



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

**LAURA DURÃO FERREIRA**

**ESCLARECIMENTO DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM CALCIFICAÇÕES  
CEREBRAIS PRIMÁRIAS E ESTUDOS *IN VITRO* DO GENE *ZBTB20*,  
ASSOCIADO À SÍNDROME DE PRIMROSE**

Recife  
2021

**LAURA DURÃO FERREIRA**

**ESCLARECIMENTO DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM CALCIFICAÇÕES  
CEREBRAIS PRIMÁRIAS E ESTUDOS *IN VITRO* DO GENE *ZBTB20*,  
ASSOCIADO À SÍNDROME DE PRIMROSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito à obtenção do título de doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** Biologia Aplicada à Saúde

Orientador: Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Recife  
2021

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Ferreira, Laura Durão

Esclarecimento diagnóstico de pacientes com calcificações cerebrais primárias e estudos *in vitro* do gene *ZBTB20*, associado à síndrome de Primrose / Laura Durão Ferreira - 2021.

126 folhas: il., fig., tab.

Orientador: João Ricardo Mendes de Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Calcificação cerebral 2. Síndrome de Primrose 3. Síndrome de Raine  
I. Oliveira, João Ricardo Mendes de (Orientador) II. Título

572.8 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-218

**LAURA DURÃO FERREIRA**

**ESCLARECIMENTO DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM CALCIFICAÇÕES  
CEREBRAIS PRIMÁRIAS E ESTUDOS *IN VITRO* DO GENE *ZBTB20*,  
ASSOCIADO À SÍNDROME DE PRIMROSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito à obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** Biologia Aplicada à Saúde

Aprovada em: 28/06/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira (Orientador)  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Paula Sandrin Garcia (Examinadora Interna)  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão (Examinador Interno)  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza (Examinador Externo)  
Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Gaël Nicolas (Examinador Externo)  
Service de Génétique, Université de Rouen Normandie

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu orientador, professor João Ricardo, por fazer da Neuro um ambiente tão receptivo, estimulante e enriquecedor. Desde a minha chegada ao grupo, no início de 2017, João sempre foi um orientador presente, amigo e prestativo, sempre disposto a nos ajudar no que fosse necessário. Com ele aprendi a importância da pesquisa clínica, do contato com o paciente, e de como o nosso trabalho reflete diretamente na vida de outras pessoas. Levarei, sem sombras de dúvidas, todos esses aprendizados para o resto da minha vida acadêmica, profissional e pessoal.

Durante esses anos, o apoio dos colegas de laboratório também foi imprescindível para que eu continuasse seguindo em frente, principalmente nos dias em que os experimentos não funcionavam. Eriton, Denis, Lylyan, Darlene, Sara, Rayssa, Eraldo, Joana e Roberta participaram, cada um de sua forma, do meu crescimento desde a chegada no grupo, e todos fazem parte desta tese. Juntos assistimos à Copa do Mundo, discutimos livros, filmes e artigos, tomamos café, celebramos casamentos e nascimentos, passamos por SINATERs e por uma pandemia. A Neuro virou casa para todos nós, e tenho certeza de que o fim dos nossos doutorados não irá mudar isso.

Agradeço ainda à minha família, principalmente a meus pais, que continuam me estimulando diariamente a adquirir cada vez mais conhecimento e a ir atrás dos meus sonhos, mesmo quando tudo parece ser difícil. Agradecimento nenhum será suficiente para compensar todo o suporte financeiro e emocional, as múltiplas caronas, e o envolvimento intenso durante todos esses anos. Agradeço também a Leo, Dani e Luca por me mostrarem que, se bebês (como Luca) conseguem aprender a andar apesar de todos os tombos e desequilíbrios, eu também consigo aprender qualquer coisa a qual eu me dedique tempo o suficiente.

Por fim, agradeço a Bruno, sem o qual eu não teria chegado até aqui. Por ser estímulo e apoio constantes, por acreditar mais em mim do que eu mesma, e por encarar todos os novos desafios da vida ao meu lado. Por segurar a minha mão, desde o ensino médio, nos momentos bons, ruins, difíceis, complicados e importantes. Por ser certeza, colo e carinho. Obrigada, obrigada, obrigada, obrigada.

*The search for knowledge about ourselves and the world around us is a fundamental human endeavour. Research is a natural extension of this desire to understand and to improve the world in which we live. (TCPS 2, 2018)*

## RESUMO

Calcificações cerebrais são um tipo de calcificação ectópica que pode estar associada a processos fisiológicos ou patológicos. Dentre os quadros patológicos, destacam-se condições genéticas raras caracterizadas pela presença de calcificações cerebrais bilaterais e simétricas. A análise meticulosa de casos suspeitos dessas doenças se torna, portanto, de extrema importância para garantir que pacientes recebam conduta médica adequada. Desse modo, este estudo teve como um de seus objetivos reavaliar casos clínicos de calcificações cerebrais primárias com diagnóstico em aberto, utilizando informações clínicas, laboratoriais, exames de imagem e ferramentas genéticas para definir diagnósticos. O sequenciamento de DNA realizado focou em genes candidatos como *MYORG*, *ZBTB20* e *FAM20C*. Através dessas análises, onde um total de 35 pacientes portadores de calcificações cerebrais pertencentes à nossa coorte foram avaliados, o diagnóstico de três condições genéticas distintas foi possível, sendo esses um caso de síndrome de Primrose (PRIMS), um caso de Calcificação Cerebral Familiar Primária, e um caso de síndrome de Raine. O diagnóstico de PRIMS, doença ultrarrara causada por variantes missense e *de novo* no gene *ZBTB20*, motivou a realização de estudos *in vitro* para explorar o papel deste gene na formação de calcificações. Além disso, a expressão do gene *ZBTB20* foi avaliada frente à superexpressão do microRNA miR-9-5p em SaOs-2 devido à alta conservação desse microRNA entre espécies e à sua elevada expressão no sistema nervoso central. Resultados indicam que, enquanto a indução de calcificação *in vitro* não causa alterações significativas na expressão do *ZBTB20* ( $p=0,40$ ), a superexpressão do miR-9-5p provoca aumento significativo na expressão do *ZBTB20* ( $p=0,0035$ ). O presente trabalho reforça, portanto, a importância de realizar caracterizações fenotípicas detalhadas em pacientes que apresentam calcificações cerebrais, garantindo que um diagnóstico diferencial adequado seja aplicado para todos os pacientes, e que o miR-9-5p pode ser uma ferramenta em potencial em estudos futuros relacionados à síndrome de Primrose.

**Palavras-chave:** calcificação cerebral; síndrome de Primrose; síndrome de Raine; ZBTB20; MYORG.

## ABSTRACT

Brain calcifications are a type of ectopic calcification that can be associated to physiological or pathological conditions. Among the pathological conditions, highlight can be given to rare genetic conditions characterized by the presence of bilateral and symmetrical brain calcifications. This way, meticulous analyses of suspected cases is extremely important to ensure that patients will receive appropriate medical care. This way, one of this study's objectives was to reevaluate cases of primary brain calcification with unknown causes, making use of clinical and laboratory data, imaging exams and genetic tools to define diagnoses. DNA sequencing focused on candidate genes such as *MYORG*, *ZBTB20* e *FAM20C*. Through these analyses, where a total of 35 patients with brain calcifications of our cohort were evaluated, the diagnosis of three distinct genetic conditions was possible, those being one case of Primary Familial Brain Calcification, one case of Primrose syndrome (PRIMS), and one case of Raine syndrome. The diagnosis of PRIMS, an ultra-rare disease caused by *de novo* and missense variants affecting *ZBTB20*, prompted the execution of *in vitro* studies to further explore the role of this gene in the development of calcifications. Additionally, the expression of *ZBTB20* was evaluated when under the influence of miR-9-5p overexpression due to the elevated degree of conservation of this microRNA among species, as well as due to its increased expression in the central nervous system. The results indicate that, while there are no significant changes in *ZBTB20* expression during *in vitro* calcification induction ( $p=0,40$ ), miR-9-5p overexpression leads to a significant increase in *ZBTB20* expression ( $p=0,0035$ ). This way, the present study reinforces the importance of promoting thorough phenotypic characterization of patients with brain calcifications, and that miR-9-5p can be a potentially interesting tool in future studies regarding Primrose syndrome.

**Keywords:** brain calcification; Primrose syndrome; Raine syndrome; *ZBTB20*; *MYORG*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diferentes tipos de padrões de calcificações cerebrais em imagens de tomografia computadorizada. (A) Calcificações fisiológicas e puntiformes demarcadas por setas (KIROĞLU et al., 2010); (B) Calcificações puntiformes, difusas e periventriculares em quadro de síndrome de Aicardi-Goutières (LA PIANA et al., 2016); (C) Calcificações bilaterais e simétricas em núcleos da base em caso de Calcificação Cerebral Familiar Primária (FERREIRA et al., 2014). Calcificações na glândula pineal (seta azul). Calcificações no plexo coroide (seta vermelha). .....21
- Figura 2 - Imagens de plano horizontal do cérebro destacando os núcleos da base. (A) Desenho anatômico destacando os núcleos da base, em rosa (KIZIRIAN, 2018); (B) Imagem de tomografia computadorizada onde as calcificações, em branco no centro da imagem, afetam os núcleos da base (FERREIRA et al., 2014). .....24
- Figura 3 - Características faciais de pacientes com síndrome de Raine letal (A) e não-letal (B), mostrando que os dismorfismos são mais marcados em pacientes letais. De modo geral, pacientes com síndrome de Raine podem apresentar exoftalmia, nariz hipoplásico, orelhas de implantação baixa, microagnatia e alterações do palato. ....29
- Figura 4 – Distribuição de novos relatos de síndrome de Primrose por ano, desde 1982. Um aumento importante nos relatos pode ser visto nos últimos três anos, possivelmente devido ao desenvolvimento de métodos de triagem genética mais efetivos e acessíveis. ....31
- Figura 5 – Características faciais de pacientes com síndrome de Primrose, sendo considerados um dos aspectos mais característicos da síndrome. Pacientes podem apresentar olhos profundos e fissuras palpebrais oblíquas (A, B, C), orelhas proeminentes (D), torus palatinus (E), queixo pontudo (A, D, F) e macrocefalia (F). ....34
- Figura 6 - Características físicas de pacientes com síndrome de Primrose. Pacientes podem apresentar achados diversos, como (A) geno valgo, (B) lordose e pelos corporais espessos, e (C) escoliose e membros finos. ....35

- Figura 7 – Isoforma longa do ZBTB20 (741 aminoácidos, NP\_001157814.1), destacando o domínio BTB na região N-terminal e os 5 domínios ZNF na região C-terminal. A isoforma curta (NP\_056457.3), gerada através de splicing alternativo, contém 668 aminoácidos e é igual à isoforma longa, com a exceção da seção em rosa na região N-terminal.....49
- Figura 8 – Esquema destacando as vesículas primárias e secundárias (à esquerda) formadas durante o desenvolvimento embrionário do SNC, assim como as estruturas formadas pelas mesmas no SNC maduro (à direita). .....53
- Figura 9 – Linha do tempo mostrando principais acontecimentos da formação do SNC e do neocórtex. Barras indicam período onde os processos são mais ativos durante o desenvolvimento. Setas indicam que os processos continuam durante o período pós-natal. ....54
- Figura 10 – Ilustração da formação sequencial de neurônios neocorticais. Os neurônios são formados por células radiais da glia residentes nas zonas ventricular e subventricular, migrando radialmente em direção à placa cortical. Na placa cortical, por sua vez, os neurônios podem ser distinguidos de acordo com suas camadas e tipos de projeções formados pelos mesmos. PC – Placa cortical; ZI – Zona Intermediária; ZSVE – Zona subventricular externa; ZSVI – Zona subventricular interna; ZV – Zona Ventricular.....55
- Figura 11 – Expressão dinâmica do gene *ZBTB20* durante o desenvolvimento pré e pós-natal em diversas áreas do cérebro. CBC – Cortex cerebelar. MD – Núcleo mediodorsal do tálamo. STR – Estriado. AMY – Amígdala. HIP – Hipocampo. NCX – Neocórtex. ....57
- Figura 12 – Representação esquemática dos mecanismos de ação através dos quais o *ZBTB20* regula a neurogênese neocortical em camundongos. A formação de neurônios residentes da camada VI, formadores de projeções corticotalâmicas, ocorre por volta de E12.5. Em seguida, para possibilitar a formação da camada V em E13.5, o *ZBTB20* atua inibindo *Sox5* e *Tbr1* diretamente, e o *Satb2* indiretamente através do *CoupTF1*. Por fim, a inibição do *Satb2* cessa em E14.5 e é substituída pela inibição do *Fezf2* por parte do *ZBTB20*, possibilitando a expressão do *Satb2* e, conseqüentemente, formação das camadas II-IV. ....59

Figura 13 – Expressão do *ZBTB20* em diferentes tipos celulares do sistema nervoso central. FPKM – Fragmentos por kilobase do transcrito, por milhão de fragmentos mapeados.....60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|        |                                                     |
|--------|-----------------------------------------------------|
| ACC    | Anomalia do corpo caloso                            |
| AFP    | Alfafetoproteína                                    |
| βG     | Beta-glicerofosfato                                 |
| BHE    | Barreira hematoencefálica                           |
| BSA    | <i>Bovine serum albumin</i>                         |
| BTB    | <i>Broad complex, Tramtrack, e Bric-à-brac</i>      |
| C2H2   | <i>Cys2His2</i>                                     |
| CCFP   | Calcificação cerebral familiar primária             |
| CRG    | Célula radial da glia                               |
| DI     | Deficiência intelectual                             |
| DMEM   | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>             |
| DNA    | Ácido desoxirribonucleico                           |
| EGFR   | <i>Endothelial growth fator receptor</i>            |
| FAM20C | <i>Family with sequence similarity 20</i>           |
| FBS    | <i>Fetal bovine serum</i>                           |
| FSH    | Hormônio folículo estimulante                       |
| GW     | <i>Gestational week</i>                             |
| JAM2   | <i>Junction Adhesion Molecule 2</i>                 |
| LH     | Hormônio luteinizante                               |
| miR-9  | <i>miR-9-5p</i>                                     |
| MYORG  | <i>Myogenesis Regulating Glycosidase</i>            |
| NPC    | <i>Neural progenitor cell</i>                       |
| NVU    | <i>Neurovascular unit</i>                           |
| PBS    | <i>Phosphate-buffered saline</i>                    |
| PC     | Placa cortical                                      |
| PCR    | <i>Polymerase chain reaction</i>                    |
| PDGFB  | <i>Platelet Derived Growth Factor subunit Beta</i>  |
| PDGFRB | <i>Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta</i> |
| PRIMS  | Síndrome de Primrose                                |
| PVDF   | <i>Polyvinylidene difluoride</i>                    |
| RMN    | Ressonância Magnética                               |

|          |                                                                  |
|----------|------------------------------------------------------------------|
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| SLC20A2  | <i>Solute Carrier Family 20 Member 2</i>                         |
| SNC      | Sistema Nervoso Central                                          |
| TBS      | <i>Tri-buffered saline</i>                                       |
| TBST     | <i>Tri-buffered saline with Tween20</i>                          |
| TC       | Tomografia computadorizada                                       |
| TEA      | Transtorno do espectro autista                                   |
| TLR      | <i>Toll-like receptor</i>                                        |
| UFPE     | Universidade Federal de Pernambuco                               |
| UFRJ     | Universidade Federal do Rio de Janeiro                           |
| VLDL     | <i>Very low density lipoprotein</i>                              |
| XPR1     | <i>Xenotropic and Polytopic Retrovirus Receptor 1</i>            |
| WES      | <i>Whole exome sequencing</i>                                    |
| ZBTB20   | <i>Zinc finger and BTB domain containing 20</i>                  |
| ZNF      | <i>Zinc finger</i>                                               |
| ZSV      | Zona subventricular                                              |
| ZV       | Zona ventricular                                                 |

## SUMÁRIO

|              |                                                                     |           |
|--------------|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                             | <b>16</b> |
| 1.1          | JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DE TRABALHO .....                          | 18        |
| 1.2          | OBJETIVOS .....                                                     | 19        |
| <b>1.2.1</b> | <b>Objetivo Geral .....</b>                                         | <b>19</b> |
| <b>1.2.2</b> | <b>Objetivos Específicos .....</b>                                  | <b>19</b> |
| <b>2</b>     | <b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>                                    | <b>21</b> |
| 2.1          | CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS .....                                       | 21        |
| 2.2          | PATOLOGIAS ASSOCIADAS A CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS .....               | 22        |
| <b>2.2.1</b> | <b>Calcificação Cerebral Familiar Primária .....</b>                | <b>24</b> |
| 2.2.1.1      | Sinais e Sintomas .....                                             | 24        |
| 2.2.1.2      | Causas e Diagnóstico .....                                          | 26        |
| <b>2.2.2</b> | <b>Síndrome de Raine .....</b>                                      | <b>28</b> |
| 2.2.2.1      | Sinais e Sintomas .....                                             | 28        |
| 2.2.2.2      | Causa e Diagnóstico .....                                           | 30        |
| <b>2.2.3</b> | <b>Síndrome de Primrose .....</b>                                   | <b>31</b> |
| 2.2.3.1      | Sinais e sintomas .....                                             | 32        |
| 2.2.3.1.1    | <i>Características físicas .....</i>                                | <i>33</i> |
| 2.2.3.1.2    | <i>Atrasos do desenvolvimento .....</i>                             | <i>35</i> |
| 2.2.3.1.3    | <i>Aspectos cognitivos e comportamentais .....</i>                  | <i>36</i> |
| 2.2.3.1.4    | <i>Sistema musculo-esquelético .....</i>                            | <i>37</i> |
| 2.2.3.1.5    | <i>Calcificações ectópicas .....</i>                                | <i>38</i> |
| 2.2.3.1.6    | <i>Perfil bioquímico .....</i>                                      | <i>39</i> |
| 2.2.3.1.7    | <i>Outros achados .....</i>                                         | <i>40</i> |
| 2.2.3.2      | Causa e Diagnóstico .....                                           | 41        |
| 2.3          | BASES GENÉTICAS DAS CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS .....                   | 43        |
| <b>2.3.1</b> | <b>Transportadores de fosfato - SLC20A2 e XPR1 .....</b>            | <b>44</b> |
| <b>2.3.2</b> | <b>Pericitos e barreira hematoencefálica - PDGFB e PDGFRB .....</b> | <b>44</b> |
| <b>2.3.3</b> | <b>Unidade Neurovascular - MYORG e JAM2 .....</b>                   | <b>45</b> |
| 2.4          | OUTROS GENES CANDIDATOS .....                                       | 47        |
| <b>2.4.1</b> | <b>FAM20C .....</b>                                                 | <b>47</b> |
| 2.4.1.1      | Funções .....                                                       | 47        |
| <b>2.4.2</b> | <b>ZBTB20 .....</b>                                                 | <b>48</b> |

|              |                                                                                                                                                                                       |            |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.4.2.1      | Funções.....                                                                                                                                                                          | 50         |
| 2.4.2.1.1    | <i>Sistema Nervoso Central</i> .....                                                                                                                                                  | 52         |
| <b>3</b>     | <b>MÉTODOS .....</b>                                                                                                                                                                  | <b>61</b>  |
| 3.1          | LOCAL DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS.....                                                                                                                                                | 61         |
| 3.2          | ESTUDOS CLÍNICO-GENÉTICOS .....                                                                                                                                                       | 61         |
| <b>3.2.1</b> | <b>Recrutamento de Pacientes e Critérios de Inclusão .....</b>                                                                                                                        | <b>61</b>  |
| <b>3.2.2</b> | <b>Coleta de dados clínicos.....</b>                                                                                                                                                  | <b>62</b>  |
| <b>3.2.3</b> | <b>Diagnóstico genético .....</b>                                                                                                                                                     | <b>63</b>  |
| 3.3          | ANÁLISE <i>IN SILICO</i> .....                                                                                                                                                        | 64         |
| 3.4          | ESTUDOS <i>IN VITRO</i> .....                                                                                                                                                         | 64         |
| <b>3.4.1</b> | <b>Cultura celular .....</b>                                                                                                                                                          | <b>64</b>  |
| 3.4.1.1      | Indução de calcificação <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                         | 65         |
| 3.4.1.2      | Transfecção do microRNA miR-9-5p e inibidor do miR-9-5p.....                                                                                                                          | 65         |
| <b>3.4.2</b> | <b>Western Blot .....</b>                                                                                                                                                             | <b>65</b>  |
| 3.4.2.1      | Preparação da Amostra.....                                                                                                                                                            | 65         |
| 3.4.2.2      | Géis de Proteínas.....                                                                                                                                                                | 66         |
| 3.4.2.3      | Transferência, marcação e revelação .....                                                                                                                                             | 66         |
| <b>3.4.3</b> | <b>Análise estatística .....</b>                                                                                                                                                      | <b>67</b>  |
| <b>4</b>     | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                                                | <b>69</b>  |
| 4.1          | ARTIGO EM PREPARO – PROTEIN EXPRESSION ANALYSES OF<br>ZBTB20 UNDER PRO-OSTEOGENIC CONDITIONS AND MIR-9-5P<br>OVEREXPRESSION .....                                                     | 70         |
|              | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                                                                                                                                                     | <b>85</b>  |
|              | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                               | <b>86</b>  |
|              | <b>APÊNDICE A – ARTIGO 1: LACK OF MAJOR OPHTHALMIC FINDINGS IN<br/>PATIENTS WITH PRIMARY FAMILIAL BRAIN CALCIFICATION<br/>LINKED TO SLC20A2 AND PDGFB (FI 2020: 3,444).....</b>       | <b>99</b>  |
|              | <b>APÊNDICE B - ARTIGO 2: EXPANSION OF THE PRIMROSE SYNDROME<br/>PHENOTYPE THROUGH THE COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO<br/>NEW CASE REPORTS WITH ZBTB20 VARIANTS (FI 2021: 2,802) ...</b> | <b>103</b> |
|              | <b>APÊNDICE C – ARTIGO 3: NEW HOMOZYGOUS INDEL IN MYORG LINKED TO<br/>BRAIN CALCIFICATION, THYROIDOPATHY, AND NEUROPATHY (FI<br/>2020: 13,501) .....</b>                              | <b>108</b> |

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| APÊNDICE D - ARTIGO 4: OVERLAPPING DISEASES IN A BRAZILIAN SUBJECT WITH BRAIN CALCIFICATION LINKED TO NOVEL PHENOTYPES (FI 2020: 3,444) ..... | 112 |
| APÊNDICE E – ARTIGO 5: NON-LETHAL RAINE SYNDROME REPORT LACKING CHARACTERISTIC CLINICAL FEATURES (FI 2020: 3,444) .....                       | 114 |
| APÊNDICE F – PRIMERS UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO GENÉTICO .....                                                                               | 119 |
| ANEXO A - APRESENTAÇÃO ORAL DE TRABALHO E PREMIAÇÃO (X INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DIAGNOSTICS AND THERAPEUTICS - 2019) .....                  | 122 |
| ANEXO B – APRESENTAÇÃO ORAL DE TRABALHO E PREMIAÇÃO (I ENCONTRO DE BIOCIÊNCIAS DA UFPE - 2019).....                                           | 123 |
| ANEXO C - APRESENTAÇÃO DE PALESTRA EM CONGRESSO (I CONGRESSO DE NEUROFISIOLOGIA DA UFPE - 2019).....                                          | 124 |
| ANEXO D – PARTICIPAÇÃO EM WORKSHOP (I STANFORD HUMAN BRAIN ORGANOGENESIS WORKSHOP - 2020).....                                                | 125 |
| ANEXO E – REVISÕES DE ARTIGOS CIENTÍFICOS .....                                                                                               | 126 |

## 1 INTRODUÇÃO

Calcificações cerebrais são lesões resultantes do acúmulo de cristais de hidroxiapatita no tecido encefálico por mecanismos que ainda não foram completamente esclarecidos (DENG; ZHENG; JANKOVIC, 2015). Essas calcificações, consideradas ectópicas por ocorrerem em tecidos moles, muitas vezes são achados incidentais em exames de neuroimagem, como ressonâncias magnéticas ou tomografias computadorizadas, e podem ocorrer tanto de maneira fisiológica quanto de maneira patológica (DE OLIVEIRA; BARROS E SILVA; DE OLIVEIRA, 2013).

Enquanto as calcificações fisiológicas costumam ser resultado do envelhecimento e não possuem associação a sintomas específicos, as calcificações patológicas podem ter diversas origens e estão associadas a uma ampla gama de sinais e sintomas (KIROĞLU et al., 2010). Alguns dos quadros de calcificações cerebrais patológicas que se destacam são quadros infecciosos, como infecções congênitas pelo citomegalovírus e zika vírus, e desordens metabólicas, como quadros relacionados ao desequilíbrio de hormônios paratireoideanos (BEKIESINSKA-FIGATOWSKA; MIERZEWSKA; JURKIEWICZ, 2013). Ambos os quadros citados anteriormente levam à formação das calcificações de maneira secundária, diferente do que é visto em quadros de calcificações cerebrais patológicas primárias onde as lesões se desenvolvem como resultado direto de variantes gênicas (QUINTÁNS; OLIVEIRA; SOBRIDO, 2018).

Dentre as condições genéticas que apresentam calcificações cerebrais como um de seus achados, se destacam as condições onde as calcificações detectadas seguem o padrão bilateral e simétrico, afetando ambos hemisférios da mesma maneira (CORDEDDU et al., 2014; LIVINGSTON et al., 2013; RAMOS et al., 2017). Essas calcificações são especialmente interessantes devido à especificidade na localização das lesões, de modo que elas serão nosso foco de estudo. Neste trabalho, ênfase será dada a doenças que apresentam essas calcificações como um de seus sinais, incluindo a Calcificação Cerebral Familiar Primária (CCFP), a síndrome de Raine e a síndrome de Primrose (PRIMS).

O principal exemplo de doença genética caracterizada pela presença de calcificações cerebrais bilaterais é a Calcificação Cerebral Familiar Primária. A CCFP é considerada uma doença genética rara cujas lesões características são detectadas

por meio de exames de imagem, normalmente afetando regiões subcorticais como os núcleos da base, tálamo e cerebelo (TAGLIA et al., 2014). A doença, que pode ter perfil de herança tanto autossômico dominante quanto autossômico recessivo, pode também ocorrer na ausência de histórico familiar devido a mutações *de novo* (FERREIRA et al., 2014; WANG et al., 2012a; YAO et al., 2018). O diagnóstico desta doença deve ser feito apenas após exclusão de outros quadros onde calcificações cerebrais ocorrem secundariamente, seguida da confirmação da presença de alguma variante patológica em um de seus seis genes alvo (KELLER et al., 2013; LEGATI et al., 2015; NICOLAS et al., 2013; RAMOS et al., 2017; SCHOTTLAENDER et al., 2020; WANG et al., 2012a; YAO et al., 2018).

Nem todos os pacientes que possuem com calcificações cerebrais primárias, entretanto, devem ser diagnosticados com CCFP. Nos últimos anos, relatos clínicos cada vez mais completos têm possibilitado a melhor caracterização fenotípica de outras doenças raras que constam com esse tipo de achado, fazendo com que diagnósticos corretos sejam atingidos mais rapidamente (FERREIRA et al., 2019). Tais relatos permitem ainda que quadros até então considerados como comorbidades passassem a ser descritos como manifestações clássicas de doenças, sendo assim informações importantes para o entendimento da fisiopatologia das doenças (FERREIRA; DE OLIVEIRA, 2019). Desse modo, diversos quadros devem ser considerados após a detecção de calcificações cerebrais primárias, como desordens mitocondriais e transtornos do desenvolvimento como a síndrome de Raine e a síndrome de Primrose (CORDEDDU et al., 2014; FINSTERER; ENZELSBERGER; BASTOWANSKY, 2017; SEIDAHMED et al., 2015).

A síndrome de Raine é uma síndrome rara, comumente ocorrendo de maneira autossômica recessiva devido à variantes de perda de função que afetam o gene *FAM20C* (WHYTE et al., 2017). Clinicamente, pacientes com síndrome de Raine apresentam sinais e sintomas de diferentes tipos e gravidades desde o nascimento, podendo apresentar tanto calcificações bilaterais e simétricas como puntiformes e difusas no encéfalo (HUNG et al., 2019; TAMAI et al., 2018). Além disso, a síndrome de Raine é geralmente letal ainda durante a primeira infância, apesar de casos não-letais já terem sido relatados (MAMELI et al., 2020; SEIDAHMED et al., 2015).

A síndrome de Primrose, por sua vez, é uma síndrome extremamente rara com menos de 50 casos descritos até o momento (MELIS et al., 2020). Essa síndrome foi associada em 2014 a variantes no gene *ZBTB20*, codificador da proteína ZBTB20 que atua como repressora transcricional de genes como *AFP*, *Sox9* e *EGFR* (CORDEDDU et al., 2014; ZHANG et al., 2018; ZHOU et al., 2015). Sinais comumente descritos em pacientes com essa síndrome são características faciais típicas, problemas auditivos, atraso no desenvolvimento global e cognitivo, calcificações do pavilhão auricular e alterações no sistema musculoesquelético (MELIS et al., 2020). Além disso, calcificações cerebrais bilaterais são um dos achados descritos nestes pacientes a partir da segunda década de vida (BATTISTI et al., 2002; CORDEDDU et al., 2014; DALAL et al., 2010). Desse modo, a triagem de pacientes com calcificações cerebrais bilaterais e que possuem sinais e sintomas condizentes com PRIMS, como transtornos do desenvolvimento e características faciais típicas, pode ser um modo mais eficiente de se definir seu diagnóstico.

### 1.1 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DE TRABALHO

Considerando o impacto das doenças genéticas mencionadas acima na qualidade de vida dos pacientes, a triagem meticulosa de casos suspeitos se torna de extrema importância já que, a partir de um diagnóstico, as medidas relacionadas à conduta médica adequada podem ser tomadas. Além disso, a raridade dessas condições faz com que relatos de caso sejam importantes para detalhar os diferentes fenótipos dos pacientes, contribuindo para o diagnóstico diligente de pacientes no futuro.

Paralelamente, explorar a função de genes como o *ZBTB20* para esclarecer seu papel na formação e resposta a calcificações pode ajudar não só a entender melhor o fenótipo de pacientes com a síndrome de Primrose, mas também de pacientes com CCFP e outras desordens genéticas que causam o mesmo tipo de lesão. Informações desse tipo, que contribuem para o esclarecimento da etiopatogênese das calcificações cerebrais, podem ainda ser utilizadas para desenvolvimento de estratégias terapêuticas e marcadores moleculares, reforçando a importância de estudos que avaliem a função de genes como o *ZBTB20*.

Desse modo, nossas hipóteses de trabalho foram:

- 1) Parte dos casos suspeitos de CCFP da nossa coorte, mas que possuem triagem genética negativa para variantes nos genes *SLC20A2*, *PDGFB*, *PFGRB* e *XPR1*, podem ser causados por variantes em homozigose no *MYORG*;
- 2) Pacientes pediátricos ou jovens que constam com calcificações cerebrais bilaterais e sintomatologia condizente com transtornos do neurodesenvolvimento podem ser afetados por outros quadros raros, como Síndrome de Primrose e Síndrome de Raine;
- 3) O *ZBTB20* é possivelmente afetado pelo processo de indução osteogênica, e de maneira similar a outros genes relacionados a calcificações cerebrais primárias como o *SLC20A2*, *PDGFB*, *PFGRB* e *XPR1*;
- 4) O miR-9-5p, devido a sua conservação entre espécies e comprovadas funções em diversos processos no SNC, se destaca como potencial ferramenta de regulação de genes envolvidos com transtornos do neurodesenvolvimento, como o *ZBTB20*.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Reavaliar casos clínicos de pacientes que possuem calcificações cerebrais e diagnóstico em aberto, utilizando informações clínicas, laboratoriais, exames de imagem e triagens genéticas para definir diagnósticos, e realizar estudos *in vitro* sobre o *ZBTB20* e seu papel na formação de calcificações.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Esclarecer diagnósticos inconclusivos de pacientes com suspeita clínica de Calcificação Cerebral Familiar Primária através da triagem genética para o gene *MYORG*;
- b) Realizar triagem genética de pacientes com transtornos do neurodesenvolvimento e calcificações cerebrais bilaterais para os genes *ZBTB20* e *FAM20C*, de acordo com seus sinais e sintomas específicos;

- c) Entender a função do *ZBTB20* e seu papel na formação de calcificações cerebrais;
- d) Verificar se o *ZBTB20* responde a estímulos de calcificação em estudos *in vitro*, particularmente em modelo celular através da indução química em SaOs-2;
- e) Determinar como a expressão do gene *ZBTB20* é afetada pela superexpressão do microRNA mir-9-5p em SaOs-2.

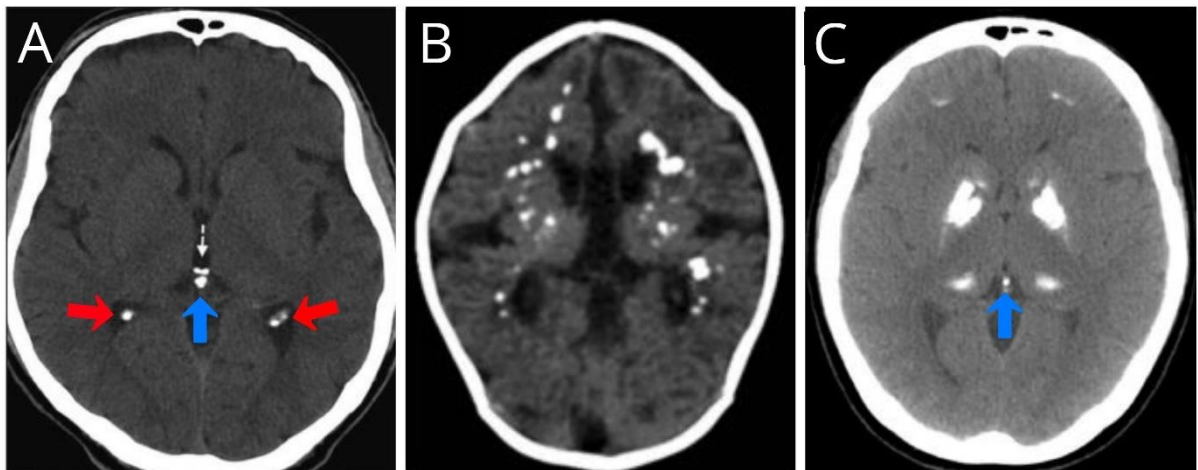
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS

As calcificações cerebrais são um tipo de calcificação ectópica que pode ser encontrada em diversas áreas do encéfalo, como plexo coróide, glândula pineal e núcleos da base (KIROĞLU et al., 2010). Essas calcificações, que são depósitos de matéria orgânica predominantemente compostos por hidroxapatita, costumam ser detectadas através de exames de imagem como ressonância magnética (RMN) e tomografia computadorizada (TC) (DENG; ZHENG; JANKOVIC, 2015; LIVINGSTON et al., 2013).

As calcificações cerebrais podem ser classificadas de acordo com seu padrão em exames de neuroimagem, os quais podem ser indicativos da origem da lesão. De maneira geral, essas calcificações ectópicas podem ser vistas de maneira puntiforme (Figura 1A), afetando estruturas específicas, de maneira difusa, com calcificações puntiformes afetando diversas estruturas (Figura 1B), ou de maneira simétrica, afetando principalmente os núcleos da base (que inclui núcleo lentiforme, núcleo caudado e amígdala) em ambos os hemisférios (Figura 1C) (DENG; ZHENG; JANKOVIC, 2015).

Figura 1 - Diferentes tipos de padrões de calcificações cerebrais em imagens de tomografia computadorizada. (A) Calcificações fisiológicas e puntiformes demarcadas por setas (KIROĞLU et al., 2010); (B) Calcificações puntiformes, difusas e periventriculares em quadro de síndrome de Aicardi-Goutières (LA PIANA et al., 2016); (C) Calcificações bilaterais e simétricas em núcleos da base em caso de Calcificação Cerebral Familiar Primária (FERREIRA et al., 2014). Calcificações na glândula pineal (seta azul). Calcificações no plexo coroide (seta vermelha).



Fonte: A autora, adaptado de (FERREIRA et al., 2014; KIROĞLU et al., 2010; LA PIANA et al., 2016).

Clinicamente, as calcificações cerebrais podem ser acompanhadas ou não de sintomas, sendo importante ressaltar que muitos dos portadores desse tipo de lesão ou não possuem quaisquer sintomas, ou possuem sintomas muito inespecíficos, como depressão e enxaqueca (RAMOS et al., 2018). Esses tipos de lesões podem ser fisiológicas, quando ocorrem em decorrência do envelhecimento, ou estarem associadas a quadros patológicos, quando se desenvolvem como resultado de uma doença de base (KIROĞLU et al., 2010). Em quadros fisiológicos, as calcificações ocorrem independente da ocorrência de sintomas, de modo que não apresentam relevância clínica e muitas vezes são detectadas incidentalmente (ALVES et al., 2013; YALCIN et al., 2016). As calcificações patológicas, em contrapartida, são comumente associadas a sintomas e/ou alterações bioquímicas, o que faz com que sejam mais facilmente detectadas do que as calcificações fisiológicas (QUINTÁNS; OLIVEIRA; SOBRIDO, 2018).

## 2.2 PATOLOGIAS ASSOCIADAS A CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS

Apesar de também ocorrerem de maneira fisiológica, as calcificações cerebrais são um tipo de achado característico de diversos quadros patológicos (KIROĞLU et al., 2010). Dentre os quadros que resultam na formação desse tipo de calcificação ectópica encontram-se quadros primários, onde as calcificações ocorrem como consequência direta de alterações genéticas, e quadros secundários, onde as lesões se formam em decorrência de processos infecciosos, vasculares, neoplásicos ou metabólicos (DENG; ZHENG; JANKOVIC, 2015; KIROĞLU et al., 2010). À vista disso, o aspecto clínico de cada caso depende principalmente do diagnóstico associado à lesão, já que portadores de calcificações cerebrais secundárias normalmente apresentam sintomas associados ao estímulo responsável pela lesão, enquanto a clínica de portadores de calcificações cerebrais primárias é menos específica e deve ser bem esclarecida no intuito de direcionar o estudo genético (BEKIESINSKA-FIGATOWSKA; MIERZEWSKA; JURKIEWICZ, 2013).

Calcificações cerebrais secundárias a condições de base são normalmente acompanhadas por sinais e sintomas relacionados a suas causas, como alterações bioquímicas em quadros de hipoparatiroidismo e infecções congênitas por citomegalovírus ou zikavírus (BEKIESINSKA-FIGATOWSKA; MIERZEWSKA; JURKIEWICZ, 2013; CHEERAN; LOKENSGARD; SCHLEISS, 2009; DANOVSKA et

al., 2018; VASCO ARAGÃO et al., 2016). Além disso, esse tipo de calcificação pode ocorrer em qualquer momento da vida, desde o período intrauterino até a vida adulta (ABATE; CLARKE, 2017; VASCO ARAGÃO et al., 2016). Desse modo, a análise dos sinais e sintomas apresentados por cada paciente pode ser indicativa da existência e causa das calcificações, garantindo que o paciente receba tratamento adequado (BEKIESINSKA-FIGATOWSKA; MIERZEWSKA; JURKIEWICZ, 2013).

Dentre as condições genéticas que apresentam calcificações cerebrais primárias como um de seus achados, condições nas quais as calcificações comumente são bilaterais e simétricas se destacam. Algumas das condições que se encaixam nesse grupo são a Calcificação Cerebral Familiar Primária, a síndrome de Raine e a síndrome de Primrose, onde pacientes usualmente desenvolvem calcificações que afetam os núcleos da base bilateralmente (FAUNDES et al., 2014; MELIS et al., 2020; WESTENBERGER; BALCK; KLEIN, 2019). Apesar de se assemelharem em relação à presença das calcificações cerebrais bilaterais e simétricas, essas três condições genéticas possuem causas e apresentações clínicas distintas (Quadro 1). Desse modo, uma avaliação clínica minuciosa é de extrema importância para definição diagnóstica e determinação da abordagem terapêutica mais apropriada para cada paciente. Com isso em mente, essas três condições genéticas serão detalhadas nos tópicos a seguir.

