 2014 Apr;21(4):552–62.
120. Anheim M, Tranchant C, Koenig M. The autosomal recessive cerebellar ataxias. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Feb 16;366(7):636–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22335741>
121. Fogel BL, Perlman S. Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias [Internet]. Available from: <http://neurology.thelancet.com>
122. Engert JC, Bérubé P, Mercier J, Doré C, Lepage P, Ge B, et al. ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Québec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* [Internet]. 2000 Feb;24(2):120–5. Available from: http://www.nature.com/articles/ng0200_120
123. Picher-Martel V, Dupre N. Current and Promising Therapies in Autosomal Recessive Ataxias. *CNS Neurol Disord Drug Targets* [Internet]. 2018 Jun 19;17(3):161–71. Available from: <https://www.eurekaselect.com/161410/article>
124. Bagaria J, Bagyinszky E, An SSA. Genetics of Autosomal Recessive Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) and Role of Sacsin in Neurodegeneration. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
125. Longo F, de Ritis D, Miluzio A, Fraticelli D, Baets J, Scarlato M, et al. Assessment of saccin turnover in patients with ARSACS. *Neurology*. 2021 Dec 7;97(23):E2315–27.

126. Thiffault I, Dicaire M, Tetreault M, Huang K, Demers-Lamarche J, Bernard G, et al. Diversity of ARSACS mutations in french-canadians. *Canadian Journal of Neurological Sciences*. 2013;40(1):61–6.
127. Grieco GS, Malandrini ; A, Comanducci ; G, Leuzzi ; v, Valoppi ; M, Tessa ; A, et al. Novel SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay type [Internet]. 2004. Available from: www.neurology.org
128. Richter AM, Ozgul RK, Poisson VC, Topaloglu H. Private SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) families from Turkey. *Neurogenetics*. 2004 Sep;5(3):165–70.
129. Criscuolo C, Saccà F, de Michele G, Mancini P, Combarros O, Infante J, et al. Novel mutation of SACS gene in a spanish family with autosomal recessive spastic ataxia. *Movement Disorders*. 2005 Oct;20(10):1358–61.
130. Sánchez MG, Pérez JE, Pérez MR, Redondo AG. Novel SACS mutation in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. Vol. 358, *Journal of the Neurological Sciences*. Elsevier B.V.; 2015. p. 475–6.
131. Parfitt DA, Michael GJ, Vermeulen EGM, Prodromou N v., Webb TR, Gallo JM, et al. The ataxia protein saccin is a functional co-chaperone that protects against polyglutamine-expanded ataxin-1. *Hum Mol Genet*. 2009;18(9):1556–65.
132. Anderson JF, Siller E, Barral JM. The Saccin Repeating Region (SRR): A Novel Hsp90-Related Supra-Domain Associated with Neurodegeneration. *J Mol Biol*. 2010;400(4):665–74.
133. Kozlov G, Denisov AY, Girard M, Dicaire MJ, Hamlin J, McPherson PS, et al. Structural basis of defects in the saccin HEPN domain responsible for Autosomal Recessive Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Jun 10;286(23):20407–12.
134. Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL, Mardinly AR, Lipton DM, Flavell SW, et al. The Angelman Syndrome Protein Ube3A Regulates Synapse Development by Ubiquitinating Arc. *Cell*. 2010 Mar 5;140(5):704–16.
135. Gentil BJ, Lai GT, Menade M, Larivière R, Minotti S, Gehring K, et al. Saccin, mutated in the ataxia ARSACS, regulates intermediate filament assembly and dynamics. *FASEB Journal*. 2019;33(2):2982–94.

136. Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. Vol. 75, *Annual Review of Biochemistry*. 2006. p. 271–94.
137. Ménade M, Kozlov G, Trempe JF, Pande H, Shenker S, Wickremasinghe S, et al. Structures of ubiquitin-like (Ubl) and Hsp90-like domains of saccin provide insight into pathological mutations. *Journal of Biological Chemistry*. 2018 Aug 17;293(33):12832–42.
138. Kamionka M, Feigon J. Structure of the XPC binding domain of hHR23A reveals hydrophobic patches for protein interaction. *Protein Science*. 2004 Sep;13(9):2370–7.
139. Zarouchlioti C, Parfitt DA, Li W, Gittings LM, Cheetham ME. DNAJ Proteins in neurodegeneration: Essential and protective factors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2018 Jan 19;373(1738).
140. Li X, Ménade M, Kozlov G, Hu Z, Dai Z, McPherson PS, et al. High-throughput screening for ligands of the HEPN domain of saccin. *PLoS One*. 2015 Sep 14;10(9).
141. Longo F, de Ritis D, Miluzio A, Fraticelli D, Baets J, Scarlato M, et al. Saccin cotranslational degradation causes autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. Available from: <https://doi.org/10.1101/2021.03.16.435646>
142. Lindberg I, Shorter J, Wiseman RL, Chiti F, Dickey CA, McLean PJ. Chaperones in neurodegeneration. Vol. 35, *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience; 2015. p. 13853–9.
143. Lottes EN, Cox DN. Homeostatic Roles of the Proteostasis Network in Dendrites. Vol. 14, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2020.
144. Hernández-Ortega K, Garcia-Esparcia P, Gil L, Lucas JJ, Ferrer I. Altered Machinery of Protein Synthesis in Alzheimer's: From the Nucleolus to the Ribosome. *Brain Pathology*. 2016 Sep 1;26(5):593–605.
145. Girard M, Larivière R, Parfitt DA, Deane EC, Gaudet R, Nossova N, et al. Mitochondrial dysfunction and Purkinje cell loss in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 31;109(5):1661–6.

