

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

**RAYSSA LEAL BORGES DE MEDEIROS**

**PESQUISA DE VARIANTES DIGÊNICAS EM GENES RELACIONADOS À  
HERANÇA AUTOSSÔMICA DOMINANTE EM PACIENTES BRASILEIROS  
COM CALCIFICAÇÃO CEREBRAL FAMILIAL PRIMÁRIA**

**Recife**  
**2021**

**RAYSSA LEAL BORGES DE MEDEIROS**

**PESQUISA DE VARIANTES DIGÊNICAS EM GENES RELACIONADOS À  
HERANÇA AUTOSSÔMICA DOMINANTE EM PACIENTES BRASILEIROS  
COM CALCIFICAÇÃO CEREBRAL FAMILIAL PRIMÁRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

**Recife  
2021**

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Medeiros, Rayssa Leal Borges de

Pesquisa de variantes digênicas em genes relacionados à herança autossômica dominante em pacientes brasileiros com calcificação cerebral familiar primária / Rayssa Leal Borges de Medeiros - 2021.

55 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 e apêndices.

1. Doença de Fahr 2. Doença digênica 3. Heterogeneidade clínica  
I. Oliveira, João Ricardo Mendes de (Orientador) II. Título

572.516

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-367

**RAYSSA LEAL BORGES DE MEDEIROS**

**PESQUISA DE VARIANTES DIGÊNICAS EM GENES RELACIONADOS À  
HERANÇA AUTOSSÔMICA DOMINANTE EM PACIENTES BRASILEIROS  
COM CALCIFICAÇÃO CEREBRAL FAMILIAL PRIMÁRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde

Aprovada em: 18/06/2021

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Danyelly Brunaska Gondim Martins  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Reginaldo Jose Petroli  
Universidade Federal de Alagoas

---

Dr. Michel Satya Naslavsky  
Universidade de São Paulo

---

Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Fabrício Oliveira Souto  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico essa Tese aos meus pais, Washington e Alessandra e ao meu companheiro de vida, Breno; a quem amo e admiro.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente à todas as mulheres que abriram e às que ainda abrem caminhos enfrentando dores e dificuldades para que hoje eu possa estar exercendo e expondo o que gosto, quero, acredito e penso. Foi e ainda é preciso coragem para romper as estruturas que silenciam meninas e mulheres em vários setores da sociedade.

Agradeço imensamente ao meu orientador João, que diante de quatro anos trabalhando juntos acreditou em minhas capacidades, muitas vezes mais que eu mesma. No último ano de pandemia causada pelo novo coronavírus (Covid-19) foi capaz de exercer comigo a tranquilidade e paciência diante dos meus vários distanciamentos. Que a vida lhe seja muito generosa.

À minha mãe, por todo o esforço em me instruir em cada fase da vida, por fazer o melhor que pôde diante das situações postas pela vida e pela compreensão de meus momentos de ausência física.

Ao meu pai, que esteve presente e educou-me enquanto pôde e agora está contemplando a realização dessa trajetória de um lugar que hoje acredito viver futuramente.

Ao meu padrasto, Eduardo Elias, que me acompanha no caminho da vida com sua inigualável compreensão do mundo, sua autenticidade e sua sabedoria que me fazem ver a arte com mais esmero.

À Mecejana Melo e Paulina Albuquerque, pelo suporte, pela amizade de valor inestimável e por serem o sustentáculo de uma parte da minha vida que não seria a mesma sem elas.

À Breno, que esteve presente quando as dificuldades e problemas se multiplicaram na estrada e prosseguiu corajosamente comigo e junto a mim, me apoiando e desejando bravura. Obrigada pela paciência, incentivo e amor que não faltaram um minuto sequer.

À Darlene Paiva e Tarcísio Cavalcanti, que transpuseram com carinho a minha vida e trouxeram um novo significado de amizade. A gratidão aqui é pequena diante de tantos alicerces que criamos juntos.

À Anne Kelly Santana, que mesmo distante, é uma imensa parte de mim mesma durante os anos desde a graduação em Biomedicina.

À Raíssa Peregrino e Luiza Andrade, mulheres essenciais no meu diagnóstico de depressão e tratamento e também na contribuição para o meu desenvolvimento pessoal.

Aos meus amigos essenciais Maria Luiza Andrade, Marcella Lins, Emmanuel Matheus, Renan Ferraz e Bruno Maciel que desde o Colégio Atual de Olinda me fazem acreditar no amor para além do romântico.

Agradeço, ainda, a participação da profª Dra. Cíntia Rocha e do profº Dr. Michel Naslavsky em minha Qualificação de Doutorado que, mesmo não sabendo, fizeram a fagulha de confiança e crença em meu trabalho como pesquisadora reacender.

À todas e todos do laboratório de Neuroimunogenética: Joana, Roberta, Eraldo, Denis, Lylyan, Eriton e Laura.

À todas e todos que trabalham, ou trabalharam, no laboratório de imunopatologia Keizo Asami (LIKA), obrigada pelos cafezinhos na copa: Jana Messias, Cláudio de Aguiar, Carmelita Bezerra, Danielle Lima, Sandra Barbosa, Marina Falcão, Fábio Costa, Ilma Santos, Kilma Coelho, Maria da Conceição Chimendes, Maria de Fátima Alves e Moisés José.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro pelos quatro anos de estudo.

Os meus mais sinceros agradecimentos à todas e todos que, mesmo não sendo aqui listados, tiveram participação nessa conquista.

Por fim, gostaria de deixar registrado neste documento público a minha angústia e desalento com a atual situação do Brasil. É de amplo conhecimento (exceto àqueles sem escrúpulos que insistem em renegar a inteligência) que desde que o ignóbil e fascista governo Bolsonaro ascendeu ao poder, investimentos em estruturas que promovem desenvolvimento social foram reduzidos à ínfimos valores. Nesse rol dos cortes cruéis, está o dilaceramento da pesquisa científica que depende de milhares de estudantes mal remunerados e sem direitos para resistir em meio à calamidade de estudos sem recursos e agora sem perspectiva de avanços. Contudo, estou aqui resistindo – mesmo subutiliza e continuamente sem oportunidades – não por bravura, mas por não me conformar com o abandono de anos a fio investidos na pesquisa. Aprendemos a ser resilientes, mas estamos sem fôlego! O único cenário que antevejo como saída a essa catástrofe é apenas um: FORA BOLSONARO!

“Devemos estar dispostos a nos livrar da vida que planejamos para ter a vida que nos espera”.

- Joseph Campbell

## RESUMO

A calcificação cerebral familiar primária (CCFP), amplamente conhecida por doença de Fahr, é uma desordem neuropsiquiátrica ocasionada por variantes patogênicas nos genes *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1*, *MYORG* ou *JAM2*. É caracterizada pela deposição ectópica de fosfato de cálcio principalmente nos gânglios da base, apresentando-se em padrão bilateral e simétrico. Pacientes com CCFP apresentam amplo espectro de sinais e sintomas, que incluem alterações motoras, cognitivas e psiquiátricas. Entretanto, é bem estabelecido que pacientes com essa doença apresentam alta heterogeneidade clínica inter e intrafamiliar, não identificando-se, ainda, a origem genética capaz de promover tal heterogeneidade. Porém, estudos recentes vêm mostrando que variantes em segundo gene (não associado à CCFP), foram identificadas em pacientes previamente diagnosticados com CCFP, promovendo nos indivíduos afetados um fenótipo complexo e heterogêneo. Nesse contexto, nosso estudo objetivou a pesquisa de variantes patogênicas em um segundo gene relacionado à CCFP e associado à herança autossômica dominante (*SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB* e *XPR1*). A coorte é composta por 13 pacientes brasileiros previamente diagnosticados com CCFP. Após a triagem por sequenciamento de Sanger, foram identificadas 25 variantes de nucleotídeos únicos (SNVs). O rs246391 (c.3137+4A>G), identificado em dois pacientes em heterozigose e dois em homozigose, se destacou por estar localizado próximo a um sítio de splicing. A análise *in silico* sugere que a variante altere o splicing e, conseqüentemente, a função proteica. Nosso estudo não conseguiu resultado significativo sobre a análise de expressão do transcrito. Entretanto, pela alta frequência populacional (MAF: 0.30) e por ser considerada benigna por banco de dados, acreditamos que esta variante não atue modulando as manifestações clínicas dos pacientes portadores das variantes. Assim, nosso estudo não identificou nenhuma variante patogênica em um segundo gene relacionado à herança autossômica da CCFP que esclareça tal complexidade fenotípica.

**Palavras-chave:** CCFP; doença digênica; heterogeneidade clínica.

## ABSTRACT

Primary familial brain calcification (PFBC), also known as Fahr's disease, is a neuropsychiatric disorder caused by pathogenic variants on *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1*, *MYORG* or *JAM2* genes. It is characterized by ectopic brain calcification, on symmetrical and bilateral pattern, located mainly in basal ganglia. PFBC patients present a wide spectrum symptoms including motor, cognitive and psychiatric alterations. However, it is well established that PFBC individuals also present high clinical intra and interfamilial heterogeneity, where the genetic base of this phenotypic heterogeneity is still not understood. However, recent studies have been shown that variants in a secondary gene, not related to PFBC, were identified in patients previously diagnosed with this disorder, promoting a complex and heterogenous phenotype. Based on this, we aimed in this study to screen pathogenic variants in a second gene associated to autosomal dominant PFBC (*SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB* e *XPR1*) in 13 Brazilian patients. After the Sanger sequencing of intended genes, were identified 25 single nucleotides variants (SNVs). The rs246391 (c.3137+4A>G), identified in four individuals, stood out to be located near to a splice site and predicted to affect splicing, and consequently, the protein function. In spite of that, our gene expression analysis did no show a significant result. Despite this, the high population frequency (MAF: 0.30) and the classification as benign in several data base, this variant seems not acting as modulator of the patient's clinical manifestations. Thus, no pathogenic variant in a second gene linked to PFBC was identified in our PFBC patients, that could clarify the complex PFBC phenotype. Therefore, still remains necessary that others studies search for variants in a second gene, allowing clarify the complex clinical heterogeneity in PFBC patients.