Quadro 1 - Quadro comparativo entre a CCFP, PRIMS, e síndrome de Raine contendo alguns dos principais sinais e sintomas relativos às três doenças.

|                                                        | <b>CCFP</b> | <b>Raine</b> | <b>PRIMS</b> |
|--------------------------------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| <i>Calcificações Cerebrais Bilaterais e Simétricas</i> | X           | X            | X            |
| <i>Nefrocalcinose</i>                                  |             | X            |              |
| <i>Calcificações do Pavilhão Auricular</i>             |             |              | X            |
| <i>Dismorfismos Craniofaciais Característicos</i>      |             | X            | X            |
| <i>Atrasos no Desenvolvimento Global</i>               |             | X            | X            |
| <i>Alterações Odontológicas</i>                        |             | X            |              |
| <i>Problemas Motores</i>                               | X           |              | X            |
| <i>Problemas Cognitivos</i>                            | X           | X            | X            |
| <i>Transtorno do Espectro Autista</i>                  |             |              | X            |
| <i>Problemas Respiratórios</i>                         |             | X            |              |
| <i>Idade Média de Aparecimento de Sintomas</i>         | 30-50       | 0-10         | 0-10         |

Fonte: A autora (2021).

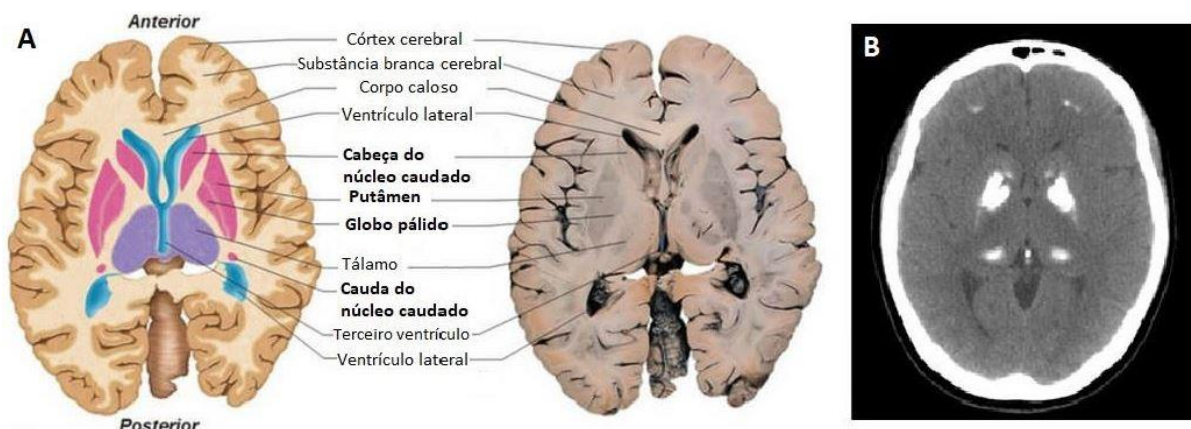
### 2.2.1 Calcificação Cerebral Familiar Primária

Inicialmente considerada uma doença rara, a CCFP (também chamada de IBGC, *idiopathic basal ganglia calcifications*, ou doença de Fahr) é uma doença genética caracterizada pela presença de calcificações cerebrais bilaterais e simétricas que parece ter sua prevalência subestimada (KELLER et al., 2013; NICOLAS et al., 2018; WANG et al., 2012a). Estudos sugerem que a baixa taxa de casos de CCFP pode se dar devido ao desconhecimento sobre a condição, sobre a sobreposição clínica da mesma com outros quadros patológicos, e sobre a alta taxa de casos assintomáticos (FERREIRA, 2018; NICOLAS et al., 2018). Nos últimos anos, entretanto, e provavelmente devido ao advento de técnicas moleculares mais sensíveis, mais casos de CCFP vem sendo diagnosticados, o que possibilita um melhor entendimento global sobre esta doença (GUO et al., 2019; SCHOTTLAENDER et al., 2020; YAO et al., 2018).

#### 2.2.1.1 Sinais e Sintomas

O principal e único sinal encontrado de maneira unânime em pacientes com CCFP são calcificações cerebrais bilaterais e simétricas, que normalmente afetam os núcleos da base (putamen, globo pálido, núcleo caudado e amígdala) e outras estruturas como tálamos e núcleo denteado (Figura 2) (RAMOS et al., 2017). Sinais de atrofia cortical também já foram relatados, mais recentemente, em grupos específicos de pacientes (CHELBAN et al., 2020). Ademais, nenhum outro sinal físico ou bioquímico é relatado de maneira consistente entre pacientes com CCFP, o que significa que, de maneira geral, pacientes com essa doença não possuem indicativos bioquímicos de distúrbios no metabolismo do cálcio, deficiência de vitamina D ou problemas na paratireóide (RAMOS et al., 2018).

Figura 2 - Imagens de plano horizontal do cérebro destacando os núcleos da base. (A) Desenho anatômico destacando os núcleos da base, em rosa (KIZIRIAN, 2018); (B) Imagem de tomografia computadorizada onde as calcificações, em branco no centro da imagem, afetam os núcleos da base (FERREIRA et al., 2014).



Fonte: (FERREIRA, 2018), adaptado de (FERREIRA et al., 2014; KIZIRIAN, 2018)

Além de só possuir calcificações cerebrais como sinal característico, a CCFP tem apresentação clínica heterogênea e inespecífica, de modo que pacientes com CCFP podem ser tanto sintomáticos quanto assintomáticos (LE MOS et al., 2013). De maneira geral, estudos sugerem que apenas cerca de 60% dos pacientes com CCFP apresenta sintomas ao longo da vida, os quais costumam surgir por volta dos 30 a 50 anos de idade (RAMOS et al., 2018; TADIC et al., 2015).

Dentre os pacientes sintomáticos, distúrbios do movimento como tremores, coreia, ataxia, distonia e parksonismo são os sintomas mais prevalentes (NICOLAS et al., 2015; RAMOS et al., 2018). Estudos recentes sugerem ainda que a ocorrência de sintomas motores é ainda mais prevalente em pacientes que apresentam calcificações na ponte, região do tronco encefálico que também pode ser acometida por calcificações em pacientes com CCFP (CHELBAN et al., 2020). Apesar de ainda ter causa desconhecida, hipotetiza-se que a grande prevalência desse tipo de sintoma em pacientes com CCFP se dá devido ao fato de que os núcleos da base, estruturas comumente afetadas pelos depósitos de hidroxiapatita, possuem função primordialmente motora (KOPELL et al., 2006). Mais estudos, entretanto, ainda são necessários para confirmar a possível existência dessa relação causal.

Além dos sintomas motores, sintomas psiquiátricos e alterações cognitivas também são frequentemente associadas a casos de CCFP, principalmente transtornos de humor e o desenvolvimento de demência (NICOLAS et al., 2015). Sintomas bulbares, como disartria e disfagia, além de enxaqueca, episódios convulsivos e casos de neuropatia também já foram relatados em diversos pacientes diagnosticados com CCFP (BAUER et al., 2019; CHELBAN et al., 2020; CHEN et al., 2020; FERREIRA; DE OLIVEIRA, 2019). Desse modo, a CCFP possui uma elevada

heterogeneidade clínica, o que dificulta o processo diagnóstico e faz com que foco seja dado para seus genes causadores e para o diagnóstico molecular dessa doença.

#### 2.2.1.2 Causas e Diagnóstico

A CCFP é uma doença genética que pode ser causada por mutações de perda de função em diversos genes, de modo que até o momento seis genes distintos já foram identificados como causadores desta doença (GUO et al., 2019; SCHOTTLAENDER et al., 2020; YAO et al., 2018). Apesar de em sua maioria ser causada por variantes genéticas de caráter autossômico dominante, relatos de caso recentes vêm destacando a existência de casos autossômicos recessivos desta doença (CEN et al., 2019; LEMOS et al., 2015; SCHOTTLAENDER et al., 2020; YAO et al., 2018). Além disso, casos de CCFP *de novo* também já foram relatados na literatura (FERREIRA et al., 2014).

Dentre os genes relacionados a casos autossômicos dominantes de CCFP destacam-se o *SLC20A2* (*Solute Carrier Family 20 Member 2*) e o *XPR1* (*Xenotropic and Polytropic Retrovirus Receptor 1*), ambos codificadores de transportadores de fosfato (LEGATI et al., 2015; WANG et al., 2012a). O *SLC20A2*, que codifica a proteína PiT-2 (*Type III sodium-dependent inorganic phosphate transporter*), foi o primeiro gene a ser relacionado a doença e é um dos principais genes responsáveis por casos de CCFP (DENG; ZHENG; JANKOVIC, 2015; RAMOS et al., 2017). O *XPR1*, por sua vez, é estimado de corresponder a apenas cerca de 2% dos casos de CCFP, de modo que relatos de caso sobre pacientes com variantes nesse gene são mais escassos do que relatos de caso associados ao *SLC20A2* (ANHEIM et al., 2016).

Além do *SLC20A2* e *XPR1*, os genes *PDGFB* (*Platelet Derived Growth Factor subunit Beta*) e *PDGFRB* (*Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta*) também são responsáveis por casos de CCFP autossômica dominante (KELLER et al., 2013; NICOLAS et al., 2013). Estudos sugerem que esses genes possam afetar a permeabilidade e integridade da barreira hematoencefálica, o que reforça a importância dos mesmos no sistema nervoso central, e que juntos eles sejam responsáveis por cerca de 13% dos casos de CCFP (MOURA; LEMOS; OLIVEIRA, 2017; NAHAR, 2019; RAMOS et al., 2017). É importante ressaltar ainda que um

caso de CCFP causada por variantes digênicas no *SLC20A2* e no *PDGFRB* já foi descrito, e que a apresentação clínica desse paciente foi mais severa do que a de pacientes heterozigotos para variantes em apenas um dos dois genes afetados (SUN et al., 2021).

Já em relação a casos de CCFP causada por herança autossômica recessiva, o gene que mais merece destaque é o *MYORG* (*Myogenesis Regulating Glycosidase*), correlacionado à doença apenas em 2018 mas já considerado como um dos principais genes relacionados à doença (BAUER et al., 2019; CHELBAN et al., 2020). Casos de CCFP causada por variantes nesse gene (MYORG-CCFP) já foram descritos tanto em situações de homozigose quanto em casos de heterozigose composta, e até o momento os casos de pelo menos 40 famílias com CCFP já foram relacionadas a este gene (CHEN et al., 2020; GRANGEON et al., 2019; KUME et al., 2020). Curiosamente, pacientes com MYORG-CCFP parecem apresentar quadro clínico mais severo e de progressão mais rápida do que pacientes com CCFP causada por outros genes, uma associação que ainda não havia feita em relação a nenhum dos outros genes associado à CCFP (CHELBAN et al., 2020; FERREIRA, 2018; FERREIRA; DE OLIVEIRA, 2019; PENG et al., 2019).

Por fim, o segundo e último gene relacionado à CCFP autossômica recessiva é o *JAM2* (*Junctional Adhesion Molecule 2*), que codifica uma proteína responsável pelo estabelecimento e manutenção de zonas de oclusão, um tipo de junção celular (SCHOTTLAENDER, 2018). Assim como visto no *MYORG*, casos de *JAM2*-CCFP já foram relatados tanto devido à homozigose quanto à heterozigose composta (SCHOTTLAENDER et al., 2020). Entretanto, e apesar da aparente semelhança clínica entre casos de CCFP causada por variantes no *JAM2* e no *MYORG*, mais relatos de casos de *JAM2*-CCFP são necessários para detalhar a clínica desses pacientes (CEN et al., 2019; SCHOTTLAENDER et al., 2020).

Levando em consideração a grande heterogeneidade clínica entre pacientes com CCFP, o diagnóstico desta condição é altamente dependente da detecção de variantes em um dos seis genes relacionados à doença (KELLER et al., 2013; LEGATI et al., 2015; NICOLAS et al., 2013; SCHOTTLAENDER et al., 2020; WANG et al., 2012a; YAO et al., 2018). O diagnóstico molecular se baseia, portanto, principalmente na utilização de técnicas como o sequenciamento de Sanger, sequenciamento do exoma ou genoma completos (RAMOS et al., 2017). É importante ressaltar, entretanto, que a ausência de variantes genéticas nos seis

genes relacionados à CCFP não deve excluir essa doença das hipóteses diagnósticas. Desse modo, pacientes podem ser diagnosticados com CCFP não-confirmada geneticamente caso possuam calcificações cerebrais bilaterais e simétricas na ausência tanto de causas secundárias quanto de variantes nos genes *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1*, *MYORG* e *JAM2* (NICOLAS et al., 2015; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2016).

### **2.2.2 Síndrome de Raine**

A síndrome de Raine é uma síndrome genética rara, de herança autossômica recessiva e normalmente letal ainda no período fetal ou perinatal (SEIDAHMED et al., 2015; WHYTE et al., 2017). Comumente associada a casos de consanguineidade, essa síndrome foi descrita pela primeira vez em 1989 e é também conhecida como “Osteomalácia esclerosante congênita com calcificações cerebrais” (OMIM 259660) (RAINE et al., 1989; WHYTE et al., 2017). Menos de 60 casos dessa síndrome de já foram descritos na literatura, com apenas 19 destes representando casos não-letais (EL-DESSOUKY et al., 2020; SHETH et al., 2018; TAMAI et al., 2018). Esses números ressaltam a alta mortalidade desta síndrome, assim como a importância da coleta de dados sobre pacientes não-letais para guiar a definição de estratégias terapêuticas apropriadas para esses casos (SIMPSON et al., 2009).

#### **2.2.2.1 Sinais e Sintomas**

Pouco se sabe sobre a apresentação clínica da síndrome de Raine em pacientes adultos, já que a maior parte das informações sobre sinais e sintomas dessa doença é derivada de relatos de caso de crianças e recém-nascidos (ELALAOUI et al., 2016). De maneira geral, pacientes com síndrome de Raine apresentam dismorfismos craniofaciais já ao nascer, incluindo hipoplasia da face medial, atresia de coanas, exoftalmia, nariz hipoplásico, alterações no palato, microagnatia e microcefalia (ELALAOUI et al., 2016; ELTAN et al., 2020). Apesar de esses dismorfismos serem mais marcados em casos letais, eles também são descritos em casos não-letais e fazem com que tais achados, em conjunto, sejam considerados como característicos e sugestivos desta síndrome (Figura 3) (SHETH et al., 2018).

Figura 3 - Características faciais de pacientes com síndrome de Raine letal (A) e não-letal (B), mostrando que os distúrbios são mais marcados em pacientes letais. De modo geral, pacientes com síndrome de Raine podem apresentar exoftalmia, nariz hipoplásico, orelhas de implantação baixa, micrognatia e alterações do palato.



Fonte: (ELALAOUI et al., 2016; LULLA; BAPAI, 2021)

Grande parte dos casos letais de síndrome de Raine são relacionados ainda a problemas respiratórios agudos que fazem com que os pacientes sejam dependentes de suporte médico desde o nascimento (FAUNDES et al., 2014; MAMELI et al., 2020). Estudos sugerem que a letalidade resultante desses problemas respiratórios esteja diretamente ligada tanto à severidade da atresia coanal, que corresponde a uma falha na comunicação entre a cavidade nasal posterior e a nasofaringe, quanto aos pulmões, que parecem ser diminuídos em pacientes com essa síndrome (FAUNDES et al., 2014; SEIDAHMED et al., 2015).

Além das má-formações congênitas e problemas respiratórios, pacientes com síndrome de Raine também costumam apresentar diferentes graus de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, problemas cognitivos e de audição (MAMELI et al., 2020; SEIDAHMED et al., 2015; SIMPSON et al., 2009). Alterações odontológicas também vem sendo relatadas nos últimos anos como um dos achados mais característicos da forma não-letal síndrome, onde pacientes comumente apresentam amelogenese imperfeita (caracterizada pela perda generalizada de esmalte, raízes incompletas e ápices abertos) e abscessos periapicais recorrentes (ACEVEDO et al., 2015). Problemas ósseos, como osteonecrose em ossos longos, osteopenia e raquitismo também parecem ser achados característicos dessa síndrome, podendo auxiliar na determinação de uma suspeita diagnóstica (MAMELI et al., 2020).

Calcificações ectópicas também já foram relatadas em pacientes com síndrome de Raine, afetando principalmente os rins e o cérebro mas também outros órgãos como pulmões, fígado e baço (ELALAOUI et al., 2016; ELTAN et al., 2020; FAUNDES et al., 2014). De maneira mais específica, as calcificações cerebrais muitas vezes estão presentes desde o nascimento e podem apresentar diferentes padrões, de modo que tanto casos de calcificações puntiformes e difusas quanto de calcificações bilaterais e simétricas já foram relatados (ELTAN et al., 2020; HUNG et al., 2019; TAMAI et al., 2018; WHYTE et al., 2017).

#### 2.2.2.2 Causa e Diagnóstico

Causada em sua maioria por mutações de perda de função no *FAM20C* (*Family with sequence similarity 20*) em homozigose, essa síndrome pode ainda ser causada por heterozigose composta, deleções e microdeleções envolvendo o mesmo gene (ABABNEH et al., 2013; SIMPSON et al., 2007). Relações entre genótipo e fenótipo vem sendo descritas em estudos recentes, sugerindo que variantes localizadas na região C-terminal sejam mais associadas à letalidade do que variantes na região N-terminal (BAJAJ et al., 2021; ELTAN et al., 2020). É importante ressaltar, entretanto, que diversas exceções existem, e mais estudos serão necessários para determinar se outros genes estão envolvidos na determinação da gravidade dessa doença (BAJAJ et al., 2021).

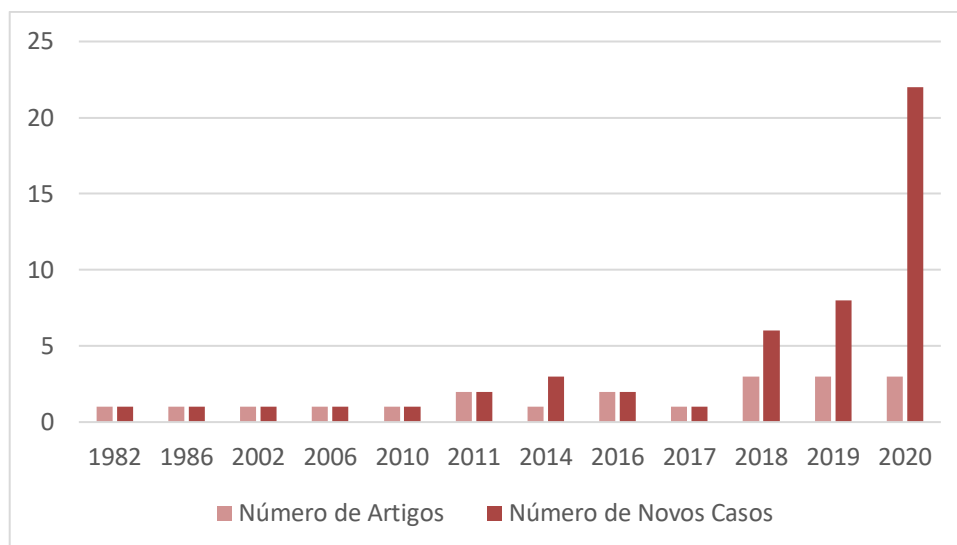
O diagnóstico da síndrome de Raine depende portanto da coleta e análise de dados clínicos, radiológicos e, principalmente, triagem genética para variantes patogênicas no gene *FAM20C* (FAUNDES et al., 2014). Diagnósticos pré-natais dessa síndrome são possíveis, principalmente em casos graves onde os dismorfismos faciais e hiperecogenicidade (calcificações) cerebrais são facilmente identificados em ultrassonografias, mas os mesmos só devem ser confirmados através da realização de triagens genéticas após o nascimento (EL-DESSOUKY et al., 2020; LULLA; BAPAI, 2021). O diagnóstico diferencial dessa síndrome deve focar em infecções congênitas pelo citomegalovírus e outras síndromes raras, como a síndrome de Kohlschütter-Tonz, síndrome de Heimler e síndrome de Jalili (ELALAOUI et al., 2016; FAUNDES et al., 2014).

### 2.2.3 Síndrome de Primrose

Descrita inicialmente pelo médico escocês D. A. Primrose em 1982, a síndrome de Primrose é uma síndrome genética, autossômica dominante, que afeta o desenvolvimento neuropsicomotor em diferentes graus e tende a ser progressiva (CORDEDDU et al., 2014; PRIMROSE, 1982). Inicialmente chamada de “Uma condição degenerativa vagarosamente progressiva caracterizada por deficiência mental, atrofia da musculatura dos membros e anormalidades ósseas, incluindo ossificação do pavilhão auricular” ou “A síndrome do retardo mental, atrofia muscular e anormalidades do esqueléticas”, a síndrome passou a ser chamada pelo epônimo “Síndrome de Primrose” já em 1986, no segundo relato médico da doença (COLLACOTT; O'MALLEY; YOUNG, 1986; PRIMROSE, 1982). O uso do epônimo, além de facilitar a identificação desta nova entidade, também contribuiu para evitar o uso de nomes muito extensos e baseados nas principais características associadas à síndrome na época, como visto acima.

Até maio de 2021, casos de apenas 47 pacientes com síndrome de Primrose haviam sido relatados na literatura médica, o que faz dessa síndrome uma doença extremamente rara (HERSH et al., 2015; MELIS et al., 2020). É importante ressaltar, entretanto, que mais da metade dos casos foi relatada nos últimos 5 anos, de modo que a prevalência dessa síndrome pode ser subestimada (Figura 4) (MELIS et al., 2020). Além disso, e por ser uma doença progressiva, diversos sinais e sintomas de PRIMS só se desenvolvem com o passar dos anos, o que dificulta o diagnóstico precoce em recém-nascidos e crianças (MELIS et al., 2020). Levando isso em consideração, é provável que o número de casos de PRIMS aumente nos próximos anos não só pelo maior conhecimento sobre a síndrome, mas principalmente pelo desenvolvimento de métodos de triagem genética mais efetivos e acessíveis.

Figura 4 – Distribuição de novos relatos de síndrome de Primrose por ano, desde 1982. Um aumento importante nos relatos pode ser visto nos últimos três anos, possivelmente devido ao desenvolvimento de métodos de triagem genética mais efetivos e acessíveis.



Fonte: A autora (2021).

Relatos médicos mostram que a síndrome de Primrose não parece ter prevalência diferente entre homens e mulheres ou diferentes raças, de modo que casos dessa síndrome já foram relatados em diversos países como Japão, EUA, Itália, França, Holanda e Brasil (ALBY et al., 2018; CORDEDDU et al., 2014; FERREIRA et al., 2019; YAMAMOTO-SHIMOJIMA et al., 2019). Pela síndrome de Primrose ser uma condição progressiva e sem achados patognomônicos, com apresentação clínica muito inespecífica durante a infância e costumando se tornar mais característica apenas após a segunda década de vida, a maioria dos casos descritos inicialmente representavam adultos (BATTISTI et al., 2002; DALAL et al., 2010; MATHIJSEN; VAN HASSELT-VAN DER VELDE; HENNEKAM, 2006). Nos últimos anos, entretanto, é possível identificar um aumento no diagnóstico ainda em crianças, provavelmente devido ao advento e barateamento de novas técnicas de sequenciamento do DNA. Essas técnicas têm facilitado a triagem genética de pacientes mesmo antes do surgimento de uma hipótese diagnóstica bem delimitada, o que faz com o que o diagnóstico de crianças seja facilitado e feito de maneira precoce (JUVEN et al., 2020).

#### 2.2.3.1 Sinais e sintomas

A síndrome de Primrose é uma síndrome complexa e com sinais e sintomas que acometem diversos sistemas, estando envolvida com alterações no SNC, sistema músculo-esquelético, cognição, vias metabólicas, desenvolvimento

neuropsicomotor entre outros (CORDEDDU et al., 2014). PRIMS se mostra ainda como uma condição progressiva, onde certos sinais e sintomas aparecem ou se intensificam com o passar dos anos, de modo que crianças e adultos com a doença costumam apresentar sintomas diferentes (MELIS et al., 2020). Além disso, é importante ressaltar que a síndrome de Primrose é uma doença clinicamente heterogênea, já que pacientes diferem entre si tanto em relação aos sintomas apresentados quanto em relação à severidade dos mesmos (CLEAVER et al., 2019). Levando isso em consideração, abaixo serão descritos os principais tipos de achados relatados em pacientes com PRIMS.

#### *2.2.3.1.1 Características físicas*

Pacientes com PRIMS apresentam características faciais específicas que, quando analisadas em conjunto, podem ser consideradas como um dos aspectos mais característicos da síndrome (Figura 5) (CLEAVER et al., 2019). Essas características se tornam mais evidentes a partir da infância, já que ao nascimento apenas a macrocefalia, achado altamente inespecífico, pode ser detectada e reportada (GRÍMSDÓTTIR et al., 2018). Apesar de variarem de paciente para paciente, tais características normalmente incluem:

**Olhos:** olhos profundos, ptose, fissuras palpebrais oblíquas (para baixo), estrabismo (CLEAVER et al., 2019; CORDEDDU et al., 2014; STELLACCI et al., 2018);

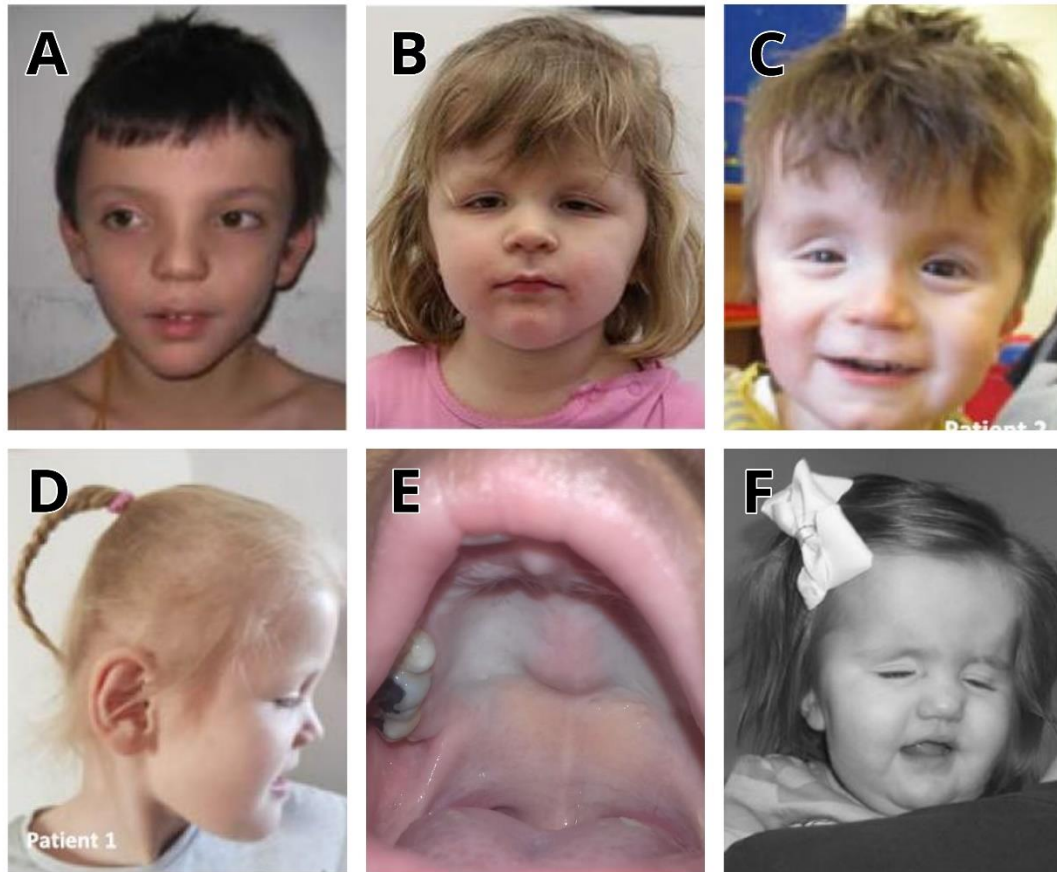
**Nariz:** nariz proeminente, ponte nasal baixa (CORDEDDU et al., 2014; MATTIOLI et al., 2016; STELLACCI et al., 2018);

**Boca:** lábio inferior proeminente, torus palatinus (COLLACOTT; O'MALLEY; YOUNG, 1986; FERREIRA et al., 2019; MATHIJSEN; VAN HASSELT-VAN DER VELDE; HENNEKAM, 2006);

**Orelhas:** orelha proeminente (CORDEDDU et al., 2014; FERREIRA et al., 2019; JUVEN et al., 2020);

**Cabeça:** macrocefalia, braquicefalia, testa e queixo proeminentes (COLLACOTT; O'MALLEY; YOUNG, 1986; CORDEDDU et al., 2014; STELLACCI et al., 2018).

Figura 5 – Características faciais de pacientes com síndrome de Primrose, sendo considerados um dos aspectos mais característicos da síndrome. Pacientes podem apresentar olhos profundos e fissuras palpebrais oblíquas (A, B, C), orelhas proeminentes (D), torus palatinus (E), queixo pontudo (A, D, F) e macrocefalia (F).

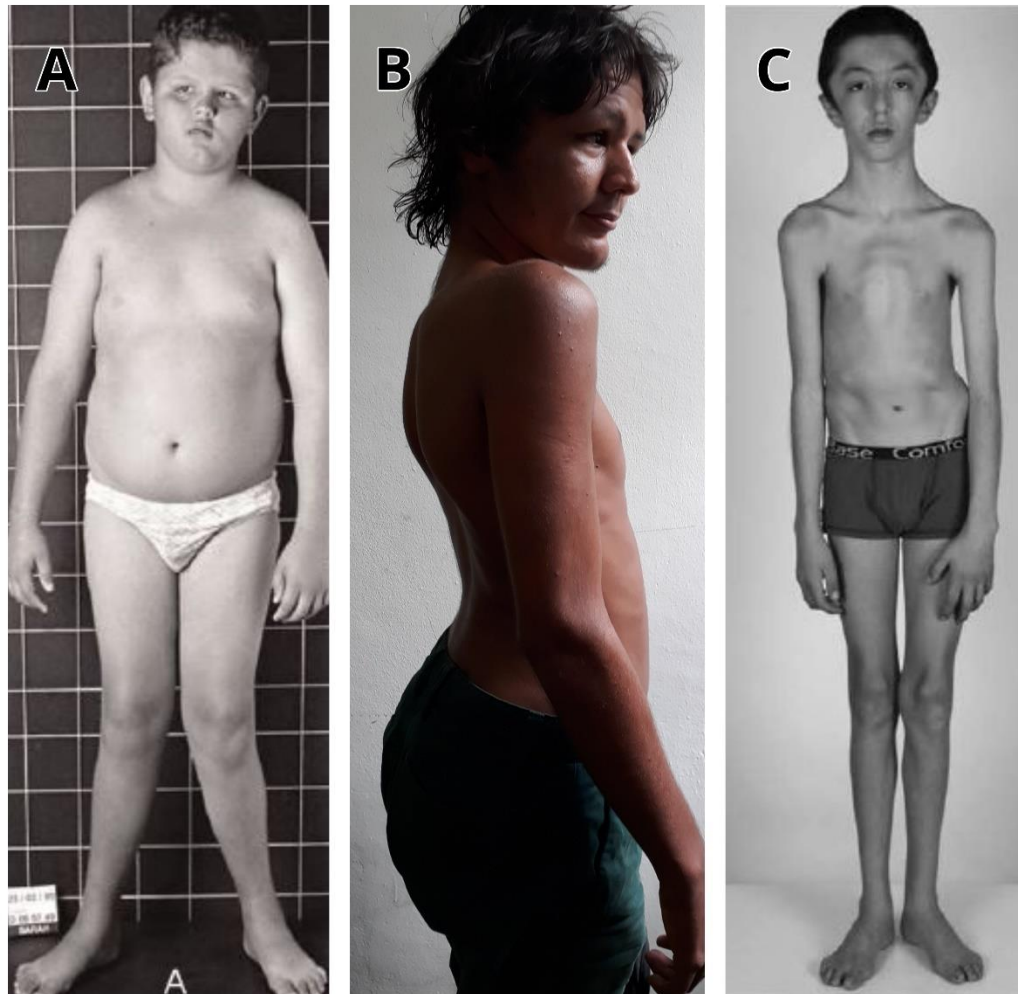


Fonte: (ALBY et al., 2018; CASERTANO et al., 2017; CLEAVER et al., 2019; FERREIRA et al., 2019; STELLACCI et al., 2018).

Apesar de não tão característicos como as características faciais listadas acima, a síndrome de Primrose também causa alterações que afetam o tronco e membros de pacientes. Dentre os casos descritos até o momento existem relatos recorrentes de obesidade truncal, membros finos, geno valgo, criptorquidismo, lordose, escoliose e pelos corporais espessos (Figura 6) (CASERTANO et al., 2017; CLEAVER et al., 2019). Além disso, a síndrome de Primrose é considerada de maneira geral como uma síndrome associada ao crescimento exacerbado, já que grande parte dos pacientes descritos inicialmente apresentavam altura e peso elevados para a faixa etária (CORDEDDU et al., 2014; MATHIJSEN; VAN HASSELT-VAN DER VELDE; HENNEKAM, 2006). Enfatiza-se entretanto que nem todos os pacientes reportados apresentam essa característica, de maneira que o crescimento exacerbado não deve ser considerado como um achado clínico

essencial para o diagnóstico de PRIMS (COLLACOTT; O'MALLEY; YOUNG, 1986; FERREIRA et al., 2019; GRÍMSDÓTTIR et al., 2018).

Figura 6 - Características físicas de pacientes com síndrome de Primrose. Pacientes podem apresentar achados diversos, como (A) geno valgo, (B) lordose e pelos corporais espessos, e (C) escoliose e membros finos.



Fonte: (CARVALHO; SPECK-MARTINS, 2011; FERREIRA et al., 2019; GRÍMSDÓTTIR et al., 2018).

#### 2.2.3.1.2 Atrasos do desenvolvimento

De maneira geral, pacientes diagnosticados com a síndrome de Primrose tendem a apresentar atraso global no desenvolvimento neuropsicomotor (HERSH et al., 2015; MATTIOLI et al., 2016). Relatos de atraso para atingir marcos do desenvolvimento, como as capacidades de sentar-se, engatinhar e andar são comuns, sendo muitas vezes um dos primeiros sinais que levam os responsáveis pelos pacientes a procurarem auxílio médico (CARVALHO; SPECK-MARTINS, 2011;

MELIS et al., 2020). É importante ressaltar, entretanto, que a síndrome de Primrose tem apresentação clínica heterogênea, de modo que diferentes casos apresentam diferentes graus de atraso do desenvolvimento.

Além da parte motora, relatos sobre a ausência do desenvolvimento da fala também já foram feitos em parte dos pacientes diagnosticados com PRIMS (COLLACOTT; O'MALLEY; YOUNG, 1986; FERREIRA et al., 2019; GRÍMSDÓTTIR et al., 2018; MATTIOLI et al., 2016). É possível que esse achado seja subnotificado, já que nem todos os autores fazem referência ao desenvolvimento da fala nos relatos de caso.

#### *2.2.3.1.3 Aspectos cognitivos e comportamentais*

Pacientes com PRIMS apresentam deficiência intelectual (DI) de diferentes graus, apesar de a maioria apresentar DI moderada ou severa (CORDEDDU et al., 2014; MELIS et al., 2020). É importante ressaltar, entretanto, que a deficiência intelectual não parece ser progressiva, de modo que pacientes mantem um mesmo grau de cognição ao longo da vida adulta (MELIS et al., 2020). Diversas proteínas da família ZNF já foram relacionados a casos de DI, reforçando a possibilidade do *ZBTB20* estar diretamente ligado a esses achados (KHAN et al., 2019). De maneira mais específica, estudos em modelos animais mostram que a expressão elevada do *ZBTB20* diminui a expressão de genes ligados à deficiência intelectual, podendo explicar o motivo de pacientes com PRIMS apresentarem problemas cognitivos (KOUL, 2014).

Vários pacientes diagnosticados com a síndrome de Primrose também recebem o diagnóstico de transtorno do espectro autista (TEA), variando em severidade e idade de diagnóstico (CORDEDDU et al., 2014; MELIS et al., 2020). Condizente com os achados de TEA, pacientes com PRIMS comumente apresentam comportamentos repetitivos, mostram dificuldades com interação social e evitam contato visual, além de muitos serem não-verbais e extremamente dependentes de rotinas (LORD et al., 2018). Assim como visto em relação à DI, estudos em modelos animais mostram que o *ZBTB20* está envolvido na regulação da transcrição de genes relacionados ao TEA, estando possivelmente relacionado à fisiopatologia dessa síndrome (KOUL, 2014). Além disso, estudos com gêmeos monozigóticos concordantes para TEA apontaram o *ZBTB20* como um dos genes possivelmente

envolvidos na etiologia desse transtorno, corroborando os achados de modelos animais (HAYRETDAG et al., 2020).

Os aspectos cognitivos e comportamentais relacionados à PRIMS vão além de apenas deficiência intelectual e TEA, incluindo relatos de agressividade, auto-mutilação, tiques motores, esquizofrenia e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (CLEAVER et al., 2019; DALAL et al., 2010; HERSH et al., 2015; MELIS et al., 2020). Tais achados são muitas vezes relatados como comorbidades em quadros de TEA e DI mesmo fora do contexto da síndrome de Primrose, dificultando a identificação e o diagnóstico desses quadros (LORD et al., 2018).

Devido à multiplicidade dos achados comportamentais relacionados à síndrome de Primrose, pacientes com PRIMS muitas vezes se beneficiam do acompanhamento por serviços diversos como fonoaudiologia, terapia ocupacional, psicologia e educação especial (DALAL et al., 2010). Em alguns casos, entretanto, o acompanhamento psiquiátrico e intervenção farmacológica também são recomendados, principalmente em pacientes que apresentam agressividade e comportamentos de auto-mutilação (LORD et al., 2018; MATTIOLI et al., 2016).

#### *2.2.3.1.4 Sistema musculo-esquelético*

Como mencionado anteriormente, pacientes com PRIMS atingem marcos do desenvolvimento motor após a faixa etária esperada, com estudos relatando casos de pacientes que ainda não ficavam em pé sem assistência aos 4 anos de idade (MATTIOLI et al., 2016). Hipotetiza-se que parte dessa questão possa ser resultado de problemas musculares de base vistos em pacientes com PRIMS, incluindo hipotonia, atrofia muscular distal e contraturas musculares (CASERTANO et al., 2017; STELLACCI et al., 2018).

A grande maioria dos pacientes com PRIMS apresenta hipotonia desde o nascimento, afetando diretamente sua capacidade de atingir marcos do desenvolvimento (ALBY et al., 2018; CLEAVER et al., 2019). As atrofias e contraturas musculares, por sua vez, costumam ter início ainda durante a infância e são progressivas, intensificando com o passar dos anos e resultando em maior debilitação ao longo da vida (MELIS et al., 2020). Estudos em modelos celulares mostram que a superexpressão do *ZBTB20* é capaz de promover a proliferação e

diferenciação de células musculares, o que pode explicar a atrofia muscular progressiva vista em indivíduos com PRIMS (ALONSO-MARTIN et al., 2016).

Muitos pacientes apresentam também alterações ósseas e do esqueleto, incluindo problemas de coluna como lordose e escoliose, genu valgo, displasia do quadril e membros e dedos alongados (Figura 6) (FERREIRA et al., 2019; GRÍMSDÓTTIR et al., 2018; MELIS et al., 2020). Alguns relatos de lesões ósseas císticas, diminuição da densidade óssea, displasia epifisária e ossos wormianos também existem na literatura, tanto em adultos quanto em crianças (ARORA et al., 2020; COLLACOTT; O'MALLEY; YOUNG, 1986; MELIS et al., 2020). Devido aos diversos acometimentos ao sistema musculo-esquelético, pacientes devem considerar o uso de serviços de fisioterapia (CASERTANO et al., 2017).