146. Larivière R, Gaudet R, Gentil BJ, Girard M, Conte TC, Minotti S, et al. Sacs knockout mice present pathophysiological defects underlying autosomal recessive spastic ataxia of charlevoix-saguenay. *Hum Mol Genet.* 2015 Feb 1;24(3):727–39.
147. Gentil BJ, Minotti S, Beange M, Baloh RH, Julien J, Durham HD. Normal role of the low-molecular-weight neurofilament protein in mitochondrial dynamics and disruption in Charcot-Marie-Tooth disease. *The FASEB Journal.* 2012 Mar;26(3):1194–203.
148. Wagner OI, Lifshitz J, Janmey PA, Linden M, Mcintosh TK, Leterrier JF. Cellular/Molecular Mechanisms of Mitochondria-Neurofilament Interactions. 2003.
149. Duncan EJ, Larivière R, Bradshaw TY, Longo F, Sgarioto N, Hayes MJ, et al. Altered organization of the intermediate filament cytoskeleton and relocalization of proteostasis modulators in cells lacking the ataxia protein sascin. *Hum Mol Genet.* 2017 Aug 15;26(16):3130–43.
150. Ady V, Toscano-Márquez B, Nath M, Chang PK, Hui J, Cook A, et al. Altered synaptic and firing properties of cerebellar Purkinje cells in a mouse model of ARSACS. *Journal of Physiology.* 2018 Sep 1;596(17):4253–67.
151. Albergaria C, Carey MR. All Purkinje cells are not created equal. *Elife.* 2014 Jun 10;3(June2014):1–3.
152. Sillitoe R v., Hawkes R. Zones and stripes: Development of cerebellar topography. In: *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders.* Springer Netherlands; 2013. p. 43–60.
153. Toscano Márquez B, Cook AA, Rice M, Smileski A, Vieira-Lomasney K, Charron F, et al. Molecular Identity and Location Influence Purkinje Cell Vulnerability in Autosomal-Recessive Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay Mice. *Front Cell Neurosci.* 2021 Dec 14;15.
154. Sarna JR, Larouche M, Marzban H, Sillitoe R v., Rancourt DE, Hawkes R. Patterned Purkinje cell degeneration in mouse models of Niemann-Pick type C disease. *Journal of Comparative Neurology.* 2003 Feb 10;456(3):279–91.
155. Brochu G, Maler L, Hawkes R. Zebrin II: A polypeptide antigen expressed selectively by purkinje cells reveals compartments in rat and fish cerebellum. *J Comp Neurol [Internet].* 1990 Jan 22;291(4):538–52.

- Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.902910405>
156. Xiao J, Cerminara NL, Kotsurovskyy Y, Aoki H, Burroughs A, Wise AK, et al. Systematic regional variations in Purkinje cell spiking patterns. *PLoS One*. 2014 Aug 21;9(8).
 157. Naef V, Marchese M, Ogi A, Fichi G, Galatolo D, Licitra R, et al. Efficient neuroprotective rescue of sarsin-related disease phenotypes in zebrafish. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 2;22(16).
 158. Zhao X, Bhattacharyya A. Human Models Are Needed for Studying Human Neurodevelopmental Disorders. Vol. 103, *American Journal of Human Genetics*. Cell Press; 2018. p. 829–57.
 159. Murtinheira F, Migueis M, Letra-Vilela R, Diallo M, Quezada A, Valente CA, et al. Sarsin Deletion Induces Aggregation of Glial Intermediate Filaments. *Cells*. 2022 Jan 1;11(2).
 160. Criscuolo C, Procaccini C, Meschini MC, Cianflone A, Carbone R, Doccini S, et al. Powerhouse failure and oxidative damage in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *J Neurol*. 2015 Dec 1;262(12):2755–63.
 161. Bradshaw TY, Romano LEL, Duncan EJ, Nethisinghe S, Abeti R, Michael GJ, et al. A reduction in Drp1-mediated fission compromises mitochondrial health in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay. *Hum Mol Genet*. 2016 Aug 1;25(15):3232–44.
 162. Rieske P, Krynska B, Azizi SA. Human fibroblast-derived cell lines have characteristics of embryonic stem cells and cells of neuro-ectodermal origin. *Differentiation*. 2005;73(9–10):474–83.
 163. Evans CS, Holzbaur ELF. Quality Control in Neurons: Mitophagy and Other Selective Autophagy Mechanisms. Vol. 432, *Journal of Molecular Biology*. Academic Press; 2020. p. 240–60.
 164. Morani F, Doccini S, Sirica R, Paterno M, Pezzini F, Ricca I, et al. Functional Transcriptome Analysis in ARSACS KO Cell Model Reveals a Role of Sarsin in Autophagy. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
 165. Cheng F, Shen Y, Mohanasundaram P, Lindström M, Ivaska J, Ny T, et al. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte

- differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jul 26;113(30):E4320–7.
166. Kurochkina N, Bhaskar M, Yadav SP, Pant HC. Phosphorylation, Dephosphorylation, and Multiprotein Assemblies Regulate Dynamic Behavior of Neuronal Cytoskeleton: A Mini-Review. *Front Mol Neurosci*. 2018 Oct 8;11.
 167. Valencia M, Kim SR, Jang Y, Lee SH. Neuronal autophagy: Characteristic features and roles in neuronal pathophysiology. Vol. 29, *Biomolecules and Therapeutics*. Korean Society of Applied Pharmacology; 2021. p. 605–14.
 168. Yue Z, Friedman L, Komatsu M, Tanaka K. The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. Vol. 1793, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2009. p. 1496–507.
 169. Holmgren A, Bouhy D, Timmerman V. Neurofilament phosphorylation and their proline-directed kinases in health and disease. Vol. 17, *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2012.
 170. Muñoz-Lasso DC, Romá-Mateo C, Pallardó F v., Gonzalez-Cabo P. Much More Than a Scaffold: Cytoskeletal Proteins in Neurological Disorders. Vol. 9, *Cells*. NLM (Medline); 2020.
 171. Shea TB, Chan WKH, Kushkuley J, Lee S. Organizational dynamics, functions, and pathobiological dysfunctions of neurofilaments. *Results Probl Cell Differ*. 2009;48:29–45.
 172. Vallin J, Grantham J. The role of the molecular chaperone CCT in protein folding and mediation of cytoskeleton-associated processes: implications for cancer cell biology. Vol. 24, *Cell Stress and Chaperones*. Cell Stress and Chaperones; 2019. p. 17–27.
 173. Stone EJ, Uchida A, Brown A. Charcot–Marie–Tooth disease Type 2E/1F mutant neurofilament proteins assemble into neurofilaments. *Cytoskeleton*. 2019 Jul 1;76(7–8):423–39.
 174. Deane CAS, Brown IR. Induction of heat shock proteins in differentiated human neuronal cells following co-application of celastrol and arimoclomol. *Cell Stress Chaperones*. 2016 Sep 1;21(5):837–48.