**Keywords:** PFBC; digenic disease; clinical heterogeneity.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA AXIAL DESTACANDO CALCIFICAÇÕES BILATERAIS E SIMÉTRICAS NO CEREBELO (SETA VERMELHA), NÚCLEOS DA BASE (SETAS VERDES) E TÁLAMO (SETA AMARELA)..... 17**
- FIGURA 2 – COMPARAÇÃO ENTRE IMAGENS AXIAIS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA, RESPECTIVAMENTE, DESTACANDO CALCIFICAÇÕES BILATERAIS E SIMÉTRICAS NOS NÚCLEOS DA BASE (SETAS)..... 17**
- FIGURA 3 – MODELO TOPOLÓGICO DO PIT-2 DESCRITO NO BANCO DE DADOS UNIPROT (Q08357). DOMÍNIOS TRANSMEMBRANA REPRESENTADO POR CILINDROS COM NUMERAÇÃO DE SEUS AMINOÁCIDOS. .... 20**
- FIGURA 4 – MODELO TOPOLÓGICO DO PDGFR-B DESCRITO NO BANCO DE DADOS UNIPROT (P09619). DOMÍNIOS TRANSMEMBRANA REPRESENTADO POR CILINDROS COM NUMERAÇÃO DE SEUS AMINOÁCIDOS ..... 21**
- FIGURA 5 – MODELO TOPOLÓGICO DO PDGF-B DESCRITO NO BANCO DE DADOS UNIPROT (P01127) COM NUMERAÇÃO DE SEUS AMINOÁCIDOS ..... 21**
- FIGURA 6 – MODELO TOPOLÓGICO DO XPR1 DESCRITO NO BANCO DE DADOS UNIPROT (Q9UBH6). DOMÍNIOS TRANSMEMBRANA REPRESENTADO POR CILINDROS COM NUMERAÇÃO DE SEUS AMINOÁCIDOS ..... 22**
- FIGURA 7 – RESUMO DA FREQUÊNCIA E LOCALIZAÇÃO DAS CALCIFICAÇÕES BILATERAIS E SIMÉTRICAS EM 8 DOS 13 PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO ..... 28**
- FIGURA 8 – SEQUÊNCIA GENÔMICA DO GENE PDGFRB. EM AZUL A SEQUÊNCIA REFERÊNCIA E EM AMARELO A CCDS 22 (SEQUÊNCIA CODIFICANTE CONSENSO). DESTACANDO EM VERMELHO A LOCALIZAÇÃO DA VARIANTE RS246391 NO ÍNTRON 22 (C.3137+4A>G) 29**

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1 - RESUMO DAS TREZE FAMÍLIAS E DE SEUS 13 INDIVÍDUOS INCLUÍDOS NO ESTUDO E SUAS VARIANTES DESCRITAS ..... 25**

**TABELA SUPLEMENTAR 1 - LISTA DE SNVS ENCONTRADAS NOS 13 PACIENTES COM CCFP AVALIADOS..... 41**

**TABELA SUPLEMENTAR 2 - RESUMO DAS INFORMAÇÕES RELATIVA A PACIENTES COM VARIANTES DIGÊNICAS COM CCFP ..... 42**

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
β	Beta
A	Adenina
ACMG	Do inglês, <i>The American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AD	Herança autossômica dominante
AVC	Acidente vascular cerebral
BHE	Barreira hematoencefálica
C	Citosina
Ca	Cálcio
CC	Calcificação cerebral bilateral e simétrica
CCFP	Calcificação cerebral familiar primária
CDS	Sequência codificante
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
Del	Deleção
DIDA	do inglês, <i>The Digenic Diseases Database</i>
DNA	Desoxirribonucleotídeo
DYT6	Do inglês, <i>torsion dystonia type 6</i>
G	Guanina
gDNA	DNA genômico
Ins	Inserção
<i>JAM2</i>	Gene
kDa	QuiloDalton
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
MAF	do inglês, <i>minor allele frequency</i>
mRNA	RNA mensageiro
MYORG	Proteína codificada pelo gene <i>MYORG</i>
<i>MYORG</i>	Gene
Na	Sódio
OMIM	Do inglês, <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p	Braço curto do cromossomo

P	Fósforo
PCR	Reação de cadeia da polimerase
<i>PDGFB</i>	Gene
PDGF-β/PDGF-BB	Proteína codificada pelo gene <i>PDGFB</i>
Pi	Fosfato inorgânico
PiT-2	Proteína codificada pelo gene <i>SLC20A2</i>
qPCR	PCR em tempo real
PTH	Paratormônio
q	Braço longo do cromossomo
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ribonucleotídeo
rs	Do inglês, <i>reference SNP</i>
RTK	Receptor tirosina quinase
Saos-2	Célula de osteosarcoma humano
<i>SLC20A2</i>	Gene
SNV	Do inglês, <i>single nucleotide variant</i>
T	Timina
TC	Tomografia computadorizada
TDA	Transtorno do espectro autista
<i>THAP1</i>	Gene
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTR	Região não transcrita
X-MLV	Receptor para vírus da leucemia murina xenotrópico
<i>XPR1/SLC35A1</i>	Gene
XPR1	Proteína codificada pelo gene <i>XPR1/SLC35A1</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 CALCIFICAÇÃO CEREBRAL FAMILIAL PRIMÁRIA.....	16
2.2 HETEROGENEIDADE CLÍNICA .....	18
2.3 GENES RELACIONADOS À HERANÇA AUTOSSÔMICA DOMINANTE .	19
2.3.1 <i>SLC20A2</i> .....	19
2.3.2 <i>PDGFB/ PDGFRB</i> .....	20
2.3.3 <i>XPR1</i> .....	22
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
3.1 Objetivo Geral .....	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS REALIZADOS</b> .....	<b>25</b>
4.1 CASUÍSTICA .....	25
4.2 ANÁLISE MOLECULAR.....	26
4.2.1 DNA Genômico .....	26
4.2.2 Sequenciamento do DNA Genômico.....	26
4.2.3 Expressão Relativa do Gene <i>PDGFRB</i> .....	26
4.2.4 Análise <i>in silico</i> .....	27
4.2.5 Análise em Banco de Dados .....	27
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
5.1 DESCRIÇÃO DA COORTE.....	28
5.2 Variantes de nucleotídeo único (SNVs).....	29
5.3 Associação da Expressão gênica com o snv rs246391 .....	29
5.4 ARTIGOS E TRABALHOS .....	30
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>
<b>APÊNDICE A – DIGENIC VARIANTS AS POSSIBLE CLINICAL MODIFIER OF PRIMARY FAMILIAL BRAIN CALCIFICATION PATIENTS</b> .....	<b>44</b>

<b>APÊNDICE B - EXPANSION OF THE PRIMROSE SYNDROME PHENOTYPE THROUGH THE COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO NEW CASE REPORTS WITH <i>ZBTB20</i> VARIANTS .....</b>	<b>45</b>
<b>APÊNDICE C - LACK OF MAJOR OPHTHALMIC FINDINGS IN PATIENTS WITH PRIMARY FAMILIAL BRAIN CALCIFICATION LINKED TO <i>SLC20A2</i> AND <i>PDGFB</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>APÊNDICE D - A COMMENTARY ON BAND-LIKE CALCIFICATION WITH SIMPLIFIED GYRATION AND POLYMICROGYRIA: REPORT OF 10 NEW FAMILIES AND IDENTIFICATION OF FIVE NOVEL <i>OCLN</i> MUTATIONS .....</b>	<b>47</b>
<b>APÊNDICE E - MORE THAN MEETS THE EYE: SEARCHING FOR ADDITIONAL FINDINGS IN PRIMARY BRAIN CALCIFICATION.....</b>	<b>48</b>
<b>APÊNDICE F .....</b>	<b>49</b>
<b>APÊNDICE G.....</b>	<b>50</b>
<b>APÊNDICE H.....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICE I .....</b>	<b>52</b>
<b>APÊNDICE J .....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A calcificação cerebral familiar primária (CCFP), amplamente conhecida como doença de Fahr ou calcificação idiopática dos gânglios da base, é uma doença neuropsiquiátrica rara caracterizada pelo depósito cumulativo de fosfato de cálcio principalmente nos gânglios da base, cerebelo, tálamo e hipocampo. Tal desordem está relacionada com variantes patogênicas em um dos seis genes já descritos na literatura: *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1*, *MYORG* e *JAM2*. No entanto, o *MYORG* e o *JAM2* foram descritos como os primeiros genes relacionados à herança autossômica recessiva.

A CCFP é uma desordem onde pacientes geneticamente afetados exibem desde quadros clinicamente assintomáticos até vasto espectro de alterações motoras, cognitivas e neuropsiquiátricas, nos quais geralmente se manifestam na quarta ou quinta década de vida. Apesar de ser uma doença bem caracterizada, é igualmente marcada pela alta heterogeneidade clínica intra e interfamiliar, não sendo ainda estabelecida a base genética para tal heterogeneidade. Entretanto, estudos recentes vêm demonstrando que paciente previamente diagnosticados com CCFP e fenótipos atípicos à CCFP, cursam com variantes patogênicas em um segundo gene não-relacionados à esta desordem, configurando, nesses casos, um modelo de doença digênica.

A herança digênica se refere à combinação de duas variantes, em dois genes distintos, nas quais contribuem sinergicamente para fenótipos mais complexos em pacientes portadores de tais variantes. Assim, tais evidências suportam o fato de que variantes em dois genes distintos são capazes de modular as manifestações clínicas em pacientes com CCFP. Esses achados ressaltam, ainda, a importância de estudos mais aprofundados acerca da possível associação de variantes digênicas com a heterogeneidade nos pacientes com esta desordem.

Assim, para melhor entender a complexidade da heterogeneidade clínica dos indivíduos brasileiros previamente diagnosticados com CCFP, foi estabelecido o objetivo de avaliar os genes com transmissão autossômica dominante (*SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB* e *XPR1*) relacionados à CCFP em busca de variantes secundárias – doença digênica. Além de avaliar se tais

variantes secundárias são capazes de atuar em sinergismo com as variantes causadoras da CCFP, agindo como modificadores dos sintomas clínicos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

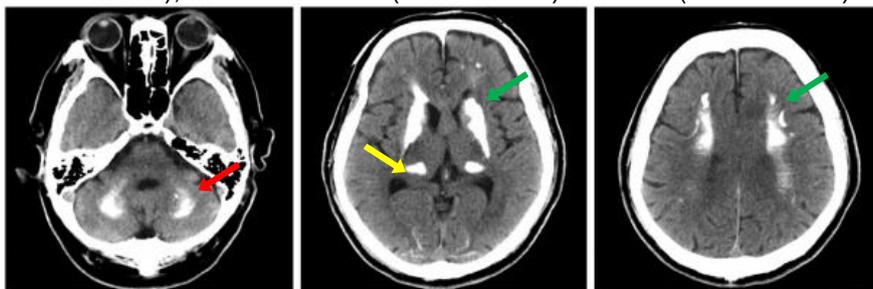
### 2.1 CALCIFICAÇÃO CEREBRAL FAMILIAL PRIMÁRIA

A calcificação cerebral familiar primária (CCFP) (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM #213600, #616413, #615007 e #615483), também conhecida pelo epônimo 'doença de Fahr', é uma doença neurodegenerativa rara caracterizada pela deposição ectópica e cumulativa de cristais de hidroxiapatita (fosfato de cálcio) e baixas concentrações de ferro, zinco e alumínio no encéfalo (Quintáns et al. 2018). Apesar da prevalência exata ser desconhecida pela ausência de levantamento de dados populacionais, estima-se que no mundo essa desordem afete cerca de 4,5 a cada 10.000 indivíduos (Nicolas et al. 2018). No Brasil, foram confirmados 14 indivíduos de seis famílias com a doença até o momento.