#### *2.2.3.1.5 Calcificações ectópicas*

Como mencionado anteriormente, a síndrome de Primrose é uma síndrome progressiva e sem achados patognomônicos, o que dificulta seu diagnóstico. Grande parte dos achados são extremamente inespecíficos, dificultando o direcionamento clínico a hipóteses diagnósticas e, muitas vezes, retardando o diagnóstico (MELIS et al., 2020). Um dos achados que pode auxiliar na definição diagnóstica da síndrome de Primrose, no entanto, é o aparecimento de calcificações ectópicas, que normalmente aparecem após a segunda década de vida e acometem o pavilhão auricular e os núcleos da base no cérebro (GRÍMSDÓTTIR et al., 2018; STELLACCI et al., 2018).

A calcificação do pavilhão auricular é a mais fácil de ser identificada e, apesar de não promover nenhuma mudança visível, pode causar dor e incômodo local em pacientes afetados devido à rigidez causada na região previamente formada por cartilagem (CARVALHO; SPECK-MARTINS, 2011; COLLACOTT; O'MALLEY; YOUNG, 1986; CORDEDDU et al., 2014; POSMYK et al., 2011). Apesar da calcificação auricular ocorrer em algumas outras condições genéticas, metabólicas e ambientais, sua detecção é um bom indicador clínico de diagnóstico de PRIMS, principalmente quando atrelada a outros achados da doença (CARVALHO; SPECK-MARTINS, 2011). Esse achado pode estar relacionado à função do ZBTB20 de promotor da ossificação endocondral, processo que ocorre na maior parte do esqueleto onde a matriz cartilaginosa é utilizada como molde durante o processo de

calcificação, mas mais estudos serão necessários para elucidar a sua relação com a calcificação auricular (ZHOU et al., 2015).

De maneira similar às calcificações que acometem o pavilhão auricular, as calcificações cerebrais não causam mudanças visíveis no corpo dos pacientes, sendo identificadas apenas através de exames de imagem como RMN ou TC. Ocorrendo também em outras condições genéticas, como CCFP e síndrome de Aicardi-Goutiérres, as calcificações cerebrais não parecem ser reponsáveis pelo aparecimento de sinais ou sintomas específicos, sendo consideradas apenas mais um achado dessas condições. Esse tipo de calcificação já foi relatada em diversos pacientes com PRIMS, afetando principalmente o núcleo caudado, putamen e globo pálido (Figura 1C, Figura 2) (BATTISTI et al., 2002; FERREIRA et al., 2019; POSMYK et al., 2011).

#### *2.2.3.1.6 Perfil bioquímico*

Estudos recentes sugerem que a grande variedade de sintomas vistos em pacientes com PRIMS sejam resultado de algum distúrbio metabólico, o que também poderia explicar o caráter progressivo de alguns destes achados (CASERTANO et al., 2017). Bioquimicamente, alguns achados que embasam essa possibilidade são a de que pacientes com PRIMS podem apresentar distúrbios que afetam o metabolismo da glicose, níveis elevados de AFP e anemia, que afetam cerca de 32%, 24% e 50% do total de pacientes, respectivamente (MELIS et al., 2020). Avaliações desses parâmetros não foram, porém, realizadas em todos os relatos de caso de PRIMS, de modo que a frequência desses achados pode ser subestimada.

A alteração no metabolismo da glicose é um dos achados bioquímicos mais característicos de PRIMS, principalmente em pacientes adultos (CLEAVER et al., 2019; CORDEDDU et al., 2014). Isso ocorre porque, assim como as calcificações ectópicas e atrofia muscular, as alterações no metabolismo da glicose são progressivas, sendo mais prevalentes em pacientes adultos do que em crianças e normalmente evoluindo para quadros de diabetes tipo II (MELIS et al., 2020). Esse achado pode estar relacionado à função do ZBTB20 sobre a função de células beta do pâncreas e regulação do metabolismo da glicose (CASERTANO et al., 2017; SUTHERLAND et al., 2009).

Cerca de metade dos pacientes com PRIMS apresenta ainda elevação dos níveis séricos de AFP, achado consistente com os resultados de estudos em modelos animais sobre o papel do ZBTB20 na repressão do AFP (MELIS et al., 2020; XIE et al., 2008). Os níveis elevados de AFP já foram relacionados ao crescimento elevado e a casos de neoplasia testicular visto em alguns dos pacientes com PRIMS, mas mais evidências são necessárias para confirmar esses achados (CASERTANO et al., 2017; CORDEDDU et al., 2014).

Quadros de anemia, apesar de menos frequentes do que distúrbios do metabolismo da glicose e elevação da AFP, também já foram relatados em alguns pacientes (CORDEDDU et al., 2014; MATHIJSEN; VAN HASSELT-VAN DER VELDE; HENNEKAM, 2006; MELIS et al., 2020). Outras alterações bioquímicas menos frequentes relatadas em pacientes com PRIMS incluem dislipidemia, hiperuricemia, testosterona baixa, LH e FSH elevados, hipotireoidismo e deficiência de IgG2 (CARVALHO; SPECK-MARTINS, 2011; MATHIJSEN; VAN HASSELT-VAN DER VELDE; HENNEKAM, 2006; MATTIOLI et al., 2016; POSMYK et al., 2011; YAMAMOTO-SHIMOJIMA et al., 2019).

#### *2.2.3.1.7 Outros achados*

Cerca de 83% dos pacientes diagnosticados com PRIMS apresentam deficiência auditiva, em geral do tipo sensorineural e variando de leve à severa (CLEAVER et al., 2019; MELIS et al., 2020). Muitas vezes diagnosticada ainda na infância, a deficiência auditiva é um dos primeiros sinais relatados em muitos pacientes, normalmente em paralelo às observações de quadros de macrocefalia, hipotonia e atraso global do desenvolvimento (CASERTANO et al., 2017; MATTIOLI et al., 2016). Estudos afirmam que as causas de deficiência auditiva sensorineural são mais facilmente determinadas em crianças de até um ano, e que deficiências auditivas bilaterais geralmente possuem origem genética (VAN BEECK CALKOEN et al., 2019). Diversos relatos de caso de PRIMS mostram, entretanto, que otites recorrentes são uma queixa comum em parte dos pacientes, de modo que a origem da deficiência auditiva vista especificamente nesses pacientes ainda é discutida (CARVALHO; SPECK-MARTINS, 2011; POSMYK et al., 2011; YAMAMOTO-SHIMOJIMA et al., 2019).

Outro achado importante associado a PRIMS são anomalias do corpo caloso (ACC), seja na forma de hipoplasia ou agenesia (CLEAVER et al., 2019; YAMAMOTO-SHIMOJIMA et al., 2019). Associado regularmente a casos de autismo e deficiência intelectual, esses tipos de anomalias estruturais do corpo caloso afetam 44% dos pacientes de PRIMS e representam o principal tipo de anomalia cerebral associada a quadros de atrasos no neurodesenvolvimento (ALBY et al., 2018; MELIS et al., 2020). Evidências sugerem que pacientes com PRIMS apresentam um alto nível de ACCs devido à diminuição da formação de neurônios neocorticais de camadas superiores causada pela ausência do ZBTB20, reduzindo assim o número de projeções contralaterais que formam o corpo caloso (ALBY et al., 2018).

Até o momento, dois relatos de caso também descreveram alacrima em pacientes com PRIMS (FERREIRA et al., 2019; MELIS et al., 2020). É possível que esse achado também seja subnotificado, já que poucos autores fazem referência ao mesmo em relatos de caso (MELIS et al., 2020). Outros achados clínicos não muito comuns incluem outras alterações oftalmológicas, como hipermetropia, astigmatismo, glaucoma e catarata, micropênis, constipação e unhas hipoplásicas (CASERTANO et al., 2017; CORDEDDU et al., 2014; MELIS et al., 2020).

#### 2.2.3.2 Causa e Diagnóstico

A síndrome de Primrose é causada por variantes no gene *ZBTB20* (*zinc finger and BTB domain containing 20*), em sua grande maioria *missense* e *de novo*. O gene foi relacionado à síndrome de Primrose pela primeira vez em 2014, através de um estudo que realizou o sequenciamento completo do exoma (WES, do inglês *whole exome sequencing*) em oito pacientes previamente diagnosticados clinicamente com PRIMS (CORDEDDU et al., 2014). Nesse estudo, variantes *missense* no *ZBTB20* foram identificadas em todos os pacientes triados, indicando assim a relação de causa entre essas variantes e o fenótipo observado. Desde então, casos de 47 pacientes foram relatados em 18 estudos na literatura médica onde triagens genéticas determinaram a presença de variantes no *ZBTB20* junto à ocorrência dos sintomas associados à síndrome, confirmando o diagnóstico desses pacientes (HERSH et al., 2015; MELIS et al., 2020).

Até o momento, a grande maioria dos relatos da síndrome confirmam que as variantes encontradas nos pacientes são *de novo* e, portanto, estão ausentes nas

células somáticas dos genitores (ALBY et al., 2018; CLEAVER et al., 2019). É importante ressaltar, entretanto, que o estudo de trios não foi realizado em todos os casos, de modo que ainda existe a possibilidade de que alguns pacientes tenham herdado tais variantes de seus pais (CORDEDDU et al., 2014; FERREIRA et al., 2019).

O diagnóstico da síndrome de Primrose deve se basear, portanto, na análise conjunta de informações clínicas e genéticas sempre que possível. Idealmente, informações clínicas ou genéticas não devem ser usadas isoladamente para determinação do quadro de pacientes principalmente dado que alguns sinais e sintomas de PRIMS são altamente inespecíficos, como DI, macrocefalia e atrofia muscular (CORDEDDU et al., 2014). Além disso, o caso de uma paciente portadora de variante *missense* no *ZBTB20* mas sem sinais e sintomas de PRIMS já foi brevemente reportado, mostrando que a presença da variante nem sempre é suficiente para a definição diagnóstica (MELIS et al., 2020).

De maneira geral, os principais achados clínicos sugestivos de um quadro de PRIMS incluem DI, geralmente de moderada a severa, acompanhada de atraso global no desenvolvimento, dismorfia facial, deficiência auditiva, calcificação do pavilhão auricular, hipotonia e atrofia muscular distal (CLEAVER et al., 2019). Já que alguns desses sinais estão presentes mais frequentemente em adultos do que em crianças, o diagnóstico precoce baseado apenas em aspectos clínicos é dificultado, reforçando a necessidade de realização de triagem genética para variantes no *ZBTB20* (MELIS et al., 2020).

Geneticamente, a identificação de variantes no gene *ZBTB20* através de WES, sequenciamento de Sanger, SNP arrays ou painéis é um forte indicativo da síndrome de Primrose (FERREIRA et al., 2019). A maioria das variantes associadas a PRIMS até o momento são do tipo *missense*, onde a troca de uma base nitrogenada do DNA causa mudança no aminoácido, mas relatos de variantes do tipo *frameshift* também existem (MELIS et al., 2020). Todas as variantes relatadas até o momento afetam os domínios ZNF do *ZBTB20*, apenas um caso foi confirmado como mosaïcismo e evidências de uma relação genótipo-fenótipo ainda não existem (ALBY et al., 2018; CLEAVER et al., 2019).

Na ausência de acesso à triagem genética, o diagnóstico diferencial da síndrome de Primrose se torna extremamente importante. É necessário diferenciar o quadro de PRIMS de outros quadros que causam DI, atraso global no

desenvolvimento, TEA e distrofia muscular para garantir que o paciente receba o acompanhamento adequado ao longo da vida (MELIS et al., 2020). Além disso, a determinação do diagnóstico de PRIMS pode ser valioso para garantir o encaminhamento de pacientes a serviços como terapia ocupacional, fonoaudiologia e fisioterapia, que tem o potencial de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (CASERTANO et al., 2017; DALAL et al., 2010).

Uma outra síndrome genética com apresentação clínica extremamente semelhante à síndrome de Primrose é a síndrome da microdeleção 3q13.31, causada por deleções de tamanhos variados no cromossomo 3 (MOLIN et al., 2012). Apesar de variarem em tamanho e localização, a maior parte das deleções engloba ao menos 5 genes em comum, sendo eles o *DRD3*, *ZNF80*, *TIGIT*, *MIR568* e *ZBTB20* (HERVÉ et al., 2016). Achados em comum entre PRIMS e a síndrome da microdeleção incluem DI, atraso global do desenvolvimento, crescimento exacerbado, malformações ósseas e alterações comportamentais (JUVEN et al., 2020). Ademais, algumas características físicas também se sobrepõem, como macrocefalia, testa proeminente, fissuras palpebrais oblíquas, ptose e orelhas proeminentes. Características observadas apenas em pacientes com PRIMS incluem atrofia muscular distal, contraturas musculares, otite recorrente e calcificações ectópicas (JUVEN et al., 2020; YAMAMOTO-SHIMOJIMA et al., 2019). Além disso, relatos de deficiência auditiva, ACCs, diabetes e hipotireoidismo também são mais frequentes em pacientes com PRIMS (JUVEN et al., 2020).

### 2.3 BASES GENÉTICAS DAS CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS

Devido às já identificadas doenças genéticas associadas às calcificações cerebrais, estudos tentam entender o papel dos genes envolvidos na etiopatogênese dessas lesões. Tendo em vista a maior prevalência da CCFP quando comparada a outros quadros primários de calcificação cerebral, além do fato de que as calcificações são o principal achado desta doença, os genes envolvidos nesta condição são, até o momento, os mais densamente estudados quanto aos seus potenciais de provocar esse tipo de lesão (TADIC et al., 2015).

De maneira geral, estudos mostram que apesar de variarem em localização, densidade e quantidade, os nódulos de calcificação formados por genes relacionados à CCFP possuem as mesmas configurações, estruturas e composições

(NAHAR, 2019). Os nódulos de calcificação ocorrem também de maneira intracelular, através da deposição sequencial de matéria orgânica, e sempre na vizinhança de vasos sanguíneos (JENSEN et al., 2018; NAHAR, 2019). Além disso, novas evidências apontam fortemente para o envolvimento de astrócitos na formação desses depósitos, informação importante para o direcionamento de futuros estudos sobre a formação desse tipo de calcificação em diversas doenças (JENSEN et al., 2018; NAHAR, 2019; ZARB et al., 2019).

### **2.3.1 Transportadores de fosfato - SLC20A2 e XPR1**

O *SLC20A2*, gene mais comumente afetado na CCFP e que codifica um transportador de fosfato inorgânico, é um dos genes mais estudados em relação à formação das calcificações cerebrais (GUO et al., 2019; RAMOS et al., 2017). Camundongos *knockout* para esse gene apresentam nódulos cerebrais calcificados já às 8 semanas de vida, localizados principalmente no citosol de pericitos e astrócitos próximos a vasos sanguíneos (JENSEN et al., 2018). Os estudos mostraram ainda que esses nódulos aumentaram em número e tamanho à medida que os animais envelheceram, semelhante ao relatado em pacientes diagnosticados com CCFP (FERREIRA; DE OLIVEIRA, 2019; JENSEN et al., 2018).

Já o *XPR1*, que também é ligado à CCFP e codifica um transportador de fosfato, é menos estudado do que o *SLC20A2*, de modo que menos dados existem sobre seu envolvimento na formação de calcificações ectópicas. Estudos mostram, entretanto, que sua disfunção pode levar ao acúmulo de fosfato no citosol, possivelmente facilitando a formação das calcificações intracelulares relatadas em outros estudos, e que esse gene pode ser ligado a diversas doenças neurodegenerativas (ANHEIM et al., 2016; JENSEN et al., 2018; LEGATI et al., 2015; MOURA; OLIVEIRA, 2015).

### **2.3.2 Pericitos e barreira hematoencefálica - PDGFB e PDGFRB**

Outros genes envolvidos na CCFP são o *PDGFB* e o *PDGFRB*, de modo que eles também são frequentemente estudados em relação aos seus papéis na formação de calcificações cerebrais. Por serem, respectivamente, ligante e receptor, as funções do *PDGFB* e *PDGFRB* estão fortemente ligadas e costumam ser estudadas em conjunto, enquanto via de sinalização (ZARB; FRANZOSO; KELLER,

2019). Ambos os genes são expressos em diversos tipos celulares cerebrais, mas suas funções ainda não foram bem esclarecidas em todos eles (ZARB; FRANZOSO; KELLER, 2019).

Estudos com modelos animais mostram que a perda de função do *PDGFB* leva à redução da cobertura de pericitos na barreira hematoencefálica (BHE), sugerindo uma possível relação dessas lesões com um aumento de permeabilidade da barreira (NAHAR, 2019). Uma sobreposição dos dados de estudos recentes mostra, entretanto, que regiões comumente afetadas por calcificações em pacientes com CCFP são aquelas com maior cobertura de pericitos em modelos animais desta doença, um achado paradoxal que indica que outros fatores estão envolvidos no desenvolvimento dessas lesões (MOURA; LEMOS; OLIVEIRA, 2017).

Curiosamente, marcadores de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos foram detectados em calcificações cerebrais de camundongos *Pdgfb<sup>ret/ret</sup>*, indicando a possível presença destas células em regiões cerebrais calcificadas (SCHIEMENZ et al., 2019; ZARB et al., 2019). A presença de astrócitos reativos e micróglia nas vizinhanças dessas lesões também foi relatada pela primeira vez nesse modelo animal de CCFP, sugerindo o possível envolvimento dessas células e do estresse oxidativo na formação das calcificações (ZARB et al., 2019). De maneira geral, entretanto, as calcificações visualizadas nesses modelos animais apresentaram aspecto laminar, indicando que a formação do depósito calcificado ocorre de maneira sequencial, de dentro para fora - fato também observado em camundongos *Slc20a2<sup>-/-</sup>* (JENSEN et al., 2018; NAHAR, 2019).

### 2.3.3 Unidade Neurovascular - MYORG e JAM2

O *MYORG* e o *JAM2*, por serem os genes mais recentemente associados à CCFP, possuem menos estudos explorando suas funções na formação de calcificações ectópicas (SCHOTTTLAENDER et al., 2020; YAO et al., 2018). Estudos sobre o *MYORG*, entretanto, são mais numerosos do que estudos sobre o *JAM2*, e modelos animais *knockout* para esse gene confirmam que mutações de perda de função no mesmo levam à formação de calcificações cerebrais (YAO et al., 2018). Estudos indicam ainda que as calcificações causadas por variantes no *MYORG* aparecem mais tardiamente do que aquelas vistas em modelos dos genes *SLC20A2* e *PDGFB* (YAO et al., 2018). A composição dos nódulos detectados, entretanto, foi

rica em fosfato de cálcio, similar ao relatado em outros modelos animais (JENSEN et al., 2018; NAHAR, 2019; YAO et al., 2018).

O *MYORG* codifica uma proteína transmembrana com possível função de glicosidase localizada, principalmente, no retículo endoplasmático de astrócitos (BAUER et al., 2019). Apesar de ainda não bem definido, é possível que a atividade de glicosidase do *MYORG* module a atividade de canais iônicos, o que pode estar relacionado ao seu papel na formação das calcificações cerebrais (BAUER et al., 2019). Estudos de expressão afirmam ainda que o *MYORG* é fortemente expresso nos núcleos da base e nos tálamos, indicando uma correlação entre as regiões de maior expressão deste gene e as regiões cerebrais mais comumente afetadas por calcificações em pacientes com MYORG-CCFP (CHELBAN et al., 2020; YAO et al., 2018). Por fim, estudos recentes indicam ainda que o *MYORG* possa se assemelhar a outros genes ligados à CCFP, como o *SLC20A2* e o *PDGFB*, por causar calcificações disseminadas nas placentas de pacientes, mas mais estudos são necessários para esclarecer como esses genes interagem (SARANZA et al., 2020). Combinando esse achado ao fato de que o *MYORG* é fortemente expresso em astrócitos, células que fazem parte da unidade neurovascular (*neurovascular unit*, NVU), sugere-se que essa possa ser a via pela qual variantes nesse gene levam ao desenvolvimento de calcificações cerebrais (SARANZA et al., 2020).

Assim como o *MYORG*, o *JAM2* causa CCFP de maneira autossômica recessiva, de modo que poucos relatos de caso envolvendo esse gene estão presentes na literatura (CEN et al., 2019). Até o momento, entretanto, nenhum estudo específico sobre o papel deste gene na formação das calcificações cerebrais foi publicado, já que este é o gene cuja relação à CCFP foi identificada mais recentemente (SCHOTTTLAENDER et al., 2020).

Como mencionado anteriormente, o *JAM2* codifica uma proteína essencial para a formação de zonas de oclusão, apresentado elevada expressão em astrócitos e células endoteliais (CEN et al., 2019). Devido à sua função e localização na membrana plasmática, estudos sugerem que o *JAM2* possua papel importante na manutenção das adesões célula-célula e, conseqüentemente, na funcionalidade na NVU (CEN et al., 2019; SCHOTTTLAENDER et al., 2020). Desse modo, a NVU como um todo parece estar envolvida no desenvolvimento das calcificações cerebrais, de modo que atenção deve ser dada não só à BHE mas também a astrócitos e células endoteliais (MARINHO; DE OLIVEIRA, 2021).

## 2.4 OUTROS GENES CANDIDATOS

### 2.4.1 FAM20C

O gene *FAM20C*, também chamado de *DMP4*, foi identificado pela primeira vez em células hematopoiéticas mas é expresso por diversos tecidos, como fígado, rins e pulmões (DU et al., 2015). A proteína FAM20C codificada por esse gene tem função quinase, se localiza primariamente no complexo de golgi, e tem expressão fortemente marcada em tecidos mineralizados, como ossos e dentes (ISHIKAWA et al., 2012; WANG et al., 2015). Variantes que afetam o *FAM20C* fazem com que sua proteína sofra redução em sua função quinase, síntese, e secreção, consequentemente comprometendo a capacidade dessa proteína exercer suas funções fisiológicas (ISHIKAWA et al., 2012; WANG et al., 2012b).

Até 2020, nenhum estudo avaliou as funções do *FAM20C*, gene relacionado à síndrome de Raine, na formação de calcificações ectópicas ou cerebrais. O *FAM20C* tem, contudo, participação ativa em processos de biomineralização fisiológica, o que pode estar relacionado a um possível envolvimento do mesmo na formação de calcificações ectópicas (ISHIKAWA et al., 2012).

#### 2.4.1.1 Funções

A principal função da proteína FAM20C é a de participação no processo de biomineralização fisiológica, estando envolvida na osteogênese e odontogênese desde o período embrionário em modelos murinos (WANG et al., 2010). Desse modo, o FAM20C tem a função de promover a diferenciação e mineralização de osteoblastos, osteócitos, odontoblastos e ameloblastos, o que reflete diretamente nos processos de formação óssea e dentária (DU et al., 2015)

Animais *knockout* para esse gene mostraram que a ausência dessa proteína leva ao desenvolvimento de ossos longos pouco mineralizados e doença periodontal, o que também é visto em pacientes com variantes nesse gene (LIU et al., 2014, 2017b). A regulação desses processos pelo FAM20C parece ocorrer através do FGF-23, onde a deleção do *FAM20C* leva ao aumento do FGF-23 e, consequentemente, a quadros de hipofosfatemia em modelos animais (DU et al., 2015; KINOSHITA et al., 2014). Pouco se sabe, entretanto, sobre os mecanismos de

regulação capazes de controlar a expressão do *FAM20C* em si (WANG et al., 2012b).

Apesar de sua importante função na biomineralização, estudos sugerem que o *FAM20C* possua outras funções pelo fato de que ele é expresso em organismos que não possuem tecidos mineralizados (SREELATHA; KINCH; TAGLIABRACCI, 2015). Tais funções, entretanto, ainda não foram bem descritas ou esclarecidas.

Um dos poucos estudos que avalia o *FAM20C* independente da biomineralização indica que esse gene parece estar fortemente relacionado à progressão maligna de gliomas (DU et al., 2020). Esse estudo mostra que uma maior expressão do *FAM20C* em gliomas está ligada a uma maior infiltração de monócitos e macrófagos no microambiente tumoral, fato que está associado a maior risco de metástase e, conseqüentemente, prognóstico negativo. Os achados desse estudo sugerem que o *FAM20C* possa ter função importante na regulação de adesão celular e que ele seja um potencial alvo terapêutico para casos de glioma, mas mais estudos ainda são necessários para elucidar esses mecanismos de ação (DU et al., 2020).

Desse modo, e baseado tanto na clínica de pacientes quanto em suas funções biológicas, o *FAM20C* aparece como potencial gene candidato para futuros estudos focados na etiopatogênese de calcificações ectópicas. Caso o mesmo esteja de fato envolvido no processo de formação dessas calcificações, informações sobre esse gene, seus alvos e suas vias de sinalização podem ser úteis não só no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a síndrome de Raine, mas também para outras doenças que estejam relacionadas a formação de calcificações ectópicas como um todo.

#### **2.4.2 ZBTB20**

O *ZBTB20*, também chamado de *DPZF*, *HOF* e *ZNF288*, se localiza no braço longo do cromossomo 3 (3q13.2) e codifica uma proteína do tipo *zinc finger* que atua como repressora transcricional, regulando a transcrição de diversos genes (XIE et al., 2008). Identificado inicialmente em células dendríticas, o *ZBTB20* possui 25 éxons, é conservado em diversos organismos e apresenta expressão elevada em vários órgãos, particularmente nos rins, cérebro, fígado e outros tecidos hematopoiéticos (NCBI, 2020; XIE et al., 2008, 2010; ZHANG et al., 2001).

A proteína ZBTB20, que possui duas isoformas geradas através do splicing alternativo, com 741 (81kD) ou 668 (73kD) aminoácidos cada, se localiza primordialmente nos núcleos celulares em células de mamíferos (KOUL, 2014). Ambas as isoformas possuem um domínio *Broad complex*, *Tramtrack*, e *Bric-à-brac* (BTB) bem conservado na região N-terminal, que é hidrofóbico e tem função importante na dimerização da proteína em homo ou heterodímeros (KOUL, 2014; NCBI, 2020). Além do domínio BTB, o ZBTB20 possui ainda 5 domínios Cys2His2 (C2H2) *zinc finger* (ZNF) na região C-terminal que são essenciais para sua ligação ao DNA (Figura 7) (KOUL, 2014; MITCHELMORE et al., 2002).

Figura 7 – Isoforma longa do ZBTB20 (741 aminoácidos, NP\_001157814.1), destacando o domínio BTB na região N-terminal e os 5 domínios ZNF na região C-terminal. A isoforma curta (NP\_056457.3), gerada através de splicing alternativo, contém 668 aminoácidos e é igual à isoforma longa, com a exceção da seção em rosa na região N-terminal.



Fonte: A autora, baseado em (KOUL, 2014). Criado com Biorender.com.

O domínio C2H2 do tipo ZNF presente no ZBTB20 é de especial importância devido à sua capacidade em se ligar diretamente ao DNA e, conseqüentemente, modular a expressão de genes alvo. Esse domínio define ainda a maior família de repressores transcricionais conhecida em humanos, sendo caracterizada pela formação de duas folha-beta e uma alfa-hélice na presença de íons zinco (KHAN et al., 2019; RAZIN et al., 2012). Além de sua função de ligação ao DNA de maneira sequência-específica mencionada acima, essas estruturas podem ainda atuar promovendo interações proteína-proteína ou RNA-proteína, de modo que diversas proteínas dessa classe já foram implicadas em processos patológicos relacionados a transtornos do desenvolvimento (RAZIN et al., 2012). Estudos recentes mostram que cerca de 10% de todas as proteínas do tipo C2H2-ZNF são essenciais para o desenvolvimento cerebral, reforçando a possibilidade de que proteínas como o ZBTB20 estejam envolvidas nesses mesmos processos (AL-NAAMA; MACKEH; KINO, 2020).

#### 2.4.2.1 Funções

Como mencionado anteriormente, a principal função do ZBTB20 é a de atuar como repressor transcricional, o que de maneira geral ocorre através da ligação de seus domínios ZNF aos promotores de genes alvo (XIE et al., 2008). Vários estudos já avaliaram e relataram a função dessa proteína em diversos processos celulares, incluindo a lipogênese, miogênese, metabolismo da glicose, diferenciação de células plasmáticas e formação do sistema nervoso central (SNC). Os efeitos do ZBTB20 sobre diversos genes e processos celulares serão descritos em mais detalhes abaixo.

O ZBTB20 parece ter forte atuação no processo de proliferação de células hepáticas, de modo que a alfafetoproteína (AFP), proteína importante no desenvolvimento fetal e que apresenta redução da sua expressão no período pós-natal, é um de seus alvos (PETERSON; MA; SPEAR, 2011). Estudos mostram que a redução pós-natal da expressão do *AFP* provavelmente se dá devido à ação do ZBTB20, que tem expressão elevada no fígado e se liga de maneira sequência-específica ao promotor do *AFP* em hepatócitos (XIE et al., 2008; ZHANG et al., 2015). Outros estudos sugerem ainda que essa repressão aconteça através de uma via composta pelo microRNA122, CUX1 e microRNA214, de modo que mais estudos serão necessários para esclarecer o modo pelo qual o ZBTB20 afeta a expressão do *AFP* (KOJIMA et al., 2011).

Outro gene com importante função hepática que tem a expressão dependente do ZBTB20 é o receptor do fator de crescimento endotelial (*Endothelial growth factor receptor*, EGFR), proteína essencial no desencadeamento do processo de regeneração hepática. Estudos mostram que camundongos com deleção específica do *ZBTB20* em hepatócitos tem menor expressão de EGFR, resultando em diminuição da ativação do processo de regeneração hepática (ZHANG et al., 2018). De maneira oposta, o *FoxO1* apresenta expressão inversamente proporcional à do *ZBTB20* em amostras de carcinoma hepatocelular, sugerindo que o ZBTB20 é ao menos parcialmente responsável pela elevada proliferação celular vista em processos carcinogênicos nesse órgão (KAN et al., 2016). Desse modo, o ZBTB20 parece influenciar a proliferação celular hepática tanto em processos fisiológicos quanto patológicos (LI; MA; XU, 2020).

Outro processo hepático impactado pelo ZBTB20 é o da lipogênese *de novo*, que ocorre através da conversão de carboidratos em triglicerídeos que são posteriormente secretados no plasma em forma de lipoproteína de densidade muito baixa (*Very low density lipoprotein*, VLDL) (LIU et al., 2017a). Camundongos com deleção do *ZBTB20* em hepatócitos apresentam hipolipidemia devido à diminuição da síntese de triglicerídeos e, consequentemente, secreção de VLDL (LI; MA; XU, 2020). Tal efeito ocorre porque o ZBTB20 é essencial para promover a transcrição do *ChREBP-a*, um dos principais fatores envolvidos na lipogênese hepática. Desse modo, a ausência da ação do ZBTB20 afeta diretamente o processo de lipogênese *de novo* (LIU et al., 2017a). Levando os dados acima em consideração percebe-se que o ZBTB20 tem importante papel na manutenção hepática, com uma pluralidade de efeitos relativos à regeneração tecidual, lipogênese e processos patológicos.

O metabolismo da glicose é outro processo afetado pelo ZBTB20, de modo que estudos com modelos animais mostram que camundongos *knockout* para o gene em questão apresentam hipoglicemia quando comparados a animais controle (SUTHERLAND et al., 2009). Curiosamente, o estudo determinou que os camundongos analisados apresentaram hipoglicemia como consequência do aumento da tolerância à glicose, causada pelo aumento de sensibilidade à insulina (SUTHERLAND et al., 2009). Tal efeito parece ocorrer devido à ausência do ZBTB20 em células  $\beta$  do pâncreas, onde o ZBTB20 atuaria inibindo a transcrição do gene *Fbp1* e seu papel de promover maior secreção de insulina (ZHANG et al., 2012). Outros estudos indicam que o *knockout* do *ZBTB20* especificamente em hepatócitos não afeta a tolerância à glicose ou à insulina, sugerindo que o fenótipo descrito acima ocorre devido à carência do ZBTB20 em tecidos extra-hepáticos e reforçando a importância dessa proteína em tecidos pancreáticos (LIU et al., 2017a).

O ZBTB20 afeta ainda o sistema imune, mais especificamente a diferenciação e a sobrevivência de plasmócitos, processos de extrema importância para a manutenção da imunidade humoral (CHEVRIER et al., 2014; LIGHTMAN; UTLEY; LEE, 2019; ZHU et al., 2018). Estudos sugerem que o aumento da expressão do *ZBTB20* é um dos mecanismos através do qual a longa sobrevivência dos plasmócitos é mantida, enquanto outras proteínas da família ZBTB participam em processos paralelos como diferenciação e duração da resposta humoral (WONG, 2019; ZHU et al., 2018).

Além do seu papel relacionado à sobrevivência de plasmócitos, estudos mostram que o ZBTB20 é essencial na manutenção da resposta imune inata mediada por *toll*-

*like receptors* (TLRs) (LIU et al., 2013). A ausência do ZBTB20 em células mielóides de camundongos provocou diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias e interferon tipo I por parte de macrófagos, resposta que seria naturalmente desencadeada a partir da ativação de TLRs. Levando essas e outras evidências em consideração, pesquisadores concluíram que o ZBTB20 atua reprimindo a transcrição do I $\kappa$ B $\alpha$ , repressor do TLR, sendo assim essencial para a promoção de uma resposta imune inata adequada frente à quadros infecciosos (LIU et al., 2013). De maneira contrária, um estudo recente indica que a deleção do *ZBTB20* em células T CD8 aumenta a reatividade das mesmas, o que opõe os outros estudos que sugerem que o ZBTB20 é essencial para garantir uma resposta imune apropriada (SUN, 2020). Desse modo, mais evidências e estudos serão necessários para esclarecer o papel do ZBTB20 no sistema imune.

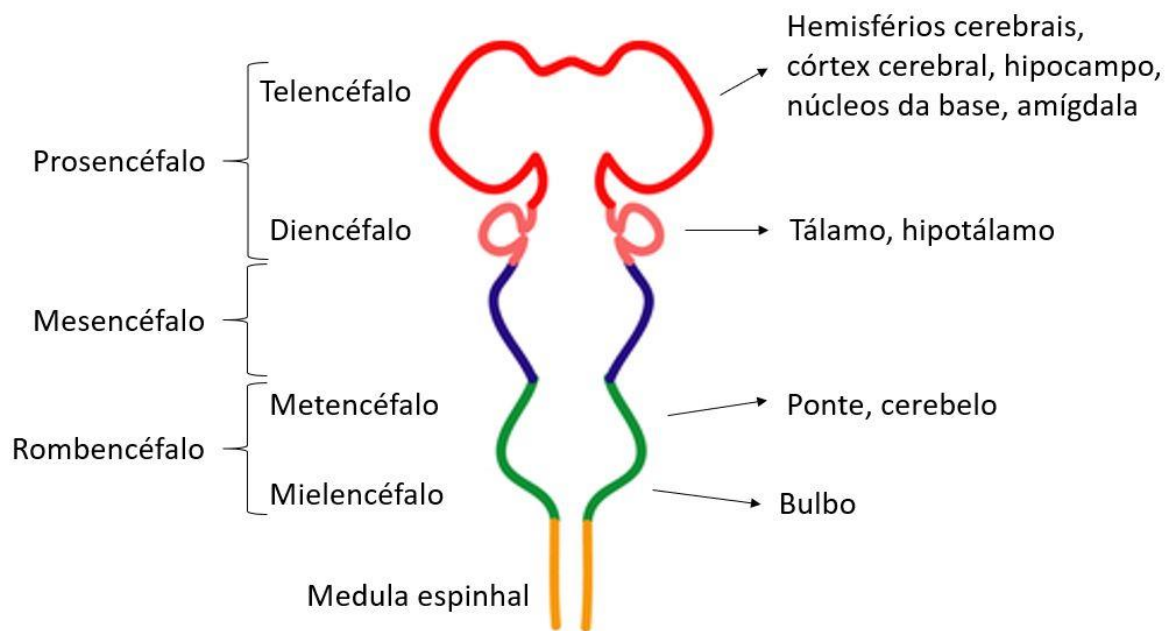
#### 2.4.2.1.1 Sistema Nervoso Central

O papel de repressor transcricional do ZBTB20 também afeta células do sistema nervoso central, de modo que grande parte dos estudos sobre esse gene foca em avaliar como a perda de função do *ZBTB20* afeta neurônios e células da glia. Tais estudos, realizados tanto em modelos animais como em cultivos celulares 2D e 3D, enfatizam que o ZBTB20 tem efeito plural, estando envolvido em diversos processos celulares como neurogênese, astrocitogênese, migração neuronal, formação de axons, dendritos e circuitos neurais (NIELSEN et al., 2014). À vista disso, entender o processo de formação do SNC se faz essencial para compreender o papel do ZBTB20 em cada um desses processos.

O processo de formação no SNC é dinâmico, complexo e altamente dependente de expressões gênicas controladas de maneira espaçotemporal (STILES; JERNIGAN, 2010). A formação do tubo neural, estrutura que marca o início do desenvolvimento do sistema nervoso primitivo, ocorre durante a semana gestacional 3 (*gestational week*, GW) e é diretamente seguida pela proliferação simétrica de neuroprogenitores (*neural progenitor cells*, NPCs) (SILBEREIS et al., 2016). Paralelo à proliferação de NPCs, o tubo neural expande e começa a formar vesículas primárias, chamadas de prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (Figura 8). Essas vesículas se subdividem posteriormente em telencéfalo e diencefalo, no caso do prosencéfalo, e em metencéfalo e mielencéfalo, no caso do

rombencéfalo. O mesencéfalo não forma vesículas secundárias (Figura 8) (SUZUKI et al., 2008). Essas vesículas são formadas entre GW4 e GW7, permitindo a identificação de estruturas primitivas do SNC já ao término do período embrionário (GW8) (Figura 9) (STILES; JERNIGAN, 2010).

Figura 8 – Esquema destacando as vesículas primárias e secundárias (à esquerda) formadas durante o desenvolvimento embrionário do SNC, assim como as estruturas formadas pelas mesmas no SNC maduro (à direita).

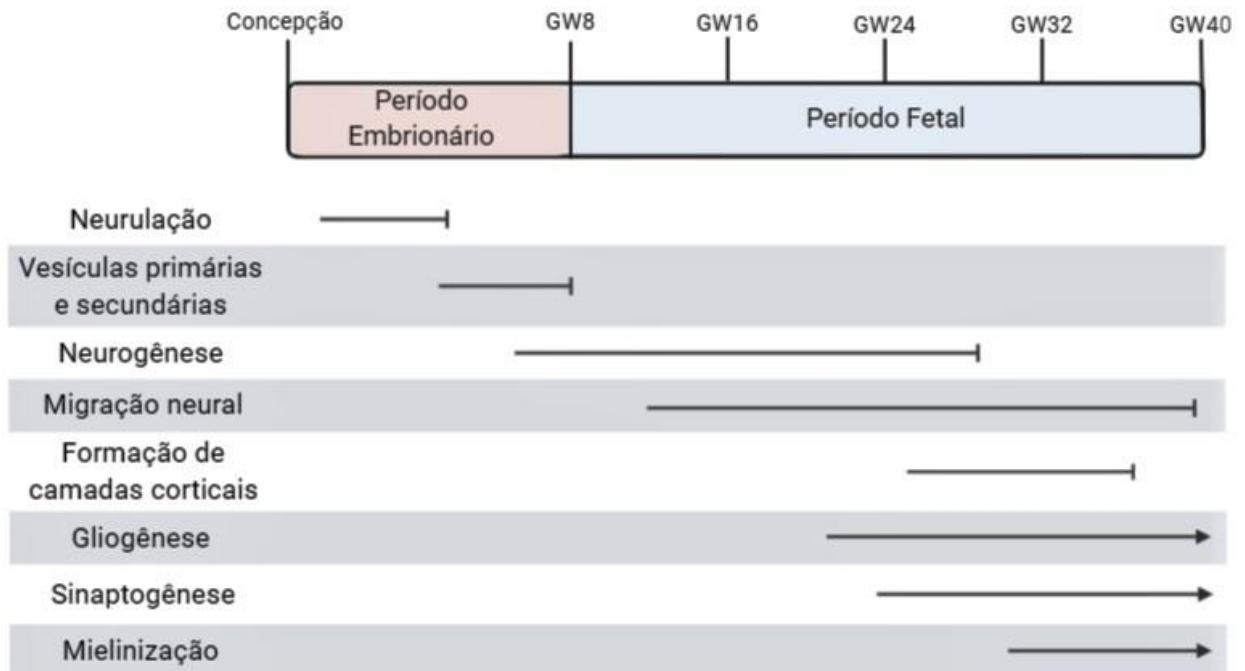


Fonte: A autora, adaptado de (BURNS, 2011).