175. Nethisinghe S, Abeti R, Kesavan M, Wigley WC, Giunti P. Hsp90 inhibition: A promising therapeutic approach for arsacs. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 1;22(21).
176. Ansar S, Burlison JA, Hadden MK, Yu XM, Desino KE, Bean J, et al. A non-toxic Hsp90 inhibitor protects neurons from A β -induced toxicity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007 Apr 1;17(7):1984–90.
177. Morani F, Doccini S, Chiorino G, Fattori F, Galatolo D, Sciarrillo E, et al. Functional Network Profiles in ARSACS Disclosed by Aptamer-Based Proteomic Technology. *Front Neurol.* 2021 Jan 27;11.
178. Romano L el, Yih Aw W, Hixson KM, Novoselova T v, Havener TM, Howell S, et al. The ataxia protein sascin is required for integrin trafficking and synaptic organization. Available from: <https://doi.org/10.1101/2021.08.20.456807>
179. Monje FJ, Kim EJ, Pollak DD, Cabatic M, Li L, Baston A, et al. Focal adhesion kinase regulates neuronal growth, synaptic plasticity and hippocampus-dependent spatial learning and memory. *Neurosignals.* 2012 Jan;20(1):1–14.
180. Bharathan SP, Manian KV, Aalam SMM, Palani D, Deshpande PA, Pratheesh MD, et al. Systematic evaluation of markers used for the identification of human induced pluripotent stem cells. *Biol Open.* 2017 Jan 15;6(1):100–8.
181. Štefková K, Procházková J, Pacherník J. Alkaline phosphatase in stem cells. Vol. 2015, *Stem Cells International.* Hindawi Publishing Corporation; 2015.
182. Schmidt CA, Fisher-Wellman KH, Darrell Neuffer P. From OCR and ECAR to energy: Perspectives on the design and interpretation of bioenergetics studies. Vol. 297, *Journal of Biological Chemistry.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2021.
183. Polster BM, Nicholls DG, Ge SX, Roelofs BA. Use of potentiometric fluorophores in the measurement of mitochondrial reactive oxygen species. In: *Methods in Enzymology.* Academic Press Inc.; 2014. p. 225–50.
184. Lee S, Pant HC, Shea TB. Divergent and convergent roles for kinases and phosphatases in neurofilament dynamics. *J Cell Sci.* 2014;127(18):4064–77.

185. Arlander SJH, Felts SJ, Wagner JM, Stensgard B, Toft DO, Karnitz LM. Chaperoning checkpoint kinase 1 (Chk1), an Hsp90 client, with purified chaperones. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Feb 3;281(5):2989–98.
186. Sotelo C, Rossi F. Purkinje cell migration and differentiation. In: *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Springer Netherlands; 2013. p. 147–78.
187. Dzubay JA, Otis TS. Climbing Fiber Activation of Metabotropic Glutamate Receptors on Cerebellar Purkinje Neurons density (Baude et al at PF synapses give rise to a slow phase of the excitatory postsynaptic current (Batchelor et al. Vol. 36, MGLuRs. *Tempia*; 2002.
188. Nedelescu H, Abdelhack M, Pritchard AT. Regional differences in Purkinje cell morphology in the cerebellar vermis of male mice. *J Neurosci Res*. 2018 Sep 1;96(9):1476–89.
189. Oberdick J, Sillitoe R v. Cerebellar zones: History, development, and function. *Cerebellum*. 2011 Sep;10(3):301–6.
190. Yew DT, Luo CB, Heizmann CW, Chan WY. Differential expression of calretinin, calbindin D28K and parvalbumin in the developing human cerebellum. Vol. 103, *Developmental Brain Research*. 1997.
191. Hoxha E, Balbo I, Miniaci MC, Tempia F. Purkinje cell signaling deficits in animal models of ataxia. Vol. 10, *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2018.
192. Xu K, Kosoy R, Shameer K, Kumar S, Liu L, Readhead B, et al. Genome-wide analysis indicates association between heterozygote advantage and healthy aging in humans. *BMC Genet*. 2019 Jul 2;20(1).
193. Johnson-Kerner BL, Ahmad FS, Diaz AG, Greene JP, Gray SJ, Samulski RJ, et al. Intermediate filament protein accumulation in motor neurons derived from giant axonal neuropathy iPSCs rescued by restoration of gigaxonin. *Hum Mol Genet*. 2015 Mar 1;24(5):1420–31.
194. Hsiao VC, Tian R, Long H, Perng M der, Brenner M, Quinlan RA, et al. Alexander-disease mutation of GFAP causes filament disorganization and decreased solubility of GFAP. *J Cell Sci*. 2005 May 1;118(9):2057–65.

195. Hajka D, Budziak B, Pietras Ł, Duda P, McCubrey JA, Gizak A. GSK3 as a regulator of cytoskeleton architecture: Consequences for health and disease. Vol. 10, *Cells*. MDPI; 2021.
196. Lowery J, Jain N, Kuczmarski ER, Mahammad S, Goldman A, Gelfand VI, et al. Abnormal intermediate filament organization alters mitochondrial motility in giant axonal neuropathy fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2016 Feb 15;27(4):608–16.
197. Mathis S, Funalot B, Boyer O, Lacroix C, Marcorelles P, Magy L, et al. Neuropathologic Characterization of INF2-Related Charcot-Marie-Tooth Disease: Evidence for a Schwann Cell Actinopathy [Internet]. 2014. Available from: <https://academic.oup.com/jnen/article/73/3/223/2917659>
198. Israeli E, Dryanovski DI, Schumacker PT, Chandel NS, Singer JD, Julien JP, et al. Intermediate filament aggregates cause mitochondrial dysmotility and increase energy demands in giant axonal neuropathy. *Hum Mol Genet*. 2016 Jun 1;25(11):2143–57.
199. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. Vol. 192, *Journal of Cellular Physiology*. 2002. p. 1–15.
200. Reddy PH. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. Vol. 1415, *Brain Research*. 2011. p. 136–48.
201. Ebnet A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow EM, et al. Overexpression of Tau Protein Inhibits Kinesin-dependent Trafficking of Vesicles, Mitochondria, and Endoplasmic Reticulum: Implications for Alzheimer's Disease [Internet]. Vol. 143, *The Journal of Cell Biology*. 1998. Available from: <http://www.jcb.org>
202. DuBoff B, Götz J, Feany MB. Tau Promotes Neurodegeneration via DRP1 Mislocalization In Vivo. *Neuron*. 2012 Aug 23;75(4):618–32.
203. Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantôme A, et al. HSP27 Is a Ubiquitin-Binding Protein Involved in I- κ B α Proteasomal Degradation. *Mol Cell Biol*. 2003 Aug 15;23(16):5790–802.
204. Carlomagno Y, Zhang Y, Davis M, Lin WL, Cook C, Dunmore J, et al. Casein kinase II induced polymerization of soluble TDP-43 into filaments is inhibited by heat shock proteins. *PLoS One*. 2014 Mar 4;9(3).