A CCFP é determinada por calcificações características, porém, não-patognomônicas, apresentando-se em padrão bilateral e simétrico, localizadas principalmente nos gânglios da base, cerebelo, hipocampo, tálamo e substância branca sub-cortical (Figura 1) (Manyam 2005; Tadic et al. 2015; Bezerra & Oliveira 2016). No entanto, os mecanismos fisiopatológicos que levam às calcificações exclusivamente nas regiões supracitadas não foram esclarecidos. Recentemente um estudo em camundongos modelos pra a CCFP descreveu que as calcificações se estabelecem inicialmente em nódulos orgânicos nas áreas afetadas e adjacientemente a vasos sanguíneos (Jensen et al. 2018).

Tal estudo revela ainda, que o foco de iniciação das calcificações acontece principalmente no interior de astrócitos e pericitos (Jensen et al. 2018). Assim, a desregulação de pericitos vem sendo descrita como estando associada com o desenvolvimento da CCFP (Keller et al. 2013; Nicolas et al. 2013b; Legati et al. 2015; Zarb et al. 2019).

Figura 1 – Tomografia computadorizada axial destacando calcificações bilaterais e simétricas no cerebelo (seta vermelha), núcleos da base (setas verdes) e tálamo (seta amarela)

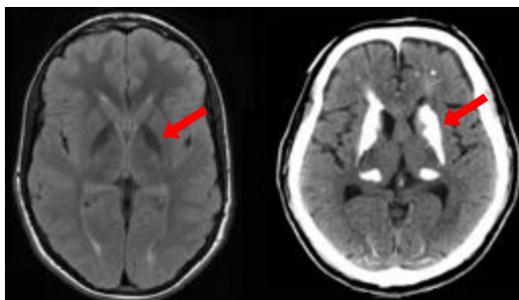


Fonte: Adaptado de Kimura et al. (2016)

Astrócitos e pericitos, células que fazem parte do sistema nervoso central, juntamente com neurônios, células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE), miócitos e componentes da matriz extracelular formam a unidade neurovascular (UNV) (Harder et al. 2002).

Nos pacientes, tais calcificações são identificadas através de exames de neuroimagem onde a tomografia computadorizada (TC) é a técnica mais recomendada para diagnóstico complementar devido à falta sensibilidade em identificar as calcificações no parênquima quando comparada com as técnicas usuais de ressonância magnética nuclear (RMN) (Figura 2) (Kimura et al. 2016; Quintáns et al. 2018).

Figura 2 – Comparação entre imagens axiais de ressonância magnética nuclear e tomografia computadorizada, respectivamente, destacando calcificações bilaterais e simétricas nos núcleos da base (setas)



Fonte: Adaptado de Kimura et al. (2016) e Knowles et al. (2018)

Atualmente, seis genes distintos estão relacionados diretamente com o desenvolvimento da CCFP: quatro relacionados à herança autossômica dominante: *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1* e dois relacionados à herança autossômica recessiva: *MYORG* e *JAM2* (Yao et al. 2018; Cen et al. 2020). É

comumente herdada, contudo variantes *de novo* já foram descritas (Wang et al. 2012a; Keller et al. 2013; Nicolas et al. 2013b; Ferreira et al. 2014).

Uma particularidade relacionada à CCFP é a ausência de alterações bioquímicas envolvendo os níveis séricos de cálcio (Ca), fósforo (P), paratormônio (PTH) e fosfatase alcalina, pois tais anormalidades estão geralmente associadas à calcificações cerebrais secundárias – de causas infecciosas, metabólicas ou mitocondriais (Quintáns et al. 2018). Ademais, já foi descrito que alguns pacientes com CCFP cursam com alto nível de fosfato inorgânico (Pi) no líquido cefalorraquidiano (Pauca et al. 2017).

A ocorrência das calcificações cerebrais tem um papel determinante no desenvolvimento dos principais sinais e sintomas clínicos nos pacientes com CCFP, nos quais surgem frequentemente entre os 45 e 60 anos, apesar de haver descrições em todas as faixas etárias (Quintáns et al. 2018). É necessário, ainda, considerar a penetrância incompleta relativa às manifestações clínicas nos pacientes, onde cerca de um terço dos indivíduos geneticamente diagnosticados com a CCFP possuem a calcificação cerebral porém são clinicamente assintomáticos (Oliveira et al. 2009; Nicolas et al. 2013a). Os sintomas, quando presentes, envolvem manifestações neurológicas, psiquiátricas e cognitivas progressivas; onde o parkinsonismo, distonia, ataxia, convulsões, depressão, ansiedade, alterações de humor e enxaqueca crônica são os sintomas mais reportados (Tadic et al. 2015; Quintáns et al. 2018; Amisha et al., 2021).

Por outro lado, a CCFP é uma desordem na qual os pacientes cursam usualmente com alta heterogeneidade clínica, até mesmo entre indivíduos de uma mesma família e com o mesmo genótipo (Carecchio et al. 2014; Keogh et al. 2015).

## 2.2 HETEROGENEIDADE CLÍNICA

As alterações genéticas responsáveis pelo desenvolvimento da CCFP são facilmente estabelecidas, no entanto, os mecanismos genéticos responsáveis pela heterogeneidade fenotípica dos pacientes ainda não foram elucidados. Diante disso, alguns estudos vêm demonstrando a complexidade fenotípica desta desordem ao sinergismo com variantes em genes não-relacionados à CCFP, caracterizando então, a CCFP como doença digênica (Baker et al. 2014;

Fjaer et al. 2015; Fujioka et al. 2015; DeMeo et al. 2018; Knowles et al. 2018; Mu et al., 2019).

A herança digênica é o tipo mais simples de herança oligogênica, estando relacionada com a combinação de duas variantes em dois genes distintos, contribuindo para um fenótipo complexo nos pacientes portadores de tais variantes (Schäffer 2013). O DIDA (do inglês, *Digenic Diseases Database*), banco de dados acerca de doenças digênicas e suas variantes, é categorizado em duas classes: a primeira, representa a “*true digenic*” (rotulada como ‘on/off’), onde duas variantes em dois genes distintos são necessárias para que a doença se manifeste (Gazzo et al. 2016; Posey et al. 2016). A segunda classe é referida como “*composite class*” (rotulada como ‘severidade’ da doença) na qual pode haver duas subcategorias: a) variante mendeliana com modificador: onde é preciso uma variante causadora de determinado fenótipo e uma variante rara no segundo gene, geralmente associado a mesma via de ação (Gonzaga-Jauregui et al. 2015); e b) diagnóstico molecular duplo: onde duas variantes, em genes diferentes, segregam de forma independente resultando em um fenótipo misto (Posey et al. 2016).

É importante ressaltar, no entanto, que nenhum dos estudos listados na Tabela 1 se refere a variantes digênicas em genes relacionados à CCFP. Contudo, foi observado que os pacientes incluídos no nosso estudo não possuíam fenótipo clínico marcante e complexo que pudesse ser associado a outro gene. Nos propomos, então, a avaliar o possível impacto de variantes digênicas apenas em genes associados à CCFP e à herança autossômica dominante relacionados à CCFP (*SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1*).

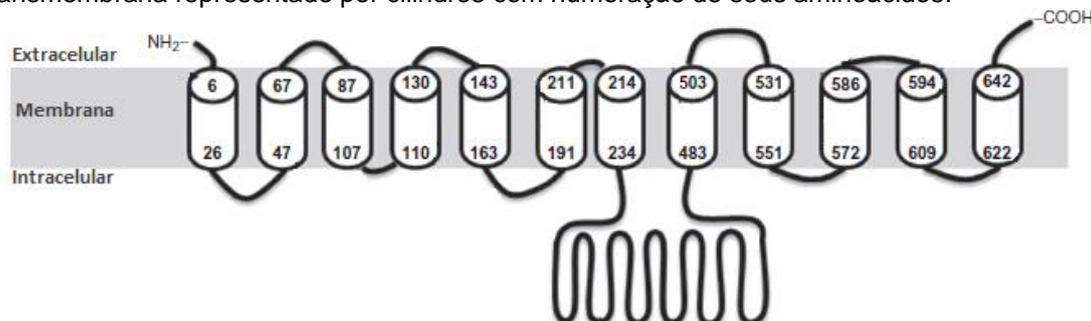
## 2.3 GENES RELACIONADOS À HERANÇA AUTOSSÔMICA DOMINANTE

### 2.3.1 *SLC20A2*

O gene *SLC20A2*, localizado no cromossomo 8 (8p11.21), codifica a proteína transmembrana PiT-2 (do inglês, *type III sodium-dependent phosphate transporter 2*) de 652 aminoácidos e 70kDa, no qual é expresso constitutivamente (*housekeeping*) em todas as células dos tecidos humanos (Figura 3) (Wang et al. 2012b). No cérebro, é o principal co-transportador de

Na<sup>+</sup>/Pi do tipo III e é encontrado principalmente no córtex e cerebelo (Beck et al. 2003).

Figura 3 – Modelo topológico do PiT-2 descrito no banco de dados UniProt (Q08357). Domínios transmembrana representado por cilindros com numeração de seus aminoácidos.