O telencéfalo é a maior das vesículas secundárias, sendo responsável pela formação de estruturas importantes como os núcleos da base, córtex cerebral e hipocampo (Figura 8) (SAKAGUCHI et al., 2015). Devido à grande quantidade de neurônios presentes nessas estruturas, em especial no neocórtex, o telencéfalo é uma estrutura bastante estudada para o esclarecimento da neurogênese. Como consequência desses estudos, sabe-se que a parte dorsal do telencéfalo é responsável pela produção de neurônios excitatórios, enquanto interneurônios gabaérgicos são produzidos por eminências ganglionárias do telencéfalo ventral e migram posteriormente em direção aos neurônios glutamatérgicos (AGIRMAN; BROIX; NGUYEN, 2017; SARNAT; FLORES-SARNAT, 2013). A neurogênese no telencéfalo humano começa por volta de E42 (GW6), antecedendo a gliogênese, e terminando por volta de GW27 (Figura 9) (DOEPPNER et al., 2018; SILBEREIS et al., 2016). A neurogênese do neocórtex é particularmente interessante, já que

neurônios são formados de maneira sequencial de acordo com sua função e localização.

Figura 9 – Linha do tempo mostrando principais acontecimentos da formação do SNC e do neocórtex. Barras indicam período onde os processos são mais ativos durante o desenvolvimento. Setas indicam que os processos continuam durante o período pós-natal.

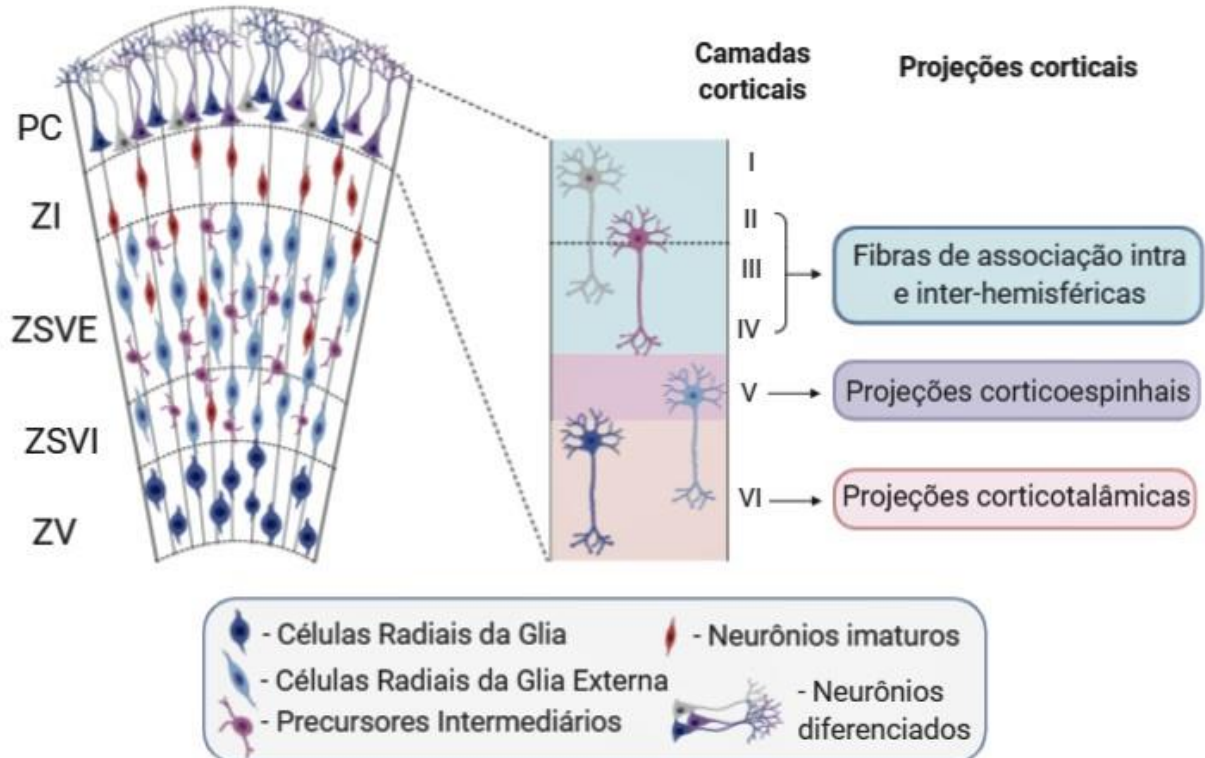


Fonte: A autora, baseado em (SILBEREIS et al., 2016; TAU; PETERSON, 2010). Criado com BioRender.com.

Neurônios neocorticais são formados a partir de células radiais da glia (CRG) derivadas de NPCs e localizadas nas zonas ventricular (ZV) e subventricular (ZSV), de modo que os neurônios gerados nessas regiões migram radialmente até atingir a placa cortical (PC) (Figura 10) (AGIRMAN; BROIX; NGUYEN, 2017). A PC, por sua vez, é formada por seis camadas neuronais que são formadas de maneira sequencial, de dentro para fora, fazendo com que as camadas mais profundas de neurônios sejam formadas antes das camadas superficiais (SARNAT; FLORES-SARNAT, 2013). Além disso, os neurônios possuem funções distintas de acordo com seu momento de formação e seu posicionamento dentre as camadas do neocórtex, onde neurônios das camadas superiores (camadas II-IV) formam fibras de associação intra e inter-hemisféricas, e neurônios de camadas inferiores (camadas V e VI) formam projeções que ligam o córtex a centros subcorticais (Figura 10) (EHSAEI; COLLO; TAYLOR, 2018). A camada I é formada por células

Cajal-Retzius, responsáveis por controlar o posicionamento de neurônios na PC através da expressão controlada de reelina (SARNAT; FLORES-SARNAT, 2013).

Figura 10 – Ilustração da formação sequencial de neurônios neocorticais. Os neurônios são formados por células radiais da glia residentes nas zonas ventricular e subventricular, migrando radialmente em direção à placa cortical. Na placa cortical, por sua vez, os neurônios podem ser distinguidos de acordo com suas camadas e tipos de projeções formados pelos mesmos. PC – Placa cortical; ZI – Zona Intermediária; ZSVE – Zona subventricular externa; ZSVI – Zona subventricular interna; ZV – Zona Ventricular.



Fonte: A autora, baseado em (EHSAEI; COLLO; TAYLOR, 2018; NIELSEN et al., 2014).  
Criado com BioRender.com.

A formação das camadas neuronais da CP depende de uma complexa rede de fatores de transcrição que atuam na determinação das identidades neuronais (NIELSEN et al., 2014; TONCHEV et al., 2016). É importante ressaltar, entretanto, que apenas alguns fatores de transcrição como CoupTF1, Brn2, Ctip2 e ZBTB20 já foram relacionados a esse processo de diferenciação, e que os mesmos não são suficientes para esclarecer o processo como um todo (DOEPPNER et al., 2018). Alguns dos fatores de transcrição envolvidos na determinação de função neural podem ser usados para diferenciar as camadas de neurônios corticais, já que cada grupo neuronal expressa diferentes genes de acordo com as suas funções (EHSAEI; COLLO; TAYLOR, 2018). Como exemplos, as camadas superiores (II-IV) expressam

marcadores como *Cux1*, *Cux2* e *Satb2*, enquanto camadas mais profundas expressam marcadores como *Sox5* (Quadro 2) (NIELSEN et al., 2014; XIE et al., 2010). Além disso, alguns marcadores são específicos de cada camada, como *ROR* para a camada IV, *Ctip2* para a camada V, e *Tbr1* para a camada VI (TONCHEV et al., 2016).

Quadro 2 – Marcadores expressos por neurônios do neocórtex. As camadas corticais às quais os neurônios pertencem podem ser diferenciadas por marcadores de camadas superficiais, camadas profundas, ou marcadores de camadas específicas, como *ROR* para a camada IV, *Ctip2* para a camada V e *Tbr1* para a camada VI.

| Camada Cortical | Genes expressos |             |              |             |              |             | Genes Específicos              |
|-----------------|-----------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------------------------|
|                 | <i>Cux1</i>     | <i>Cux2</i> | <i>Satb2</i> | <i>Brn2</i> | <i>Foxp1</i> | <i>Sox5</i> |                                |
| II              | X               | X           | X            | X           |              |             |                                |
| III             | X               | X           | X            | X           | X            |             |                                |
| IV              | X               | X           | X            |             | X            |             | <i>CoupTF1, ROR</i>            |
| V               |                 |             |              | X           | X            | X           | <i>Ctip2, Fezf2</i>            |
| VI              |                 |             |              |             | X            | X           | <i>Tbr1, Foxp2, Tle4, Zfp2</i> |

Fonte: A autora, baseado em (NIELSEN et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, os neurônios glutamatérgicos do neocórtex formam projeções que podem ser direcionadas a outras partes do córtex ou a estruturas subcorticais (EHSAEI; COLLO; TAYLOR, 2018). De maneira geral, os neurônios de camadas superficiais (II-IV) são responsáveis pela formação de fibras de associação, onde axônios fazem conexões com outras regiões corticais (STANDRING, 2004). Enquanto os neurônios da camada II formam fibras de associação intrahemisféricas, neurônios das camadas III e IV fazem conexões com regiões corticais do hemisfério oposto, recebendo o nome de fibras de associação inter-hemisféricas, projeções axônicas contralaterais ou fibras comissurais (TONCHEV et al., 2016). As fibras comissurais são, portanto, responsáveis pela formação do corpo caloso (ALBY et al., 2018). Os neurônios das camadas V e VI, por sua vez, formam ligações com regiões subcerebrais, sendo chamadas de projeções corticoespinhais e corticotalâmicas, respectivamente (TONCHEV et al., 2016). A formação dessas projeções se inicia pouco após a formação das camadas corticais (STILES; JERNIGAN, 2010).

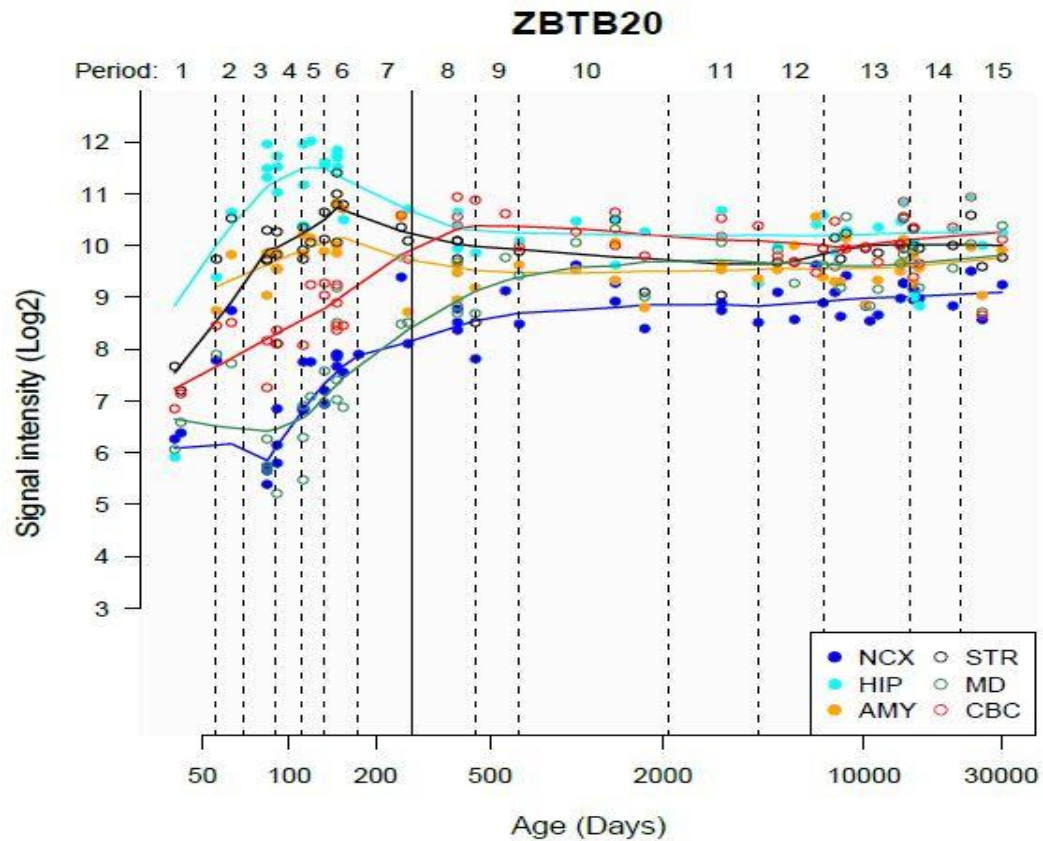
A gliogênese, processo através do qual são formados astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, sucede a neurogênese no neocórtex, tendo início no período perinatal e continuando após nascimento (DOEPPNER et al., 2018; FARHY-TSELNICKER; ALLEN, 2018). Assim como neurônios, células da glia são produzidas a partir de CRGs residentes da ZV, mas ainda não se sabe muito sobre o que provoca a transição de um processo para o outro (RAO; JACOBSON, 2005). Dentre as células da glia, destaque deve ser dado aos astrócitos devido à sua numerosa presença no SNC e às suas diversas funções, incluindo formação da barreira hematoencefálica e de circuitos neurais (AKDEMIR; HUANG; DENEEN, 2020).

Apesar da neurogênese cortical terminar por volta de GW27 e ser predominantemente substituída pela gliogênese, estudos recentes reforçam a ideia de que outras regiões cerebrais mantêm esse processo no período pós-natal (KUHN; TODA; GAGE, 2018). O hipocampo é uma das duas regiões cerebrais onde a neurogênese pós-natal é comprovadamente mantida, sendo um processo importante para aspectos como aprendizado e memória (CAMERON; GLOVER, 2015; JIN, 2016). Neurônios hipocampais gerados no período pós-natal se integram a circuitos neurais pré-existent, recebendo tanto sinais inibitórios quanto excitatórios de neurônios gerados durante o desenvolvimento fetal (LI; MU; GAGE, 2009). Além disso, estudos mostram que a neurogênese hipocampal pós-natal pode ser modulada por estímulos físicos ou mentais, reforçando um potencial alvo terapêutico para processos degenerativos (CAMERON; GLOVER, 2015; JIN, 2016; KUHN; TODA; GAGE, 2018).

A partir de agora, e considerando as informações descritas acima sobre o processo de formação do SNC, o papel do ZBTB20 em cada uma das etapas desse processo pode ser detalhado.

O *ZBTB20* apresenta expressão elevada em diversos tipos celulares do SNC ainda no período fetal, indicando seu potencial papel na modulação de processos como formação de neurônios, células da glia, sinapses e projeções axônicas (Figura 11). Evidências dessas funções são relatadas em diversos estudos que exploram o papel do ZBTB20 no SNC, como visto abaixo.

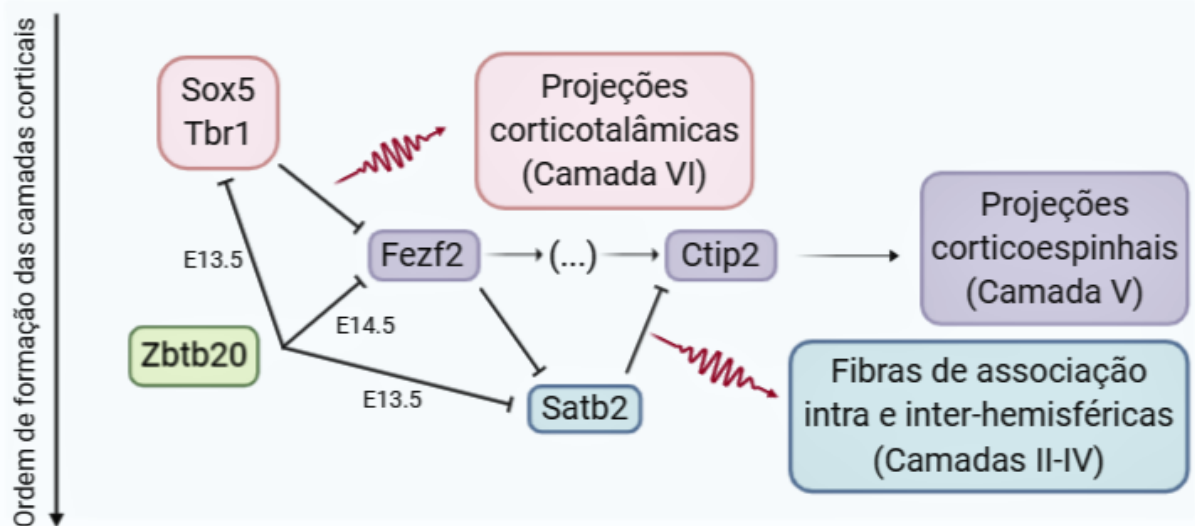
Figura 11 – Expressão dinâmica do gene *ZBTB20* durante o desenvolvimento pré e pós-natal em diversas áreas do cérebro. CBC – Cortex cerebelar. MD – Núcleo mediodorsal do tálamo. STR – Estriado. AMY – Amígdala. HIP – Hipocampo. NCX – Neocórtex.



Fonte: ("Human Brain Transcriptome", [s.d.]; KANG et al., 2011).

Estudos mostram que o *ZBTB20* participa ativamente da formação sequencial dos neurônios corticais ainda na embriogênese (Figura 12), de modo que sua perda de função causa aumento dos neurônios das camadas V e VI em detrimento da formação das camadas II e III (ARAÚJO, 2019; TONCHEV et al., 2016). Esse achado exalta a expressão dinâmica do *ZBTB20* durante a neurogênese cortical, onde a repressão de *CoupTF1* pelo *ZBTB20* em camundongos entre E12.5 e E16.5 parece ser essencial para garantir a formação das camadas superficiais do neocórtex. Além disso, o *ZBTB20* é importante para garantir a diferenciação e migração de neurônios das camadas II e III, estando diretamente relacionado à formação de projeções axônicas contralaterais que formam o corpo caloso (STANDRING, 2004; TONCHEV et al., 2016). De maneira mais específica, estudos mostram que a ausência dessa proteína em progenitores neocorticais resulta na redução da inervação contralateral resultante das projeções axônicas das camadas III e IV, o que acontece em paralelo ao aumento de projeções intra-hemisféricas advindas da camada II (ARAÚJO, 2019).

Figura 12 – Representação esquemática dos mecanismos de ação através dos quais o *ZBTB20* regula a neurogênese neocortical em camundongos. A formação de neurônios residentes da camada VI, formadores de projeções corticotalâmicas, ocorre por volta de E12.5. Em seguida, para possibilitar a formação da camada V em E13.5, o *ZBTB20* atua inibindo *Sox5* e *Tbr1* diretamente, e o *Satb2* indiretamente através do *CoupTF1*. Por fim, a inibição do *Satb2* cessa em E14.5 e é substituída pela inibição do *Fezf2* por parte do *ZBTB20*, possibilitando a expressão do *Satb2* e, conseqüentemente, formação das camadas II-IV.



Fonte: A autora, baseado em (NIELSEN et al., 2014). Criado com BioRender.com.

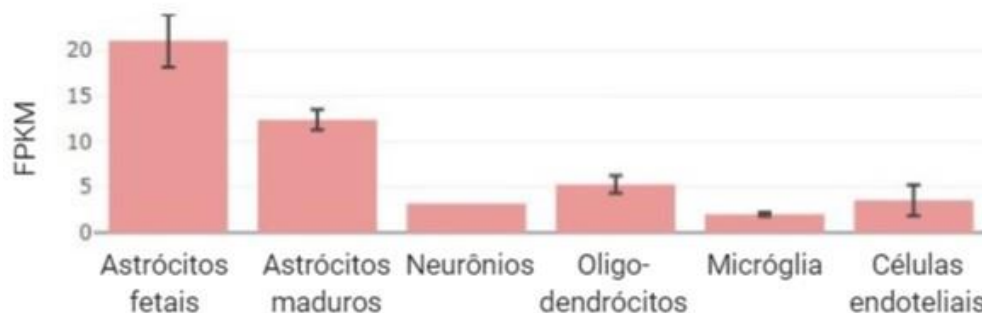
Estudos indicam ainda que o *ZBTB20* é particularmente importante para diferenciação e funcionalidade de neurônios hipocâmpais, afetando diretamente a estrutura do hipocampo. Pesquisadores detectaram que camundongos *Zbtb20*<sup>-/-</sup> tem padrão de expressão gênica alterado no hipocampo, além de um aumento da morte celular dos neurônios da região. Como consequência, esses animais apresentaram hipocâmpos menores quando comparados a camundongos selvagens (XIE et al., 2010). Além de estar relacionado ao aumento da apoptose local, a proteína *ZBTB20* afeta ainda o processo de especificação de neurônios piramidais do tipo CA1 através da repressão de genes ligados a formação de neurônios de camadas profundas, superficiais e de suas projeções, como *Tbr1*, *Sox5* e *Foxp2*, *Cux1* e *Cux2*, e *Satb2*, respectivamente (Quadro 2) (NIELSEN et al., 2014). Estudos com cultura celular 3D também foram capazes de mostrar a importância do *ZBTB20* durante a recapitulação do desenvolvimento do hipocampo *in vitro*, onde esse gene apresentou expressão significativa antes mesmo de marcadores específicos das regiões CA3 e DG, como *KA1* e *Prox1*, respectivamente (SAKAGUCHI et al., 2015).

Em relação à morfologia neuronal, variantes que afetam a região N-terminal do *ZBTB20* afetam espinhas dendríticas, enquanto variantes que se localizam na

região C-terminal afetam tanto o comprimento quanto o grau de arborização dos dendritos (JONES et al., 2018). Apesar de ambos afetarem a conectividade neuronal e a estabilidade sináptica, é possível que isso explique a grande heterogeneidade clínica vista em pacientes com variantes neste gene devido às diferentes localizações das mesmas. Até o momento, entretanto, não existem evidências clínicas que suportem essas suposições (MELIS et al., 2020).

Além de neurônios, o ZBTB20 também tem função importante da formação de células da glia. De maneira mais específica, estudos com de camundongos *Zbtb20*<sup>LacZ/LacZ</sup> mostram que a proteína ZBTB20 é essencial para promover a transição do processo da neurogênese para gliogênese no período peri-natal (DOEPPNER et al., 2018). Seguindo esta mesma linha, estudos mostram que a expressão do *ZBTB20* é especialmente essencial na astrocitogênese, ocorrendo antes mesmo da expressão de marcadores chave como *GFAP* e *S100β* (Figura 13) (NAGAO et al., 2016). Desse modo, a ausência da proteína ZBTB20 afeta diretamente a formação de astrócitos já durante a embriogênese, enfatizando a importância do ZBTB20 desde o período fetal (DOEPPNER et al., 2018).

Figura 13 – Expressão do *ZBTB20* em diferentes tipos celulares do sistema nervoso central. FPKM – Fragmentos por kilobase do transcrito, por milhão de fragmentos mapeados.



Fonte: Traduzido de Brain RNA-Seq, 2020.

As evidências listadas acima reforçam a relevância do *ZBTB20* no neurodesenvolvimento, sugerindo que esse gene possa apresentar papel importante em condições ligadas a atrasos no desenvolvimento neuropsicomotor, deficiência intelectual entre outros.

### **3 MÉTODOS**

#### **3.1 LOCAL DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS**

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Neuroimunogenética do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), localizado na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As amostras e dados obtidos se deram dentro de projetos aprovados pelo comitê de ética do CCS-UFPE (CAAE-0296.0.172.000-08 e 09475912.8.0000.5208). Todos os pacientes envolvidos nos estudos clínico-genéticos assinaram termos de consentimento livre e esclarecido.

#### **3.2 ESTUDOS CLÍNICO-GENÉTICOS**

##### **3.2.1 Recrutamento de Pacientes e Critérios de Inclusão**

Pacientes foram recrutados através do ambulatório de psiquiatria do Hospital das Clínicas (HC) da UFPE. Além disso, e devido à colaboração de médicos de outros serviços e estados do país, alguns indivíduos não oriundos do HC-UFPE foram direcionados ao Laboratório de Neuroimunogenética do LIKA-UFPE após a identificação de calcificações cerebrais bilaterais e simétricas.

Os critérios de inclusão deste estudo foram a presença de calcificações cerebrais simétricas e bilaterais, detectadas por meio de RMN e/ou TC, na ausência de apresentações clínicas características de desordens secundárias, como desbalanços hormonais e histórico médico de infecções intrauterinas, traumas e quadros neoplásicos (BEKIESINSKA-FIGATOWSKA; MIERZEWSKA; JURKIEWICZ, 2013; NICOLAS et al., 2015). Não houve a especificação de sinais e sintomas adicionais dentre os critérios de inclusão já que a triagem genética relacionada às calcificações cerebrais envolveu doenças com quadros clínicos distintos. Por fim, pacientes recrutados poderiam ser de ambos os sexos e não houve limitação de faixa etária para o recrutamento dos mesmos.

Indivíduos que atendiam aos critérios de inclusão e exclusão do estudo foram incluídos no estudo após obtenção de consentimento livre e esclarecido. O consentimento para estudo realizado em indivíduos menores de idade foi obtido através de seus representantes legais. Ao todo, cerca de 40 pacientes índice, além de seus familiares, participaram do estudo. Por se tratar de um estudo

observacional, onde os pacientes não precisam ser submetidos a intervenções além de uma coleta de sangue periférico necessária ao estudo, o risco aos quais os pacientes foram submetidos podem ser considerados mínimos por não ultrapassar riscos associados, por exemplo, a exames de rotina.

### 3.2.2 Coleta de dados clínicos

Dados clínicos foram coletados no primeiro contato com os pacientes índice, e em momentos subsequentes quando necessário obter informações mais detalhadas sobre histórico clínico (sinais e sintomas relacionados a problemas motores, cognitivos, psiquiátricos, entre outros) e familiar. Essa coleta foi feita por meio de contato pessoal e/ou através do uso de questionários disponibilizados *on-line*.

Quando possível e disponível, informações referentes à exames laboratoriais, imagens de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada, assim como seus respectivos laudos, foram coletados. As imagens de RMN e TC foram analisadas para identificação da presença de calcificações cerebrais em estruturas como núcleo caudado, tálamo, núcleos lenticulares, substância branca subcortical, córtex cerebral, cerebelo, ponte, mesencéfalo e medula.

Todas as informações obtidas foram encaminhadas ao Laboratório de Neuroimunogenética do LIKA-UFPE, centro de referência em diagnóstico de doenças genéticas relacionadas a calcificações cerebrais. As informações pessoais obtidas dos pacientes foram substituídas por códigos identificadores para garantir a privacidade dos participantes do estudo.

O diagnóstico de provável CCFP, Síndrome de Primrose e Síndrome de Raine foram determinados baseado nos padrões adotados nos últimos anos em estudos com propostas semelhantes (CORDEDDU et al., 2014; NICOLAS et al., 2015; WHYTE et al., 2017). Pacientes com calcificações cerebrais bilaterais e simétricas que possuíam sintomas motores e bulbares marcantes, como disfagia e disartria, com rápida progressão da doença e/ou triagem genética negativa para *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB* e *XPR1* foram triados para MYORG-CCFP (CHELBAN et al., 2020; YAO et al., 2018). Paralelamente, pacientes com calcificações cerebrais bilaterais e simétricas que apresentaram características faciais típicas, calcificação do pavilhão auricular e atraso no desenvolvimento global foram triados para a

síndrome de Primrose, enquanto pacientes com as mesmas lesões cerebrais e alterações odontológicas foram triados para a síndrome de Raine (CORDEDDU et al., 2014; WHYTE et al., 2017). Os pacientes tiveram seus diagnósticos confirmados após obtenção dos resultados de triagens genéticas, como detalhado no tópico a seguir.

### 3.2.3 Diagnóstico genético

O diagnóstico genético foi direcionado a partir do perfil fenotípico de cada paciente, de modo que 33 pacientes foram triados para MYORG-CCFP, um paciente foi triado para a Síndrome de Primrose, e um paciente foi triado para a Síndrome de Raine.

A técnica utilizada para diagnóstico genético em genes candidatos foi o sequenciamento automático de Sanger, precedido por reação em cadeia da polimerase (PCR) dos genes candidatos. Para realização da PCR, utilizamos GoTaq® Green Master Mix (Cat#M712C, Promega) contendo DNA Polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> e tampão de reação. Os amplicons gerados pela PCR foram visualizados através de eletroforese utilizando géis de TAE 1% e GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Cat#41003, Biotium). Os primers utilizados para tais experimentos estão descritos no Apêndice A. Os produtos de PCR foram sequenciados em um sequenciador ABI 3700 no Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Os pacientes diagnosticados com MYORG-CCFP confirmada geneticamente foram apenas aqueles que obtiveram positividade para variantes patogênicas em éxons codificadores de proteína e regiões de fronteira entre éxons e íntrons do gene *MYORG*, gene previamente relacionado a casos autossômico recessivos de CCFP (RICHARDS et al., 2015; YAO et al., 2018). De maneira similar, os pacientes diagnosticados com PRIMS ou síndrome de Raine foram apenas aqueles nos quais variantes patogênicas foram detectadas nos genes *ZBTB20* ou *FAM20C*, respectivamente (CORDEDDU et al., 2014; RICHARDS et al., 2015; SIMPSON et al., 2007).

### 3.3 ANÁLISE *IN SILICO*

Com a finalidade de investigar a função e possíveis mecanismos de regulação do *ZBTB20*, avaliamos a possibilidade de microRNAs atuarem como reguladores pós-transcricionais sobre este gene (FELEKKIS et al., 2010). Dentre os microRNAs, a conservação do miR-9-5p entre espécies e suas comprovadas funções em diversos processos no SNC fizeram com que esse microRNA se destacasse como potencial ferramenta de regulação de genes envolvidos com transtornos do neurodesenvolvimento e doenças neurodegenerativas, como o *ZBTB20* (PAIVA; KEASEY; OLIVEIRA, 2017).

A predição da afinidade da ligação do miR-9-5p (miR-9) ao *ZBTB20* foi avaliada através das plataformas de bioinformática TargetScan e DianaTools, que estão disponíveis on-line em [http://www.targetscan.org/docs/UTR\\_profiles.html](http://www.targetscan.org/docs/UTR_profiles.html) e <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=site/index>, respectivamente. Esses programas foram utilizados devido às suas altas seletividades e baixo número de alvos falso positivos (ALEXIOU et al., 2009).

### 3.4 ESTUDOS *IN VITRO*

#### 3.4.1 Cultura celular

Células humanas osteoblásticas da linhagem SaOs-2 obtidas do banco público de tecidos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) foram utilizadas como modelo de calcificação *in vitro*, assim como para estudos sobre o efeito do miR-9-5p na expressão do *ZBTB20*. As células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Cat#12100046, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS, Cat#10437028, Gibco), 1mM de glutamina (Cat #25030081, Gibco) e 10.000 U/mL de penicilina e estreptomicina (Cat#15140122, Invitrogen, USA). As células cultivadas foram utilizadas para extração de proteínas após a indução da calcificação *in vitro* ou do uso do mir-9-5p seguindo protocolo descrito por Keasey et al., 2013 (KEASEY et al., 2013).

#### 3.4.1.1 Indução de calcificação *in vitro*

Células SaOs-2 foram plaqueadas (100.000 células/mL), e induzidas quimicamente a calcificar através da utilização de 1 mM  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ G) (Sigma) e 250  $\mu$ M ácido ascórbico (Sigma), seguindo o protocolo descrito por Keasey et al., 2016 (KEASEY et al., 2016). Trocas de meio e adição de  $\beta$ G foram realizadas a cada três dias, enquanto a adição de ácido ascórbico foi realizada diariamente. As células foram mantidas sob essas condições por períodos de 7 ou 14 dias. Células controle e diferenciadas foram fixadas com paraformaldeído a 4% (PFA) em PBS pH 7,2, e coradas com alizarina para confirmar as calcificações.

#### 3.4.1.2 Transfecção do microRNA miR-9-5p e inibidor do miR-9-5p

A transfecção do miR-9 (30 nM, Cat#PM10022, Ambion) e de seu inibidor (30 nM, Cat#MIMAT0000142, Dharmacon) em células SaOs-2 foi realizada em triplicata, através da utilização de Lipofectamina 2000 (Cat#11668027, Invitrogen) e seguindo protocolo descrito previamente (PAIVA; KEASEY; OLIVEIRA, 2017). A proteína destas células foi extraída 24h após a realização da transfecção.

### 3.4.2 Western Blot

#### 3.4.2.1 Preparação da Amostra

Placas com células foram colocadas em gelo, após o qual o meio DMEM foi removido e as células lavadas com PBS 1x gelado. O scrapp foi feito com tampão Ripa com coquetel antiprotease (Amaresco). Em seguida o homogenato foi passado 10x na seringa de insulina, colocado no gelo por 20 minutos e centrifugado por 20 minutos a 12.500 rpm. O sobrenadante foi, então, colocado em um novo tubo para posterior quantificação. A determinação da concentração de proteínas foi realizada a partir da técnica descrita por Bradford, utilizando o Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo scientific) e a albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*, BSA) como padrão nas concentrações ( $\mu$ g/mL) 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000  $\mu$ g/mL.

### 3.4.2.2 Géis de Proteínas

Para a separação das proteínas da amostra de acordo com o seu tamanho foram usados géis de proteínas (SDS-PAGE). Inicialmente, preparou-se o gel de separação, utilizando acrilamida 30% (BioRad) (5ml: 1,9 ml H<sub>2</sub>O, 1,7 ml acrilamida 30%, 1,3 ml 1.5 M Tris pH 8.8, 0,05 ml SDS 10%, 0,05 ml Persulfato de Amônio 10% e 0,002 ml TEMED (Sigma)). A polimerização deste gel ocorre em 30 minutos. Em seguida, preparou-se o gel de concentração (2ml: 1,4 ml H<sub>2</sub>O, 0,33 ml acrilamida 30%, 0,25 ml 0.5 M Tris pH 6.8, 0,02 ml SDS 10%, 0,02 ml Persulfato de Amônio 10% e 0,002 ml TEMED), cuja polimerização leva 15 minutos.

Por poço, 10ug/uL de cada amostra foi adicionada. O marcador de pesos moleculares utilizado foi o Novex Sharp Pre-stained Protein 13 Standard (Invitrogen). Os géis foram corridos em sistema Mini-PROTEAN III (BioRad), em tampão de corrida 1x (25 mM Tris, 0,192 M glicina, 0,1% SDS, pH 8,3). Aplicou-se uma voltagem de 100mV enquanto as amostras se encontravam no gel de concentração, a qual foi aumentada para 120mV quando as amostras atingiram o gel de separação.

### 3.4.2.3 Transferência, marcação e revelação

A membrana de PVDF foi inicialmente submersa em metanol durante um minuto, seguida de lavagem em água destilada e, finalmente, equilibrada em tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 20% de Metanol, pH entre 8 e 8,3). Simultaneamente, incubou-se o gel em tampão de transferência durante 10 minutos. O gel e a membrana foram colocados em um cassete, entre quatro folhas de papel filtro. As proteínas foram transferidas durante 30min a 15V em tampão de transferência no sistema de transferência semiseco Trans-Blotting Turbo (BioRad Laboratories).

Após a transferência, as membranas foram lavadas três vezes em solução de TBS (500 mM Tris-HCl, 1500 mM NaCl, pH 7.4) e 0,1% Tween20 (TBST), e bloqueadas em seguida com uma solução de 5% leite Molico em TBST durante 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os anticorpos primários foram adicionados a uma nova solução de 5% leite Molico em TBST, e a incubação foi realizada *overnight* a 4°C. No dia seguinte, realizaram-se três lavagens de dez

minutos cada em TBST, seguidas pela incubação de anticorpos secundários (preparados em 5% leite Molico em TBST) durante duas horas, em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente em TBST três vezes durante dez minutos cada, seguindo-se mais três lavagens de dez minutos cada em TBS.

O sinal foi detectado utilizando uma mistura 1:1 das soluções Novex™ ECL Chemiluminescent Substrates (Cat#WP20005, Invitrogen). A obtenção de imagens das membranas de western blot foi feita através do uso do iBright CL1000 (Thermo Fisher Scientific), localizado no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães. As bandas de proteínas foram quantificadas por densitometria através da utilização do ImageJ, e expressas como uma razão em relação ao GAPDH.

Quando necessário, realizou-se o stripping das membranas, de modo a remover os anticorpos primários e secundários ligados às proteínas da membrana para realização de re-blot com anticorpos diferentes. Para realização do stripping, as membranas foram submersas em tampão de stripping (1L: 15g glicina, 1g SDS, 10mL 0,1% Tween20, pH 2.2) e incubadas duas vezes, durante cinco a dez minutos cada, em temperatura ambiente. Posteriormente a membrana foi sujeita a duas lavagens com PBS de dez minutos cada, e duas lavagens com TBST, de cinco minutos cada. Após isto, a membrana estava apta a realização de novo bloqueio (5% leite Molico em TBST).

O anticorpo primário usado para a detecção do ZBTB20 foi o sc-515370 (*mouse monoclonal*, 1:750), e o GAPDH foi utilizado como controle endógeno (sc-25778, *rabbit polyclonal*, 1:1000). Estudos prévios mostram que a expressão do GAPDH em SaOs-2 não muda sob as condições estudadas, fazendo com que esta proteína seja adequada para utilização como controle endógeno (DOS SANTOS JUNIOR et al., 2018; PAIVA; KEASEY; OLIVEIRA, 2017). Os anticorpos secundários utilizados foram *goat anti-rabbit IgG* (sc-2030, 1:5000) e *goat anti-mouse IgG* (sc-2005, 1:5000), a depender do anticorpo primário utilizado para a proteína de interesse (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

### 3.4.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando os softwares GraphPAD Prism (versão 8.0.1) e OriginPro 2020 (versão 9.7.5.184). As análises foram feitas com

One-Way ANOVA ( $\alpha < 0,05$ ) com o pós-teste de Dunnett para avaliar a expressão do *ZBTB20* frente à estímulos de calcificação e do miR-9-5p em cultura celular. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para confirmar a distribuição normal dos dados.

## 4 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão divididos entre as seções Resultados e Apêndices, seguindo a sugestão da Biblioteca Central da UFPE para trabalhos compostos por artigos em processo de submissão ou já publicados em revistas científicas. Deste modo, os resultados deste trabalho estão dispostos da seguinte maneira:

Seção 6.1 – Artigo em preparo – Protein expression analyses of ZBTB20 under pro-osteogenic conditions and mir-9-5p overexpression;

Apêndice A – Artigo publicado no periódico *Journal of Molecular Neuroscience* (FI 2020: 3,444), relativo a comparações fenotípicas entre modelos animais e pacientes com CCFP;

Apêndice B – Artigo publicado no periódico *American Journal of Medical Genetics – Part A* (FI 2021: 2,802), relativo ao estudo clínico-genético de pacientes com Síndrome de Primrose;

Apêndice C – Carta ao editor publicada no periódico *Brain* (FI 2020: 13,501), relativa ao estudo clínico-genético de paciente com CCFP autossômica recessiva causada por variante em homozigose no gene *MYORG*;

Apêndice D – Artigo publicado no periódico *Journal of Molecular Neuroscience* (FI 2020: 3,444), relativo à realização de WES em paciente com CCFP autossômica recessiva causada por variante em homozigose no gene *MYORG*;

Apêndice E – Artigo aceito para publicação no periódico *Journal of Molecular Neuroscience* (FI 2020: 3,444), relativo ao estudo clínico-genético realizado com paciente diagnosticado com Síndrome de Raine.