205. Sztal TE, Stainier YR. Transcriptional adaptation: A mechanism underlying genetic robustness. *Development (Cambridge)*. 2020 Aug 14;147(15).
206. El-BrolosyMassachusetts Kontarakis Z, Rossi A, Kuenne C, Günther S, Fukuda N, et al. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature*. 2019 Apr 11;568(7751):193–7.
207. Lee DSM, Park J, Kromer A, Baras A, Rader DJ, Ritchie MD, et al. Disrupting upstream translation in mRNAs is associated with human disease. *Nat Commun*. 2021 Dec 1;12(1).
208. Gregory A, Kurian M, Maher E, Hogarth P, Hayflick SJ. PLA2G6-Associated Neurodegeneration. [Internet]. [cited 2022 Jun 2]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1675/pdf/Bookshelf_NBK1675.pdf
209. Tello C, Darling A, Lupo V, Pérez-Dueñas B, Espinós C. On the complexity of clinical and molecular bases of neurodegeneration with brain iron accumulation. Vol. 93, *Clinical Genetics*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 731–40.
210. Hinarejos I, Machuca-Arellano C, Sancho P, Espinós C. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neuroinflammation in neurodegeneration with brain iron accumulation (Nbia). Vol. 9, *Antioxidants*. MDPI; 2020. p. 1–28.
211. KurianMassachusetts Hayflick SJ. Pantothenate Kinase-Associated Neurodegeneration (PKAN) and PLA2G6-Associated Neurodegeneration (PLAN). Review of Two Major Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation (NBIA) Phenotypes. In: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc.; 2013. p. 49–71.
212. Hayflick SJ, KurianMassachusetts Hogarth P. Neurodegeneration with brain iron accumulation. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2018. p. 293–305.
213. Guo YP, Tang BS, Guo JF. PLA2G6-Associated Neurodegeneration (PLAN): Review of Clinical Phenotypes and Genotypes. Vol. 9, *Frontiers in Neurology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
214. IllingworthMassachusetts Meyer E, Chong WK, Manzur AY, Carr LJ, Younis R, et al. PLA2G6-associated neurodegeneration (PLAN): Further expansion of the clinical, radiological and mutation spectrum associated with infantile

- and atypical childhood-onset disease. *Mol Genet Metab*. 2014;112(2):183–9.
215. Farina L, Nardocci N, Bruzzone MG, D’Incerti L, Zorzi G, Verga L, et al. Infantile neuroaxonal dystrophy: neuroradiological studies in 11 patients. *Neuroradiology* [Internet]. 1999 May 7;41(5):376–80. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s002340050768>
216. Khan AO, AlDrees A, Elmalik SA, Hassan HH, Koenig M, Stevanin G, et al. Ophthalmic features of PLA2G6-related paediatric neurodegeneration with brain iron accumulation. *British Journal of Ophthalmology*. 2014;98(7):889–93.
217. Wu Y, Jiang Y, Gao Z, Wang J, Yuan Y, Xiong H, et al. Clinical study and PLA2G6 mutation screening analysis in Chinese patients with infantile neuroaxonal dystrophy. *Eur J Neurol*. 2009 Feb;16(2):240–5.
218. Kolarova H, Tan J, Strom TM, Meitinger T, Wagner M, Klopstock T. Lifetime risk of autosomal recessive neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) disorders calculated from genetic databases. 2022; Available from: <https://doi.org/10.1016/j>.
219. Hayflick SJ, Hartman M, Coryell J, Gitschier J, Rowley H. Brain MRI in Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation with and without PANK2 Mutations [Internet]. Available from: www.ajnr.org
220. SalihMassachusetts Mundwiler E, Khan AO, AlDrees A, Elmalik SA, Hassan HH, et al. New Findings in a Global Approach to Dissect the Whole Phenotype of PLA2G6 Gene Mutations. *PLoS One*. 2013 Oct 9;8(10).
221. Kimura S. Terminal axon pathology in infantile neuroaxonal dystrophy. *Pediatr Neurol* [Internet]. 1991 Mar;7(2):116–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0887899491900078>
222. Yoshino H, Tomiyama H, Tachibana N, Ogaki K, Li Y, Funayama M, et al. Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism [Internet]. 2010. Available from: www.neurology.org
223. Riku Y, Ikeuchi T, Yoshino H, Mimuro M, Mano K, Goto Y, et al. Extensive aggregation of α -synuclein and tau in juvenile-onset neuroaxonal dystrophy: an autopsied individual with a novel mutation in the PLA2G6 gene-splicing site [Internet]. 2013. Available from: <http://www.actaneurocomms.org/content/1/1/12>