Fonte: Adaptado de Quintáns et al. (2018)

O Pi possui função indispensável em processos metabólicos e em componentes estruturais da célula, tais como regulação ácido-base e metabolismo celular (Prié & Friedlander 2010). A manutenção de seus níveis fisiológicos no encéfalo ocorre de forma altamente regulada, sendo o PiT-2 o principal mediador do seu transporte do meio intersticial para o interior das células (Beck et al. 2003). Além disso, estudos demonstram que alterações no transporte de Pi com consequente aumento dos níveis extracelular, estão associados com deposição anormal de fosfato de cálcio em tecidos, resultando em calcificação pulmonar e formação de cálculo renal, além de induzir a calcificação vascular (Prié & Friedlander 2010; Kendrick et al. 2011).

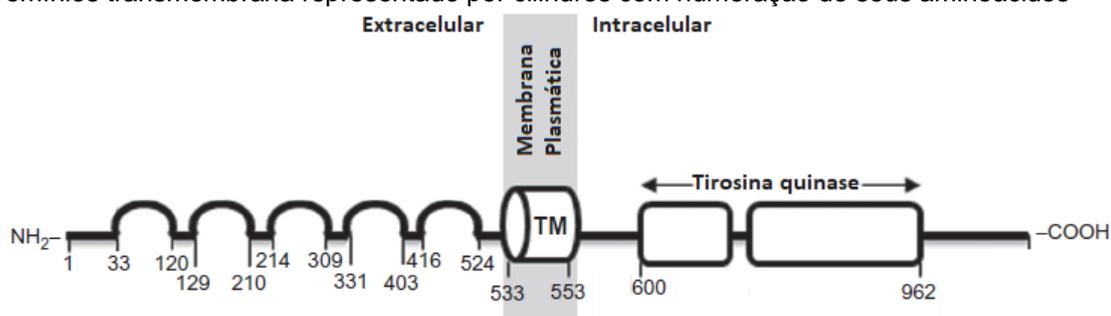
O *SLC20A2* foi o primeiro gene associado com a CCFP, onde Wang e cols. Em 2012 descreveram sete famílias (três chinesas, três espanholas e uma brasileira) com sete variantes patogênicas distintas e todas relacionadas com a herança autossômica dominante e com perda de função proteica (Wang et al. 2012a). Atualmente, variantes neste gene acometem cerca de 50% dos pacientes com calcificação primária, sendo o primeiro gene a ser triado em caso de suspeita de CCFP (Quintáns et al. 2018).

### 2.3.2 PDGFB/ PDGFRB

O *PDGFRB*, localizado no cromossomo 5 (5q32), codifica o receptor tirosina quinase (RTK) PDGF-R $\beta$  (do inglês, *platelet-derived growth 20etro receptor beta*), no qual está localizado principalmente na superfície celular e

possui alta afinidade ao homodímero PDGF-BB, no qual faz parte da família de PDGFs (Funa & Sasahara 2014). É uma proteína transmembrana com cinco domínios extracelulares sendo um destes, o domínio RTK (Figura 4). A ligação substrato/receptor leva à auto-ativação por fosforilação com desencadeamento da cascata de sinalização intracelular, onde sua principal função no encéfalo, se dá no seu envolvimento com a integridade da BHE (Funa & Sasahara 2014; Quintáns et al. 2018). É expresso em neurônios, células musculares lisas vasculares e pericitos dos gânglios da base e cerebelo (Nicolas et al. 2013b).

Figura 4 – Modelo topológico do PDGFR- $\beta$  descrito no banco de dados UniProt (P09619). Domínios transmembrana representado por cilindros com numeração de seus aminoácidos



Fonte: Adaptado de Quintáns et al. (2018)

Seu principal ligante, o fator de crescimento homodímero PDGF- $\beta$  (PDGF-BB) (do inglês, *platelet-derived growth 21etro subunit B*), é codificado pelo *PDGFB*, localizado no cromossomo 22 (22q13.1) e expresso principalmente em neurônios e células endoteliais (Figura 5) (Andrae et al. 2008; Keller et al. 2013). A via PDGF-R $\beta$ /PDGF- $\beta$  está especialmente relacionada ao recrutamento de pericitos durante a angiogênese na BHE (Andrae et al. 2008). Acredita-se que alterações nessas células possam levar à disfunção da BHE com consequente aumento de permeabilidade capilar, fato que irá favorecer a deposição de fosfato de cálcio (Lemos et al. 2013).

Figura 5 – Modelo topológico do PDGF- $\beta$  descrito no banco de dados UniProt (P01127) com numeração de seus aminoácidos



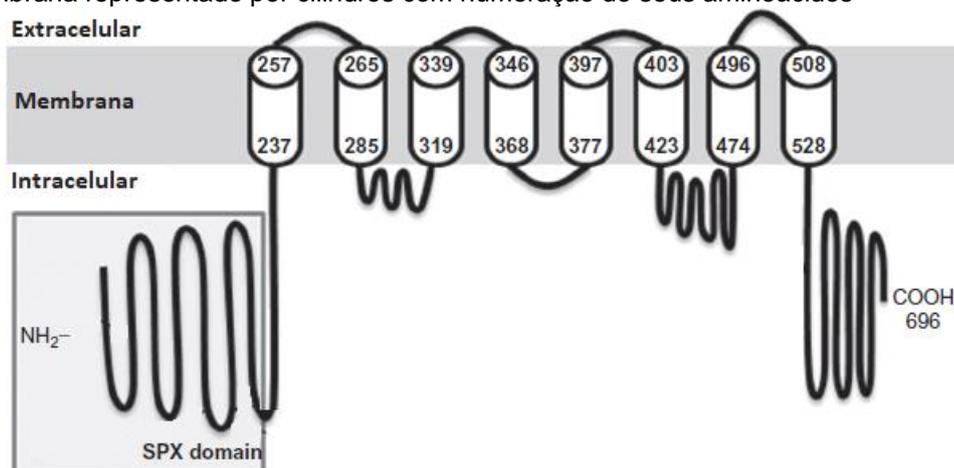
Fonte: Adaptado de Quintáns et al. (2018)

Variantes patogênicas tanto no *PDGFB* quanto no *PDGFRB*, seguem o padrão autossômico dominante de herança, levando também à perda de função de suas proteínas (Keller et al. 2013; Nicolas et al. 2013b). São atualmente os dois genes mais frequentes, depois do *SCL20A2*, que estão associados ao desenvolvimento da CCFP (Quintáns et al. 2018).

### 2.3.3 XPR1

O *XPR1*, também descrito como *SLC35A1*, está localizado no cromossomo 1 (1q25.3) e codifica a proteína de mesma sigla XPR1 (do inglês, *xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1*), e assim como o PiT-2, é uma proteína transmembrana transportadora de fosfato (Pi) (Legati et al. 2015). No entanto, o XPR1, localizado principalmente na membrana plasmática, está associado à mediação do efluxo do Pi da célula para o meio intersticial e é o único exportador de Pi conhecido em humanos (Figura 6) (Gaudet et al. 2011; López-Sánchez et al. 2019).

Figura 6 – Modelo topológico do XPR1 descrito no banco de dados UniProt (Q9UBH6). Domínios transmembrana representado por cilindros com numeração de seus aminoácidos



Fonte: Adaptado de Quintáns et al. (2018)

O XPR1 foi inicialmente identificado como o receptor para vírus da leucemia murina xenotrópico (X-MLV), retrovírus capaz de infectar células humanas (Battini et al. 1999; Tailor et al. 2002). Somente em 2013/2014 foi descrito o domínio conservado SPX na região N-terminal cujo papel tem sido associado à regulação direta dos níveis intracelulares de Pi em plantas e leveduras (Wild et al. 2016).

Em 2015, Legati e colaboradores associaram pacientes (de seis famílias) com calcificação primária, e negativos para o *SLC20A2*, *PDGFB* e *PDGFRB*, com variantes patogênicas no *XPR1* (Legati et al. 2015). Em 2016, um segundo estudo publicou a sétima família associada com esse gene, e em 2018 mais três pacientes foram descritos, sendo o gene com menor frequência na CCFP (Anheim et al. 2016; Ramos et al. 2018; López-Sánchez et al. 2019).

Interessantemente, das cinco variantes patogênicas descritas nos pacientes de todas as famílias, sete estão localizadas na região N-terminal e quatro dessas no domínio SPX, resultando em perda de função do XPR1 e, conseqüentemente, em redução da exportação de Pi, demonstrando a importância dessa região (Legati et al. 2015; Anheim et al. 2016; López-Sánchez et al. 2019).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de variantes digênicas em genes relacionados à herança autossômica dominante (*SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1*) no perfil clínico de pacientes brasileiros com calcificação cerebral familiar primária.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar variantes digênicas em genes não triados e relacionados com o desenvolvimento da calcificação cerebral familiar primária (*SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB*, *XPR1*) em pacientes brasileiros previamente diagnosticados com CCFP;
- b) Avaliar a influência das variantes digênicas identificadas em genes relacionados à calcificação cerebral familiar primária (*SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1*) com as manifestações clínicas dos pacientes.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS REALIZADOS

### 4.1 CASUÍSTICA

O presente estudo foi realizado no período de abril/2017 a fevereiro/2020. Foram incluídos 13 pacientes brasileiros de seis famílias distintas, diagnosticados geneticamente com CCFP. A Tabela 1 resume as famílias, o número de indivíduos e as variantes já descritas previamente.

Todos os indivíduos tiveram as calcificações cerebrais confirmadas por exames de imagem (CT ou RMN) e também excluídos para causas secundárias de calcificação cerebral.

Tabela 1 – Resumo das seis famílias e de seus 13 indivíduos incluídos no estudo e suas variantes descritas

Famílias (n=6)	Indivíduos (n=13)	Naturalidade	Gene CCFP	Variante		Referências
				CDS	Proteína	
1A	1A01BR 1A02 BR	Rio de Janeiro	<i>SLC20A2</i>	c.1483G>A	p.Ala495Thr	Lemos et al., 2013
1B	1B01 BR 1B02 BR	São Paulo	<i>SLC20A2</i>	c.1187_1188InsT	p.P397Afs*19	Ramos et al., 2018
1H	1H01BR	São Paulo	<i>SLC20A2</i>	c.1158C>G	p.Tyr386*	Ferreira et al., 2014
1K	1K01 BR 1K03 BR 1K04 BR	São Paulo	<i>PDGFB</i>	c.356T>C	p.Leu119Pro	Keller et al., 2013
1L	1L01 BR 1L02 BR 1L03 BR 1L04 BR	São Paulo	<i>SLC20A2</i>	c.1409delC	p.Pro470Leufs*38	Wang et al., 2012
1P	1P01BR	Rio de Janeiro	<i>SLC20A2</i>	c.1753G>A	p.Ala585Thr	Lemos et al., 2015

Legenda: CDS= sequência codificante (do inglês, *coding sequence*)

As amostras estudadas são oriundas dos projetos aprovados no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde/UFPE (Nº do parecer: 0296.0.172.000-08 e 09475912.8.0000.5208). O projeto foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Todos os pacientes envolvidos foram orientados sobre a proposta do projeto e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente aprovado pelo CEP.