#### 4.1 ARTIGO EM PREPARO – PROTEIN EXPRESSION ANALYSES OF ZBTB20 UNDER PRO-OSTEOGENIC CONDITIONS AND MIR-9-5P OVEREXPRESSION

##### **Protein expression analyses of ZBTB20 under pro-osteogenic conditions and miR-9-5p overexpression**

Laura D. Ferreira<sup>1</sup>, Darlene P. Bezerra<sup>2</sup>, João Ricardo M. de Oliveira<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Keizo Asami Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>2</sup>Genetics Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>3</sup>Neuropsychiatry Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

Address for corresponding author: João Ricardo M. de Oliveira, Neuropsychiatry Department, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil. Telephone number: +55 81 987819856. E-mail: joao.ricardo@ufpe.br

##### **FUNDING**

LDF received a fellowship from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE; IBPG-0750-2.02/16). JRMO received funding from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 310150/2016-7 and 311664/2020-2) and PROPESQ-UFPE (2018-2019).

##### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank E. Cunha, L. Pimentel, and E. Santos-Júnior for technical support, and I. Gomes for helpful discussions. We would also like to thank Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support.

## ABSTRACT

**Introduction:** *ZBTB20* encodes a transcriptional repressor protein that plays important roles in numerous physiological processes, especially in the central nervous system. Variants in this gene have been linked to a rare and progressive neurodevelopmental condition called Primrose syndrome, which is characterized by intellectual deficiency, global developmental delay, and characteristic facial features. Additionally, patients with Primrose syndrome also develop ectopic calcifications during their second decade of life. For this reason, we have evaluated how *ZBTB20* expression responds to calcification induction *in vitro*, as well as whether miR-9-5p overexpression is able to regulate *ZBTB20* expression. The relationship between miR-9-5p and *ZBTB20* was explored due to miR-9-5p's 5p is highly conserved between species and knowingly has important roles in several CNS processes, which makes it a potential regulatory mechanism for genes involved in neurodevelopmental and neurodegenerative processes. **Methods:** Western blots were performed with proteins extracted from SaOs-2 after pro-osteogenic induction and miR-9-5p overexpression protocols to evaluate changed to the expression of *ZBTB20*. **Results:** Though not significant ( $p=0,33$ ), this study's results indicate the tendency of a *ZBTB20* expression drop at day 7 of *in vitro* osteogenic induction in SaOs-2. MicroRNA analysis, on the other hand, showed that miR-9-5p's overexpression causes a significant increase in *ZBTB20* expression ( $p=0,0035$ ). This finding differs from what has been reported in previous studies about this microRNA's effect over genes linked to brain calcifications, where a reduction in expression is usually seen. **Conclusion:** Our findings indicate that miR-9-5p is a strong modulator of *ZBTB20* expression in *in vitro* studies. Repeat protein and qPCR analyses are necessary to confirm the findings mentioned above.

**Keywords:** Primrose Syndrome, *ZBTB20*, brain calcification, ectopic calcification, miR-9-5p.

## INTRODUCTION

Located at 3q13.2, *ZBTB20* encodes a transcriptional repressor protein that plays important roles in numerous physiological processes (Xie et al., 2008). The zinc finger protein encoded by *ZBTB20* has a N-terminal *Broad Complex, Tramtrack, and Bric-à-brac* (BTB) domain, necessary for protein dimerization, in addition to five Cys2His2 (C2H2) *zinc finger* (ZNF) domains on its C-terminal region (Koul, 2014; NCBI, 2020). These ZNF domains of *ZBTB20* are essential to ensure this protein's DNA-binding properties to target genes, therefore being of utmost importance to *ZBTB20*'s functionality (Mitchelmore et al., 2002).

Considering its ubiquitous role as a transcriptional repressor, *ZBTB20* has unsurprisingly been linked to diverse physiological processes such as lipogenesis, glucose metabolism and plasma cell differentiation (Lightman et al., 2019; Liu et al., 2017; Zhang et al., 2012; Zhu et al., 2018). More striking, however, is how *ZBTB20* also plays important roles in the central nervous system (CNS) development, actively regulating pathways involved with neurogenesis, gliogenesis, and the formation of neuronal projections (Nielsen et al., 2014).

As of 2021, two distinct but similar neurodevelopmental conditions have been linked to genetic variants affecting *ZBTB20*, the main one being Primrose Syndrome (Cordeddu et al., 2014; Molin et al., 2012). Primrose syndrome is a rare, progressive syndrome characterized by intellectual deficiency, global developmental delay, behavioral issues, muscle contractures, characteristic facial features and ectopic calcifications (Juven et al., 2020). The detection of these ectopic calcifications is one of the most characteristic and curious signs of this condition, especially because there is still no consensus about how these calcium phosphate deposits form, or as to why they are found specifically in the pinnae and basal ganglia of affected patients (Ferreira et al., 2019; Grímsdóttir et al., 2018; Stellacci et al., 2018). This way, one of this study's goals was to evaluate how *ZBTB20* expression responded to calcification induction *in vitro*.

In addition to looking at how *ZBTB20* responds to pro-osteogenic conditions, we also evaluated whether miR-9-5p overexpression was able to regulate *ZBTB20* expression. The effect of microRNA miR-9-5p on *ZBTB20*'s expression was evaluated due to the capacity that microRNAs have to promote post-transcriptional gene regulation (Felekkis et al., 2010). Additionally, miR-9-5p is highly conserved between species and knowingly has important roles in several CNS processes (Paiva et al., 2017). This way, miR-9-5p

appears to be a potential regulatory mechanism of genes such as *ZBTB20*, which are involved with both neurodevelopment and neurodegenerative processes (Koul, 2014).

## METHODS

### In silico analysis

Binding affinity of miR-9-5p (miR-9) to *ZBTB20* was evaluated through TargetScan and DianaTools, two online bioinformatic tools available at [http://www.targetscan.org/docs/UTR\\_profiles.html](http://www.targetscan.org/docs/UTR_profiles.html) and <http://diana.imis.athenainnovation.gr/DianaTools/index.php?r=site/index>, respectively. These programs were chosen due to its low number of false positives, as well as high selectivity (Alexiou et al., 2009).

### In vitro studies

#### - Cell Culture

SaOs-2 cells obtained from the public tissue bank of Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) were used for the *in vitro* calcification model, as well as for miR-9 transfection. Cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Cat#12100046, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Cat#10437028, Gibco), 1mM glutamine (Cat #25030081, Gibco), and 10,000 u/mL penicillin and streptomycin (Cat#15140122, Invitrogen, USA) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

#### - Osteogenic induction

After being plated (100,000 cells/mL), SaOs-2 cells were induced to calcify following the protocol previously described by Keasey and collaborators (2016) (Keasey et al., 2016). As per described in the protocol, media changes and 1mM  $\beta$ -glycerofosfato ( $\beta$ G) (Sigma) additions were done every three days, while the addition of 250  $\mu$ M ascorbic acid (Sigma) was done daily. Cells were maintained under these conditions for either 7 or 14 days, before being fixed with 4% paraphormaldehyde in PBS (pH 7,2) and stained with alizarin red (pH4.5, Sigma, Cat#A5533) to confirm the development of calcifications (Keasey et al., 2016).

#### - miR-9-5p microRNA transfection

SaOs-2 cells were plated on 6-well plates (100,000 cells/mL of media) and transfection followed the protocol described by Paiva, Keasey and Oliveira (2017) (Paiva et al., 2017). After reaching 50% confluency, the cells were transfected with miR-9-5p (30 nM, Cat#PM10022, Ambion) and its inhibitor (Cy3, 30 nM, Cat#MIMAT0000142, Dharmacon), in triplicate, by using Lipofectamine 2000 (Cat#11668027, Invitrogen). Proteins were extracted from these cells 24h after transfection.

### **Western Blot**

Proteins were isolated from SaOs-2 cultures following the protocol described by Keasey and collaborators (2013) (Keasey et al., 2013). Novex Sharp Pre-stained Protein 13 Standard (Invitrogen) was used as a molecular weight marker, and the primary antibodies used for the Western Blot were ZBTB20 (sc-515370, mouse monoclonal, 1:750) and GAPDH (sc-25778, rabbit polyclonal, 1:1000). Secondary antibodies used were goat anti-rabbit IgG (sc-2030, 1:5000) and goat anti-mouse IgG (sc-2005, 1:5000), and signal was developed by using the Novex<sup>TM</sup> ECL Chemiluminescent Substrates (Cat#WP20005, Invitrogen). Images of western blot membranes were acquired through the iBright CL1000 (Thermo Fisher Scientific), and ZBTB20 protein levels were quantified by densitometry using ImageJ and expressed as a relative ratio to GAPDH.

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPAD Prism (8.0.1) and OriginPro 2020 (9.7.5.184). Analyses were based on one-way ANOVA ( $\alpha < 0.05$ ) followed by a Dunnett's post-hoc test to evaluate changes to ZBTB20 expression under pro-osteogenic conditions and miR-9-5p overexpression. Shapiro-Wilk test was used to confirm normal distribution of data.

## **RESULTS & DISCUSSION**

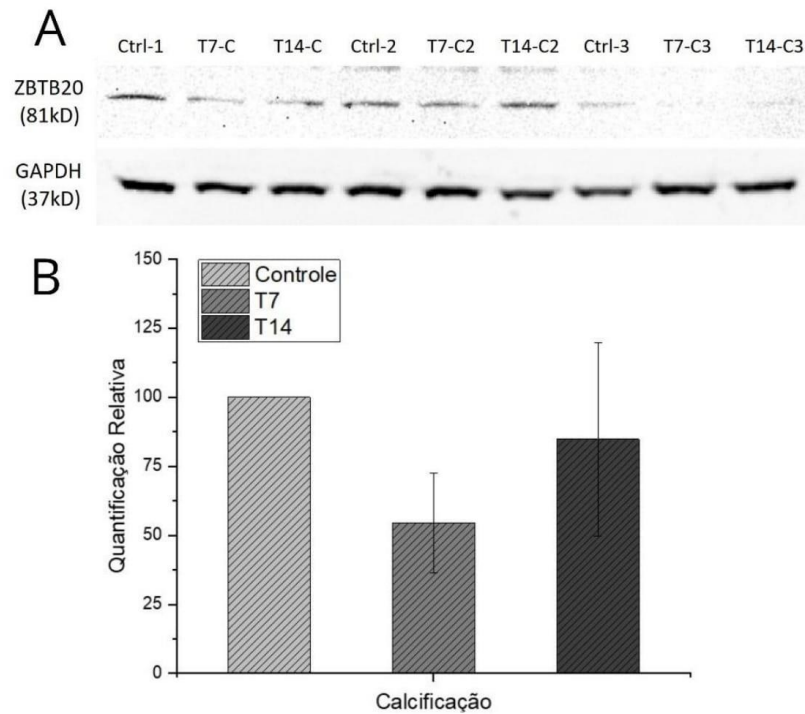
### **ZBTB20 response to osteogenic induction *in vitro***

The *in vitro* induction of osteogenic differentiation process is that by which cells develop bone-like characteristics after the addition of dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ G to culture (Keasey et al., 2016). Previous data confirms that the protocol described by Keasey and collaborators (2016) promotes the development of extracellular calcium phosphate deposits in SaOs-2 cell cultures, making this *in vitro* calcification model an appropriate option to further investigate the mechanisms involved with calcification formation (Keasey et al., 2016).

Previous studies have shown that the *in vitro* induction of osteogenesis has different effects on genes linked to primary brain calcifications, such as *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB* e *XPRI*. The expression of genes that encode phosphate transporters, more specifically *SLC20A2* and *XPRI*, showed significant reductions by day 7, which was maintained up until day 14 of osteogenic induction (Keasey et al., 2016). A reduction in *SLC20A2* expression has also been reported in samples from patients diagnosed with PFBC, which is in agreement with what and been previously reported in *in vitro* studies (Pimentel et al., 2017). Curiously, recently published data suggest the existence of a compensatory effect between *PDGFRB* and *PDGFB* during the cellular calcification process, where the expression of the former reduces at day 14 while the expression of the latter increases (Bezerra et al., 2021). Data about the expression of *in vitro* osteogenic induction on the expression of *MYORG* and *JAM2*, two additional genes linked to primary brain calcifications, have not been reported yet.

Our analyses, shown in Figure 1, indicate the tendency of a *ZBTB20* expression drop at day 7, although no statistical significance was seen ( $p=0,33$ ). Unlike the expected, however, the tendency of reduction seen at day 7 was not maintained at day 14, but there was also no statistically significant difference to controls ( $p=0,85$ ).

Figure 1 - Effect of *in vitro* osteogenic induction in SaOs-2 cells on *ZBTB20* expression. (A) Representative Western blot for *ZBTB20* and GAPDH. (B) Relative quantification of Western Blot showing that osteogenic induction did not cause significant changes to *ZBTB20* expression. Bars indicate the average of three independent experiments  $\pm$  standard error. Statistical differences were determined through ANOVA and Dunnett's post-hoc test. Ctrl – Control. T7 – Day 7 of osteogenic induction. T14 – Day 14 of osteogenic induction.



Based on the results shown in Figure 1, the effect of *in vitro* calcification on *ZBTB20*'s expression does not seem to follow the pattern previously described for genes involved with other types of primary brain calcification, such as those seen in patients with PFBC. Even though statistical significance was not reached, the data indicates a possible reduction in *ZBTB20* expression at day 7 followed by an increase at day 14, similar to what has been seen for *PDGFB* but different from what has been reported about *SLC20A2*, *XPR1* e *PDGFRB* (Bezerra et al., 2021; Keasey et al., 2016).

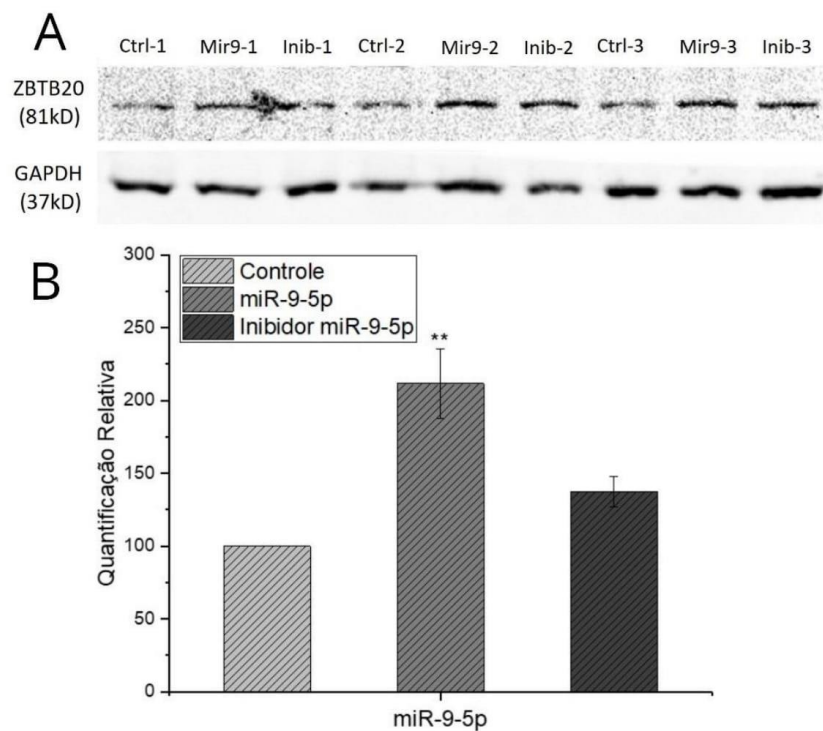
A potential explanation for the unexpected behaviour of *ZBTB20* under *in vitro* osteogenic induction is the presence of a compensatory effect with other genes, similar to what is suggested to be the case for *PDGFB* (Bezerra et al., 2021). New protein expression analyses should be combined with qPCR experiments to confirm these findings.

#### Evaluation of miR-9-5p binding affinity and effects on *ZBTB20*

Because of the indication that miR-9 has five potential binding sites on *ZBTB20*, the effect of this microRNA's overexpression on the expression of *ZBTB20* was evaluated in an *in vitro* model. Interestingly, the analysis of miR-9-5p's effect on *ZBTB20* expression showed that this gene is indeed affected by miR-9-5p's overexpression, which

causes a significant increase in its expression ( $p=0,0035$ ) (Figure 3). The use of miR-92 inhibitor, however, did not cause significant alterations to *ZBTB20*'s expression when compared to control ( $p=0,21$ ).

Figure 3 – Effect of *in vitro* miR-9-5p overexpression and miR-9-5p inhibitor on *ZBTB20* expression in SaOs-2. (A) Representative Western blot for *ZBTB20* and GAPDH. (B) Relative quantification of Western Blot showing that miR-9-5p overexpression caused significant changes to *ZBTB20* expression. Bars indicate the average of three independent experiments  $\pm$  standard error. Statistical differences were determined through ANOVA and Dunnett's post-hoc test. Ctrl – Control. Mir9 –miR-9-5p overexpression. Inib – Addition of miR-9-5p. (\*\* $p$  value  $\leq 0.01$ )



Previous *in vitro* studies have shown that the overexpression of this miR-9 causes a reduction in the expression of genes linked to primary brain calcifications, such as *SLC20A2* in HEK293 cells (PAIVA; KEASEY; OLIVEIRA, 2017). Similarly, recently published data about SaOs-2 also indicate a decrease in the expression of both *SLC20A2* and *PDGFRB* when exposed to miR-9 overexpression, suggesting that this microRNA has the same effects in different genes linked to brain calcifications (Bezerra et al., 2021).

The use of miR-9 inhibitors increased the expression of the genes mentioned in both cases. Our results show, however, that the same cannot be said about *ZBTB20*, whose expression increases under miR-9 overexpression and is not affected by its inhibitor (Figure 3).

The increase in *ZBTB20* expression mentioned and shown above (Figure 3) is both curious and unexpected, especially considering that *in silico* predictions suggested *ZBTB20* to be a target of miR-9 (Figure 2) and that the expected effect of miR-9 on its targets is to cause a decrease in gene expression (Coolen et al., 2012; Felekakis et al., 2010). As a comparison, *SLC20A2* and *PDGFRB* only have one miR-9 binding site each and showed a marked reduction in expression when subjected to miR-9 overexpression (Paiva et al., 2017). This finding could be justified by the action of miR-9 on genes that potentially inhibit *ZBTB20* expression, where the decrease in their expression would in turn result in an increase expression of *ZBTB20*. Another possibility that must be considered is that miR-9-5p, instead downregulating *ZBTB20*, might in fact up-regulate its translation (Vasudevan et al., 2007). Although uncommon, this type of microRNA activity has been previously reported and could explain the effects of miR-9-5p over *ZBTB20* reported above (Ma et al., 2010; Vasudevan et al., 2007). This way, new analyses could be helpful in determining whether miR-9-5p affects *ZBTB20* translation directly or indirectly, as well as in identifying potential intermediary agents that are involved in the modulation of *ZBTB20* expression.

In addition to the unexpected finding regarding the effect of miR-9 on the expression of *ZBTB20*, the results shown also indicate that miR-9 inhibitors do not cause significant changes in *ZBTB20* expression when compared to controls, which once again differs from what has been previously seen with *SLC20A2*, *PDGFRB* and *PDGFB* (Bezerra et al., 2021). A possible explanation for the lack of effect seen in our experiments is the low concentration of miR-9 inhibitor used (30nM), as well as the short exposure period that the cells had to this molecule (24h). New analyses with higher miR-9 inhibitor concentrations and/or a longer exposure period could be potential strategies to check if the same that has been previously seen for other genes linked to brain calcifications can also be reproduced for *ZBTB20*.

It's important to point out, however, that even if unexpected the effect of miR-9 on the expression of *ZBTB20* is a positive finding once we consider that patients with Primrose syndrome have loss of function variants affecting this gene (Cordeddu et al., 2014). This way, and considering that the loss-of-function of *ZBTB20* causes the

development of diverse phenotypes associated with this condition, the use of miR-9 as a tool to potentially increase this gene's expression up to physiological levels becomes an interesting alternative (Kreth et al., 2018).

## CONCLUSION

Our results show that pro-osteogenic induction has no significant effects on the expression of *ZBTB20*, which differs from what has been reported in previous studies that focused on genes associated with primary brain calcifications. Furthermore, our results also indicate that miR-9-5p is, directly or indirectly, a strong modulator of *ZBTB20* expression in *in vitro* studies, which makes it an interesting alternative for future studies in cases of *ZBTB20* loss-of-function. Repeat protein and qPCR analyses are necessary to confirm the findings mentioned above. If these findings are confirmed, more experiments will be essential to determine whether the modulation of *ZBTB20* by miR9-5p happens directly, through upregulation, or indirectly, through the downregulation of one of *ZBTB20*'s inhibitors.

## REFERENCES

- Alexiou, P., Maragkakis, M., Papadopoulos, G. L., Reczko, M., & Hatzigeorgiou, A. G. (2009). Lost in translation: An assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics*, 25(23), 3049–3055. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp565>
- Bezerra, D. P., de Aguiar, J. P., Keasey, M. P., Rodrigues, C. G., & de Oliveira, J. R. M. (2021). MiR-9-5p Regulates Genes Linked to Cerebral Calcification in the Osteogenic Differentiation Model and Induces Generalized Alteration in the Ion Channels. *Journal of Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01830-w>
- Coolen, M., Thieffry, D., Drivenes, Ø., Becker, T. S., & Bally-Cuif, L. (2012). MiR-9 Controls the Timing of Neurogenesis through the Direct Inhibition of Antagonistic Factors. *Developmental Cell*, 22(5), 1052–1064. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.03.003>
- Cordeddu, V., Redeker, B., Stellacci, E., Jongejan, A., Fragale, A., Bradley, T. E. J., Anselmi, M., Ciolfi, A., Cecchetti, S., Muto, V., Bernardini, L., Azage, M., Carvalho, D. R., Espay, A., Male, A., Molin, A. M., Posmyk, R., Battisti, C., Casertano, A., ... Hennekam, R. C. (2014). Mutations in ZBTB20 cause Primrose syndrome. *Nature Genetics*, 46(8), 815–817. <https://doi.org/10.1038/ng.3035>
- Felekakis, K., Touvana, E., Stefanou, C., & Deltas, C. (2010). microRNAs: A newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*, 14(4), 236–240.
- Ferreira, L. D., Borges-Medeiros, R. L., Thies, J., Schnur, R. E., Lam, C., & Oliveira, J. R. M. (2019). Expansion of the Primrose syndrome phenotype through the comparative analysis of two new case reports with ZBTB20 variants. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 179(11), 2228–2232. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61297>
- Grímsdóttir, S., Hove, H. B., Kreiborg, S., Ek, J., Johansen, A., Darvann, T. A., & Hermann, N. V. (2018). Novel de novo mutation in ZBTB20 in primrose syndrome in boy with short stature. *Clinical Dysmorphology*, 28(1), 41–45. <https://doi.org/10.1097/mcd.0000000000000244>
- Juven, A., Nambot, S., Jean-marçais, A. P. N., Masurel, A., Callier, P., Mosca-boidron, N. M. A., Kuentz, P., Philippe, C., Chevarin, M., Duffourd, Y., Gautier, E.,

- Munnich, A., Rio, M., Rondeau, S., El, S., Élise, C., Bénédicte, S., Sonia, G., Catherine, B., & Delorme, V. (2020). Primrose syndrome: A phenotypic comparison of patients with a ZBTB20 missense variant versus a 3q13.31 microdeletion including ZBTB20. *European Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0582-3>
- Keasey, Kang, S., Lovins, C., & Hagg, T. (2013). Inhibition of a novel specific neuroglial integrin signaling pathway increases STAT3-mediated CNTF expression. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-35>
- Keasey, M. P., Lemos, R. R., Hagg, T., & Oliveira, J. R. M. (2016). Vitamin-D receptor agonist calcitriol reduces calcification in vitro through selective upregulation of SLC20A2 but not SLC20A1 or XPR1. *Scientific Reports*, 6(1), 25802. <https://doi.org/10.1038/srep25802>
- Koul, R. (2014). *Functional Characterization of ZBTB20 and the Role of ZBTB20-Dependent Transcription Regulation in Autism Spectrum Disorders and Intellectual Disability* (p. 197).
- Kreth, S., Hübner, M., & Hinske, L. C. (2018). MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine: *Anesthesia & Analgesia*, 126(2), 670–681. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002444>
- Lightman, S. M., Utley, A., & Lee, K. P. (2019). Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. *Frontiers in Immunology*, 10(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00965>
- Liu, G., Zhou, L., Zhang, H., Chen, R., Zhang, Y., Li, L., Lu, J. Y., Jiang, H., Liu, D., Qi, S., Jiang, Y. M., Yin, K., Xie, Z., Shi, Y., Liu, Y., Cao, X., Chen, Y.-X., Zou, D., & Zhang, W. J. (2017). Regulation of hepatic lipogenesis by the zinc finger protein Zbtb20. *Nature Communications*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms14824>
- Ma, F., Liu, X., Li, D., Wang, P., Li, N., Lu, L., & Cao, X. (2010). MicroRNA-466l Upregulates IL-10 Expression in TLR-Triggered Macrophages by Antagonizing RNA-Binding Protein Tristetraprolin-Mediated IL-10 mRNA Degradation. *The Journal of Immunology*, 184(11), 6053–6059. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902308>
- Mitchellmore, C., Kjærulff, K. M., Pedersen, H. C., Nielsen, J. V., Rasmussen, T. E., Fisker, M. F., Finsen, B., Pedersen, K. M., & Jensen, N. A. (2002).

- Characterization of Two Novel Nuclear BTB/POZ Domain Zinc Finger Isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7598–7609. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110023200>
- Molin, A.-M., Andrieux, J., Koolen, D. A., Malan, V., Carella, M., Colleaux, L., Cormier-Daire, V., David, A., de Leeuw, N., Delobel, B., Duban-Bedu, B., Fischetto, R., Flinter, F., Kjaergaard, S., Kok, F., Krepischi, A. C., Le Caignec, C., Ogilvie, C. M., Maia, S., ... Anner  n, G. (2012). A novel microdeletion syndrome at 3q13.31 characterised by developmental delay, postnatal overgrowth, hypoplastic male genitals, and characteristic facial features. *Journal of Medical Genetics*, 49(2), 104–109. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100534>
- NCBI. (2020, abril 28). *ZBTB20 zinc finger and BTB domain containing 20 [Homo sapiens (human)]*. ZBTB20 zinc finger and BTB domain containing 20 [Homo sapiens (human)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26137#gene-expression>
- Nielsen, J. V., Thomassen, M., M  llg  rd, K., Noraberg, J., & Jensen, N. A. (2014). Zbtb20 defines a hippocampal neuronal identity through direct repression of genes that control projection neuron development in the isocortex. *Cerebral Cortex*, 24(5), 1216–1229. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs400>
- Paiva, D. P., Keasey, M., & Oliveira, J. R. M. (2017). MiR-9-5p Down-Regulates PiT2, but not PiT1 in Human Embryonic Kidney 293 Cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 62(1), 28–33. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0906-0>
- Pimentel, L. F., Lemos, R. R., & Oliveira, J. R. (2017). Phosphate Transporters Expression in Patients with Primary Familial Brain Calcifications. *Journal of Molecular Neuroscience*, 62(3–4), 276–280. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0934-9>
- Stellacci, E., Steindl, K., Joset, P., Mercurio, L., Anselmi, M., Cecchetti, S., Gogoll, L., Zweier, M., Hackenberg, A., Bocchinfuso, G., Stella, L., Tartaglia, M., & Rauch, A. (2018). Clinical and functional characterization of two novel ZBTB20 mutations causing Primrose syndrome. *Human Mutation*, 1–16. <https://doi.org/10.1002/humu.23546>
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science*, 318(5858), 1931–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>
- Xie, Z., Zhang, H., Tsai, W., Zhang, Y., Du, Y., Zhong, J., Szpirer, C., Zhu, M., Cao, X., Barton, M. C., Grusby, M. J., & Zhang, W. J. (2008). Zinc finger protein ZBTB20

- is a key repressor of alpha-fetoprotein gene transcription in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31), 10859–10864. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800647105>
- Zhang, Y., Xie, Z., Zhou, L., Li, L., Zhang, H., Zhou, G., Ma, X., Herrera, P. L., Liu, Z., Grusby, M. J., & Zhang, W. J. (2012). The zinc finger protein ZBTB20 regulates transcription of fructose-1,6-bisphosphatase 1 and  $\beta$  cell function in mice. *Gastroenterology*, 142(7), 1571–1580. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.043>
- Zhu, C., Chen, G., Zhao, Y., Gao, X. M., & Wang, J. (2018). Regulation of the development and function of B cells by ZBTB transcription factors. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00580>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho reforça a importância de realizar caracterizações fenotípicas detalhadas em pacientes que apresentam calcificações cerebrais, garantindo que um diagnóstico diferencial adequado seja aplicado para todos os pacientes. A correta análise da apresentação clínica dos pacientes permite uma análise genética direcionada para genes candidatos, reduzindo os custos relacionados a realização e análise de testes genéticos. Apesar de nem sempre possível devido a limitações estruturais e financeiras, o diagnóstico genético deve ser realizada sempre que possível quando em casos de calcificações primárias.

Neste estudo, o diagnóstico genético foi realizado de maneira direcionada, através do sequenciamento individual de genes candidatos previamente relacionados à condição de cada paciente. Três pacientes portadores de calcificações cerebrais foram diagnosticados com condições distintas, sendo elas a CCFP, a síndrome de Raine e a síndrome de Primrose. Todas as condições têm a presença de calcificações cerebrais bilaterais como um sinal em comum, de modo que a análise da apresentação clínica de cada paciente foi essencial para diferenciação dos quadros. Estes exemplos reforçam, portanto, que a detecção de calcificações cerebrais não deve ser considerada como aspecto único para definição diagnóstica, de modo que a prática clínica deve focar em uma avaliação rigorosa que envolva a obtenção de informações clínicas, hematológicas, bioquímicas, radiológicas e genéticas, quando possível.

Por fim, os estudos funcionais realizados indicam que a expressão do *ZBTB20* é alterada significativamente frente à superexpressão do miR-9-5p, indicando que este microRNA possa ser uma ferramenta em potencial em estudos futuros relacionados à síndrome de Primrose. Além disso, a expressão do *ZBTB20* frente a estímulos de calcificação *in vitro* não seguiu o padrão visto em outros genes ligados a calcificações cerebrais primárias, sugerindo a possível presença de um efeito compensatório envolvendo outros genes relacionados a esta patologia.

## REFERÊNCIAS

- ABABNEH, F. K. et al. Hereditary deletion of the entire *FAM20C* gene in a patient with Raine syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 161, n. 12, p. 3155–3160, dez. 2013.
- ABATE, E. G.; CLARKE, B. L. Review of hypoparathyroidism. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. JAN, p. 1–7, 2017.
- ACEVEDO, A. C. et al. Variability of systemic and oro-dental phenotype in two families with non-lethal Raine syndrome with *FAM20C* mutations. **BMC Medical Genetics**, v. 16, n. 1, p. 8, dez. 2015.
- AGIRMAN, G.; BROIX, L.; NGUYEN, L. Cerebral cortex development: an outside-in perspective. **FEBS Letters**, v. 591, n. 24, p. 3978–3992, dez. 2017.
- AKDEMIR, E. S.; HUANG, A. Y.-S.; DENEEN, B. Astrocytogenesis: where, when, and how. **F1000Research**, v. 9, p. 233, 2 abr. 2020.
- ALBY, C. et al. Novel de novo *ZBTB20* mutations in three cases with Primrose syndrome and constant corpus callosum anomalies. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 176, n. 5, p. 1091–1098, maio 2018.
- ALEXIOU, P. et al. Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. **Bioinformatics**, v. 25, n. 23, p. 3049–3055, 1 dez. 2009.
- AL-NAAMA, N.; MACKEH, R.; KINO, T. C2H2-Type Zinc Finger Proteins in Brain Development, Neurodevelopmental, and Other Neuropsychiatric Disorders: Systematic Literature-Based Analysis. **Frontiers in Neurology**, v. 11, p. 14, 14 fev. 2020.
- ALONSO-MARTIN, S. et al. Gene Expression Profiling of Muscle Stem Cells Identifies Novel Regulators of Postnatal Myogenesis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, n. June, p. 1–20, 2016.
- ALVES, G. et al. Pineal Gland And Choroid Plexus Calcifications On CT: A Retrospective Study In A Brazilian Subtropical City. **The Internet Journal of Human Anatomy**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2013.
- ANHEIM, M. et al. *XPR1* mutations are a rare cause of primary familial brain calcification. **Journal of Neurology**, v. 263, n. 8, p. 1559–1564, ago. 2016.
- ARAÚJO, J. **Roles of *ZBTB20* in the specification of upper layer neurons and astrocytes in the neocortex**. Tese—Natal: UFRN, dez. 2019.
- ARORA, V. et al. Unique skeletal manifestations in patients with Primrose syndrome. **European Journal of Medical Genetics**, v. 63, n. 8, p. 103967, ago. 2020.

BAJAJ, S. et al. Recurrent variant c.1680C>A in FAM20C gene and genotype-phenotype correlation in a patient with Raine syndrome: a case report. **BMC Pediatrics**, v. 21, n. 1, p. 113, dez. 2021.

BATTISTI, C. et al. The Primrose syndrome with progressive neurological involvement and cerebral calcification [7]. **Journal of Neurology**, v. 249, n. 10, p. 1466–1468, 2002.

BAUER, M. et al. MYORG Mutations : a Major Cause of Recessive Primary Familial Brain Calcification. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 19, n. 10, p. 70–70, 2019.

BEKIESINSKA-FIGATOWSKA, M.; MIERZEWSKA, H.; JURKIEWICZ, E. Basal ganglia lesions in children and adults. **European Journal of Radiology**, v. 82, n. 5, p. 837–849, 2013.

BURNS, T. **Encephalon! Carnivals!** Blog educacional. Disponível em: <[https://www.nature.com/scitable/blog/cognoculture/encephalon\\_carnivals/](https://www.nature.com/scitable/blog/cognoculture/encephalon_carnivals/)>. Acesso em: 28 abr. 2020.

CAMERON, H. A.; GLOVER, L. R. Adult Neurogenesis: Beyond Learning and Memory. **Annual Review of Psychology**, v. 66, n. 1, p. 53–81, 3 jan. 2015.

CARVALHO, D. R.; SPECK-MARTINS, C. E. Additional features of unique Primrose syndrome phenotype. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 155, n. 6, p. 1379–1383, 2011.

CASERTANO, A. et al. Alterations in metabolic patterns have a key role in diagnosis and progression of primrose syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 173, n. 7, p. 1896–1902, 2017.

CEN, Z. et al. Biallelic loss-of-function mutations in JAM2 cause primary familial brain calcification. **Brain: a journal of neurology**, v. 143, n. 2, p. 491–502, 2019.

CHEERAN, M. C. J.; LOKENSGARD, J. R.; SCHLEISS, M. R. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: Disease mechanisms and prospects for intervention. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 99–126, 2009.

CHELBAN, V. et al. MYORG -related disease is associated with central pontine calcifications and atypical parkinsonism. **Neurology Genetics**, v. 0, 2020.

CHEN, Y. et al. MYORG Mutation Heterozygosity Is Associated With Brain Calcification. **Movement Disorders**, p. 1–8, 2020.

CHEVRIER, S. et al. The BTB-ZF transcription factor Zbtb20 is driven by Irf4 to promote plasma cell differentiation and longevity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 5, p. 827–840, 2014.

CLEAVER, R. et al. Refining the Primrose syndrome phenotype: A study of five patients with ZBTB20 de novo variants and a review of the literature. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 179, n. 3, p. 344–349, mar. 2019.

COLLACOTT, R. A.; O'MALLEY, B. . P.; YOUNG, I. D. The syndrome of mental handicap, cataracts, muscle wasting and skeletal abnormalities: Report of a second case. **Journal of Mental Deficiency Research**, v. 30, p. 301–308, 1986.

COOLEN, M. et al. miR-9 Controls the Timing of Neurogenesis through the Direct Inhibition of Antagonistic Factors. **Developmental Cell**, v. 22, n. 5, p. 1052–1064, maio 2012.

CORDEDDU, V. et al. Mutations in ZBTB20 cause Primrose syndrome. **Nature Genetics**, v. 46, n. 8, p. 815–817, 2014.

DALAL, P. et al. Motor tics, stereotypies and self-flagellation in Primrose Syndrome. **Neurology**, v. 75, p. 284–286, 24 out. 2010.

DANOVSKA, M. P. et al. Extensive intracranial calcification with neurological and ophthalmological complications in a patient with idiopathic hypoparathyroidism: A case report. **Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)**, v. 24, n. 2, p. 1991–1994, 2018.

DE OLIVEIRA, M. F.; BARROS E SILVA, E.; DE OLIVEIRA, J. R. M. Prevalence of brain calcifications in a Brazilian cohort: A retrospective study in radiology services. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 7, n. 2, p. 210–215, 2013.

DENG, H.; ZHENG, W.; JANKOVIC, J. Genetics and molecular biology of brain calcification. **Ageing Research Reviews**, v. 22, p. 20–38, 2015.

DOEPPNER, T. R. et al. Zbtb20 Regulates Developmental Neurogenesis in the Olfactory Bulb and Gliogenesis After Adult Brain Injury. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 1, p. 567–582, 2018.

DOS SANTOS JUNIOR, E. F. et al. Calcitriol Reverses the Down-Regulation Pattern of Tuberous Sclerosis Complex Genes in an In Vitro Calcification Model. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 64, n. 1, p. 140–143, jan. 2018.

DU, E.-X. et al. Characterization of Fam20C expression in odontogenesis and osteogenesis using transgenic mice. **International Journal of Oral Science**, v. 7, n. 2, p. 89–94, jun. 2015.

DU, S. et al. Secretory Pathway Kinase FAM20C, a Marker for Glioma Invasion and Malignancy, Predicts Poor Prognosis of Glioma. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 13, p. 11755–11768, nov. 2020.

EHSAEI, Z.; COLLO, G.; TAYLOR, V. Pluripotent Stem Cell Based Cultures to Study Key Aspects of Human Cerebral Cortex Development. **Neuropsychiatry (London)**, v. 8, n. 6, p. 1715–1725, 2018.

ELALAOUI, S. C. et al. Non lethal Raine syndrome and differential diagnosis. **European Journal of Medical Genetics**, v. 59, n. 11, p. 577–583, nov. 2016.

EL-DESSOUKY, S. H. et al. Raine syndrome: Prenatal diagnosis based on recognizable fetal facial features and characteristic intracranial calcification. **Prenatal Diagnosis**, v. 40, n. 12, p. 1578–1597, nov. 2020.

ELTAN, M. et al. A Rare Cause of Hypophosphatemia: Raine Syndrome Changing Clinical Features with Age. **Calcified Tissue International**, 27 abr. 2020.

FARHY-TSELNICKER, I.; ALLEN, N. J. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. **Neural Development**, v. 13, n. 1, p. 7, dez. 2018.

FAUNDES, V. et al. Raine syndrome: An overview. **European Journal of Medical Genetics**, v. 57, n. 9, p. 536–542, set. 2014.

FELEKKIS, K. et al. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. **Hippokratia**, v. 14, n. 4, p. 236–240, 2010.

FERREIRA, J. B. M. M. et al. First Report of a De Novo Mutation at SLC20A2 in a Patient with Brain Calcification. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 54, n. 4, p. 748–751, 2014.

FERREIRA, L. D. **Triagem genética e caracterização fenotípica de pacientes com calcificações cerebrais não ligadas a mutações nos genes SLC20A2, PDGFB, PDGFRB e XPR1**. Recife, Brasil: Universidade Federal de Pernambuco, 9 nov. 2018.

FERREIRA, L. D. et al. Expansion of the Primrose syndrome phenotype through the comparative analysis of two new case reports with *ZBTB20* variants. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 179, n. 11, p. 2228–2232, nov. 2019.

FERREIRA, L. D.; DE OLIVEIRA, J. R. M. New homozygous indel in MYORG linked to brain calcification, thyroidopathy and neuropathy. **Brain**, v. 142, n. 9, p. e51–e51, 1 set. 2019.