224. Iodice A, Spagnoli C, Salerno GG, Frattini D, Bertani G, Bergonzini P, et al. Infantile neuroaxonal dystrophy and PLA2G6-associated neurodegeneration: An update for the diagnosis. Vol. 39, *Brain and Development*. Elsevier B.V.; 2017. p. 93–100.
225. Babin PL, Rao SNR, Chacko A, Alvina FB, Panwala A, Panwala L, et al. Infantile Neuroaxonal Dystrophy: Diagnosis and Possible Treatments. *Front Genet*. 2018 Dec 10;9.
226. Morgan N v, Westaway SK, Morton JE v, Gregory A, Gissen P, Sonek S, et al. PLA2G6, encoding a phospholipase A 2 , is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron [Internet]. Available from: <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>
227. Crompton D, Rehal PK, MacPherson L, Foster K, Lunt P, Hughes I, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis is an effective tool for the detection of novel intragenic PLA2G6 mutations: Implications for molecular diagnosis. *Mol Genet Metab*. 2010 Jun;100(2):207–12.
228. Tonelli A, Romaniello R, Grasso R, Cavallini A, Righini A, Bresolin N, et al. Novel splice-site mutations and a large intragenic deletion in PLA2G6 associated with a severe and rapidly progressive form of infantile neuroaxonal dystrophy. *Clin Genet*. 2010 Nov;78(5):432–40.
229. Yamamoto T, Shimojima K, Shibata T, Akiyama M, Oka M, Akiyama T, et al. Novel PLA2G6 mutations associated with an exonic deletion due to non-allelic homologous recombination in a patient with infantile neuroaxonal dystrophy. *Hum Genome Var*. 2015 Dec;2(1).
230. Engel LA, Jing Z, O'Brien DE, Sun M, Kotzbauer PT. Catalytic function of PLA2G6 is impaired by mutations associated with infantile neuroaxonal dystrophy but not dystonia-parkinsonism. *PLoS One*. 2010;5(9).
231. Winstead M v, Balsinde J, Dennis EA. Calcium-independent phospholipase A 2 : structure and function [Internet]. Available from: www.elsevier.com/locate/bba
232. Larsson PKA, Claesson HE, Kennedy BP. Multiple Splice Variants of the Human Calcium-independent Phospholipase A 2 and Their Effect on Enzyme Activity* [Internet]. 1998. Available from: <http://www.jbc.org>

233. Larsson Forsell PKA, Kennedy BP, Claesson HE. The human calcium-independent phospholipase A2 gene . Multiple enzymes with distinct properties from a single gene. *Eur J Biochem* [Internet]. 1999 Jun;262(2):575–85. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.1999.00418.x>
234. Balsinde JS, Dennis EA. Function and Inhibition of Intracellular Calcium-independent Phospholipase A 2 * [Internet]. 1997. Available from: <http://www.jbc.org>
235. Malley KR, Koroleva O, Miller I, Sanishvili R, Jenkins CM, Gross RW, et al. The structure of iPLA2 β reveals dimeric active sites and suggests mechanisms of regulation and localization. *Nat Commun*. 2018 Dec 1;9(1).
236. Ramanadham S, Tomader A, Ashley JW, Bone RN, Hancock WD, Lei X. Calcium-independent phospholipases A2 and their roles in biological processes and diseases. Vol. 56, *Journal of Lipid Research*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2015. p. 1643–68.
237. Turk J, White TD, Nelson AJ, Lei X, Ramanadham S. iPLA 2 β and its role in male fertility, neurological disorders, metabolic disorders, and inflammation. Vol. 1864, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier B.V.; 2019. p. 846–60.
238. Sun GY, Geng X, Teng T, Yang B, Appenteng MK, Greenlief CM, et al. Dynamic role of phospholipases A2 in health and diseases in the central nervous system. Vol. 10, *Cells*. MDPI; 2021.
239. Ong WY, Yeo JF, Ling SF, Farooqui AA. Distribution of calcium-independent phospholipase A2 (iPLA 2) in monkey brain. *J Neurocytol*. 2006 Dec;34(6):447–58.
240. Shirai Y, Ito M. Specific differential expression of phospholipase A 2 subtypes in rat cerebellum. *J Neurocytol*. 2004 May;33(3):297–307.
241. Song H, Bao S, Lei X, Jin C, Zhang S, Turk J, et al. Evidence for proteolytic processing and stimulated organelle redistribution of iPLA2 β . *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2010 May;1801(5):547–58.
242. Williams SD, Gottlieb RA. Inhibition of mitochondrial calcium-independent phospholipase A 2 (iPLA 2) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective. Vol. 362, *Biochem. J*. 2002.

243. Seleznev K, Zhao C, Zhang XH, Song K, Ma ZA. Calcium-independent phospholipase A2 localizes in and protects mitochondria during apoptotic induction by staurosporine. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Aug 4;281(31):22275–88.
244. Polster B, Crosier M, Lindsay S, Hayflick S. Expression of PLA2G6 in human fetal development: Implications for infantile neuroaxonal dystrophy. *Brain Res Bull*. 2010 Nov 20;83(6):374–9.
245. Kolko M, Kiilgaard JF, Wang J, Poulsen KA, Andreasen JR, la Cour M, et al. Calcium-independent phospholipase A2 regulates retinal pigment epithelium proliferation and may be important in the pathogenesis of retinal diseases. *Exp Eye Res*. 2009 Sep;89(3):383–91.
246. Kolko M, Vohra R, Westlund van der Burght B, Poulsen K, Nissen MH. Calcium-independent phospholipase A₂, group VIA, is critical for RPE cell survival. *Mol Vis* [Internet]. 2014;20:511–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24791136>
247. Mehta S, Takkar A, Singh D, Aggarwal A, Lal V. Unusual Presentation of PLA2G6-Related Neurodegeneration with Retinal Vasculitis. Vol. 9, Movement Disorders Clinical Practice. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 113–7.
248. Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K. Recent progress in phospholipase A2 research: From cells to animals to humans. Vol. 50, Progress in Lipid Research. 2011. p. 152–92.
249. Yang HC, Mosior M, Johnson CA, Chen Y, Dennis EA. Group-Specific Assays That Distinguish between the Four Major Types of Mammalian Phospholipase A₂ [Internet]. 1999. Available from: <http://www.idealibrary.com>
250. Shinzawa K, Sumi H, Ikawa M, Matsuoka Y, Okabe M, Sakoda S, et al. Neuroaxonal dystrophy caused by group VIA phospholipase A2 deficiency in mice: A model of human neurodegenerative disease. *Journal of Neuroscience*. 2008 Feb 27;28(9):2212–20.
251. Malik I, Turk J, Mancuso DJ, Montier L, Wohltmann M, Wozniak DF, et al. Disrupted membrane homeostasis and accumulation of ubiquitinated proteins in a mouse model of infantile neuroaxonal dystrophy caused by PLA2G6 mutations. *American Journal of Pathology*. 2008;172(2):406–16.