## 4.2 ANÁLISE MOLECULAR

### 4.2.1 DNA Genômico

O DNA genômico (gDNA) dos 13 pacientes com CCFP incluídos no estudo faziam parte do banco de gDNA já disponível no Laboratório de Neuroimunogenética do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### 4.2.2 Sequenciamento do DNA Genômico

A partir das amostras de gDNA, foram realizadas PCRs para as regiões codificantes (éxons) e os limites íntron-éxon dos seguintes genes de interesse: *SLC20A2*, *PDGFB* e *PDGFRB* *XPR1*. Apenas genes relacionados à herança autossômica dominante foram escolhidos para isolar apenas uma variante patogênica e a associação, com possível segunda variante encontrada, ser facilitada.

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método Sanger utilizando o kit 'BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit no equipamento ABI PRISM® 3500 Genetic Analyser (Thermo Fisher Scientific, USA) localizado no Departamento de Genética do Centro de Biociências e no Núcleo de Plataforma Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães. As sequências foram analisadas utilizando o software CLC Main WorkBench 8.1 (Qiagen, EUA) de acordo com as sequências referências: NG\_032161.1 (*SLC20A2*), NG\_050964.1 (*XPR1*), NG\_012111.1 (*PDGFB*) e NG\_023367.1 (*PDGFRB*).

### 4.2.3 Expressão Relativa do Gene *PDGFRB*

Como será descrito nos Resultados (subitem 5.2, página 31), apenas uma variante (rs246391; *PDGFRB*) foi encontrada sendo potencialmente capaz de alterar a expressão gênica no presente estudo. Assim, apenas a análise de expressão do *PDGFRB* foi realizada.

Para tal análise, foi obtida a amostra de sangue de uma paciente portadora em heterozigose da variante. A extração do mRNA e síntese do cDNA

da amostra utilizada para a avaliação da expressão do *PDGFRB* foi realizada por um ex-colaborador da Neuroimunogenética, Danyllo Oliveira, que atualmente desenvolve projeto na Universidade de São Paulo.

Sondas TaqMan® para o gene *PDGFRB* e gene de referência (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, GAPDH) foram utilizadas. Realizadas em triplicata técnicas. O ensaio de expressão gênica foi realizado por qPCR quantitativo no equipamento ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA).

#### **4.2.4 Análise *in silico***

A análise *in silico* foi realizada a partir do software de bioinformática *Human Splicing Finder* versão 3.1, disponível online através do site <http://www.umd.be/HSF/> (Desmet et al. 2009).

#### **4.2.5 Análise em Banco de Dados**

Para a análise quanto à consequência das variantes e seus significados clínicos foi utilizado o Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>) e quanto a interpretação e classificação das variantes, foram seguidas as recomendações do *The American College of Medical Genetics*.

Para a análise da expressão do gene *PDGFRB* foi utilizado o The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org>).

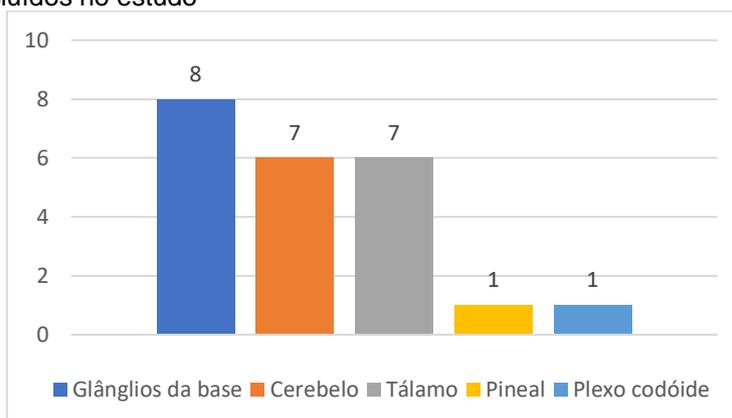
## 5 RESULTADOS

### 5.1 DESCRIÇÃO DA COORTE

Com uma mediana de idade de 45 anos (29 a 90) (excluindo-se três pacientes com idades não disponíveis), sete (53,8%) dos 13 pacientes diagnosticados com CCFP são do sexo feminino e seis (46,2%) do sexo masculino. Dos dados disponíveis, os pacientes 1A01BR e 1H01BR tiveram seus sintomas iniciados na terceira década de vida, 1K01BR aos 46 anos de idade e 1K03BR e 1K04BR reportam enxaqueca crônica desde os 10 anos de idade.

Foi observado um padrão referente à localização das calcificações cerebrais, onde dos 8 pacientes, que possuíam dados disponíveis, todos os 8 possuíam os gânglios da base afetados, seguidos de calcificação no cerebelo (7/8), calcificação no tálamo (7/8), e apenas um paciente (1/8) apresentou calcificação na pineal e calcificação no plexo coroide (Figura 7).

Figura 7 – Resumo da frequência e localização das calcificações bilaterais e simétricas em 8 dos 13 pacientes incluídos no estudo



Fonte: Acervo pessoal

Além disso, foi possível a coleta de dados acerca das manifestações clínicas de apenas 8 dos 13 pacientes.

pois como não há seguimento de muitos pacientes, esta abordagem não exclui a possibilidade de o paciente ter desenvolvido ou vir a desenvolver algum sintoma.

As manifestações clínicas mais frequentes na coorte são: parkinsonismo (4/8), enxaqueca (3/8), depressão (2/8), afasia (2/8), disartria (1/8) e bradicinesia

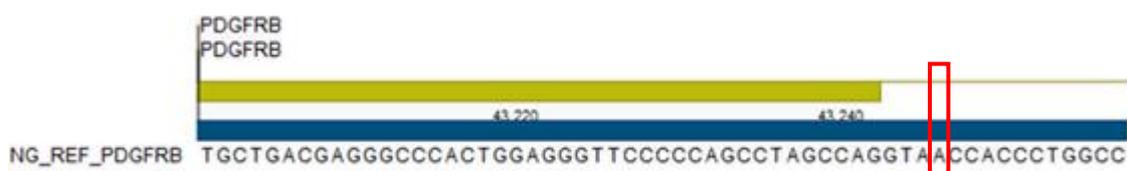
(1/8). Além das alterações típicas da doença, foi descrito acidente vascular cerebral (AVC) em um paciente (1/13) (1B01BR), e outro indivíduo cursa com hipovitaminose D crônica (1H01BR).

## 5.2 VARIANTES DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNVs)

A triagem e pesquisa de variantes nos genes não avaliados previamente e relacionados à CCFP foi realizada em todos os 13 pacientes. Dentre os indivíduos analisados, foram encontradas apenas variantes de nucleotídeo único (SNVs). Todas as variantes encontradas estão na Tabela Suplementar 1 (página 43).

Dentre os 25 SNVs identificados, o rs246391 (c.3137+4A>G), de MAF (do inglês, *minor allele frequency*) 0.30 (Figura 9). Tal variante foi identificada em quatro pacientes dois em heterozigose (1B01BR, 1H01BR) e dois em homozigose (1K01BR e 1K03BR), sendo os dois últimos pai e filho, respectivamente.

Figura 8 – Sequência genômica do gene *PDGFRB*. Em azul a sequência referência e em amarelo a CCDS 22 (sequência codificante consenso). Destacando em vermelho a localização da variante rs246391 no íntron 22 (c.3137+4A>G)



Fonte: Adaptação do CLC Main WorkBench 8.1

Para identificar o efeito da variante rs246391 no splicing, foi feita a análise *in silico*, na qual prediz uma alteração no splicing próxima à região conservada (doador) do pré-mRNA (MaxEntScan score: -17.67).

## 5.3 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA COM O SNV rs246391

A análise de expressão gênica do *PDGFRB* só foi possível de ser realizada em um único paciente (1H01BR; diagnosticado com variante patogênica no *SLC20A2*), sendo este com genótipo heterozigoto (TC) para o SNV rs246391. Não foi observada amplificação de sinal relativa ao gene *PDGFRB* no paciente caso e no controle sem a doença CCFP (dado não mostrado).

#### 5.4 ARTIGOS E TRABALHOS

Os apêndices de A à E mostram cinco artigos científicos publicados durante o Doutorado em revistas com Qualis/CAPES na área de avaliação Ciências Biológicas I B1, B2, B1 e B1 e de fator de impacto 2.678, 2.125, 2.678 e 2.831 respectivamente. Além desses apêndices, foram adicionados resumos de congressos participados (apêndices F a I) e no apêndice J foi adicionado material instrucional publicado no site do *National Organization for Rare Diseases* ([Link](#)) dos EUA.

## 6 DISCUSSÃO

Desordens motoras e neuropsiquiátricas causadas pela calcificação cerebral familiar primária (CCFP) são frequentes, embora número significativo de pacientes, cerca de 47%, sejam assintomáticos (Nicolas et al. 2015). A CCFP é caracterizada por alta heterogeneidade clínica, ainda não esclarecida geneticamente, apesar da base molecular ser bem estabelecida e determinada por variantes patogênicas em seis genes distintos (*SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1*, *MYORG* e *JAM2*).

Nesse contexto, seis estudos independentes mostraram o envolvimento de variantes em genes não-relacionado à CCFP (doença digênica), promovendo fenótipo complexo em indivíduos previamente diagnosticados com CCFP (Baker et al. 2014; Fjaer et al. 2015; Fujioka et al. 2015; DeMeo et al. 2018; Knowles et al. 2018; Mu et al. 2019). A primeira descrição de um paciente com CCFP e variante em um segundo gene foi 2014 quando Baker e cols. descreveram uma família com calcificação cerebral bilateral e simétrica e distonia severa de início precoce, identificando uma grande deleção no cromossomo 8, excluindo o *SLC20A2* e o *THAP1* (Baker et al. 2014). Variantes no *THAP1* que promovem a perda de função da proteína estão relacionados com a distonia de torção primária (DYT6), fato que gerou a distonia severa na família supracitada (Müller 2009; Spatola & Wider 2011).