FINSTERER, J.; ENZELSBERGER, B.; BASTOWANSKY, A. Basal Ganglia calcification with tetanic seizure suggest mitochondrial disorder. **American Journal of Case Reports**, v. 18, p. 375–380, 2017.

GRANGEON, L. et al. Biallelic MYORG mutation carriers exhibit primary brain calcification with a distinct phenotype. **Brain: a journal of neurology**, v. 142, n. 6, p. 1573–1586, abr. 2019.

GRÍMSDÓTTIR, S. et al. Novel de novo mutation in ZBTB20 in primrose syndrome in boy with short stature. **Clinical Dysmorphology**, v. 28, n. 1, p. 41–45, 2018.

GUO, X.-X. et al. Spectrum of SLC20A2 , PDGFRB , PDGFB , and XPR1 mutations in a large cohort of patients with primary familial brain calcification. **Human Mutation**, n. November 2018, p. 1–12, 2019.

HAYRETDAG, C. et al. Determination of genetic changes in etiology of autism spectrum disorder in twins by whole-exome sequencing. **Gene Reports**, v. 19, n. February, p. 100618–100628, 2020.

HERSH, J. et al. Primrose Syndrome: A New Case And Review. v. 155, n. 11, p. 1–1, 2015.

HERVÉ, B. et al. The emerging microduplication 3q13.31: Expanding the genotype-phenotype correlations of the reciprocal microdeletion 3q13.31 syndrome. **European Journal of Medical Genetics**, v. 59, n. 9, p. 463–469, 2016.

**Human Brain Transcriptome**. Disponível em: <<https://hbatlas.org/>>. Acesso em: 28 abr. 2020.

HUNG, C. Y. et al. A novel FAM20C mutation causes a rare form of neonatal lethal Raine syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 179, n. 9, p. 1866–1871, 11 jul. 2019.

ISHIKAWA, H. O. et al. The Raine Syndrome Protein FAM20C Is a Golgi Kinase That Phosphorylates Bio-Mineralization Proteins. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42988, 10 ago. 2012.

JENSEN, N. et al. Mice Knocked Out for the Primary Brain Calcification Associated Gene Slc20a2 Show Unimpaired Prenatal Survival but Retarded Growth and Nodules in the Brain that Grow and Calcify Over Time. **The American Journal of Pathology**, v. 188, n. 8, p. 1865–1881, 2018.

JIN, X. The role of neurogenesis during development and in the adult brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 44, n. 6, p. 2291–2299, set. 2016.

JONES, K. A. et al. Neurodevelopmental disorder-associated ZBTB20 gene variants affect dendritic and synaptic structure. **PLOS ONE**, v. 13, n. 10, p. e0203760, 2018.

JUVEN, A. et al. Primrose syndrome: a phenotypic comparison of patients with a ZBTB20 missense variant versus a 3q13.31 microdeletion including ZBTB20. **European Journal of Human Genetics**, 2020.

KAN, H. et al. Zinc finger protein ZBTB20 is an independent prognostic marker and promotes tumor growth of human hepatocellular carcinoma by repressing FoxO1. **Oncotarget**, v. 7, n. 12, p. 14336–14349, 2016.

KANG, H. J. et al. Spatio-temporal transcriptome of the human brain. **Nature**, v. 478, n. 7370, p. 483–489, out. 2011.

KEASEY et al. Inhibition of a novel specific neuroglial integrin signaling pathway increases STAT3-mediated CNTF expression. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, n. 1, p. 35, 2013.

KEASEY, M. P. et al. Vitamin-D receptor agonist calcitriol reduces calcification in vitro through selective upregulation of SLC20A2 but not SLC20A1 or XPR1. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25802, set. 2016.

KELLER, A. et al. Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. **Nature Genetics**, v. 45, n. 9, p. 1077–1082, 2013.

KHAN, K. et al. Recessive variants in ZNF142 cause a complex neurodevelopmental disorder with intellectual disability, speech impairment, seizures, and dystonia. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 11, p. 2532–2542, 2019.

KINOSHITA, Y. et al. Functional analysis of mutant FAM20C in Raine syndrome with FGF23-related hypophosphatemia. **Bone**, v. 67, p. 145–151, out. 2014.

KIROĞLU, Y. et al. Intracranial calcifications on CT. **Diagnostic and Interventional Radiology**, v. 16, n. 4, p. 263–269, 2010.

KIZIRIAN, A. **Cerebral White Matter and Gray Matter and Basal Ganglia**. Disponível em: <<https://antranik.org/cerebral-white-matter-and-gray-matter-and-basal-ganglia/>>.

KOJIMA, K. et al. MicroRNA122 is a key regulator of  $\alpha$ -fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, p. 310–338, 2011.

KOPELL, B. H. et al. Anatomy and Physiology of the Basal Ganglia: Implications for Deep Brain Stimulation for Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 21, n. 14, p. 238–246, 2006.

KOUL, R. **Functional Characterization of ZBTB20 and the Role of ZBTB20-Dependent Transcription Regulation in Autism Spectrum Disorders and Intellectual Disability**. [s.l: s.n.].

KRETH, S.; HÜBNER, M.; HINSKE, L. C. MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine: **Anesthesia & Analgesia**, v. 126, n. 2, p. 670–681, fev. 2018.

KUHN, H. G.; TODA, T.; GAGE, F. H. Adult Hippocampal Neurogenesis: A Coming-of-Age Story. **The Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 49, p. 10401–10410, 5 dez. 2018.

KUME, K. et al. The first Japanese case of primary familial brain calcification caused by an MYORG variant. **Journal of Human Genetics**, 25 maio 2020.

LA PIANA, R. et al. Neuroradiologic patterns and novel imaging findings in Aicardi-Goutières syndrome. **Neurology**, v. 86, n. 1, p. 28–35, 2016.

LEGATI, A. et al. Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. **Nature Genetics**, v. 47, n. 6, p. 29–39, 2015.

LEMOS, R. R. et al. An Update on Primary Familial Brain Calcification. In: **International Review of Neurobiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 110p. 349–371.

LEMOS, R. R. et al. Update and mutational analysis of SLC20A2: A major cause of primary familial brain calcification. **Human Mutation**, v. 36, n. 5, p. 489–495, 2015.

LI, G.; MA, X.; XU, L. **The Roles of Zinc Finger Proteins in Nonalcoholic Fatty Liver**. [s.l.] The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, 2020.

LI, Y.; MU, Y.; GAGE, F. H. Development of Neural Circuits in the Adult Hippocampus. In: **Current Topics in Developmental Biology**. [s.l.] Elsevier, 2009. v. 87p. 149–174.

LIGHTMAN, S. M.; UTLEY, A.; LEE, K. P. Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. May, p. 1–12, 2019.

LIU, G. et al. Regulation of hepatic lipogenesis by the zinc finger protein Zbtb20. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–13, 2017a.

LIU, P. et al. Inactivation of Fam20C in Cells Expressing Type I Collagen Causes Periodontal Disease in Mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e114396, 5 dez. 2014.

LIU, P. et al. Specific ablation of mouse Fam20C in cells expressing type I collagen leads to skeletal defects and hypophosphatemia. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3590, dez. 2017b.

LIU, X. et al. Zinc finger protein ZBTB20 promotes toll-like receptor-triggered innate immune responses by repressing I B gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. 11097–11102, 2013.

LIVINGSTON, J. H. et al. Recognizable phenotypes associated with intracranial calcification. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 55, n. 1, p. 46–57, 2013.

LORD, C. et al. Autism spectrum disorder. **The Lancet**, v. 392, n. 10146, p. 508–520, ago. 2018.

LULLA, C.; BAPAI, A. Raine Syndrome, a Rare Lethal Osteosclerotic Bone Dysplasia: Prenatal Diagnosis With 3-DIMENSIONAL Ultrasound and a Postnatal Clinical Exome Evaluation. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 40, n. 3, p. 641–643, mar. 2021.

MAMELI, C. et al. Natural history of non-lethal Raine syndrome during childhood. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, n. 1, p. 93, dez. 2020.

MARINHO, W. L. V. A.; DE OLIVEIRA, J. R. M. JAM2: A New Culprit at the Pathophysiology of Primary Familial Brain Calcification. **Journal of Molecular Neuroscience**, 20 mar. 2021.

MATHIJSEN, I. B.; VAN HASSELT-VAN DER VELDE, J.; HENNEKAM, R. C. M. Testicular cancer in a patient with Primrose syndrome. **European Journal of Medical Genetics**, v. 49, n. 2, p. 127–133, 2006.

MATTIOLI, F. et al. Novel de novo mutations in ZBTB20 in Primrose syndrome with congenital hypothyroidism. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 170, n. 6, p. 1626–1629, 2016.

MELIS, D. et al. Primrose syndrome: Characterization of the phenotype in 42 patients. **Clinical Genetics**, p. cge.13749, 20 abr. 2020.

MITCHELMORE, C. et al. Characterization of Two Novel Nuclear BTB/POZ Domain Zinc Finger Isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7598–7609, 2002.

MOLIN, A.-M. et al. A novel microdeletion syndrome at 3q13.31 characterised by developmental delay, postnatal overgrowth, hypoplastic male genitals, and characteristic facial features. **Journal of Medical Genetics**, v. 49, n. 2, p. 104–109, fev. 2012.

MOURA, D. A. P.; LEMOS, R. R.; OLIVEIRA, J. R. M. New Data from Pdfgbret/retMutant Mice Might Lead to a Paradoxical Association Between Brain Calcification, Pericytes Recruitment and BBB Integrity. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 63, n. 3–4, p. 419–421, 2017.

MOURA, D. A. P.; OLIVEIRA, J. R. M. XPR1: a Gene Linked to Primary Familial Brain Calcification Might Help Explain a Spectrum of Neuropsychiatric Disorders. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 57, n. 4, p. 519–521, dez. 2015.

NAGAO, M. et al. Zbtb20 promotes astrocytogenesis during neocortical development. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–14, 2016.

NAHAR, K. **The role of PDGF-B in brain blood vessels**. [s.l: s.n.].

NCBI. **ZBTB20 zinc finger and BTB domain containing 20 [Homo sapiens (human)]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26137#gene-expression>>.

NICOLAS, G. et al. Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. **Neurology**, v. 80, n. 2, p. 181–187, 2013.

NICOLAS, G. et al. Brain calcification process and phenotypes according to age and sex: Lessons from SLC20A2, PDGFB, and PDGFRB mutation carriers. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 168, n. 7, p. 586–594, 2015.

NICOLAS, G. et al. Estimation of minimal disease prevalence from population genomic data: Application to primary familial brain calcification. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 177, n. 1, p. 68–74, 2018.

NIELSEN, J. V. et al. Zbtb20 defines a hippocampal neuronal identity through direct repression of genes that control projection neuron development in the isocortex. **Cerebral Cortex**, v. 24, n. 5, p. 1216–1229, 2014.

OLIVEIRA, J. R. M.; OLIVEIRA, M. F. Primary brain calcification in patients undergoing treatment with the biphosphonate alendronate. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 22961–22961, 2016.

PAIVA, D. P.; KEASEY, M.; OLIVEIRA, J. R. M. MiR-9-5p Down-Regulates PiT2, but not PiT1 in Human Embryonic Kidney 293 Cells. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 62, n. 1, p. 28–33, maio 2017.

PENG, Y. et al. A novel mutation in MYORG causes primary familial brain calcification with central neuropathic pain. **Clinical Genetics**, v. 95, n. 3, p. 433–435, mar. 2019.

PETERSON, M. L.; MA, C.; SPEAR, B. T. Zhx2 and Zbtb20: Novel regulators of postnatal alpha-fetoprotein repression and their potential role in gene reactivation during liver cancer. **Semin Cancer Biol**, v. 21, n. 1, p. 21–27, 2011.

PIMENTEL, L. F.; LEMOS, R. R.; OLIVEIRA, J. R. Phosphate Transporters Expression in Patients with Primary Familial Brain Calcifications. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 62, n. 3–4, p. 276–280, 2017.

POSMYK, R. et al. New case of Primrose syndrome with mild intellectual disability. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 155, n. 11, p. 2838–2840, 2011.

PRIMROSE, D. A. a Slowly Progressive Degenerative Condition Characterized By Mental Deficiency, Wasting of Limb Musculature and Bone Abnormalities, Including Ossification of the Pinnae. **Journal of Intellectual Disability Research**, v. 26, n. 2, p. 101–106, 1982.

QUINTÁNS, B.; OLIVEIRA, J.; SOBRIDO, M. J. **Primary familial brain calcifications**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 147p. 317

RAINE, J. et al. Unknown syndrome: microcephaly, hypoplastic nose, exophthalmos, gum hyperplasia, cleft palate, low set ears, and osteosclerosis. **Journal of Medical Genetics**, v. 26, n. 12, p. 786–788, dez. 1989.

RAMOS, E. M. et al. Primary familial brain calcification. **GeneReviews**, p. 1–20, 2017.

RAMOS, E. M. et al. Primary brain calcification: an international study reporting novel variants and associated phenotypes. **European Journal of Human Genetics**, p. 26–40, 2018.

RAO, M. S.; JACOBSON, M. (EDS.). **Developmental neurobiology**. 4th ed ed. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2005.

RAZIN, S. V. et al. Cys2His2 zinc finger protein family: Classification, functions, and major members. **Biochemistry (Moscow)**, v. 77, n. 3, p. 217–226, mar. 2012.

RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405–423, 2015.

RIPAMONTI, S. et al. SUMOylation controls the neurodevelopmental function of the transcription factor Zbtb20. **Journal of Neurochemistry**, p. jnc.15008, 16 abr. 2020.

SAKAGUCHI, H. et al. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2015.

SARANZA, G. et al. Primary brain calcification due to a homozygous MYORG mutation causing isolated paroxysmal kinesigenic dyskinesia. **Brain**, v. 143, n. 5, p. e36–e36, 1 maio 2020.

SARNAT, H. B.; FLORES-SARNAT, L. Neuroembryology and brain malformations. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 111p. 117–128.

SCHIEMENZ, C. et al. Osteoclast imbalance in primary familial brain calcification: evidence for its role in brain calcification. **Brain: a journal of neurology**, v. 143, n. 1, p. e1–e1, 2019.

SCHOTTLAENDER, L. V. **Genetic analysis of multiple system atrophy and related movement disorders**. [s.l.: s.n.].

SCHOTTLAENDER, L. V. et al. Bi-allelic JAM2 Variants Lead to Early-Onset Recessive Primary Familial Brain Calcification. **The American Journal of Human Genetics**, v. 106, n. 3, p. 412–421, 2020.

SEIDAHMED, M. Z. et al. Report of a case of Raine syndrome and literature review. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 167, n. 10, p. 2394–2398, out. 2015.

SHETH, J. et al. A case of Raine syndrome presenting with facial dysmorphism and review of literature. **BMC Medical Genetics**, v. 19, n. 1, p. 76, dez. 2018.

SILBEREIS, J. C. et al. The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. **Neuron**, v. 89, n. 2, p. 248–268, jan. 2016.

SIMPSON, M. et al. Mutations in FAM20C also identified in non-lethal osteosclerotic bone dysplasia. **Clinical Genetics**, v. 75, n. 3, p. 271–276, mar. 2009.

SIMPSON, M. A. et al. Mutations in FAM20C Are Associated with Lethal Osteosclerotic Bone Dysplasia (Raine Syndrome), Highlighting a Crucial Molecule in Bone Development. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 5, p. 906–912, nov. 2007.

SREELATHA, A.; KINCH, L. N.; TAGLIABRACCI, V. S. The secretory pathway kinases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 10, p. 1687–1693, out. 2015.

STANDRING, S. **Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice**. 39. ed. [s.l.] Churchill Livingstone, 2004.

STELLACCI, E. et al. Clinical and functional characterization of two novel ZBTB20 mutations causing Primrose syndrome. **Human Mutation**, p. 1–16, 2018.

STILES, J.; JERNIGAN, T. L. The Basics of Brain Development. **Neuropsychology Review**, v. 20, n. 4, p. 327–348, dez. 2010.

SUN, H. et al. Severe brain calcification and migraine headache caused by SLC20A2 and PDGFRB heterozygous mutations in a five-year-old Chinese girl. p. 5, 1 abr. 2021.

SUN, Y. **Characterizing ZBTB20 as a novel regulator of CD8 T cell differentiation and metabolism**. Hanover, New Hampshire: Dartmouth College, abr. 2020.

SUTHERLAND, A. P. R. et al. Zinc Finger Protein Zbtb20 Is Essential for Postnatal Survival and Glucose Homeostasis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 10, p. 2804–2815, 2009.

SUZUKI, D. E. et al. Células-tronco e progenitores no sistema nervoso central: aspectos básicos e relevância clínica. **Einstein**, v. 6, n. 1, p. 93–96, 2008.

TADIC, V. et al. Primary familial brain calcification with known gene mutations: A systematic review and challenges of phenotypic characterization. **JAMA Neurology**, v. 72, n. 4, p. 460–467, 2015.

TAGLIA, I. et al. Primary familial brain calcification: Genetic analysis and clinical spectrum. **Movement Disorders**, v. 29, n. 13, p. 1691–1695, 2014.

TAMAI, K. et al. Fetal ultrasonographic findings including cerebral hyperechogenicity in a patient with non-lethal form of Raine syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 176, n. 3, p. 682–686, mar. 2018.

TAU, G. Z.; PETERSON, B. S. Normal Development of Brain Circuits. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 147–168, jan. 2010.

TONCHEV, A. B. et al. Zbtb20 modulates the sequential generation of neuronal layers in developing cortex. **Molecular Brain**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2016.

VAN BEECK CALKOEN, E. A. et al. The etiological evaluation of sensorineural hearing loss in children. **European Journal of Pediatrics**, 2019.

VASCO ARAGÃO, M. DE F. et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: Retrospective case series study. **BMJ (Online)**, v. 353, p. 1–10, 2016.

WANG, C. et al. Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. **Nature Genetics**, v. 44, n. 3, p. 254–256, 2012a.

WANG, X. et al. Expression of FAM20C in the Osteogenesis and Odontogenesis of Mouse. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 58, n. 11, p. 957–967, nov. 2010.

WANG, X. et al. Inactivation of a Novel FGF23 Regulator, FAM20C, Leads to Hypophosphatemic Rickets in Mice. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 5, p. e1002708, 17 maio 2012b.

WANG, X. et al. The Specific Role of FAM20C in Dentinogenesis. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 2, p. 330–336, fev. 2015.

WESTENBERGER, A.; BALCK, A.; KLEIN, C. Primary familial brain calcifications: genetic and clinical update. **Current Opinion Neurology**, v. 32, n. 4, p. 571–578, 2019.

WHYTE, M. P. et al. Raine Syndrome (OMIM #259775), Caused By *FAM20C* Mutation, Is Congenital Sclerosing Osteomalacia With Cerebral Calcification (OMIM 259660): CONGENITAL SCLEROSING OSTEOMALACIA. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 4, p. 757–769, abr. 2017.

WONG, R. **Generation and Utilization of Diverse Memory B Cells After Flavivirus Challenges**. [s.l: s.n.].

XIE, Z. et al. Zinc finger protein ZBTB20 is a key repressor of alpha-fetoprotein gene transcription in liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 31, p. 10859–10864, 2008.

XIE, Z. et al. Zbtb20 is essential for the specification of CA1 field identity in the developing hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 14, p. 6510–6515, 2010.

YALCIN, A. et al. Age and gender related prevalence of intracranial calcifications in CT imaging; data from 12,000 healthy subjects. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 78, p. 20–24, 2016.

YAMAMOTO-SHIMOJIMA, K. et al. Primrose syndrome associated with unclassified immunodeficiency and a novel ZBTB20 mutation Patient report. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 182, n. 3, p. 521–526, 2019.

YAO, X.-P. et al. Biallelic Mutations in MYORG Cause Autosomal Recessive Primary Familial Brain Calcification. **Neuron**, v. 98, n. 6, p. 1116- 1123.e5, jun. 2018.

ZARB, Y. et al. Ossified blood vessels in primary familial brain calcification elicit a neurotoxic astrocyte response. **Brain: a journal of neurology**, v. 142, n. 4, p. 885–902, 2019.

ZARB, Y.; FRANZOSO, F. D.; KELLER, A. Pericytes in Primary Familial Brain Calcification. In: **Pericyte Biology in Disease**. [s.l: s.n.]. p. 247–264.

ZHANG, H. et al. ZBTB20 is a sequence-specific transcriptional repressor of alpha-fetoprotein gene. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11979–11979, dez. 2015.

ZHANG, H. et al. ZBTB20 regulates EGFR expression and hepatocyte proliferation in mouse liver regeneration. **Cell Death and Disease**, v. 9, 2018.

ZHANG, W. et al. Identification and Characterization of DPZF, a Novel Human BTB/POZ Zinc Finger Protein Sharing Homology to BCL-6. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 4, p. 1067–1073, abr. 2001.

ZHANG, Y. et al. The zinc finger protein ZBTB20 regulates transcription of fructose-1,6-bisphosphatase 1 and  $\beta$  cell function in mice. **Gastroenterology**, v. 142, n. 7, p. 1571–1580, 2012.

ZHOU, G. et al. Zbtb20 regulates the terminal differentiation of hypertrophic chondrocytes via repression of Sox9. **Development**, v. 142, n. 2, p. 385–93, 2015.

ZHU, C. et al. Regulation of the development and function of B cells by ZBTB transcription factors. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, p. 1–8, 2018.

# APÊNDICE A – ARTIGO 1: LACK OF MAJOR OPHTHALMIC FINDINGS IN PATIENTS WITH PRIMARY FAMILIAL BRAIN CALCIFICATION LINKED TO SLC20A2 AND PDGFB (FI 2020: 3,444)

Journal of Molecular Neuroscience  
https://doi.org/10.1007/s12031-018-1250-8



## Lack of Major Ophthalmic Findings in Patients with Primary Familial Brain Calcification Linked to *SLC20A2* and *PDGFB*

Rayssa Leal Borges-Medeiros<sup>1</sup> · Laura Durão Ferreira<sup>1</sup> · João Ricardo Mendes de Oliveira<sup>1,2</sup>

Received: 9 December 2018 / Accepted: 21 December 2018  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

### Abstract

Primary familial brain calcification (PFBC) is a rare neurodegenerative disorder characterized by symmetrical and bilateral brain calcification. It is typically inherited as an autosomal dominant disorder, and de novo variants have also been described. Interestingly, just recent studies have reported the first autosomal recessive PFBC-causative gene. PFBC patients exhibit high clinical heterogeneity including Parkinsonism, dystonia, ataxia, depression, and migraine. Mice studies, an important research tool, have been a breakthrough in increasing the understanding of PFBC's main signs and symptoms, and many findings reported in these mice have been subsequently reported in patients. One phenotype that has been observed in PFBC mice models but not in PFBC patients, however, is the development of ophthalmic abnormalities. This way, this report focused on performing an ophthalmic assessment in six Brazilian patients genetically diagnosed with PFBC. The assessments showed that none of the PFBC individuals included presented any of the ophthalmic abnormalities reported in mice models, such as cataracts, ocular calcification, abnormal iris and lens morphology, and retinal deterioration. Additionally, of the six PFBC patients described, two *SLC20A2* mutation carriers showed physiological excavation of the optic nerve head and partial vitreous detachment, while just one individual presented bilateral narrowing of retinal arterioles. In summary, no evidence of similar ophthalmological abnormalities found in mice were found in our patients; nonetheless, further studies in larger sample size are warranted to corroborate with our findings. To our knowledge, this study is the first to focus on investigating, in PFBC patients, the ophthalmological phenotypes described in the PFBC mice models.

**Keywords** Brain calcification · *SLC20A2* · *PDGFB* · Eye globe

Dear Editor,

Primary familial brain calcification (PFBC), formerly known as Fahr's disease, is a rare neuropsychiatric condition characterized by the presence of symmetric and bilateral calcifications mainly in the basal ganglia, in absence of secondary causes (Quintáns et al. 2018). To date, mutations in four different genes

(*SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, and *XPR1*) causing autosomal dominant trait (and also reported as de novo) have been shown to be involved with the development of this disease, and all variants result in a loss of protein function (Wang et al. 2012a; Keller et al. 2013; Anheim et al. 2016). Additionally, just recently, the *MYORG* gene has been described as the first gene associated with autosomal recessive inheritance of PFBC (Yao et al. 2018).

Clinically, PFBC proves to be extremely heterogeneous, ranging from asymptomatic patients to those with severe and progressive cognitive, motor and/or psychiatric impairment (Quintáns et al. 2018). Taking this into consideration, animal model studies provide important information regarding the broad range of signs and symptoms that can arise from mutations in some of the PFBC genes (Lindblom et al. 2003; Jensen et al. 2013, 2016; Wallingford et al. 2016). This is of great importance as it brings the attention to manifestations that have yet to be described in PFBC patients, making physicians more alert and open to new findings in affected individuals, in addition to brain calcification.

Rayssa Leal Borges-Medeiros and Laura Durão Ferreira contributed equally to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12031-018-1250-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ João Ricardo Mendes de Oliveira  
joao.ricardo@ufpe.br

<sup>1</sup> Keizo Asami Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>2</sup> Neuropsychiatric Department, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil

*Slc20a2* knockout (KO) mice studies showed the development of extensive and bilateral brain calcifications, in agreement with what had already been reported in PFBC patients (Jensen et al. 2013). Additionally, these studies also helped to identify the occurrence of elevated cerebrospinal fluid inorganic phosphate levels in mice (Wallingford et al. 2016; Jensen et al. 2016), which was also detected in humans upon further investigation (Paucar et al. 2017; Hozumi et al. 2018). Furthermore, this animal model has also been reported to have ophthalmic abnormalities including ocular calcification, altered iris morphology, and cataracts (Dickinson et al. 2016). Lastly, when it comes to *Pdgfr* retention-motif KO (*Pdgfr<sup>ret</sup>*) and *Myorg* KO mice, both exhibit brain calcifications but show no evidence of intraocular calcification was reported (Lindblom et al. 2003; Keller et al. 2013; Dickinson et al. 2016; Yao et al. 2018).

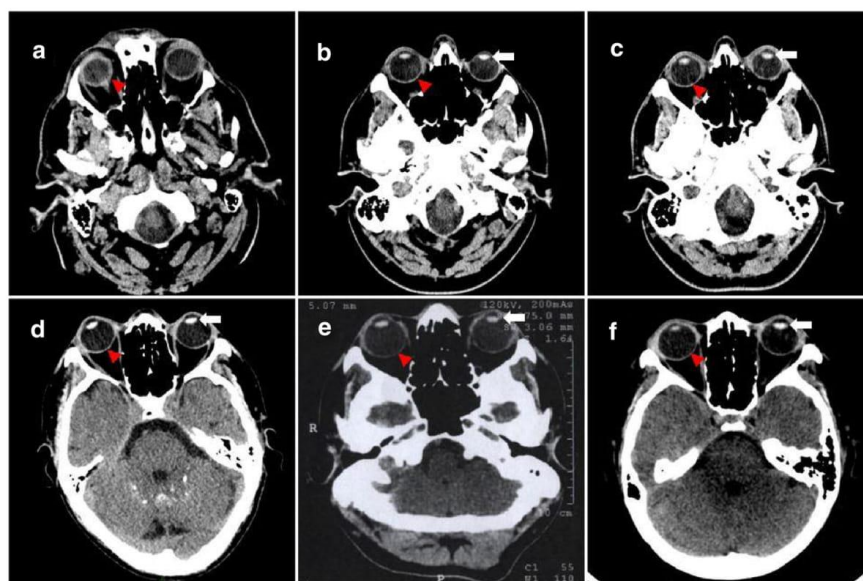
A common finding in both *Slc20a2* and *Pdgfr* KO models worth mentioning is abnormalities in the eyes, including abnormal lens and iris morphology, cataracts in the former, and retinal changes in the latter (Lindblom et al. 2003; Dickinson et al. 2016). In this report, we present novel information regarding the lack of ophthalmologic abnormalities in previously described PFBC patients (Keller et al. 2013; Lemos et al. 2013, 2015; Ferreira et al. 2014; Ramos et al. 2018).

A total of six Brazilian patients of four unrelated families with confirmed PFBC diagnosis were included in this report. The pedigrees of the families can be found on previously

published works (Keller et al. 2013; Lemos et al. 2013, 2015; Ferreira et al. 2014; Ramos et al. 2018). Patients A, B, and C are from the same family and all have a mutation on the *PDGFB* gene, while all other patients have mutations on *SLC20A2*. Computed tomography (CT) scan images were assessed to determine presence or absence of ocular calcifications, and retinal mapping exams were also performed.

CT scans of patients A, B, C, D, E, and F showcasing their orbital space are shown in Fig. 1a–f, respectively. There is no evidence of abnormal lens morphology, optic, or retina calcifications, as previously reported in animal studies (Dickinson et al. 2016).

Additionally, retinal mapping exams were performed in all six patients. Patients A, B, C, and E examinations showed no abnormal findings, including intraocular calcifications. Patient D and patient F showed physiological optical nerve excavation and partial vitreous detachment; lens, macula, and retina were normal in both patients. Vitreous detachment is a common ophthalmic finding in patients over 50, its incidence increases with age, and it has been associated with other conditions such as cataracts, glaucoma and certain types of LASIK (laser in situ keratomileusis) surgery (Lorenzo Carrero 2012; Schwab et al. 2017; Osman et al. 2017). Lastly, patient F, carrier of a de novo variant on *SLC20A2*, presented arterial narrowing in both eyes. This sign is a result of increased peripheral vascular resistance and has been strongly



**Fig. 1** Brain CT scans available from five PFBC patients showing absence of retina or optic nerve calcifications (a–f) and normal lens morphology (b–f). White arrows indicate the lens. Red arrow heads indicate the retina

associated as a predictor of hypertension (Wang et al. 2012b). An image from the retinal mapping exam from patient F can be seen in Supplementary Fig. 1 and the CT scan of a non-PFBC control is shown in Supplementary Figure 2.

Even though these results do not agree with what was described in animal models, this is easily explained by the fact that the animal models where these issues were described have both alleles of the gene affected, whereas PFBC patients only have one copy harboring mutations. Taking this into consideration, our findings, although preliminary due to small number of patients, suggest that not all *Slc20a2*<sup>−/−</sup> and *Pdgfrb*<sup>ret/ret</sup> animal model findings reflect onto clinical features observed in human patients.

To our knowledge, this is the first report that focused on assessing ophthalmological features in PFBC patients, although this is not the first one to analyzed phenotypes other than calcification. Similar to our report, another study which also performed an ophthalmologic examination, but in a *PDGFRB* patient, also found no evidence of eyes abnormalities (Nicolas et al. 2013). Two different studies already analyzed skin biopsies of PFBC subjects, finding evidences of microangiopathy and hypodermal microvessel calcifications (Biancheri et al. 2016; Nicolas et al. 2017).

On the other hand, it is also relevant to highlight that these studies referred to microscopic assessments, while our report referred to structural-eyes analyzes. Regardless, it is important to remain aware of the possibility of eye-related pathologies developing in PFBC patients. Only upon replication of these findings in a larger cohort that it will be possible to completely dissociate these findings from this disorder.

**Acknowledgments** The contributions of the authors to this letter were financially supported by CNPq, Brazil.

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## References

- Anheim M, López-Sánchez U, Giovannini D, Richard AC, Touhami J, N'Guyen L, Rudolf G, Thibault-Stoll A, Frebourg T, Hannequin D, Campion D, Battini JL, Sitbon M, Nicolas G (2016) XPR1 mutations are a rare cause of primary familial brain calcification. *J Neurol* 263:1559–1564. <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8166-4>
- Biancheri R, Severino M, Robbiano A, Iacomino M, del Sette M, Minetti C, Cervasio M, del Basso de Caro M, Striano P, Zara F (2016) White matter involvement in a family with a novel PDGFB mutation. *Neurol Genet* 2:e77. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000077>
- Dickinson ME, Flenniken AM, Ji X et al (2016) High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature* 537:508–514. <https://doi.org/10.1038/nature19356>
- Ferreira JB, Pimentel L, Keasey MP, Lemos RR, Santos LM, Oliveira MF, Santos S, Jensen N, Teixeira K, Pedersen L, Rocha CR, Dias da Silva MR, Oliveira JRM (2014) First report of a De novo mutation at SLC20A2 in a patient with brain calcification. *J Mol Neurosci* 54:748–751. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0357-9>
- Hozumi I, Kurita H, Ozawa K, Furuta N, Inden M, Sekine SI, Yamada M, Hayashi Y, Kimura A, Inuzuka T, Seishima M (2018) Inorganic phosphorus (Pi) in CSF is a biomarker for SLC20A2-associated idiopathic basal ganglia calcification (IBGC1). *J Neurol Sci* 388:150–154. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.03.014>
- Jensen N, Autzen JK, Pedersen L (2016) Slc20a2 is critical for maintaining a physiologic inorganic phosphate level in cerebrospinal fluid. *Neurogenetics* 17:125–130. <https://doi.org/10.1007/s10048-015-0469-6>
- Jensen N, Schröder HD, Hejbøl EK, Fuchtbauer EM, de Oliveira JRM, Pedersen L (2013) Loss of function of Slc20a2 associated with familial idiopathic basal ganglia calcification in humans causes brain calcifications in mice. *J Mol Neurosci* 51:994–999. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0085-6>
- Keller A, Westenberger A, Sobrido MJ, García-Murias M, Domingo A, Sears RL, Lemos RR, Ordoñez-Ugalde A, Nicolas G, da Cunha JEG, Rushing EJ, Hugelshofer M, Wurnig MC, Kaech A, Reimann R, Lohmann K, Dobričić V, Carracedo A, Petrović I, Miyasaki JM, Abakumova I, Mäe MA, Raschperger E, Zatz M, Zschiedrich K, Klepper J, Spiteri E, Prieto JM, Navas I, Preuss M, Dering C, Janković M, Paurcar M, Svenningsson P, Salimnejad K, Khorshid HRK, Novaković I, Aguzzi A, Boss A, le Ber I, Defer G, Hannequin D, Kostić VS, Campion D, Geschwind DH, Coppola G, Betsholtz C, Klein C, Oliveira JRM (2013) Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nat Genet* 45:1077–1082. <https://doi.org/10.1038/ng.2723>
- Lemos RR, Oliveira MF, Oliveira JRM (2013) Reporting a new mutation at the SLC20A2 gene in familial idiopathic basal ganglia calcification. *Eur J Neurol* 20:e43–e44. <https://doi.org/10.1111/ene.12044>
- Lemos RR, Ramos EM, Legati A, Nicolas G, Jenkinson EM, Livingston JH, Crow YJ, Campion D, Coppola G, Oliveira JRM (2015) Update and mutational analysis of SLC20A2: a major cause of primary familial brain calcification. *Hum Mutat* 36:489–495. <https://doi.org/10.1002/humu.22778>
- Lindblom P, Gerhardt H, Liebner S et al (2003) Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev* 17:1835–1840. <https://doi.org/10.1101/gad.266803>
- Lorenzo Carrero J (2012) Incomplete posterior vitreous detachment: prevalence and clinical relevance. *Am J Ophthalmol* 153:497–503. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2011.08.036>
- Nicolas G, Marguet F, Laquerrière A, Mendes de Oliveira JR, Hannequin D (2017) Microangiopathy in primary familial brain calcification: evidence from skin biopsies. *Neurol Genet* 3:e134. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000134>
- Nicolas G, Pottier C, Maltête D et al (2013) Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology* 80:181–187. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31827ccf34>
- Osman MH, Khalil NM, El-Agha M-S (2017) Incidence of posterior vitreous detachment after femtosecond LASIK compared with microkeratome LASIK. *Cornea* 36:1036–1039. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001277>
- Paurcar M, Almqvist H, Jelic V, Hagman G, Jörneskog G, Holmin S, Björkhem I, Svenningsson P (2017) A SLC20A2 gene mutation carrier displaying ataxia and increased levels of cerebrospinal fluid phosphate. *J Neurol Sci* 375:245–247. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.02.007>

- Quintáns B, Oliveira J, Sobrido MJ (2018) Primary familial brain calcifications. *Handbook of Clinical Neurology*
- Ramos EM, Carecchio M, Lemos R et al (2018) Primary brain calcification: an international study reporting novel variants and associated phenotypes. *Eur J Hum Genet* 26:1462–1477. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0185-4>
- Schwab C, Glatz W, Schmidt B, Lindner E, Oettl K, Riedl R, Wedrich A, Ivastinovic D, Velikay-Parel M, Mossboeck G (2017) Prevalence of posterior vitreous detachment in glaucoma patients and controls. *Acta Ophthalmol* 95:276–280. <https://doi.org/10.1111/aos.13339>
- Wallingford M, Chia J, Leaf E et al (2016) SLC20A2 deficiency in mice leads to elevated phosphate levels in cerebrospinal fluid and glymphatic pathway-associated arteriolar calcification, and recapitulates human idiopathic basal ganglia calcification. *Brain Pathol* 3: [Epub ahead of print]:64–76. <https://doi.org/10.1111/bpa.12362>
- Wang C, Li Y, Shi L, Ren J, Patti M, Wang T, de Oliveira JRM, Sobrido MJ, Quintáns B, Baquero M, Cui X, Zhang XY, Wang L, Xu H, Wang J, Yao J, Dai X, Liu J, Zhang L, Ma H, Gao Y, Ma X, Feng S, Liu M, Wang QK, Forster IC, Zhang X, Liu JY (2012a) Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat Genet* 44:254–256. <https://doi.org/10.1038/ng.1077>
- Wang S, Xu L, Jonas JB, Wang YS, Wang YX, You QS, Yang H, Zhou JQ (2012b) Five-year incidence of retinal microvascular abnormalities and associations with arterial hypertension: the Beijing eye study 2001/2006. *Ophthalmology* 119:2592–2599. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.06.031>
- Yao XP, Cheng X, Wang C, Zhao M, Guo XX, Su HZ, Lai LL, Zou XH, Chen XJ, Zhao Y, Dong EL, Lu YQ, Wu S, Li X, Fan G, Yu H, Xu J, Wang N, Xiong ZQ, Chen WJ (2018) Biallelic mutations in MYORG cause autosomal recessive primary familial brain calcification. *Neuron* 98:1116–1123.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.037>

# APÊNDICE B - ARTIGO 2: EXPANSION OF THE PRIMROSE SYNDROME PHENOTYPE THROUGH THE COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO NEW CASE REPORTS WITH ZBTB20 VARIANTS (FI 2021: 2,802)

Received: 2 May 2019 | Revised: 18 June 2019 | Accepted: 3 July 2019

DOI: 10.1002/ajmg.a.61297

## CLINICAL REPORT

AMERICAN JOURNAL OF  
medical genetics **A** WILEY

## Expansion of the Primrose syndrome phenotype through the comparative analysis of two new case reports with *ZBTB20* variants

Laura D. Ferreira<sup>1</sup> | Rayssa L. Borges-Medeiros<sup>1</sup> | Jenny Thies<sup>2</sup> | Rhonda E. Schnur<sup>3</sup> | Christina Lam<sup>2,4</sup> | João R. M. de Oliveira<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Keizo Asami Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>2</sup>Division of Genetic Medicine, Seattle Children's Hospital, Seattle, Washington

<sup>3</sup>Clinical Genomics Program, GeneDx, Gaithersburg, Maryland

<sup>4</sup>Division of Genetic Medicine, University of Washington, Seattle, Washington

<sup>5</sup>Neuropsychiatry Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

### Correspondence

João R. M. de Oliveira, Neuropsychiatry Department, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil.  
Email: joao.ricardo@ufpe.br

### Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 310150/2016-7; Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Grant/Award Numbers: IBPG-0749-2.02/16, IBPG-0750-2.02/16

### Abstract

Primrose syndrome (PRIMS), a rare genetic disorder with several clinical findings including intellectual disability, macrocephaly, typical facial features, and muscle wasting, is caused by heterozygous variants in the *ZBTB20* gene. We report the cases of two males diagnosed with PRIMS at different ages, emphasizing the likely progressive nature of the disorder, as well as the differences and similarities of presentation during infancy and adulthood. Patient 1 is a 2-year-old American male with a medical history marked by impaired hearing, developmental delays, and fainting spells. Patient 2 is a 28-year-old Brazilian male, who presents with a phenotype similar to that seen in Patient 1 with additional features of ectopic calcifications and prominent muscular and skeletal abnormalities. Additionally, Patient 2 has a history of fainting spells and diminished body height and weight, with the latter features having only been reported in one PRIMS patient so far. Both Patients 1 and 2 were found to carry heterozygous likely pathogenic missense variants, detected in the last coding exon of *ZBTB20* (c.1822T>C, p.Cys608Arg, de novo, and c.1873A>G, p.Met625Val, respectively), consistent with PRIMS. Overall, these case reports highlight PRIMS's likely progressive nature and contribute to the understanding of the natural history of this condition.