252. Wada H, Yasuda T, Miura I, Watabe K, Sawa C, Kamijuku H, et al. Establishment of an improved mouse model for infantile neuroaxonal dystrophy that shows early disease onset and bears a point mutation in *Pla2g6*. *American Journal of Pathology*. 2009;175(6):2257–63.
253. de León GA, Mitchell MH. Histological and ultrastructural features of dystrophic isocortical axons in infantile neuroaxonal dystrophy (Seitelberger's disease). *Acta Neuropathol* [Internet]. 1985 Jun;66(2):89–97. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00688682>
254. Beck G, Sugiura Y, Shinzawa K, Kato S, Setou M, Tsujimoto Y, et al. Neuroaxonal dystrophy in calcium-independent phospholipase A2 β deficiency results from insufficient remodeling and degeneration of mitochondrial and presynaptic membranes. *Journal of Neuroscience*. 2011 Aug 3;31(31):11411–20.
255. Blanchard H, Taha AY, Cheon Y, Kim HW, Turk J, Rapoport SI. iPLA2 β knockout mouse, a genetic model for progressive human motor disorders, develops age-related neuropathology. *Neurochem Res*. 2014;39(8):1522–32.
256. Sumi-Akamaru H, Beck G, Kato S, Mochizuki H. Neuroaxonal dystrophy in PLA2G6 knockout mice. *Neuropathology*. 2015 Jun 1;35(3):289–302.
257. Liu W, Porter NA, Schneider C, Brash AR, Yin H. Formation of 4-hydroxynonenal from cardiolipin oxidation: Intramolecular peroxy radical addition and decomposition. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jan 1;50(1):166–78.
258. Zhao Z, Zhang X, Zhao C, Choi J, Shi J, Song K, et al. Protection of pancreatic β -cells by group VIA phospholipase A 2-mediated repair of mitochondrial membrane peroxidation. *Endocrinology*. 2010 Jul;151(7):3038–48.
259. KiebishMassachusetts Han X, Cheng H, Lunceford A, Clarke CF, Moon H, et al. Lipidomic analysis and electron transport chain activities in C57BL/6J mouse brain mitochondria. *J Neurochem*. 2008 Jul;106(1):299–312.
260. Chiu CC, Lu CS, Weng YH, Chen YL, Huang YZ, Chen RS, et al. PARK14 (D331Y) PLA2G6 Causes Early-Onset Degeneration of Substantia Nigra Dopaminergic Neurons by Inducing Mitochondrial Dysfunction, ER Stress, Mitophagy Impairment and Transcriptional Dysregulation in a Knockin Mouse Model. *Mol Neurobiol*. 2019 Jun 1;56(6):3835–53.

261. Cheon Y, Kim HW, Igarashi M, Modi HR, Chang L, Ma K, et al. Disturbed brain phospholipid and docosahexaenoic acid metabolism in calcium-independent phospholipase A2-VIA (iPLA2 β)- knockout mice. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2012 Sep;1821(9):1278–86.
262. Chiu CC, Yeh TH, Lu CS, Huang YC, Cheng YC, Huang YZ, et al. PARK14 PLA2G6 mutants are defective in preventing rotenone-induced mitochondrial dysfunction, ROS generation and activation of mitochondrial apoptotic pathway. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Oct 3;8(45):79046–60. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.20893>
263. Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, Patel M, Shchepinov MS, Stockwell BR. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 23;113(34):E4966–75.
264. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. Vol. 2019, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2019.
265. Paradies G, Paradies V, de Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. Vol. 1837, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2014. p. 408–17.
266. Green JT, Orr SK, Bazinet RP. The emerging role of group VI calcium-independent phospholipase A 2 in releasing docosahexaenoic acid from brain phospholipids. In: *Journal of Lipid Research*. 2008. p. 939–44.
267. Li C, Wu X, Liu S, Shen D, Zhu J, Liu K. Role of Resolvins in the Inflammatory Resolution of Neurological Diseases. Vol. 11, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
268. Zhao Z, Wang J, Zhao C, Bi W, Yue Z, Ma ZA. Genetic ablation of PLAG6 in mice leads to cerebellar atrophy characterized by purkinje cell loss and glial cell activation. *PLoS One*. 2011;6(10).
269. Strokin M, Seburn KL, Cox GA, Martens KA, Reiser G. Severe disturbance in the Ca²⁺ signaling in astrocytes from mouse models of human infantile neuroaxonal dystrophy with mutated Pla2g6. *Hum Mol Genet*. 2012 Jun;21(12):2807–14.

270. Strokin M, Reiser G. Mitochondria from a mouse model of the human infantile neuroaxonal dystrophy (INAD) with genetic defects in VIA iPLA2 have disturbed Ca²⁺ regulation with reduction in Ca²⁺ capacity. *Neurochem Int.* 2016 Oct 1;99:187–93.
271. Strokin M, Reiser G. Neurons and astrocytes in an infantile neuroaxonal dystrophy (INAD) mouse model show characteristic alterations in glutamate-induced Ca²⁺ signaling. *Neurochem Int.* 2017 Sep 1;108:121–32.
272. Kinghorn KJ, Castillo-Quan JI, Bartolome F, Angelova PR, Li L, Pope S, et al. Loss of PLA2G6 leads to elevated mitochondrial lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction. *Brain.* 2015 Jul 1;138(7):1801–16.
273. Iliadi KG, Gluscencova OB, Iliadi N, Boulianne GL. Mutations in the Drosophila homolog of human PLA2G6 give rise to age-dependent loss of psychomotor activity and neurodegeneration. *Sci Rep.* 2018 Dec 1;8(1).
274. Lin G, Lee PT, Chen K, Mao D, Tan KL, Zuo Z, et al. Phospholipase PLA2G6, a Parkinsonism-Associated Gene, Affects Vps26 and Vps35, Retromer Function, and Ceramide Levels, Similar to α -Synuclein Gain. *Cell Metab.* 2018 Oct 2;28(4):605-618.e6.
275. Beharier O, Tyurin VA, Goff JP, Guerrero-Santoro J, Kajiwara K, Chu T, et al. PLA2G6 guards placental trophoblasts against ferroptotic injury. 2020; Available from: <https://www.pnas.org>
276. Sun WY, Tyurin VA, Mikulska-Ruminska K, Shrivastava IH, Anthony Muthu TS, Zhai YJ, et al. Phospholipase iPLA2 β averts ferroptosis by eliminating a redox lipid death signal. *Nat Chem Biol [Internet].* 2021 Apr 4;17(4):465–76. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41589-020-00734-x>
277. Chen D, Chu B, Yang X, Liu Z, Jin Y, Kon N, et al. iPLA2 β -mediated lipid detoxification controls p53-driven ferroptosis independent of GPX4. *Nat Commun.* 2021 Dec 1;12(1).
278. Villalón-García I, Álvarez-Córdoba M, Povea-Cabello S, Talaverón-Rey M, Villanueva-Paz M, Luzón-Hidalgo R, et al. Vitamin E prevents lipid peroxidation and iron accumulation in PLA2G6-Associated Neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2022 Apr 1;165.