Além desse estudo, outros trabalhos vêm relatando a influência de variantes em um segundo gene no fenótipo complexo/atípico de pacientes com CCFP, tal como está detalhado na Tabela Suplementar 2 (página 44). Entretanto, observa-se que tais trabalhos não identificaram a segunda variante em entre os seis genes relacionados à CCFP, tal como proposto neste trabalho. Neste estudo foi observado que, dentre as 23SNVs identificadas na coorte, destacou-se a variante rs246391 (c.3137+4A>G) no gene *PDGFRB*. A variante está localizada na região 5' do sítio de splicing no último íntron do gene *PDGFRB* (íntron 22) e que, por meio de análise *in silico*, foi predita possível alteração no splicing (MaxEntScan score:-17.67).

Variantes nessa região podem resultar em alterações no reconhecimento do sítio de splicing pelo complexo proteico responsável pelo processamento do pré-mRNA em mRNA, o spliceossomo (Ward & Cooper 2010). Tal evento ocorre

por meio de ligações de elementos cis em regiões intrônicas do pré-mRNA, através do reconhecimento de sequências conservadas: regiões 5', 3' e *branch point* (Ward and Cooper 2010). Desse modo, uma vez alterada a sequência conservada através de variantes genéticas, pode haver uma redução da eficiência de ligação desses elementos causando danos à proteína, resultado da retenção do íntron, ativação de um sítio crítico de splicing ou até pela exclusão de um éxon da sequência (McCullough and Berget 2000; Faustino and Cooper 2003; Ward and Cooper 2010).

O estudo relativo à implicação transcricional da variante rs246391, descrita em quatro pacientes nesse estudo, foi realizado através da análise da expressão gênica por PCR em tempo real. A análise obtida de sangue periférico, não mostrou resultados significativos (dados não incluídos), devido a baixo ou indetectáveis índices de expressão relativa. De acordo com dados consenso disponíveis no banco de dados The Human Protein Atlas, a maior expressão do *PDGFRB* ocorre em monócitos não-clássicos, nos quais compreendem de 2% a 11% dos monócitos circulantes no SP (Sampath et al. 2018). Vale ainda destacar que em indivíduos adultos saudáveis os monócitos aparecem em apenas 4% dos leucócitos totais presente no SP (Programa Nacional de Controle de Qualidade, 2020). Assim, fica evidente que a expressão gênica para avaliar a expressão do rs246391 na proteína PDGFR- $\beta$  deve ser feita, para obtenção de resultados significativos, a partir de amostras tecido-específicas, inviável para o caso em questão.

Em primeira análise, e de forma hipotética, sugere-se que a presença da variante rs246391, associada a variantes patogênicas em genes relacionados à desordem em estudo, possa levar à potencialização das manifestações clínicas. Nesse sentido, o estudo da família 1K, formada por um pai e filhos gêmeos com CCFP (1K01BR, 1K03BR e 1K04BR) (Figura Suplementar 1, página 45), revela que o quadro clínico do pai (1K01BR) é um dos mais severos descrito na coorte em estudo, no qual inclui prejuízo motor e de linguagem e posteriormente, diante de um quadro já delicado, morte por broncopneumonia. Destrinchando os dados, nota-se que além da variante no *PDGFB*, o paciente 1K01BR possui a variante rs246391 em homozigose, assim como seus filhos. Por se tratar de uma desordem de caráter progressivo, é necessário estudos adicionais, juntamente

com seguimento dos pacientes da família 1K, para que o real impacto da variante seja avaliado a longo prazo.

Entretanto, a variante rs246391 não parece, de forma isolada, ter a capacidade de desencadear manifestações clínicas características da CCFP. Tal possibilidade pôde ser observada em experimento complementar realizado em estudo familiar (família 1H), onde a mesma região gênica (éxon 22-íntron22) da variante rs246391 foi triada em pais não afetados pela CCFP. Foi, então, identificado que a mãe da paciente 1H01BR segrega a mesma variante (Figura Suplementar 1, página 45). Assim, os dados corroboram com o banco de dados Ensembl, no qual prediz que a significância clínica da variante seja benigna (MAF: 0.30). Adicionalmente, foi analisado, através do banco de dados STRING e SMART, que a região da variante rs246391 está próxima a uma região de baixa complexidade da proteína PDGFR- $\beta$  (Figura Suplementar 1, página 45), região que parece afetar pouco a funcionalidade proteica.

É, ainda, de extrema importância trazer à luz que o recentemente estudo de San et al., 2021 (Sun et al. 2021) identificou em uma criança chinesa de cinco anos, a presença, pela primeira vez na literatura, de duas variantes patogênicas em heterozigose em dois genes relacionados à CCFP, o *SLC20A2* (c.1787A>G; p.His596Arg) e o *PDGFRB* (rs544478083). Tal sinergismo foi capaz de promover um fenótipo mais agressivo na paciente, quando comparada com sua mãe assintomática (*PDGFRB* c.317G>C; p.Arg106Pro) e com seu pai também assintomático (*SLC20A2* c.1787A>G; p.His596Arg). Assim, tal estudo demonstra a possibilidade de haver, concomitantemente, a existência de variantes digênicas em genes relacionados à CCFP a qual este trabalho se propôs a estudar inicialmente (doença digênica) (Borges-Medeiros and de Oliveira 2020).

Por fim, não foi possível demonstrar a associação do rs246391 como modulador genético do quadro clínico dos pacientes previamente diagnosticados com CCFP. No entanto, é preciso frisar acerca da limitação desse estudo, que inclui um número insuficiente de pacientes com CCFP e a dificuldade na padronização de prontuários/formulário médicos para melhor analisar as manifestações clínicas, visto que se trata de uma doença rara e de nosso estudo não ser multicêntrico.

Enfatizamos, ainda, a necessidade de estudos relatarem e descreverem variantes genéticas identificadas nos genes relacionados à CCFP para que, a

longo prazo, a comunidade que se dedica ao estudo dessa doença seja capaz de compilar tais dados e gerar mais fundamento para identificar causas genéticas da heterogeneidade clínicas nos pacientes.

## 7 CONCLUSÕES

- Na coorte em estudo, não houve a identificação de nenhuma variante patogênica em genes não avaliados anteriormente nos pacientes previamente diagnosticados com CCFP.
- Por não haver a identificação de variantes patogênicas em um segundo gene associado à CCFP, não foi possível relacionar a heterogeneidade das manifestações clínicas nos pacientes em questão.

## REFERÊNCIAS

- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*
- Amisha F, Munakomi S. Fahr Syndrome. 2021 Feb 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 32809692
- Anheim M, López-Sánchez U, Giovannini D, et al (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>
- Baker M, Strongosky AJ, Sanchez-Contreras MY, et al (2014) SLC20A2 and THAP1 deletion in familial basal ganglia calcification with dystonia. *Neurogenetics*. <https://doi.org/10.1007/s10048-013-0378-5>
- Battini J-L, Rasko JEJ, Miller AD (1999) A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: Possible role in G protein-coupled signal transduction. *Proc Natl Acad Sci* 96:1385–1390. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1385>
- Beck GR, Moran E, Knecht N (2003) Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including Nrf2. *Exp Cell Res*. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00213-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00213-1)
- Bezerra DP, Oliveira JRM (2016) New Studies on Knockout Mouse for the SLC20A2 Gene Show Much More Than Brain Calcifications. *J Mol Neurosci* 59:565–566. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0778-8>
- Borges-Medeiros RL, de Oliveira JRM (2020) Digenic Variants as Possible Clinical Modifier of Primary Familial Brain Calcification Patients. *J Mol Neurosci* 70:142–144. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01430-9>
- Carecchio M, Varrasi C, Barzaghi C, et al (2014) Phenotypic heterogeneity of movement disorders due to intracranial calcifications with or without SLC20A2 mutations. *Mov Disord*
- Cen Z, Chen Y, Chen S, et al (2020) Biallelic loss-of-function mutations in JAM2 cause primary familial brain calcification. *Brain* 143:491–502. <https://doi.org/10.1093/brain/awz392>
- DeMeo NN, Burgess JD, Blackburn PR, et al (2018) Co-occurrence of a novel PDGFRB variant and likely pathogenic variant in CASR in an individual with extensive intracranial calcifications and hypocalcaemia. *Clin Case Reports*.

- <https://doi.org/10.1002/ccr3.1265>
- Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, et al (2009) Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215>
- Faustino NA, Cooper TA (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.*
- Ferreira JB, Pimentel L, Keasey MP, et al (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>
- Fjaer R, Brodtkorb E, Øye AM, et al (2015) Generalized epilepsy in a family with basal ganglia calcifications and mutations in SLC20A2 and CHRN2. *Eur J Med Genet.* <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.10.005>
- Fujioka S, Strongosky AJ, Hassan A, et al (2015) Clinical presentation of a patient with SLC20A2 and THAP1 deletions: Differential diagnosis of oromandibular dystonia. *Park. Relat. Disord.*
- Funa K, Sasahara M (2014) The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.*
- Gaudet P, Livstone MS, Lewis SE, Thomas PD (2011) Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Brief Bioinform.* <https://doi.org/10.1093/bib/bbr042>
- Gazzo AM, Daneels D, Cilia E, et al (2016) DIDA: A curated and annotated digenic diseases database. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1068>
- Gonzaga-Jauregui C, Harel T, Gambin T, et al (2015) Exome Sequence Analysis Suggests that Genetic Burden Contributes to Phenotypic Variability and Complex Neuropathy. *Cell Rep.* <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.023>
- Harder DR, Zhang C, Gebremedhin D (2002) Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. *News Physiol Sci*
- Jensen N, Schrøder HD, Hejbøl EK, et al (2018) 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. *Am J Pathol.* <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.04.010>