### KEYWORDS

developmental delay, ectopic calcification, intellectual disability, Primrose syndrome, *ZBTB20*

## 1 | INTRODUCTION

Primrose syndrome (PRIMS; OMIM #259050) is a very rare autosomal dominant disorder first described in 1982 (Primrose, 1982). This syndrome has a variable phenotype characterized by distal muscle wasting, hypotonia, cognitive delays, intellectual disability, hearing loss, postnatal overgrowth, and characteristic facial features. Calcified external ears are also often present (Carvalho & Speck-Martins, 2011; Casertano et al., 2017; Cordeddu et al., 2014; Mattioli et al., 2016).

In 2014, Cordeddu and colleagues described heterozygous variants in *ZBTB20* (most de novo) in eight patients previously diagnosed clinically with PRIMS. Thus far, there have been a total of 22 individuals with molecularly confirmed PRIMS reported in the literature (Alby et al., 2018; Casertano et al., 2017; Cleaver et al., 2019; Cordeddu et al., 2014; Grímsdóttir et al., 2018; Hersh et al., 2015; Mattioli et al., 2016; Stellacci et al., 2018).

*ZBTB20*, located on chromosome 3q13.31, encodes a zinc-finger protein that contains a highly conserved broad complex, Tramtrack, and Bric-à-brac (BTB) domain at the N terminus and five C2H2

zinc-finger domains (ZnF) at the C terminus (Sutherland et al., 2009). It plays an essential role as a transcriptional repressor interacting with genomic DNA through its ZnF domains and has also been implicated in regulating glucose homeostasis, immune responses, and development (Sutherland et al., 2009; Xie et al., 2008).

Here, we report two additional individuals diagnosed with PRIMS with some novel features. Both subjects were confirmed to harbor likely pathogenic heterozygous variants in the *ZBTB20* gene. Patient 1 is a 2-year-old American male with a medical history marked by developmental delays and hearing impairment. Patient 2 is a 28-year-old Brazilian male with unique features, including short first metatarsals, persistence of the cavum septum pellucidum and carvum vergae, and progressively diminishing growth rate. This is the second reported case of PRIMS in Brazil and the third in the United States.

## 2 | SUBJECTS AND METHODS

### 2.1 | Editorial policies and ethical considerations

Clinical studies were approved by Institutional Review Board at the registries STUDY00001495 and CAAE-0296.0.172.000-08. Informed consent was obtained from the parents of both subjects for genetic testing, publication of clinical pictures, and the processing of personal data. Variants were deposited to ClinVar and dbSNP.

### 2.2 | Clinical reports

#### 2.2.1 | Patient 1

Patient 1 is a young male born to unrelated parents of European ancestry. He was born at 42 weeks gestation via emergency C-section for intolerance of labor, with fetal heart decelerations and presence of a pinched umbilical cord; the pregnancy was otherwise uncomplicated, and his birth weight was 3.340 kg (49th percentile). He failed his newborn hearing screens and was subsequently diagnosed with mild to moderate sensorineural hearing loss.

At 7 months, he was found to have macrocephaly and positional plagiocephaly for which he underwent molding helmet therapy. Brain imaging at 8 months noted macrocephaly without ventriculomegaly as well as hypoplasia of the corpus callosum. The genu region was present, but the corpus callosum was otherwise absent. Repeat brain magnetic resonance imaging (MRI) at 25 months of age noted an absent splenium of the corpus callosum, with hypoplasia/near-complete aplasia of the body and rostrum.

The patient had a skeletal survey at 19 months that showed mild thoracolumbar junction kyphosis and multiple wormian bones. He has a history of fainting spells provoked by becoming upset, consisting of hyperventilation, perioral cyanosis, and brief loss of consciousness. At 22 months of age, the patient had a normal echocardiogram and an electrocardiogram that noted sinus tachycardia, but was otherwise normal. He also has a history of severe constipation that is currently well managed and is thought to be a result of his overall hypotonia.

Patient 1 also had global developmental delay. At 30 months, he was not able to get into a sitting position, nor was he pulling to stand. If placed into a crawling position, he could transition into a sitting position and was able to scoot from place to place on his buttocks. He was also starting to stand in place with the use of a walker, but he could not take steps himself. He was able to point and follow single-step commands, and had a five-word vocabulary.

At 2 years 10 months, his length was 97.7 cm (83rd percentile), weight was 14.7 kg (64th percentile), and head circumference was 52.8 cm (96th percentile). On physical exam, he appeared to be macrocephalic with residual plagiocephaly, with deep set eyes; he was also hypotonic (Figure 1; Table S51).

He previously had a nondiagnostic biochemical genetics evaluation, including an acylcarnitine profile, very long chain fatty acids, plasma amino acids, urine mucopolysaccharides, urine oligosaccharides, 7-dehydrocholesterol, carbohydrate-deficient transferrin analysis, and Apo CIII profiling. In addition, he had a normal chromosomal SNP microarray and *SMN1* dosage analysis.

Patient 1 was subjected to clinical trio exome sequencing. Using genomic DNA from the proband and parents, the exonic regions and flanking splice junctions of the genome were captured using the IDT xGen Exome Research Panel v1.0. Massively parallel (NextGen) sequencing was performed on an Illumina system with 100 bp or greater paired-end reads. Reads were aligned to human genome build GRCh37/UCSC hg19 and analyzed for sequence variants using a custom-developed analysis tool. Additional sequencing technology and variant interpretation protocol have been previously described (Retterer et al., 2016). The general assertion criteria for variant classification are publicly available on the GeneDx ClinVar submission page (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ClinVar/submitters/26957/>). This exome sequencing with mitochondrial genome analysis identified a novel heterozygous de novo likely pathogenic variant (c.1822T>C, p. Cys608Arg; SCV000899114) in *ZBTB20* (NM\_001164342.2). In silico assessment by Provean scoring suggested that p.Cys608Arg would be damaging. This variant is absent in large population databases (GnomAD; Lek et al. 2016). No additional pathogenic variants were detected.

#### 2.2.2 | Patient 2

Born at term via cesarean delivery after an uneventful pregnancy, Patient 2 is the fourth child (with healthy siblings) of his unrelated mother and father, who were 41 and 39 years, respectively, at the time of the birth. No documented complications occurred during birth; however, per parental report, he did not cry immediately. Birth weight was 3.2 kg (38th percentile) and birth length was 48 cm (26th percentile).

At age 18 months, his physician noted strabismus, and developmental and cognitive delays were noticed by the family in the following decade. The patient was able to sit unassisted at 6 months although he never crawled and walked late. Moderate hearing loss was diagnosed during childhood, and the family reported that he suffered from fainting spells during infancy, mainly when he became



**FIGURE 1** Front and profile pictures of Patient 1 at 22 months (a,b) and Patient 2 at 27 years (c,d), highlighting Primrose syndrome's characteristic facial features such as deep set eyes, downslanted palpebral fissures, ptosis, wide forehead, and large ears

upset. Similar to Patient 1, his fainting spells consisted of hyperventilation and cyanosis, followed by loss of consciousness; these episodes have completely resolved after infancy.

Patient 2 also has a medical history of skeletal abnormalities and behavioral issues. When he was 18 years old, his mother first noticed distal muscle wasting, affecting his knees, shoulders, distal, and proximal phalanges (Figure S51b–d). The condition progressively worsened and caused difficulty in walking; creatine kinase values were normal, and an echocardiogram detected no evidence of cardiomyopathy, besides the incidental finding of a systolic murmur. At age 21, he presented with aggressive behavior, was diagnosed with autism spectrum disorder, and treated with risperidone. Impaired hearing persisted, and the skeletal abnormalities previously noted by relatives were classified as lumbar hyperlordosis and *genu valgum* (Figure S51c,d), prompting his referral to physical therapy.

Ectopic calcifications were also detected in Patient 2's outer ears and brain. Neuroimaging studies (CT and MRI) at age 21 detected diminished gyri in the frontal lobe, persistence of the *cavum septum pellucidum* (CSP) and *cavum vergae* (CV) cyst, and bilateral basal ganglia calcifications (not shown). Six years later, calcified pinnae were noticed during a routine consultation.

Patient 2 did not grow as expected and showed progressively diminishing growth rate although in infancy he was tall for his age. When he was 1 year old, he weighed 10 kg (63rd percentile) and

measured 81 cm (99th percentile); at age 3, he weighed 12.7 kg (15th percentile) and measured 90 cm (5th percentile); at age 6, the patient weighed 19 kg (28th percentile) and measured 100 cm (0.2nd percentile). At the age of 27, he weighed 53 kg and his height was 165 cm, with normal head circumference (55 cm). Currently, the patient has brachycephaly, wide forehead, ptosis, deep set eyes, and other characteristic facial features (Figure 1; Table S51). Torus palatinus, sparse body hair, and short first metatarsals were also seen (Figure S51a,c,d). He also showed mutism, developing communication by mimicry; in addition, his mother reported that he has never cried with tears.

Biochemical analysis showed normal levels of parathyroid hormone, calcium, phosphorus, thyroid stimulating hormone, and free T3 and T4 even though he had a slightly elevated fasting blood glucose. Electroencephalogram and electroneuromyography were normal.

Considering all clinical features, PRIMS was considered a probable diagnosis. Genetic analysis of *ZBTB20* in Patient 2 was performed by polymerase chain reaction amplification of coding exons and intronic sequences near the exon boundaries, using primers previously reported (Cordeddu et al., 2014), followed by direct Sanger sequencing. Sanger sequencing identified a heterozygous missense variant c.1873A>G in exon 5 (coding exon 4) of the *ZBTB20* (NM\_001164342.2). This variation predicts a methionine to valine substitution in position 625 of the protein (p.Met625Val, NP\_001157814.1), within the second zinc-finger domain. In silico assessment by PolyPhen-2, SIFT, and MutationTaster

suggested the p.Met625Val variant to be likely pathogenic, damaging, and probably deleterious, respectively. This variant was not found in his mother or in any of his siblings; his father's DNA was unavailable. Additionally, this variant was not found in the ExAC Browser, 1000 Genome Project, gnomAD, or ABraOM databases. This variant was however previously deposited in NCBI's ClinVar and dbSNP databases (rs1064795382), also as a likely pathogenic variant, even though the supporting clinical data were not publicly available.

### 3 | DISCUSSION

PRIMS is a very rare genetic condition with variable but severe clinical presentations that include what appears to be a progressive form of muscle wasting, intellectual disability, brain calcification, calcified pinnae, and various dysmorphic features, some of which only occur later in life (Alby et al., 2018; Carvalho & Speck-Martins, 2011; Cordeddu et al., 2014). PRIMS is caused by heterozygous missense variants in *ZBTB20*. Over 60% of the variants reported are located in the ZnF domains of this gene, which are predicted to alter its binding affinity to DNA (Alby et al., 2018; Casertano et al., 2017; Cleaver et al., 2019; Cordeddu et al., 2014; Hersh et al., 2015; Mattioli et al., 2016). In agreement, both variants reported here affect the second ZnF domain of *ZBTB20*, within which several other disease-associated variants have been reported. This supports the hypothesis that missense variants altering the wild-type ZnF domains in *ZBTB20* are more likely to affect protein structure and function and thus are more likely to be pathogenic than variants in other sites, such as the BTB domain (Cleaver et al., 2019).

Both patients reported here have a heterozygous missense variant affecting the last coding exon of *ZBTB20* and the second zinc-finger domain of the *ZBTB20* protein; According to the American College of Medical Genetics and Genomics guidelines, both variants are likely pathogenic (Richards et al., 2015). While Patient 1 has a novel de novo variant, never described in a patient with PRIMS, Patient 2 has an apparently recurrent variant that was previously detected and deposited in NCBI's ClinVar and dbSNP databases (rs1064795382) as a likely pathogenic variant. Very few variants in *ZBTB20* associated with PRIMS have been recurrent, and the fact that Patient 2's variant has been seen before in another affected individual reinforces the pathogenicity of this variant (Cordeddu et al., 2014; Rossi et al., 2017).

The majority of Patient 1's presentation is largely typical for PRIMS in early infancy, being characterized by hearing impairment, cognitive, and developmental delays, as well as variable skeletal abnormalities. However, fainting spells that were very significant to his chief complaint and presentation have not been previously reported in PRIMS.

Patient 2, however, is somewhat more atypical given his documented progressive failure to thrive as opposed to the increased post-natal growth that is widely described as one of the hallmarks of this disorder (Mattioli et al., 2016). At the age of 27, his height and weight

were a clear difference to that of previously reported adult PRIMS patients (Carvalho & Speck-Martins, 2011; Casertano et al., 2017; Mattioli et al., 2016). Unfortunately, growth hormones were not evaluated during this patient's childhood or adolescence. To our knowledge, this is only the second time failure to thrive that has been reported in patients diagnosed with PRIMS (Grimsdóttir et al., 2018). Additionally, CSP and CV cysts, short first metatarsals, and alacrima have not been described before in the cases of PRIMS, although these findings could be coincidental (Decherchi, 2005; Hersh et al., 2015). Interestingly, similar to Patient 1, Patient 2 also experienced significant fainting spells during infancy, giving more evidence of their relationship with PRIMS. New findings aside, Patient 2 illustrates the progression of PRIMS and highlights how specific signs and symptoms tend to develop in certain timeframes, such as hearing impairment and developmental delays early in life, and ectopic calcifications (affecting the basal ganglia and pinnae) and muscular atrophy past the second decade of life.

Overall, these case reports show how PRIMS typically progresses throughout a patient's lifespan, emphasizing a broader spectrum of presentations in early infancy and adulthood. Additionally, both cases have frontal bossing, deep set eyes, large ears, and prominent chins, which seem to be characteristic features of PRIMS patients. They also expand the phenotypic spectrum, especially with regard to fainting spells, which may not be specific to this condition but should be highlighted in order to increase awareness. Other associations may include constipation and alacrima. Additional studies including more patients are necessary not only to ensure more accurate and encompassing clinical descriptions of the syndrome but also to help determine its true frequency.

### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the patients' families for their participation in the study. L.D.F. and R.L.B.-M. received fellowships from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE). J.R.M.O. received funding from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Process Number 310150/2016-7). We would like to thank GeneDx, G. Leal, H. Lacerda, R. Gitirana, L. Pimentel, J. Ferreira, E. Santos-Júnior, D. Moura, and E. Cunha for technical support and helpful discussion.

### CONFLICT OF INTEREST

L.D.F., R.L.B.-M., J.T., C.L., and J.R.M.O. declare no conflict of interest. R.E.S. is an employee of GeneDx, Inc.

### ORCID

Laura D. Ferreira  <https://orcid.org/0000-0003-3150-8731>

João R. M. de Oliveira  <https://orcid.org/0000-0001-7474-9266>

## REFERENCES

- Alby, C., Boudaud, L., Bessi res, B., Serre, V., Rio, M., Cormier-Daire, V., ... Thomas, S. (2018). Novel de novo ZBTB20 mutations in three cases with Primrose syndrome and constant corpus callosum anomalies. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 176(5), 1091–1098. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38684>
- Carvalho, D. R., & Speck-Martins, C. E. (2011). Additional features of unique Primrose syndrome phenotype. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 155(6), 1379–1383. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33955>
- Casertano, A., Fontana, P., Hennekam, R. C., Tartaglia, M., Genesio, R., Dieber, T. B., ... Melis, D. (2017). Alterations in metabolic patterns have a key role in diagnosis and progression of Primrose syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 173(7), 1896–1902. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38124>
- Cleaver, R., Berg, J., Craft, E., Foster, A., Gibbons, R. J., Hobson, E., ... Tatton-Brown, K. (2019). Refining the Primrose syndrome phenotype: A study of five patients with ZBTB20 de novo variants and a review of the literature. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 179(3), 344–349. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61024>
- Cordeddu, V., Redeker, B., Stellacci, E., Jongejan, A., Fragale, A., Bradley, T. E. J., ... Hennekam, R. C. (2014). Mutations in ZBTB20 cause Primrose syndrome. *Nature Genetics*, 46(8), 815–817. <https://doi.org/10.1038/ng.3035>
- Decherchi, P. (2005). Dudley joy Morton's foot syndrome. *Presse Medicale (Paris, France)* (1983), 34(22 Pt 1), 1737–1740.
- Gr msd ttir, S., Hove, H. B., Kreiborg, S., Ek, J., Johansen, A., Darvann, T. A., & Hermann, N. V. (2018). Novel de novo mutation in ZBTB20 in Primrose syndrome in boy with short stature. *Clinical Dysmorphology*, 28(1), 41–45. <https://doi.org/10.1097/mcd.0000000000000244>
- Hersh, J., Schmitt, E., Pancratz, L., Dobies, D., Autullo, L., Goodin, K., ... Ciliberto, C. (2015). *Primrose Syndrome: A New Case and Review*. Paper presented at the meeting of the American College of Medical Genetics 2016 Annual Clinical Genetics Meeting. 155(11), 1.
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., ... MacArthur, D. G. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285–291. <https://doi.org/10.1038/nature19057>
- Mattioli, F., Piton, A., G rard, B., Superti-Furga, A., Mandel, J. L., & Unger, S. (2016). Novel de novo mutations in ZBTB20 in Primrose syndrome with congenital hypothyroidism. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 170(6), 1626–1629. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37645>
- Primrose, D. A. (1982). A slowly progressive degenerative condition characterized by mental deficiency, wasting of limb musculature and bone abnormalities, including ossification of the pinnae. *Journal of Intellectual Disability Research*, 26(2), 101–106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.1982.tb00133.x>
- Retterer, K., Juusola, J., Cho, M. T., Vitazka, P., Millan, F., Gibellini, F., ... Bale, S. (2016). Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genetics in Medicine*, 18(7), 696–704. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.148>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Rossi, M., El-Khechen, D., Black, M. H., Farwell Hagman, K. D., Tang, S., & Powis, Z. (2017). Outcomes of diagnostic exome sequencing in patients with diagnosed or suspected autism spectrum disorders. *Pediatric Neurology*, 70, 34–43.e2. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2017.01.033>
- Stellacci, E., Steindl, K., Joset, P., Mercurio, L., Anselmi, M., Cecchetti, S., ... Rauch, A. (2018). Clinical and functional characterization of two novel ZBTB20 mutations causing Primrose syndrome. *Human Mutation*, 39, 1–6. <https://doi.org/10.1002/humu.23546>
- Sutherland, A. P. R., Zhang, H., Zhang, Y., Michaud, M., Xie, Z., Patti, M.-E., ... Zhang, W. J. (2009). Zinc finger protein Zbtb20 is essential for post-natal survival and glucose homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), 2804–2815. <https://doi.org/10.1128/MCB.01667-08>
- Xie, Z., Zhang, H., Tsai, W., Zhang, Y., Du, Y., Zhong, J., ... Zhang, W. J. (2008). Zinc finger protein ZBTB20 is a key repressor of alpha-fetoprotein gene transcription in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31), 10859–10864. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800647105>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Ferreira LD, Borges-Medeiros RL, Thies J, Schnur RE, Lam C, de Oliveira JRM. Expansion of the Primrose syndrome phenotype through the comparative analysis of two new case reports with ZBTB20 variants. *Am J Med Genet Part A*. 2019;179A:2228–2232. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61297>

# APÊNDICE C – ARTIGO 3: NEW HOMOZYGOUS INDEL IN MYORG LINKED TO BRAIN CALCIFICATION, THYROIDOPATHY, AND NEUROPATHY (FI 2020: 13,501)

doi:10.1093/brain/awz225

BRAIN 2019; 142: 1–4 | e51

**BRAIN**  
A JOURNAL OF NEUROLOGY

## LETTER TO THE EDITOR

### New homozygous indel in *MYORG* linked to brain calcification, thyroidopathy and neuropathy

 Laura D. Ferreira<sup>1</sup> and João Ricardo M. de Oliveira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Keizo Asami Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>2</sup> Neuropsychiatry Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

Correspondence to: João Ricardo M. de Oliveira

Neuropsychiatry Department, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil

E-mail: joao.ricardo@ufpe.br

Sir,

Primary familial brain calcification (PFBC) is a rare disorder characterized by bilateral brain calcifications affecting the basal ganglia, commonly associated to psychiatric, motor and cognitive impairment. This condition has been associated to pathogenic variants in five genes, four (*SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB* and *XPR1*) causing the autosomal dominant form of the condition (AD-PFBC) (Quintáns *et al.*, 2018). The recessive form of PFBC was only recently described, when Yao *et al.* (2018) first reported *MYORG* as a causative gene for the disease.

The myogenesis-regulating glycosidase (*MYORG*, also known as *NET37* or *KIAA1161*) gene encodes a putative nuclear envelope transmembrane protein with a predicted glycosidase function (Datta *et al.*, 2009). In the human brain, *MYORG* is expressed in several regions (Arkadir *et al.*, 2018). Animal models have shown that *MYORG* is specifically expressed in astrocytes, a cell type that has not been involved in the calcification model yet, but is part of the neurovascular unit (Tadic *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2018).

Since the first report of *MYORG*'s involvement in PFBC, 48 cases of autosomal recessive PFBC (AR-PFBC) have been described in 26 families in China, Israel, Germany, Italy and France (Arkadir *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2018; Forouhdeh *et al.*, 2019; Grangeon *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2019). Here, we present the results of screening a Brazilian cohort, with previous negative genetic screenings for all AD-PFBC genes, for variants of *MYORG*. One new variant was found in *MYORG*, being responsible for causing PFBC in a 54-

year-old female who, interestingly, also has a Hashimoto's thyroiditis diagnosis and polyneuropathy. No other pathogenic variants were detected in the remaining patients.

Twenty patients with previous negative screenings for *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB* and *XPR1* were screened for variants on *MYORG*. Genetic screening of *MYORG* in all patients was performed by PCR amplification of exon 2, as well as the intronic sequences near the exon's boundaries, using primers reported previously (Yao *et al.*, 2018), followed by direct Sanger sequencing. Informed consent was obtained from all subjects for genetic testing, processing of personal data and publication of data in scientific journals.

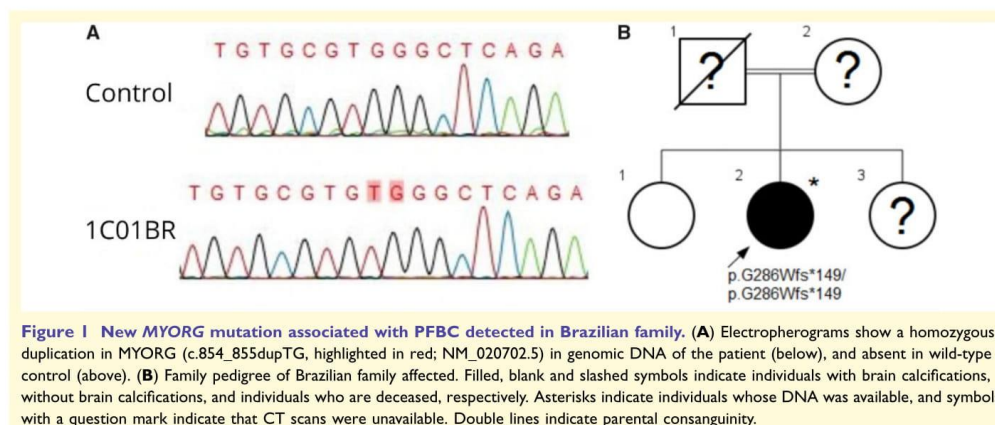
Sanger sequencing of genomic DNA identified a homozygous duplication c.854\_855dupTG at exon 2 of *MYORG* (NM\_020702.5) in Patient 1C01BR (Fig. 1A). This variant predicts a G to W substitution in position 286 with frameshift (p.G286Wfs\*149, NP\_065753.2) never described before. *In silico* assessment by MutationTaster suggested the p.G286Wfs\*149 variant to be disease causing. Unfortunately, genetic screening of her sisters and parents was not possible. The variant was not found in ExAC Browser or 1000 Genomes Project.

Patient 1C01BR is the second daughter of consanguineous parents, who were first cousins (Fig. 1B). The 54-year-old female has a medical history marked by extreme fatigue, dysarthria and movement disorder. She reports experiencing debilitating fatigue and vertigo starting at age 41, making it hard to walk especially in an erect position. In the following years the fatigue intensified, and

Advance Access publication July 22, 2019

© The Author(s) (2019). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.

For permissions, please email: journals.permissions@oup.com



**Figure 1** New MYORG mutation associated with PFBC detected in Brazilian family. (A) Electropherograms show a homozygous duplication in MYORG (c.854\_855dupTG, highlighted in red; NM\_020702.5) in genomic DNA of the patient (below), and absent in wild-type control (above). (B) Family pedigree of Brazilian family affected. Filled, blank and slashed symbols indicate individuals with brain calcifications, without brain calcifications, and individuals who are deceased, respectively. Asterisks indicate individuals whose DNA was available, and symbols with a question mark indicate that CT scans were unavailable. Double lines indicate parental consanguinity.

additional hand and head tremors, reduced strength in hands and numbness affecting the hands and arms affected her fine motor skills. Additionally, dysarthria and difficulty to write developed and even though gait became more impaired with time, she was still able to walk independently for a few years. At the age of 50 the patient reports the numbness has spread to the crotch, legs and feet, rendering her unable to walk unassisted by the time she was 52. At that time, dysphagia also began to develop.

As early as age 41, CT and MRI scans already showed the presence of large calcifications affecting the globus pallidus, pons, and cerebellum (Fig. 2A–C). Calcifications on the pineal gland and choroid plexus were also noted, as well as accentuated subarachnoid cisterns (Fig. 2C). A couple of years later, a new CT scan indicated the expansion of these calcifications to the thalami, centrum semiovales, subcortical white matter and to both the cerebral and cerebellar peduncles (Fig. 2F–H). Brain imaging exams also indicate she had asymmetric lateral ventricles, with the right ventricle being smaller than the left (Fig. 2C and G), accentuated cerebellar atrophy (Fig. 2A and E), and optic nerve head drusen (Fig. 2A and F).

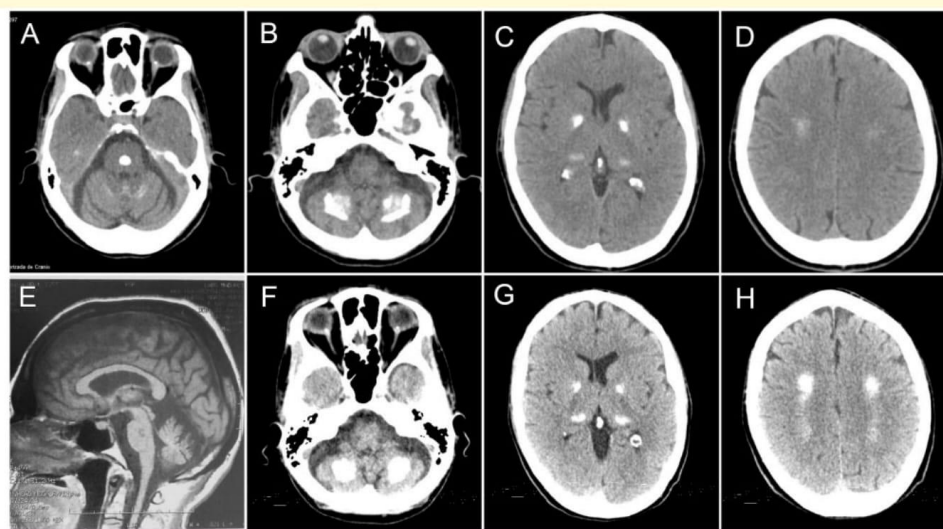
Electromyoneurography (EMNG) of lower limbs from when she was 44 showed findings consistent with predominantly axonal sensory polyneuropathy. Haematological and biochemical screenings show she has anaemia (Hb = 10.3 g/dl; normal = 12–15.5 g/dl) and anisocytosis (red cell distribution width = 16.3%; normal = 11.9–15.5%), with a majority of microcytic (mean corpuscular volume = 63 fl; normal = 82–98 fl) and hypochromic (mean corpuscular haemoglobin = 19.7 pg; normal = 26–34 pg) red blood cells likely due to a minor form of thalassaemia. Additionally, her elevated antithyroglobulin (AbTG = 992.2 IU/ml; normal < 115 IU/ml) and anti-thyroid peroxidase antibodies (AbTPO = 96.12 IU/ml; normal < 34 IU/ml) are consistent with Hashimoto's thyroiditis, confirmed

through Doppler ultrasound. Standardized psychiatric evaluations performed when the patient was 48 resulted in a score of 30 for Mini-Mental State Examination, 124/126 for Functional Independence Measure, 13 for Beck, 11 in Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Stage 3 in Hoehn and Yahr, and a 90% Schwab Score.

Family history shows that her father died at age 78, with a medical history of hypertension and stroke, and her mother is currently 89 years old, having been treated for Parkinson's disease for the past 10 years; she does not walk. Her older sister, currently 71, has a medical history marked by a stroke at age 61 and brain imaging shows ventricle deviation but no calcification (images not shown). Her younger sister, currently 53 years old, is asymptomatic without complaints of any major medical issues, as are the remaining relatives.

This case report brings another patient with an autosomal recessive form of PFBC, caused by a homozygous duplication on MYORG. So far, 64.5% of all reported MYORG-PFBC cases are homozygous and 35.5% are compound heterozygous. Interestingly, a high incidence of indels in MYORG can be seen in the context of PFBC: ~48% of all confirmed AR-PFBC cases are caused (completely or partially, in the case of homozygous or compound heterozygous cases, respectively) by insertions, deletions or duplications (Supplementary Table 1).

Coming from a consanguineous family, Patient 1C01BR has a severe clinical presentation marked by motor and sensorineural impairment that affects her fine motor skills, gait, ability to speak and swallow. These signs and symptoms have been widely described in patients with homozygous or compound heterozygous MYORG variants, although at different levels of severity. In fact, bulbar signs, mainly in the form of dysarthria and dysphagia, are the most commonly reported symptoms in AR-PFBC (38/48), closely followed by any sort of motor impairment (including gait ataxia,



**Figure 2** CT scan and MRI brain images of Patient 1C01BR. CT scans images showing bilateral and symmetric brain calcification on the pons (A), cerebellum (B and F), basal ganglia, choroid plexus (C and G) and subcortical white matter (D and H). Optic nerve head drusen can also be seen (A and F). MRI image showing calcification on the pons, cerebellar atrophy and enlarged posterior fossa and basal cistern (E). B–D and F–H show the same brain structures and were taken 4 years apart, allowing for the observation of lesion growth.

parkinsonism, and hyperkinesia; 34/48) (Supplementary Table 2). Cognitive and psychiatric impairment, however, do not seem to be as present in AR-PFBC patients (15/48 and 4/48, respectively) as they are in AD-PFBC. (Grangeon *et al.*, 2019). Additionally, and similar to other MYORG-PFBC cases, this patient had a fast clinical deterioration, with a culmination of complete gait impairment happening <15 years from the first appearance of symptoms.

Interestingly, in Patient 1C01BR the presence of optic nerve head drusen was noted; no ophthalmic abnormalities have been reported in PFBC patients so far, even though ocular calcifications have been described in PFBC animal models (Borges-Medeiros *et al.*, 2019). The most important difference in this case is that Patient 1C01BR also has a confirmed Hashimoto's thyroiditis diagnosis. Because brain calcifications can be both primary and secondary, the co-occurrence of any thyroid hormonal imbalances with these types of lesions usually results in the genetic screening for PFBC-related genes being considered unnecessary, and thus not being performed (Nicolas *et al.*, 2013; Sava *et al.*, 2013). In fact, recent literature shows at least one other case of Hashimoto's thyroiditis with brain calcification (Lee *et al.*, 2010). It is important to point out, however, that both the thyroidopathy and neuropathy could be either comorbidities or new clinical aspects specific to MYORG-PFBC cases.

This case report highlights that patients with hormonal imbalances and bilateral brain calcifications can still be

genetically diagnosed with PFBC, reinforcing the recommendation of performing genetic testing whenever possible. Understanding the patient's family history may also be an indicative of PFBC, as many of the cases have either an autosomal dominant (*SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB* and *XPR1*) or autosomal recessive (*MYORG*) mode of inheritance, but sporadic cases should not be excluded from these analyses.

### Data availability

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

### Acknowledgements

We would like to thank the patients and their families for their participation in the study. We would also like to thank H. Leal, R. Gitirana, L. Pimentel, R. Borges-Medeiros, D. Moura and E. Cunha for technical support and helpful discussion.

### Funding

L.D.F. received a fellowship from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE; IBPG-

0750-2.02/16). J.R.M.O. received funding from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 310150/2016-7 and 457556/2013-7) and PROPESQ-UFPE (2018-2019).

## Competing interests

The authors report no competing interests.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

## References

- Arkadir D, Lossos A, Rahat D, Abu Sninch M, Schueler-Furman O, Nitschke S, et al. MYORG is associated with recessive primary familial brain calcification. *Ann Clin Transl Neurol* 2018; 6: 106–13.
- Borges-Medeiros RL, Ferreira LD, de Oliveira JRM. Lack of major ophthalmic findings in patients with primary familial brain calcification linked to SLC20A2 and PDGFB. *J Mol Neurosci* 2019; 67: 441–4.
- Chen Y, Fu F, Chen S, Cen Z, Tang H, Huang J et al. Evaluation of MYORG mutations as a novel cause of primary familial brain calcification. *Mov Disord* 2018; 34: 291–7.
- Datta K, Guan T, Gerace L. NET37, a nuclear envelope transmembrane protein with glycosidase homology, is involved in myoblast differentiation. *J Biol Chem* 2009; 284: 29666–76.
- Forouhdeh Y, Müllet K, Ruf W, Assi M, Seker T, Tunca C, et al. A biallelic mutation links MYORG to autosomal-recessive primary familial brain calcification. *Brain* 2019; 142: 1–4.
- Grangeon L, Wallon D, Charbonnier C, Quenez O, Richard AC, Rousseau S, et al. Biallelic MYORG mutation carriers exhibit primary brain calcification with a distinct phenotype. *Brain* 2019; 142: e4.
- Lee JE, Hsieh ST, Lin SK, Wang KC. Extensive bilateral striocerebellar calcifications associated with Hashimoto's hypothyroidism. *Tzu Chi Med J* 2010; 23: 23–5.
- Nicolas G, Pottier C, Charbonnier C, Guyant-Maréchal L, Le Ber I, Pariente J, et al. Phenotypic spectrum of probable and genetically-confirmed idiopathic basal ganglia calcification. *Brain* 2013; 136 (Pt 11): 3395–407.
- Peng Y, Wang P, Chen Z, Jiang H. A novel mutation in MYORG causes primary familial brain calcification with central neuropathic pain. *Clin Genet* 2018; 95: 433–5.
- Quintás B, Oliveira J, Sobrido MJ. Primary familial brain calcifications. *Handbook Clin Neurol* 2018; 147: 307–17.
- Ramos EM, Roca A, Chumchim N, Dokuna DR, Berlo VV, De Michele G, et al. Primary familial brain calcification caused by a novel homozygous MYORG mutation in a consanguineous Italian family. *Neurogenetics* 2019; 20: 99–102.
- Sava A, Dumitrescu G, Haba D, Hodorog D, Mihailov C, Sapte E. The Fahr syndrome and the chronic lymphocytic thyroiditis. *Rom J Morphol Embryol* 2013; 54: 195–200.
- Tadic V, Westenberger A, Domingo A, Alvarez-Fischer S, Klein C, Kasten M. Primary familial brain calcification with known gene mutations: a systematic review and challenges of phenotypic characterization. *JAMA Neurol* 2015; 72: 460–7.
- Yao XP, Cheng X, Wang C, Zhao M, Guo XX, Su HZ, et al. Biallelic mutations in MYORG cause autosomal recessive primary familial brain calcification. *Neuron* 2018; 98: 1116–23.

# APÊNDICE D - ARTIGO 4: OVERLAPPING DISEASES IN A BRAZILIAN SUBJECT WITH BRAIN CALCIFICATION LINKED TO NOVEL PHENOTYPES (FEBRUARY 2020: 3,444)

Journal of Molecular Neuroscience  
https://doi.org/10.1007/s12031-020-01534-7



## Overlapping Diseases in a Brazilian Subject with Brain Calcification Linked to Novel Phenotypes

Laura D. Ferreira<sup>1</sup> · João Ricardo M. de Oliveira<sup>1,2</sup>

Received: 6 February 2020 / Accepted: 12 March 2020  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

### Abstract

Primary familial brain calcification (PFBC) is a well-known genetic condition that has recently had a surge of autosomal recessive cases. We recently reported a case of autosomal recessive PFBC on a 54-year-old Brazilian patient with a novel homozygous variant on *MYORG*. Interestingly, that patient also had a series of uncommon signs and symptoms, including Hashimoto's thyroiditis, polyneuropathy, optic nerve head drusen (ONHD), and persistent anemia. We chose to perform whole exome sequencing (WES) to possibly detect other unknown genetic conditions that could explain the extra-neurological findings reported. WES confirmed the presence of the *MYORG* variant previously reported by us, and determined the presence of a heterozygous nonsense variant on *HBB* (c.118C>T, p.Q40\*), defining a diagnosis of beta-thalassemia. Based on literature review, the new WES finding explains the persistent anemia and polyneuropathy shown by the patient, while still leaving the ONHD and autoimmune thyroiditis without a clear genetic link. This way, we propose that these novel clinical findings could be linked to *MYORG*, but still encourage further studies to evaluate this possibility.

**Keywords** Primary familial brain calcification · *MYORG* · Whole exome sequencing · Thalassemia · Drusen

Primary familial brain calcification (PFBC) is a well-known genetic condition that, despite its previous history marked predominantly by autosomal dominant cases, has recently had a surge of autosomal recessive cases described in literature (Yao et al. 2018; Cen et al. 2019). *MYORG* was one of the genes linked to this new form of PFBC, and it has quickly become one of the most prominent genes linked to this disorder (Bauer et al. 2019). Nicolas et al. (2019) have recently proposed four major criteria suggestive of *MYORG* variants in patients with brain calcification, based on what has been made available in literature since Yao et al. (2018). The proposed criteria, that include progressive motor impairment, extensive brain calcifications affecting the brainstem, cerebellar atrophy and consanguinity, are consistent with what has been repeatedly reported and are highly likely to aid physicians in proposing *MYORG* screening.

We recently reported a novel homozygous variant on *MYORG* (Ferreira and Oliveira 2019), being responsible for causing PFBC in a female that fits all major criteria proposed by Nicolas et al. (2019), reinforcing the marked phenotype present in most *MYORG*-PFBC cases. Curiously, the patient also has Hashimoto's thyroiditis, polyneuropathy, optic nerve head drusen (ONHD), and persistent anemia; at the time, we proposed that the former two could be comorbidities or new clinical findings specific to *MYORG*-PFBC cases, and that more studies and data would be necessary to clarify this case. Understanding that other unknown genetic conditions could be present in this patient and that this could, in turn, explain the extra-neurological findings reported (Nicolas et al. 2019), we chose to perform whole exome sequencing (WES) to assess this possibility and to ensure that no other genetic conditions were left undiagnosed.

As a result, WES confirmed the presence of the *MYORG* variant previously reported by us (Ferreira and Oliveira 2019), and determined the presence of a heterozygous nonsense variant on *HBB* (c.118C>T, p.Q40\*), defining a diagnosis of beta-thalassemia that, in turn, explained the persistent anemia reported. No other pathogenic variants were reported.