279. Félix R, Valentão P, Andrade PB, Félix C, Novais SC, Lemos MFL. Evaluating the in vitro potential of natural extracts to protect lipids from oxidative damage. Vol. 9, *Antioxidants*. MDPI; 2020.
280. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Vol. 2014, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Landes Bioscience; 2014.
281. Reichert CO, de Freitas FA, Sampaio-Silva J, Rokita-Rosa L, Barros P de L, Levy D, et al. Ferroptosis mechanisms involved in neurodegenerative diseases. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–27.
282. Yan HF, Tuo QZ, Yin QZ, Lei P. The pathological role of ferroptosis in ischemia/reperfusion-related injury. *Zool Res*. 2020;41(3):220–30.
283. Moos T. Brain iron homeostasis. *Dan Med Bull* [Internet]. 2002 Nov;49(4):279–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553165>
284. Hagemeyer J, Geurts JJ, Zivadinov R. Brain iron accumulation in aging and neurodegenerative disorders. *Expert Rev Neurother* [Internet]. 2012 Dec 9;12(12):1467–80. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/ern.12.128>
285. Bettencourt C, Forabosco P, Wiethoff S, Heidari M, Johnstone DM, Botía JA, et al. Gene co-expression networks shed light into diseases of brain iron accumulation. *Neurobiol Dis*. 2016 Mar 1;87:59–68.
286. Drecourt A, Babdor J, Dussiot M, Petit F, Goudin N, Garfa-Traoré M, et al. Impaired Transferrin Receptor Palmitoylation and Recycling in Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation. *Am J Hum Genet*. 2018 Feb 1;102(2):266–77.
287. Costa CA da, Manaa W el, Duplan E, Checler F. The Endoplasmic Reticulum Stress/Unfolded Protein Response and Their Contributions to Parkinson’s Disease Physiopathology. Vol. 9, *Cells*. NLM (Medline); 2020.
288. Mori A, Hatano T, Inoshita T, Shiba-Fukushima K, Koinuma T, Meng H, et al. Parkinson’s disease-associated iPLA2-VIA/PLA2G6 regulates neuronal functions and α -synuclein stability through membrane remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Oct 8;116(41):20689–99.

289. Ke M, Chong CM, Zeng H, Huang M, Huang Z, Zhang K, et al. Azoramide protects iPSC-derived dopaminergic neurons with PLA2G6 D331Y mutation through restoring ER function and CREB signaling. *Cell Death Dis.* 2020 Feb 1;11(2).
290. Bosc C, Broin N, Fanjul M, Saland E, Farge T, Courdy C, et al. Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nat Commun.* 2020 Dec 1;11(1).
291. Kubli DA, Gustafsson ÅB. Mitochondria and mitophagy: The yin and yang of cell death control. Vol. 111, *Circulation Research*. 2012. p. 1208–21.
292. Levi S, Tiranti V. Neurodegeneration with brain iron accumulation disorders: Valuable models aimed at understanding the pathogenesis of Iron deposition. Vol. 12, *Pharmaceuticals*. MDPI AG; 2019.
293. Arber C, Angelova PR, Wiethoff S, Tsuchiya Y, Mazzacuva F, Preza E, et al. iPSC-derived neuronal models of PANK2-associated neurodegeneration reveal mitochondrial dysfunction contributing to early disease. *PLoS One.* 2017 Sep 1;12(9).
294. Cozzi A, Orellana DI, Santambrogio P, Rubio A, Cancellieri C, Giannelli S, et al. Stem Cell Modeling of Neuroferritinopathy Reveals Iron as a Determinant of Senescence and Ferroptosis during Neuronal Aging. *Stem Cell Reports.* 2019 Nov 12;13(5):832–46.
295. Chen X, Kang R, Tang D. Ferroptosis by Lipid Peroxidation: The Tip of the Iceberg? *Front Cell Dev Biol.* 2021 Mar 25;9.
296. Spaul RV, Soo AKS, Hogarth P, Hayflick SJ, Kurian MA. Towards Precision Therapies for Inherited Disorders of Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation. Vol. 11, *Tremor and Other Hyperkinetic Movements*. Center for Digital Research and Scholarship; 2021.
297. Iankova V, Karin I, Klopstock T, Schneider SA. Emerging Disease-Modifying Therapies in Neurodegeneration With Brain Iron Accumulation (NBIA) Disorders. Vol. 12, *Frontiers in Neurology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
298. Jeong SY, Hogarth P, Placzek A, Gregory AM, Fox R, Zhen D, et al. 4'-Phosphopantetheine corrects CoA, iron, and dopamine metabolic defects in mammalian models of PKAN. *EMBO Mol Med.* 2019 Dec;11(12).