- Keller A, Westenberger A, Sobrido MJ, et al (2013) Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nat Genet* 45:1077–82. <https://doi.org/10.1038/ng.2723>
- Kendrick J, Kestenbaum B, Chonchol M (2011) Phosphate and Cardiovascular Disease. *Adv. Chronic Kidney Dis.*
- Keogh MJ, Pyle A, Daud D, et al (2015) Clinical heterogeneity of primary familial brain calcification due to a novel mutation in PDGFB. *Neurology*
- Kimura T, Miura T, Aoki K, et al (2016) Familial idiopathic basal ganglia calcification: Histopathologic features of an autopsied patient with an SLC20A2 mutation. *Neuropathology*. <https://doi.org/10.1111/neup.12280>
- Knowles JK, Santoro JD, Porter BE, Baumer FM (2018) Refractory focal epilepsy in a paediatric patient with primary familial brain calcification. *Seizure*. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.02.001>
- Legati A, Giovannini D, Nicolas G, et al (2015) Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. *Nat Genet* 47:579–81. <https://doi.org/10.1038/ng.3289>
- Lemos RR, Ferreira JBMM, Keasey MP, Oliveira JRM (2013) An Update on Primary Familial Brain Calcification. *Int Rev Neurobiol* 110:349–371. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410502-7.00015-6>
- López-Sánchez U, Nicolas G, Richard AC, et al (2019) Characterization of XPR1/SLC53A1 variants located outside of the SPX domain in patients with primary familial brain calcification. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43255-x>
- Manyam B V. (2005) What is and what is not “Fahr’s disease.” *Park. Relat. Disord.* 11:73–80
- McCullough AJ, Berget SM (2000) An intronic splicing enhancer binds U1 snRNPs to enhance splicing and select 5’ splice sites. *Mol Cell Biol*
- Mu W, Tochen L, Bertsch C, et al (2019) Intracranial calcifications and dystonia associated with a novel deletion of chromosome 8p11.2 encompassing SLC20A2 and THAP1. *BMJ Case Rep* 12:e228782. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-228782>
- Müller U (2009) The monogenic primary dystonias. *Brain*
- Nicolas G, Charbonnier C, Campion D, Veltman JA (2018) Estimation of minimal disease prevalence from population genomic data: Application to primary

- familial brain calcification. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*.  
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32605>
- Nicolas G, Charbonnier C, de Lemos RR, et al (2015) Brain calcification process and phenotypes according to age and sex: Lessons from SLC20A2, PDGFB, and PDGFRB mutation carriers. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 168:586–594. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32336>
- Nicolas G, Pottier C, Charbonnier C, et al (2013a) Phenotypic spectrum of probable and genetically-confirmed idiopathic basal ganglia calcification. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awt255>
- Nicolas G, Pottier C, Maltête D, et al (2013b) Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31827ccf34>
- Oliveira JRM, Lima Filho JL, Zatz M (2009) Identical twins with Idiopathic Basal Ganglia Calcification (“Fahr’s Disease”) presenting with a remarkably similar pattern of neuroimaging findings. *Park. Relat. Disord*.
- Paucar M, Almqvist H, Jelic V, et al (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>
- Posey JE, Harel T, Liu P, et al (2016) Resolution of Disease Phenotypes Resulting from Multilocus Genomic Variation. *N Engl J Med*. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1516767>
- Prié D, Friedlander G (2010) Genetic Disorders of Renal Phosphate Transport. *N Engl J Med*. <https://doi.org/10.1056/nejmra0904186>
- Quintáns B, Oliveira J, Sobrido MJ (2018) Primary familial brain calcifications. In: *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*. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0185-4>
- Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R (2018) Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front. Immunol*.
- Schäffer AA (2013) Digenic inheritance in medical genetics. *J. Med. Genet*.
- Spatola M, Wider C (2011) 3.1.1 OVERVIEW OF PRIMARY MONOGENIC DYSTONIA. *Parkinsonism Relat Disord*. <https://doi.org/10.1016/s1353->

8020(11)70695-2

- Sun H, Cao Z, Gao R, et al (2021) Severe brain calcification and migraine headache caused by SLC20A2 and PDGFRB heterozygous mutations in a five-year-old Chinese girl . *Mol Genet Genomic Med.* <https://doi.org/10.1002/mgg3.1670>
- Tadic V, Westenberger A, Domingo A, et al (2015) Primary familial brain calcification with known gene mutations: a systematic review and challenges of phenotypic characterization. *JAMA Neurol* 72:460–7. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.3889>
- Taylor CS, Nouri A, Lee CG, et al (2002) Cloning and characterization of a cell surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses. *Proc Natl Acad Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.927>
- Wang C, Li Y, Shi L, et al (2012a) Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat Genet.* <https://doi.org/10.1038/ng.1077>
- Wang C, Li Y, Shi L, et al (2012b) Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat Genet* 44:254–6. <https://doi.org/10.1038/ng.1077>
- Ward AJ, Cooper TA (2010) The pathobiology of splicing. *J. Pathol.*
- Wild R, Gerasimaite R, Jung JY, et al (2016) Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains. *Science* (80- ). <https://doi.org/10.1126/science.aad9858>
- Yao XP, Cheng X, Wang C, et al (2018) Biallelic Mutations in MYORG Cause Autosomal Recessive Primary Familial Brain Calcification. *Neuron.* <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.037>
- Zarb Y, Franzoso FD, Keller A (2019) Pericytes in Primary Familial Brain Calcification. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp 247–264

## TABELA SUPLEMENTAR 1

Tabela Suplementar 1 - Lista de SNVs encontradas nos 13 pacientes com CCFP avaliados

Gene	RefSNP (rs)	Tipo	Anotação	MAF	Localização	Classificação ACMG
<i>SLC20A2</i>	rs115993270	Sinônima	c.58T>C	0.01	Éxon	Benigna/ Provavelmente Benigna
<i>PDGFB</i>	rs5757575	-	c.-51T>C	0.33	Íntron	-
<i>PDGFB</i>	rs1800817	-	c.63+53C>A	0.25	Íntron	-
<i>PDGFB</i>	rs9622979	-	c.161-80C>T	0.13	Íntron	-
<i>PDGFB</i>	rs11704525	-	c.250+111G>T	0.28	Íntron	-
<i>PDGFB</i>	rs2239769	-	c.601+65G>A	0.29	Íntron	-
<i>PDGFRB</i>	rs740750	-	c.364+44C>T	0.46	Íntron	-
<i>PDGFRB</i>	rs1864972	-	c.1579+50T>C	0.19	Íntron	-
<i>PDGFRB</i>	rs1075846	-	c.1912+132A>G	0.42	Íntron	-
<i>PDGFRB</i>	rs112938568	-	c.3137+76C>T	0.03	Íntron	-
<i>PDGFRB</i>	rs75732095	-	c.3138-28C>T	0.06	Íntron	-
<i>PDGFRB</i>	rs2229558	Missense	c.1033C>T	<0.01	Éxon	Benigna/ Provavelmente Benigna
<i>PDGFRB</i>	rs56388645	-	c.2024-74C>G	0.01	Íntron	-
<i>PDGFRB</i>	rs246395	Sinônima	c.2601A>G	0.22	Éxon	-
<i>PDGFRB</i>	<u>rs246391</u>	-	<u>c.3137+4A&gt;G</u>	<u>0.30</u>	<u>Íntron - Sítio de Splicing</u>	<u>Significado Incerto</u>
<i>PDGFRB</i>	rs246388	Sinônima	c.3252A>G	0.32	Éxon	Benigna
<i>PDGFRB</i>	rs11748255	-	c.1127+271C>T	0.40	Íntron	-
<i>PDGFRB</i>	rs41287110	Missense	c.1453G>A	0.01	Éxon	Benigna
<i>PDGFRB</i>	rs41287104	-	c.2587-40T>A	0.01	Íntron	-
<i>PDGFRB</i>	rs246396	-	c.935-173A>G	0.05	Íntron	-
<i>PDGFRB</i>	rs2304061	-	c.2023+143C>T	0.13	Íntron	-
<i>PDGFRB</i>	rs78436628	-	c.1992-61G>A	0.01	Íntron	-
<i>PDGFRB</i>	rs2229562	-	c.*73A>G	0.32	3'-UTR	-
<i>XPR1</i>	rs10914123	-	c.2030+61T>C	0.38	Íntron	-
<i>XPR1</i>	rs372311507	-	c.223+17_223+18InsT	0.10	3'-UTR	-

Legenda por ordem alfabética: ACMG= do inglês, *The American College of Medical Genetics and Genomics*; MAF= do inglês, *minor allele frequency*; UTR= região não transcrita

## TABELA SUPLEMENTAR 2

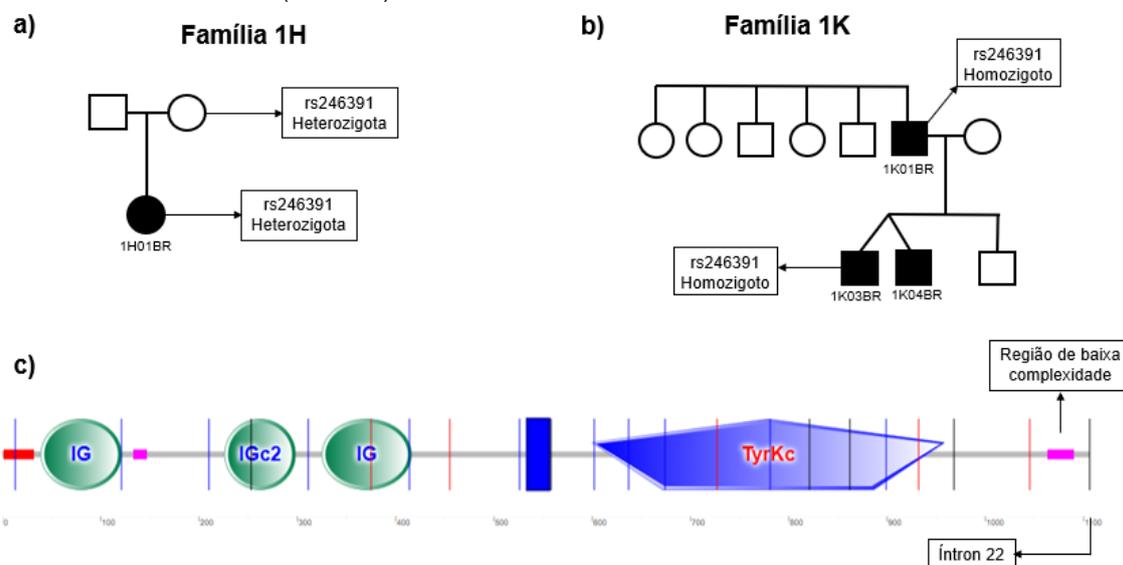
Tabela Suplementar 2 - Resumo das informações relativa a pacientes com variantes digênicas com CCFP

Gene CCFP	Variante	Classificação ACMG	Gene secundário	Variante	Classificação ACMG	Doença associada/ Herança genética	Principais características clínicas associada às variantes digênicas	Referências
<i>SLC20A2</i>	Del.chr8:42247654–42810910	Patogênica	<i>THAP1</i>	Del. chr8:42247654–42810910	Patogênica	Distonia de torção primária/ AD	CC, distonia oromandibular	Baker et al., 2014/Fujioka et al., 2015
<i>SLC20A2</i>	c.C1703T: p.Pro568Leu	Patogênica	<i>CHRNA2</i>	c.C1378G: p.Arg460Gly	Patogênica	Epilepsia do lobo frontal/ AD	CC, convulsão tônica-clônica generalizada	Fjaer et al., 2015
<i>PDGFRB</i>	c.1126C>T: p.Arg376Trp	Significância incerta	<i>CASR</i>	c.2431A>G: p.Met811Val	Provável Patogênica	Hipocalcemia tipo I/ AD	CC, hipocalcemia	DeMeo et al., 2018
<i>SLC20A2</i>	c.971C>A: p.Ser324*	Patogênica	<i>SCN2A</i>	c.2063A > G: p.Tyr688Cys	Significância incerta	Convulsão infantil e TDA/ AD	CC, convulsão tônica-clônica generalizada	Knowles et al., 2018
<i>SLC20A2</i>	Microdel. in 8p11.2	Patogênica	<i>THAP1</i>	Microdel. in 8p11.2	Patogênica	Distonia de torção primária/ AD	CC, distonia generalizada	Mu et al., 2019

Legenda em ordem alfabética: ACMG= do inglês, *The American College of Medical Genetics and Genomics*, AD= autossômica dominante; CC= calcificação cerebral bilateral e simétrica; Del= deleção; TDA= transtornos do espectro autista.