Beta-thalassemia is a common chronic hemoglobinopathy caused by altered beta-globin chain synthesis, affecting hemoglobin and usually resulting in anemia

✉ João Ricardo M. de Oliveira  
joao.ricardo@ufpe.br

<sup>1</sup> Keizo Asami Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil  
<sup>2</sup> Neuropsychiatry Department, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil

(Origa 2017). Although clinical presentation varies according to the form of beta-thalassemia that each patient has, there have been several recent reports of peripheral neuropathy linked to thalassemia which could explain the presence of this unusual finding in this PFBC patient (Sawaya et al. 2006; Nemtsas et al. 2018).

Taking this into account, the optic nerve head drusen and the autoimmune thyroiditis were the only two signs left unexplained by the WES report. ONHDs are a type of ectopic calcification usually detected incidentally during ophthalmic evaluations, being mostly asymptomatic and relatively common in the overall population (Palmer et al. 2018). Similar to the brain calcifications characteristic of PFBC, ONHDs are predominantly formed by calcium and phosphate and have been previously reported in animal models of this disorder (Dickinson et al. 2016). Unlike many of the other PFBC animal model findings, however, ophthalmic abnormalities such as ONHDs had not been reported in PFBC patients until Ferreira and Oliveira (2019) (Borges-Medeiros et al. 2019), meaning that this patient's case could raise awareness about the possible occurrence of ONHDs in other patients. Similarly, cases of autoimmune thyroiditis such as Hashimoto's are not classically associated with brain calcification despite its commonality, but this report can serve as a reminder of the clinical heterogeneity seen in PFBC patients (Nicolas et al. 2019).

All things considered, we believe that this case report update is important to elucidate which of the originally reported signs and symptoms were proved comorbidities or likely new findings associated to MYORG-PFBC. Additionally, it highlights the value of WES as part of a thorough evaluation of complex genetic disorders. Lastly, we understand our single case report is not enough to determine the associations between the novel clinical findings and *MYORG*, and therefore encourage further studies to evaluate this possibility.

**Acknowledgements** We would like to thank Genomika, R. Gitirana, L. Pimentel, R. Borges-Medeiros, D. Moura and E. Cunha for technical support and helpful discussion.

**Funding** L.D.F. received a fellowship from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE; IBPG-0750-2.02/16).

J.R.M.O. received funding from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 310150/2016-7) and PROPESQ-UFPE (2018–2019).

## Compliance with Ethical Standards

**Competing Interests** The authors report no competing interests.

## References

- Bauer M, Rahat D, Zisman E, Tabach Y, Lossos A, Meiner V, Arkadir D (2019) MYORG mutations: a major cause of recessive primary familial brain calcification. *Curr Neurol Neurosci Rep* 19(10):70. <https://doi.org/10.1007/s11910-019-0986-z>
- Borges-Medeiros RL, Ferreira LD, Oliveira JRM (2019) Lack of major ophthalmic findings in patients with primary familial brain calcification linked to SLC20A2 and PDGFB. *J Molecular Neurosci* 67(3):441–444. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1250-8>
- Cen Z, Chen Y, Chen S et al (2019) Biallelic loss-of-function mutations in *JAM2* cause primary familial brain calcification. *Brain* 143(2):491–502. <https://doi.org/10.1093/brain/awz392>
- Dickinson ME, Flenniken AM, Ji X et al (2016) High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature* 537:508–514. <https://doi.org/10.1038/nature19356>
- Ferreira LD, Oliveira JRM (2019) New homozygous indel in MYORG linked to brain calcification, thyroidopathy and neuropathy. *Brain* 142(9):e51. <https://doi.org/10.1093/brain/awz225>
- Nemtsas P, Armaoutoglou M, Perifanis V, Koutsouraki E, Spanos G, Armaoutoglou N, Chalkia P, Pantelidou D, Orologos A (2018) Polyneuropathy and myopathy in beta-thalassemia major patients. *Ann Hematol* 97(5):899–904. <https://doi.org/10.1007/s00277-018-3251-7>
- Nicolas G, Grangeon L, Wallon D (2019) Reply: new homozygous indel in MYORG linked to brain calcification, thyroidopathy and neuropathy. *Brain* 142(9):e52. <https://doi.org/10.1093/brain/awz227>
- Origa R (2017)  $\beta$ -Thalassemia. *Genet Med* 19(6):609–619. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.173>
- Palmer E, Gale J, Crowstond JG, Wells AP (2018) Optic nerve head drusen: an update. *Neuroophthalmology* 42(6):367–384. <https://doi.org/10.1080/01658107.2018.1444060>
- Sawaya RA, Zahed L, Taher A (2006) Peripheral neuropathy in thalassemia. *Ann Saudi Med* 26(5):358–363
- Yao XP, Cheng X, Wang C, Zhao M, Guo XX, Su HZ et al (2018) Biallelic mutations in *MYORG* cause autosomal recessive primary familial brain calcification. *Neuron* 98(6):1116–1123

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

# APÊNDICE E – ARTIGO 5: NON-LETHAL RAINE SYNDROME REPORT LACKING CHARACTERISTIC CLINICAL FEATURES (FI 2020: 3,444)

Journal of Molecular Neuroscience  
<https://doi.org/10.1007/s12031-021-01873-z>



## Non-lethal Raine Syndrome Report Lacking Characteristic Clinical Features

Laura D. Ferreira<sup>1</sup> · Gabriela F. Leal<sup>2</sup> · João Ricardo Mendes de Oliveira<sup>1,3</sup>

Received: 7 May 2021 / Accepted: 11 June 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

### Abstract

Raine syndrome is a rare, often lethal autosomal recessive condition marked by congenital malformations that range in severity. Considering that several case reports of this syndrome describe cases of stillbirth or perinatal death, information about the clinical presentation and development of this condition in mild, non-lethal cases is lacking. With that in mind, in this case report, we describe the clinical, oro-dental, and skeletal findings of a 14-year-old Brazilian patient diagnosed with a mild form of non-lethal Raine syndrome. This patient has very mild facial dysmorphism, not displaying hypoplastic nose, micrognathia, low set ears or depressed nasal bridge, which is uncommon even in other mild, non-lethal cases of RS. Furthermore, this patient has bilateral brain calcifications and a series of oro-dental abnormalities, such as amelogenesis imperfecta and recurrent periodontal abscesses. Sanger sequencing of genomic DNA identified a homozygous missense variant c.1487C>T at exon 9 of *FAM20C* (NM\_020223.4) in the patient. The patient's mother carries the same variant but is heterozygous. This variant predicts a proline to leucine substitution in position 496 (p.P496L, NP\_064608.2) previously reported, which allows for the phenotypic comparison between these cases. This way, this case report calls attention to how differently RS can appear, highlighting the importance of new non-lethal Raine syndrome case reports to help further determine the phenotypic spectrum of this condition.

**Keywords** Raine syndrome · *FAM20C* · Brain calcification · Facial dysmorphism · Developmental delay

### Introduction

First reported in 1989 by Raine and collaborators, Raine syndrome (RS, OMIM 259,775, also known as congenial sclerosing osteomalacia with cerebral calcification, OMIM 259,660) is a rare, often lethal condition marked by congenital malformations that range in severity (Raine et al. 1989; Whyte et al. 2017). It is an autosomal recessive condition caused by homozygous or compound heterozygous variants on *FAM20C*, a broadly expressed gene that encodes a protein

of the same name (Faundes et al. 2014; Ishikawa et al. 2012; Sheth et al. 2018; Simpson et al. 2009, 2007).

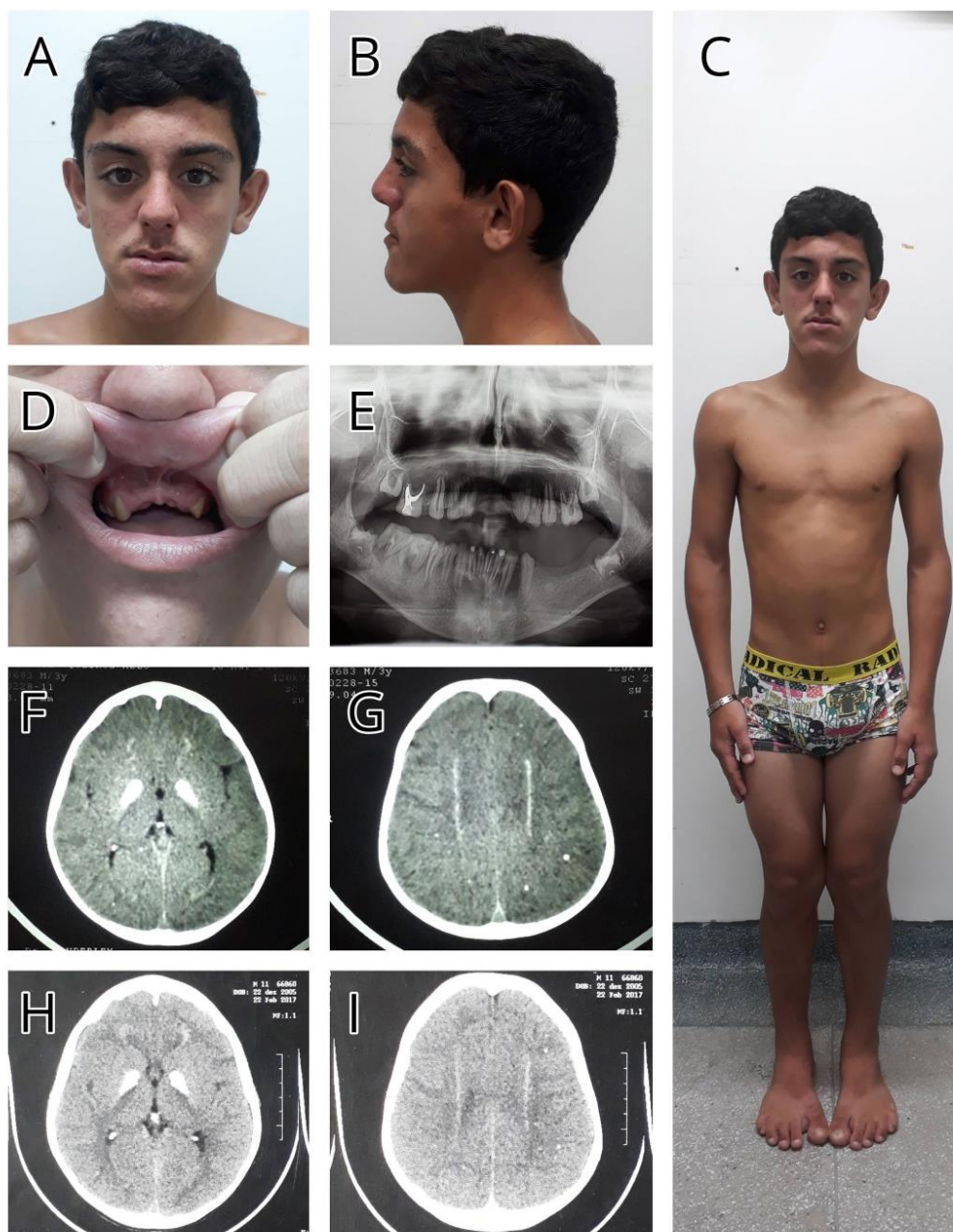
It is not uncommon for RS cases to be misdiagnosed or go undiagnosed for years, especially considering how rare this condition is (Rolvien et al. 2019). Additionally, this condition's symptoms are not specific enough to ensure a fast and definite diagnosis, as it affects several organs and tissues in different ways (Elalaoui et al. 2016). As an example, patients diagnosed with RS have been reported to have choanal atresia, brain and kidney calcifications, developmental delay, short limbs, osteonecrosis or rickets, and characteristic facial features (Faundes et al. 2014). Although the latter could be considered the most distinctive finding of Raine syndrome, usually consisting of midface hypoplasia with a marked hypoplastic nose, depressed nasal bridge, exophthalmos, micrognathia, and low set ears, it is important to say that those should be considered as supportive features rather than diagnostic (Seidahmed et al. 2015). A wide range of dental problems has also been described in several of these patients, including amelogenesis imperfecta, gingival

✉ João Ricardo Mendes de Oliveira  
[joao.ricardo@ufpe.br](mailto:joao.ricardo@ufpe.br)

<sup>1</sup> Keizo Asami Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE 50670-901, Brazil

<sup>2</sup> Medical Genetics Service, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Recife, Brazil

<sup>3</sup> Neuropsychiatry Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil



**Fig. 1** Physical, dental, and CT scan findings on a 14-year-old patient with non-lethal Raine syndrome. **A** Front image shows mild exophthalmos; **B** profile image shows prominent, normally placed ears, and midface hypoplasia; **C** patient has wide feet and broad halluces; **D** picture showing absence of top incisors and yellowish tint to the canines, consistent with abnormal enamel and amelogenesis imperfecta; **E** panoramic X-ray showing several mandibular and maxillary findings; **F, G** CT scan performed when the patient was 3 years old detected intracranial calcifications affecting the basal ganglia, choroid plexus, and pineal gland, as well as diffuse calcifications on the white matter; **H, I** a repeat CT scan performed when the patient was 11 showed maintenance of the findings previously reported

enlargement, unerupted teeth, periapical lesions, and palate malformations (Acevedo et al. 2015).

Here we describe the clinical, oro-dental, and skeletal findings of a 14-year-old Brazilian patient diagnosed with a mild form of non-lethal Raine syndrome. Interestingly, this patient has very mild facial dysmorphia, not displaying hypoplastic nose, micrognathia, low set ears, or depressed nasal bridge, which is uncommon even in other mild, non-lethal cases of RS (Sheth et al. 2018). This way, this case report calls attention to how differently RS can appear, highlighting clinical heterogeneities between patients and other disparities between case reports.

## Case Report

The patient is a 14-year-old male born to healthy consanguineous parents. The patient's mother had pre-eclampsia. After birth, the patient spent 2 weeks in the neonatal intensive care unit (NICU) due to respiratory distress; according to his mother, his soft spots took a long time to close. He had normal motor development, having walked at 14 months. He attends mainstream school with an additional day of special education once a week, as he has difficulties keeping up and frequently does not meet expected learning standards for his age group. He does not have epilepsy but had febrile seizures as a child.

At 13 years of age, the patient was 154 cm tall (10–25th centile) and had a head circumference of 53.2 cm (10–25th centile). The patient has midface hypoplasia, mild exophthalmos, prominent ears (Fig. 1A, B), narrow high palate, wide feet, and broad halluces (Fig. 1C). There was no evidence of osteosclerosis on radiographic exams. Serum calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, and parathormone were normal. Ophthalmological examination revealed no functional or morphological abnormalities. Mild hearing impairment was detected in his right ear.

A dental evaluation at age 12 years detected dentin dysplasia, amelogenesis imperfecta (Fig. 1D), and a history of periapical and periodontal abscesses. A panoramic dental X-ray showed several maxillary and mandibular findings, marked by generalized enamel loss, incomplete root

formation, and impaired apex formation on the root canals of his teeth, suggestive of amelogenesis imperfecta (Fig. 1E). Maxillary sinus opacity was also evident. Slight bone loss was seen on alveolar bones, as well as in the edentulous zone, of both the maxilla and mandibula, and several teeth were absent (11, 12, 21, 22, 26, 35, 36, and 37). Restoration and obturation material were seen on teeth 16, 31, 32, 41, and 42, in agreement with previous dental work done. Additionally, increased pericoronal radiolucencies were seen on developing teeth 18, 28, 38, and 48, which could all be due to hyperplastic dental follicles. Imaging also pointed towards the presence of a radicular cyst on the lower jaw (well-defined radiolucent image on periapical regions of teeth 31, 33, 41, and 42), and possible bone sclerosis (radiopaque image projected on the region corresponding to tooth 36). Additional mandibular findings included periapical radiolucencies on teeth 46 and 47, suggestive of apical lesions (Fig. 1E).

Brain computerized tomography (CT) scans revealed the presence of brain calcification affecting the choroid plexus, pineal gland, basal ganglia, and periventricular white matter as early as age 3 years (Fig. 1F, G). Those images also showed complete fusion of the cranial sutures, resulting in a brachycephalic head and diffuse calcifications affecting both cerebral hemispheres (Fig. 1G). Repeat scans at ages 11 (Fig. 1H, I) and 12 years (images not shown) reported the maintenance of previously reported lesions and no additional findings.

Genetic screening for *FAM20* variants was performed with genomic DNA, provided by both the patient and his mother after obtaining appropriate informed consent and assent for genetic testing, processing of personal data, and publication of data in scientific journals. PCR amplification of *FAM20C*'s exons, as well as the intronic sequences near the exon's boundaries, was performed using GoTaq® Green Master Mix (Cat#M712C, Promega) which contains taq DNA polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, and reaction buffers, as well as primer sequences kindly provided by Dr. Whyte and Dr. Mumm from the Washington University School of Medicine. These primers have been used on previously published studies (Whyte et al. 2017). PCR products were then purified using ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Cat#78,205.10.ML, Applied Biosystems). Sanger sequencing directly followed PCR product purification and was performed on the ABI 3700 sequencer after a reaction using BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Cat#4,337,455, Applied Biosystems). DNA sequences were then analyzed using CLC Main Workbench Software version 8.1 (Qiagen, USA).

Sanger sequencing of genomic DNA identified a homozygous missense variant c.1487C > T at exon 9 of *FAM20C* (NM\_020223.4) in the patient (Supplementary Fig. 1A). The patient's mother carries the same variant but is

heterozygous (Supplementary Fig. 1B). This variant predicts a proline to leucine substitution in position 496 (p.P496L, NP\_064608.2) previously reported in two brothers by Acevedo and collaborators, also from a consanguineous Brazilian family (Acevedo et al. 2015). In silico assessment by MutationTaster suggested the variant to be disease causing. Genetic screening of his sister and father was not possible, but we believe that the evidence shown is enough to imply that the disease occurrence is due to the variants being inherited from both parents. The variant was not found in ExAC Browser or 1000 Genomes Project.

## Discussion and Conclusions

As of early 2021 less than 60 cases of Raine syndrome had been reported, with a large part of those being lethal and from consanguineous families (Faundes et al. 2014; Hung et al. 2019; Rolvien et al. 2019; Sheth et al. 2018; Tamai et al. 2018). The consanguinity reinforces the autosomal recessive nature of this condition, which can in turn be confirmed through genetic testing to identify possible variants affecting *FAM20C*.

*FAM20C* is a gene whose protein has a proved kinase activity, and it appears to have an increased expression in bone and teeth, suggesting it has an important role in bone formation (Ishikawa et al. 2012). This hypothesis has been confirmed by a series of in vivo studies that showed *FAM20C* knockout mice have poorly mineralized long bones and periodontal disease, which are consistent with what is seen in RS patients (Liu et al. 2014, 2017). Furthermore, in vitro data shows that *FAM20C* is a bone formation promoter and that *FAM20C* variants can affect *FAM20C* localization inside cells due to protein misfolding, as well as its secretion rate and kinase activity (Ishikawa et al. 2012; Wang et al. 2012).

Historically, Raine syndrome has been considered a highly lethal condition with several cases of stillbirth or death shortly after birth. As a matter of fact, the amount of lethal RS reports is higher than those of non-lethal RS (Tamai et al. 2018). Recently, however, there have been more reports of non-lethal cases of RS, likely due to more awareness and better screening methods (Elalaoui et al. 2016). It is suggested that the most important factor related to lethality is lung size, which is in turn linked to the severity of the breathing issues displayed by each patient, usually neonatally (Faundes et al. 2014).

Here we have reported a new non-lethal case of RS on a 14-year-old Brazilian patient. This patient carries the same variant as two of the patients reported by Acevedo and collaborators (Acevedo et al. 2015), which interestingly allows for phenotypic comparison between all three cases. Besides the c.1487C>T variant, all three patients

share respiratory problems, intracranial calcifications, and exophthalmos. Additionally, all three patients match in most of the oro-dental findings, including gingival enlargement, amelogenesis imperfecta, unerupted permanent teeth, incomplete root formation, and recurrent periapical lesions. Furthermore, neither of them has dysplastic ears or micrognathia. Despite those similarities, our patient differs from the two brothers reported by Acevedo and colleagues (Acevedo et al. 2015) in all other aspects gathered from the case report. Our patient, though similar in age to the other two patients, does not have microcephaly, depressed nasal bridge, low set ears, short stature, short fingers, or clinodactyly. Taking this into consideration, the disparities seen between these three cases indicate that more than just the *FAM20C* variant is at play to determine the severity and the signs and symptoms of each case, reinforcing the possible roles of the environment and modifier genes on disease severity (Whyte et al. 2017).

All things considered, RS is a rare condition with a wide range of symptoms where each case seems to be similar to one another, although particular in its own way. The management of patients requires a multidisciplinary approach, focusing on each patient's needs while also acknowledging the natural course of the disease (Faundes et al. 2014). This way, the reports of new non-lethal RS cases are important to help further determine the phenotypic spectrum of this condition, and consequently to aid on the adequate provision of medical assistance to all patients.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01873-z>.

**Acknowledgements** We would like to thank the patient and his family for their participation in the study. We would also like to thank H. Leal for technical support.

**Author Contribution** All the authors contributed to the study conception and design. LDF performed genetic analysis and literature review, and drafted the manuscript. GFL performed clinical evaluation and revised the manuscript. JRMO monitored the study execution and revised the manuscript. All the authors have read and approved the final manuscript.

**Funding** LDF received a fellowship grant from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE; IBPG-0750-2.02/16). JRMO received funding from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 310150/2016-7 and 311664/2020-2) and PROPESQ-UFPE (2018–2019).

**Availability of Data and Materials** All data generated or analyzed during this study are available in this manuscript article and its supplementary information files.

## Declarations

**Ethics Approval** Ethics approval for study execution was obtained from the Universidade Federal de Pernambuco institutional review board

(Comitê de Ética em Pesquisa) under the CAAE-0296.0.172.000–08 registry.

**Consent to Participate and for Publication of Results** Consent to study was obtained from the patient's legal guardian, and the patient provided assent to participate. Study participants were informed about the study design, its benefits and risks, and provided consent and assent to undergo genetic testing, as well as the processing of personal data and publication of clinical data and pictures.

**Competing Interests** The authors declare no competing interests.

## References

- Acevedo AC, Poulter JA, Alves PG, de Lima CL, Castro LC, Yamaguti PM, Paula LM, Parry DA, Logan CV, Smith CEL, Johnson CA, Inglehearn CF, Mighell AJ (2015) Variability of systemic and orodental phenotype in two families with non-lethal Raine syndrome with FAM20C mutations. *BMC Med Genet* 16(1):8. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0154-5>
- Elaloui SC, Al-Sheqaih N, Ratbi I, Urquhart JE, O'Sullivan J, Bhaskar S, Williams SS, Elalloussi M, Lyahyai J, Sbihi L, Cherkaoui Jaouad I, Sbihi A, Newman WG, Sefiani A (2016) Non lethal Raine syndrome and differential diagnosis. *Eur J Med Genet* 59(11):577–583. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.09.018>
- Faundes V, Castillo-Taucher S, Gonzalez-Hormazabal P, Chandler K, Crosby A, Chioza B (2014) Raine syndrome: an overview. *Eur J Med Genet* 57(9):536–542. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.07.001>
- Hung CY, Rodriguez M, Roberts A, Bauer M, Mihalek I, Bodamer O (2019) A novel FAM20C mutation causes a rare form of neonatal lethal Raine syndrome. *Am J Med Genet A* 179(9):1866–1871. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61291>
- Ishikawa HO, Xu A, Ogura E, Manning G, Irvine KD (2012) The Raine syndrome protein FAM20C is a Golgi kinase that phosphorylates bio-mineralization proteins. *PLoS One* 7(8):e42988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042988>
- Liu P, Ma S, Zhang H, Liu C, Lu Y, Chen L, Qin C (2017) Specific ablation of mouse Fam20C in cells expressing type I collagen leads to skeletal defects and hypophosphatemia. *Sci Rep* 7(1):3590. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03960-x>
- Liu P, Zhang H, Liu C, Wang X, Chen L, Qin C (2014) Inactivation of Fam20C in cells expressing type I collagen causes periodontal disease in mice. *PLoS One* 9(12):e114396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114396>
- Raine J, Winter RM, Davey A, Tucker SM (1989) Unknown syndrome: microcephaly, hypoplastic nose, exophthalmos, gum hyperplasia, cleft palate, low set ears, and osteosclerosis. *J Med Genet* 26(12):786–788. <https://doi.org/10.1136/jmg.26.12.786>
- Rolvien T, Kornak U, Schinke T, Amling M, Oheim R (2019) A novel FAM20C mutation causing hypophosphatemic osteomalacia with osteosclerosis (mild Raine syndrome) in an elderly man with spontaneous osteonecrosis of the knee. *Osteoporos Int* 30(3):685–689. <https://doi.org/10.1007/s00198-018-4667-6>
- Seidahmed MZ, Alazami AM, Abdelbasit OB, Al Hussein K, Miqdad AM, Abu-Sa'da, O., Mustafa, T., Bahjat, S., & Alkuraya, F. S. (2015) Report of a case of Raine syndrome and literature review. *Am J Med Genet A* 167(10):2394–2398. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37159>
- Sheth J, Bhavsar R, Gandhi A, Sheth F, Pancholi D (2018) A case of Raine syndrome presenting with facial dysmorphism and review of literature. *BMC Med Genet* 19(1):76. <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0593-x>
- Simpson MA, Hsu R, Keir LS, Hao J, Sivapalan G, Ernst LM, Zackai EH, Al-Gazali LI, Hulskamp G, Kingston HM, Prescott TE, Ion A, Patton MA, Murday V, George A, Crosby AH (2007) Mutations in FAM20C are associated with lethal osteosclerotic bone dysplasia (Raine syndrome), highlighting a crucial molecule in bone development. *Am J Hum Genet* 81(5):906–912. <https://doi.org/10.1086/522240>
- Simpson MA, Scheuerle A, Hurst J, Patton M, Stewart H, Crosby A (2009) Mutations in FAM20C also identified in non-lethal osteosclerotic bone dysplasia. *Clin Genet* 75(3):271–276. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01118.x>
- Tamai K, Tada K, Takeuchi A, Nakamura M, Marunaka H, Washio Y, Tanaka H, Miya F, Okamoto N, Kageyama M (2018) Fetal ultrasonographic findings including cerebral hyperchogenicity in a patient with non-lethal form of Raine syndrome. *Am J Med Genet A* 176(3):682–686. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38598>
- Wang X, Wang S, Li C, Gao T, Liu Y, Rangiani A, Sun Y, Hao J, George A, Lu Y, Groppe J, Yuan B, Feng JQ, Qin C (2012) Inactivation of a novel FGF23 regulator, FAM20C, leads to hypophosphatemic rickets in mice. *PLoS Genet* 8(5):e1002708. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002708>
- Whyte MP, McAlister WH, Fallon MD, Pierpont ME, Bijanki VN, Duan S, Otaify GA, Sly WS, Mumm S (2017) Raine Syndrome (OMIM #259775), Caused by FAM20C mutation, is congenital sclerosing osteomalacia with cerebral calcification (OMIM 259660): congenital sclerosing osteomalacia. *J Bone Miner Res* 32(4):757–769. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3034>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## APÊNDICE F – PRIMERS UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO GENÉTICO

| GENE          | NOME DO PRIMER | SEQUÊNCIA 5'-3'          | REFERÊNCIA         |
|---------------|----------------|--------------------------|--------------------|
| <b>MYORG</b>  | MYORG_Ex2.1F   | CTCAGGTTCCAGTATTCATC     | Yao et al., 2018   |
|               | MYORG_Ex2.1R   | GTAGCACATGACCGTGTCCTT    |                    |
|               | MYORG_Ex2.2F   | TCCGCAATCAGAAGGGAGAG     |                    |
|               | MYORG_Ex2.2R   | CGCCGATGCCGTTCCACCAG     |                    |
|               | MYORG_Ex2.3F   | CAGCCACCTGGAAATCGACGACAT |                    |
|               | MYORG_Ex2.3R   | GCAGGAGATGTTCTGTGACTGGTA |                    |
|               | MYORG_Ex2.4F   | CGCGGGACTTCAGCACCTAC     |                    |
|               | MYORG_Ex2.4R   | AAGTCAGCAGCCACTTAATG     |                    |
| <b>FAM20C</b> | FAM20C-e1-1-F  | GCACCGATGGACCTTGAC       | Whyte et al., 2017 |
|               | FAM20C-e1-1-R  | CGTGGGGTCTTAGGGCG        |                    |
|               | FAM20C-e1-2-F  | GGCCCAACAAGCACACG        |                    |
|               | FAM20C-e1-2-R  | GCCCCTGAACCTCTCTACAC     |                    |
|               | FAM20C-e2-F    | GAGGCGCCTTCAACACAT       |                    |
|               | FAM20C-e2-R    | TCTAACACATAGCCTGCCCC     |                    |
|               | FAM20C-e3-F    | CCAAGAGCCCTCGTCCG        |                    |

|               |              |                        |                       |
|---------------|--------------|------------------------|-----------------------|
|               | FAM20C-e3-R  | AGGAGACACGGCCATCC      |                       |
|               | FAM20C-e4-F  | TATGAGGAACCCAGCACGTC   |                       |
|               | FAM20C-e4-R  | CAGGACGGCCTCACTCAC     |                       |
|               | FAM20C-e5-F  | CACAGAGCACAGACCCTCC    |                       |
|               | FAM20C-e5-R  | CAGGCTACCTGAAGAGA      |                       |
|               | FAM20C-e6-F  | TGCCCATGAGAAGCACC      |                       |
|               | FAM20C-e6-R  | AGGCTCTGCACCCATCTCTG   |                       |
|               | FAM20C-e7-F  | TCTTCTGCTCCTCATGGC     |                       |
|               | FAM20C-e7-R  | TCCACGCAAGGCGAGTGACAC  |                       |
|               | FAM20C-e8-F  | AGAGCACAGAGGCCTCTGAG   |                       |
|               | FAM20C-e8-R  | CATCCCTCCACTGGAGGGTCT  |                       |
|               | FAM20C-e9-F  | GGGTACAGGCAGGTGGAC     |                       |
|               | FAM20C-e9-R  | CTGTGGCCTCCTCTGTCTC    |                       |
|               | FAM20C-e10-F | TCCCTCTCACTTTCTCTCGC   |                       |
|               | FAM20C-e10-R | TCACTGAATTCACGACGGG    |                       |
| <b>ZBTB20</b> | ZBTB20_1F    | AGCAGGAAAGTTGAATGTTCC  | Cordeddu et al., 2014 |
|               | ZBTB20_1R    | TACGTATGGCTGACATTATCC  |                       |
|               | ZBTB20_2F    | GATTCTAAAAATGCCTTTTCCC |                       |

|  |              |                        |
|--|--------------|------------------------|
|  | ZBTB20_2R    | GCTGAATGAAAATGGTGGCAC  |
|  | ZBTB20_3(A)F | TTTGTGTCTGCGTTGACATGCT |
|  | ZBTB20_3(A)R | GTCGATGACTGTTTTGATCTGC |
|  | ZBTB20_3(B)F | CTTCATGTACAGCGGCGTGC   |
|  | ZBTB20_3(B)R | GCGTTCCAGGATCTGCACCT   |
|  | ZBTB20_3(C)F | TGGGCAACATCCACATCAAGC  |
|  | ZBTB20_3(C)R | TCACAAACTGGGTCTGCTGGC  |
|  | ZBTB20_3(D)F | CATTGGCACAGCTGGCAACAC  |
|  | ZBTB20_3(D)R | CCCTTCTACCTGCTCTCTTAC  |
|  | ZBTB20_4(A)F | TAGGAGGGCCTGGATTTTTC   |
|  | ZBTB20_4(A)R | TCGCTCCAGGAGGGTCTTG    |
|  | ZBTB20_4(B)F | AGAAGTTCTCTCACAAGACC   |
|  | ZBTB20_4(B)R | AATGTAATGTACCAGCAGGCA  |

**ANEXO A - APRESENTAÇÃO ORAL DE TRABALHO E PREMIAÇÃO (X  
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DIAGNOSTICS AND THERAPEUTICS -  
2019)**



**SINATERX**  
X International Symposium on Diagnostics and Therapeutics  
XIV LIKA Scientific Journey



**RDIS**  
V International Symposium  
on Rare Diseases

## CERTIFICATE

*[Signature]*  
**João Luiz de Lima Filho**  
Director of LIKA - UFPE  
Coordinator of SINATER, RDIs and  
LIKA Scientific Journey - Recife, Brazil

*[Signature]*  
**James Owen**  
Professor, University College London  
Coordinator of SINATER, RDIs and  
LIKA Scientific Journey - London, England

This award is presented to **Laura Durão Ferreira, João Ricardo Mendes de Oliveira** for winning **1st place** in the **ORAL** category presenting the work **Overlapping diseases in a brazilian subject with brain calcification linked to novel phenotypes: two needles in a haystack** during the event “X International Symposium on Diagnostics and Therapeutics (SINATER), V International Symposium on Rare Diseases (RDIS) and XIV LIKA Scientific Journey” (SigProj No. 336560.1825.121666.02072019), promoted by Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil, on 28th – 30th August 2019 (20 hours).

**Organization:**




**Support:**



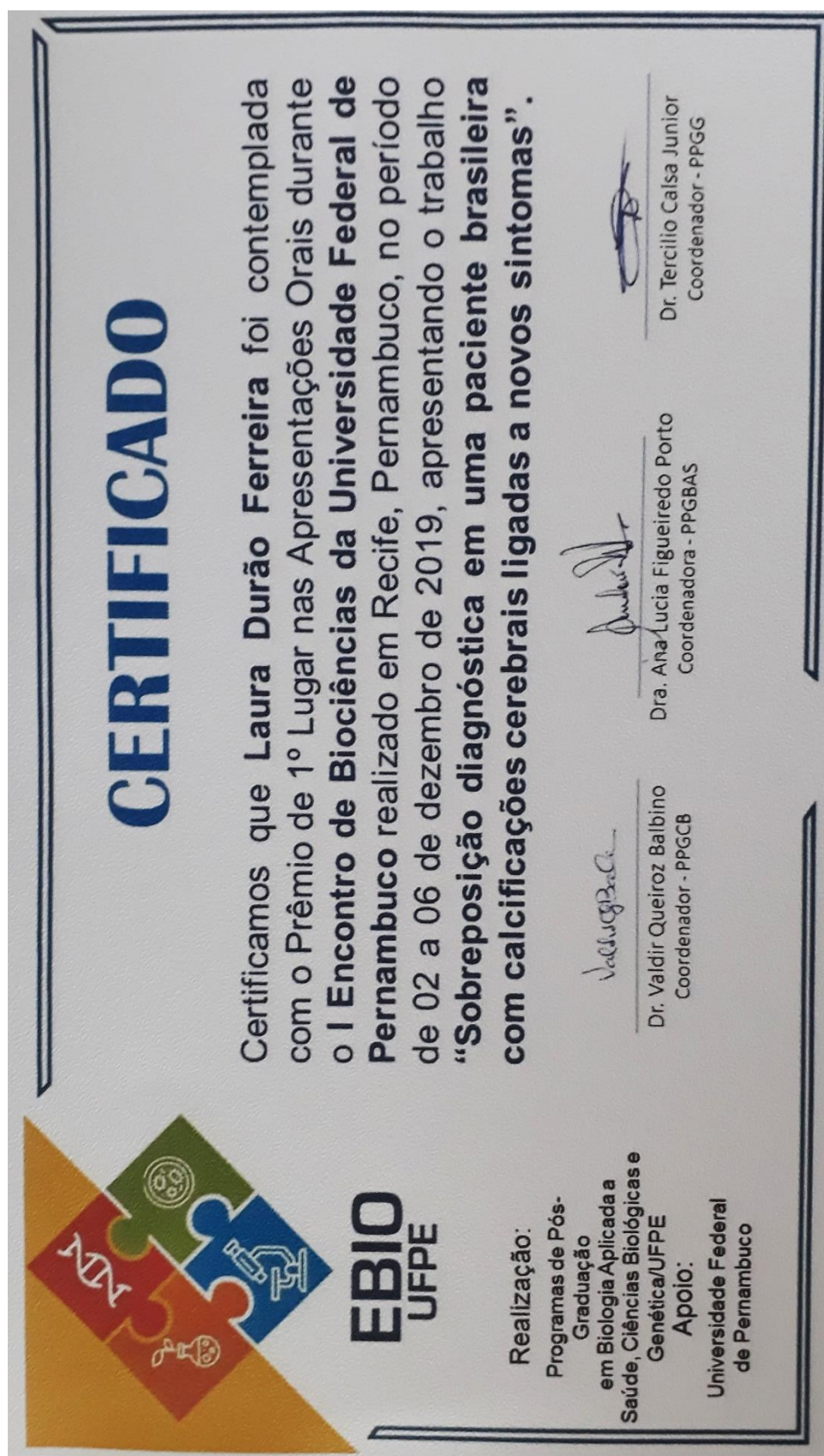




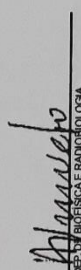




**ANEXO B – APRESENTAÇÃO ORAL DE TRABALHO E PREMIAÇÃO (I  
ENCONTRO DE BIOCIÊNCIAS DA UFPE - 2019)**

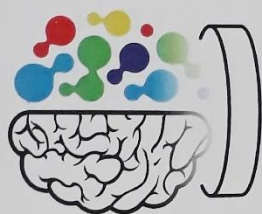


**ANEXO C - APRESENTAÇÃO DE PALESTRA EM CONGRESSO (I CONGRESSO  
DE NEUROFISIOLOGIA DA UFPE - 2019)**

|                                                                                                                           |                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <br>UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO | NÚCLEO DE ESTUDOS EM NEUROCIÊNCIAS | <h2 style="margin: 0;">CERTIFICADO</h2> <p style="margin-top: 20px;">Certificamos que <b>Laura Durão Ferreira</b> ministrou uma palestra intitulada "Calcificações cerebrais: diagnóstico molecular, abordagem experimental e perspectivas" durante do <b>I CONGRESSO DE NEURO-FISIOLOGIA</b>, entre os dias 06 a 08 de Novembro, na Universidade Federal de Pernambuco promovido pelo Núcleo de Estudos em Neurociências do Departamento de Biofísica e Radiobiologia, totalizando uma carga horária de <b>3 horas</b>.</p> <p style="text-align: right; margin-top: 20px;">Recife, 08 de Novembro de 2019.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;"> <br/> <small>COORDENADORA DO NÚCLEO DE ESTUDOS EM NEUROCIÊNCIAS.<br/>PROF. DR. ISVÂNIA M. S. LOPE</small> </div> <div style="text-align: center;"> <br/> <small>DIRETOR DO NÚCLEO DE BIOFÍSICA E RADIOLOGIA.<br/>PROF. DR. ABEL VIEIRA NETO</small> </div> </div> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**ANEXO D – PARTICIPAÇÃO EM WORKSHOP (I STANFORD HUMAN BRAIN  
ORGANOGENESIS WORKSHOP - 2020)**

# Stanford Human Brain Organogenesis Course



## CERTIFICATE OF COMPLETION

This is to Certify that Laura Ferreira  
Attended and Survived the

**Stanford Human Brain Organogenesis Hands-on Workshop**  
between January 27<sup>th</sup> – January 31<sup>st</sup>, 2020



Fikri Birey, PhD.  
Lead Course Instructor  
Stanford Brain Organogenesis Program

Sergiu P. Pasca, M.D.  
Bonnie Uytensu and Family Director  
Stanford Brain Organogenesis Program

## ANEXO E – REVISÕES DE ARTIGOS CIENTÍFICOS


[BROWSE](#)
[COMMUNITY](#)
[FAQ](#)





[Researchers](#)
[Laura Ferreira](#)



**Laura Ferreira**  
*"Laura D. Ferreira"*  
[Show more](#)

Web of Science ResearcherID 

AAO-4490-2021

|                     |                          |                                                                                       |                         |
|---------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>PUBLICATIONS</b> | <b>TOTAL TIMES CITED</b> | <b>H-INDEX</b>                                                                        | <b>VERIFIED REVIEWS</b> |
| 7                   | 14                       | 2  | 4                       |

**Verified reviews** 

 (2) Brain

 (2) Journal of Molecular Neuroscience

[Summary](#)
[Metrics](#)
[Publications](#)
[Peer review](#)