299. del Rey MQ, Mancias JD. NCOA4-mediated ferritinophagy: A potential link to neurodegeneration. Vol. 13, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2019.
300. Campanella A, Privitera D, Guaraldo M, Rovelli E, Barzaghi C, Garavaglia B, et al. Skin fibroblasts from pantothenate kinase-associated neurodegeneration patients show altered cellular oxidative status and have defective iron-handling properties. *Hum Mol Genet*. 2012 Sep;21(18):4049–59.
301. Seibler P, Burbulla LF, Dulovic M, Zittel S, Heine J, Schmidt T, et al. Iron overload is accompanied by mitochondrial and lysosomal dysfunction in WDR45 mutant cells. *Brain*. 2018 Oct 1;141(10):3052–64.
302. Zhao YG, Sun L, Miao G, Ji C, Zhao H, Sun H, et al. The autophagy gene Wdr45/Wipi4 regulates learning and memory function and axonal homeostasis. *Autophagy*. 2015 Jan 1;11(6):881–90.
303. Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* [Internet]. 2006 Oct 10;38(10):1184–91. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng1884>
304. de Figueiredo P, Doody A, Polizotto RS, Drecktrah D, Wood S, Banta M, et al. Inhibition of Transferrin Recycling and Endosome Tubulation by Phospholipase A2 Antagonists. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Dec 14;276(50):47361–70.
305. Kett LR, Dauer WT. Endolysosomal dysfunction in Parkinson’s disease: Recent developments and future challenges. *Movement Disorders*. 2016 Oct 1;31(10):1433–43.
306. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. Vol. 435, *Biochemical Journal*. 2011. p. 297–312.
307. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem*. 2010;47:53–67.
308. Santambrogio P, Dusi S, Guaraldo M, Rotundo LI, Broccoli V, Garavaglia B, et al. Mitochondrial iron and energetic dysfunction distinguish fibroblasts and induced neurons from pantothenate kinase-associated neurodegeneration patients. *Neurobiol Dis*. 2015 Sep 1;81:144–53.

309. Compagnoni GM, Fonzo A di, Corti S, Comi GP, Bresolin N, Masliah E. The Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: the Lesson from Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. 2035; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01926-1>
310. Trombetta-Lima M, Sabogal-Guáqueta AM, Dolga AM. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases: A focus on iPSC-derived neuronal models. *Cell Calcium*. 2021 Mar 1;94.
311. Area-Gomez E, Guardia-Laguarta C, Schon EA, Przedborski S. Mitochondria, OxPhos, and neurodegeneration: Cells are not just running out of gas. Vol. 129, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2019.
312. Yadav DK, Kumar S, Choi EH, Chaudhary S, Kim MH. Molecular dynamic simulations of oxidized skin lipid bilayer and permeability of reactive oxygen species. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
313. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. Vol. 23, *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc.; 2015. p. 1144–70.
314. Kagan VE, Mao G, Qu F, Angeli JPF, Doll S, Croix CS, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol*. 2017 Jan 1;13(1):81–90.
315. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012 May 25;149(5):1060–72.
316. Bayir H, Anthonymuthu TS, Tyurina YY, Patel SJ, Amoscato AA, Lamade AM, et al. Achieving Life through Death: Redox Biology of Lipid Peroxidation in Ferroptosis. Vol. 27, *Cell Chemical Biology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 387–408.
317. Jyotsana N, Ta KT, DelGiorno KE. The Role of Cystine/Glutamate Antiporter SLC7A11/xCT in the Pathophysiology of Cancer. Vol. 12, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
318. la Rosa P, Petrillo S, Turchi R, Berardinelli F, Schirinzi T, Vasco G, et al. The Nrf2 induction prevents ferroptosis in Friedreich's Ataxia. *Redox Biol*. 2021 Jan 1;38.

319. Grazia Cotticelli M, Xia S, Lin D, Lee T, Terrab L, Wipf P, et al. Ferroptosis as a novel therapeutic target for Friedreich's ataxia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2019 Apr 1;369(1):47–54.
320. Zesiewicz T, Heerinckx F, de Jager R, Omidvar O, Kilpatrick M, Shaw J, et al. Randomized, clinical trial of RT001: Early signals of efficacy in Friedreich's ataxia. *Movement Disorders*. 2018 Jun 1;33(6):1000–5.
321. Lynch DR, Farmer G. Mitochondrial and metabolic dysfunction in Friedreich ataxia: update on pathophysiological relevance and clinical interventions. *Neuronal Signal*. 2021 Jun 25;5(2).
322. Doll S, Freitas FP, Shah R, Aldrovandi M, da Silva MC, Ingold I, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*. 2019 Nov 28;575(7784):693–8.
323. Bersuker K, Hendricks JM, Li Z, Magtanong L, Ford B, Tang PH, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature*. 2019 Nov 28;575(7784):688–92.
324. Song X, Long D. Nrf2 and Ferroptosis: A New Research Direction for Neurodegenerative Diseases. Vol. 14, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2020.
325. Ross D, Siegel D. Functions of NQO1 in cellular protection and CoQ10 metabolism and its potential role as a redox sensitive molecular switch. Vol. 8, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
326. van Haaften RIM, Haenen GRMM, Evelo CTA, Bast A. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. Vol. 35, *Drug Metabolism Reviews*. Marcel Dekker Inc.; 2003. p. 215–53.
327. Doria-Lamba L, de Grandis E, Cristiani E, Fiocchi I, Montaldi L, Grosso P, et al. Efficacious vitamin E treatment in a child with ataxia with isolated vitamin E deficiency. *Eur J Pediatr*. 2006 Jun;165(7):494–5.
328. Yokota T, Igarashi K, Uchihara T, Jishage K ichi, Tomita H, Inaba A, et al. Delayed-onset ataxia in mice lacking-tocopherol transfer protein: Model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress [Internet]. Vol. 18, *PNAS* December. 2001. Available from: <https://www.pnas.org>

329. Belaidi AA, Bush AI. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. *Journal of Neurochemistry*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 179–97.
330. Belaidi AA, Masaldan S, Southon A, Kalinowski P, Acevedo K, Appukuttan AT, et al. Apolipoprotein E potently inhibits ferroptosis by blocking ferritinophagy. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2022 Apr 28; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41380-022-01568-w>
331. Bao WD, Pang P, Zhou XT, Hu F, Xiong W, Chen K, et al. Loss of ferroportin induces memory impairment by promoting ferroptosis in Alzheimer's disease. *Cell Death Differ*. 2021 May 1;28(5):1548–62.
332. Wang ZL, Yuan L, Li W, Li JY. Ferroptosis in Parkinson's disease: glia–neuron crosstalk. Vol. 28, *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd; 2022. p. 258–69.
333. Kuschner CE, Choi J, Yin T, Shinozaki K, Becker LB, Lampe JW, et al. Comparing phospholipid profiles of mitochondria and whole tissue: Higher PUFA content in mitochondria is driven by increased phosphatidylcholine unsaturation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2018 Sep 1;1093–1094:147–57.
334. Liang Z, Schmidtke MW, Greenberg ML. Current Knowledge on the Role of Cardiolipin Remodeling in the Context of Lipid Oxidation and Barth Syndrome. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2022 May 27;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2022.915301/full>