## FIGURA SUPLEMENTAR 1

Figura Suplementar 1 – Figuras de estudo. a) heredograma da família 1H, destacando que a paciente (1H01BR) possui a variante rs246391 em heterozigose, assim como sua mãe, que segrega a mesma variante e não possui a doença. b) heredograma da família 1K, destacando que o paciente 1K01BR é homozigoto para a variante rs246391, como seus filhos. c) receptor PDGFR- $\beta$ , mostrando suas regiões de maior importância: IG, IGc2, região transmembrana (retângulo azul) e o domínio tirosino-quinase. Além de mostrar a região de baixa complexidade ao final da proteína, região imediatamente anterior à região que está a variante rs246391 (ínton 22)



Fonte: Acervo pessoal

## APÊNDICE A – DIGENIC VARIANTS AS POSSIBLE CLINICAL MODIFIER OF PRIMARY FAMILIAL BRAIN CALCIFICATION PATIENTS

Journal of Molecular Neuroscience  
<https://doi.org/10.1007/s12031-019-01430-9>

### Digenic Variants as Possible Clinical Modifier of Primary Familial Brain Calcification Patients



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

Received: 3 September 2019 / Accepted: 3 November 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

#### Abstract

Primary familial brain calcification (PFBC), widely known as Fahr's disease, is a rare disorder caused by pathogenic variants in *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1*, or *MYORG* genes. It is characterized by ectopic brain calcification, mostly affecting basal ganglia, thalamus, and cerebellum. PFBC patients can present a wide spectrum of symptoms including cognitive, neuropsychiatric, and motor alterations. However, it is well established that PFBC individuals also present high clinical heterogeneity, though the genetic cause of this phenotypic is not understood. Recently, Wang et al. (Front Cell Neurosci. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00250>, 2019) reported on the role of *MEA6* gene in cerebellar development and motor performance, also citing that *MEA6* might be linked to PFBC. A *MEA6* variant was described in 2007 as a PFBC candidate gene in an American family. However, this family was later linked to the *SLC20A2* gene discarding the *MEA6* as a PFBC-gene and also some members were confirmed as phenocopy. Additionally, five independent studies have been shown that variants in a second gene, not related to PFBC, were identified in PFBC patients, promoting a complex and heterogeneous phenotype. Thus, further investigation is required to explain whether and how *MEA6* contributes to the clinical presentation in this American family. Finally, this letter highlights the possible digenic influence on clinical heterogeneity of PFBC patients, and such a possibility might advance our understanding of PFBC phenotypes.

**Keywords** PFBC · Phenocopy · Digenic disease · MEA6 · SLC20A2

# APÊNDICE B - EXPANSION OF THE PRIMROSE SYNDROME PHENOTYPE THROUGH THE COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO NEW CASE REPORTS WITH *ZBTB20* VARIANTS

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, GenDx, 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 Number: 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*

## APÊNDICE C - LACK OF MAJOR OPHTHALMIC FINDINGS IN PATIENTS WITH PRIMARY FAMILIAL BRAIN CALCIFICATION LINKED TO *SLC20A2* AND *PDGFB*

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

# APÊNDICE D - A COMMENTARY ON BAND-LIKE CALCIFICATION WITH SIMPLIFIED GYRATION AND POLYMICROGYRIA: REPORT OF 10 NEW FAMILIES AND IDENTIFICATION OF FIVE NOVEL *OCN* MUTATIONS

Journal of Human Genetics \_\_\_\_\_  
<https://doi.org/10.1038/s10038-017-0390-y>



COMMENT



## A commentary on band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria: report of 10 new families and identification of five novel *OCN* mutations

Rayssa Borges-Medeiros<sup>1</sup> · João Ricardo Mendes de Oliveira<sup>1</sup>

Received: 24 October 2017 / Accepted: 25 October 2017  
 © The Japan Society of Human Genetics 2017

There are evidences suggesting that mutations in occludin (*OCN*) gene (5q13) are associated with the development of band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria (BLC-PMG) (OMIM#251290), and some cases has been described [1–3]. In 2010, this disorder has been included in the pseudo-TORCH spectrum (PTS) [1]. The PTS phenotypes mimics congenital infections with major cerebral malformations, including mainly: congenital microcephaly, intracranial calcification in a heterogeneous pattern, seizures, enlarged ventricles, and severe neurodevelopmental disorder [1–3].

On the volume 62, issue 5 of this periodical, Abdel-Hamid and collaborators [3] conducted a study on the aforementioned gene in patients with BLC-PMG of 10 consanguineous families. They reported that pathogenic mutations in this gene are related to development of neurological and clinical manifestations present in the individuals studied. Phenotypically, the patients presented progressive microcephaly, brain calcification and areas of polymicrogyria, leading to a severe mental retardation, and seizures.

*OCN* gene encodes for a tight-junction protein (occludin) whose loss of functions might affect the permeability of the blood–brain barrier (BBB) [1]. Considering the genetic landscape for the development of calcifications, the authors cited that *Ocln* knockout (KO) mouse has extracranial manifestations, such as chronic gastritis, thinning of compact bone, and testicular atrophy [4]. We would like to highlight that the *Ocln* KO also presents brain calcification, reinforcing the association with the phenotype reported in humans.

Few disorders, such as primary brain calcification (PBC) and type 1 interferonopathy (a PTS disorder), exhibits brain

calcification located most commonly in basal ganglia and/or thalamus, similar to BLC-PMG [5, 6]. The PFC is a rare neuropsychiatric condition that might be inherited in an autosomal dominant pattern or even caused by de novo mutations. Four different genes (*SLC20A2*, *PDGFB*, *PBGFRB*, and *XPR1*) have been associated with the development of this disorder [6–8]. More recently, patients with type 1 interferonopathy are being linked to mutations in *USP18* gene and also presents calcifications in some areas of the brain [5].

Additionally, homozygous for pathogenic variants in *ISG15* gene present a interferonopathy and bilateral and symmetric calcifications, such as in PBC [9]. Nicolas et al. [10] have reported the association between patients with severe neurodevelopmental deficit that presented spots of brain calcification and a homozygous *PCDH12* variant. Intriguingly, mice with hypomorphic *Pdgfb* and *Slc20a2* KO mice shows focus of brain calcification, such as *Ocln* KO mice, and patients with BLC-PMG [3, 7, 8].

Altogether, we attempt to demonstrate the clinical importance and susceptibility of some areas of the brain to calcify, and the overlap of several phenotypes and diseases. We also called attention to the studies in animal models that may represent, at least in part, an important factor that contribute to understand the outcomes seen in patients.

### Compliance with ethical standards

**Conflicts of interest** The authors declare that they have no competing interests.

### References

- O'Driscoll MC, Daly SB, Urquhart JE, Black GC, Fyfe DT, Brockmann K, et al. Recessive mutations in the gene encoding the tight junction protein occludin cause band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria. *Am J Hum Genet.* 2010;87:354–64

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

<sup>1</sup> Keizo Asami Laboratory and Neuropsychiatric Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

## APÊNDICE E - MORE THAN MEETS THE EYE: SEARCHING FOR ADDITIONAL FINDINGS IN PRIMARY BRAIN CALCIFICATION

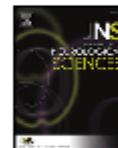
Journal of the Neurological Sciences 379 (2017) 117–118



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Neurological Sciences

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jns](http://www.elsevier.com/locate/jns)



### Letter to the Editor

#### More than meets the eye: Searching for additional findings in primary brain calcification



#### Keywords:

PFBC  
White matter hyperintensities  
Cerebrospinal fluid

#### Dear Editor,

Recent studies regarding primary familial brain calcification (PFBC) indicate that there is more to this disease than just progressive calcifications in the basal ganglia, thalamus and dentate nuclei [1]. Alternative imaging findings such as white matter hyperintensities (WMH), biochemical imbalances represented by elevated inorganic phosphate levels in the cerebrospinal fluid (CSF-Pi), and damage of microvessels in tissues other than the brain are some of the evidences showing that brain calcifications might not be the only thing to look at [2–6]. An example of this is shown in the letter from Paucar and colleagues published in this same journal in February 2017 [2].

The authors report a c.1399C > T (R467X) variation in exon 8 of the *SLC20A2* gene in a 54 year-old woman with elevated CSF-Pi and WMH. They described neuropsychiatric manifestations related to PFBC, besides a medical history of type 1 diabetes mellitus (T1DM), hypertension, obstructive sleep apnea and cataracts. Their preliminary CSF analysis suggests that the integrity of the blood brain barrier (BBB) was maintained [2].

In support of the work above, Jensen et al. (2016) [3] and Wallingford et al. (2016) [4] also reported markedly elevated phosphate levels in the CSF of *Slc20a2* knockout (KO) mice in the presence of an intact BBB. Curiously, additional phenotyping of these same mice shows other findings such as decreased body length and weight, abnormal lens and iris morphology with cataract, and various abnormalities in bone structure and composition [7]. Furthermore, it was noted that *Slc20a2* KO mice exhibited unbalanced fat to lean mass ratio, decreased fasted circulating glucose level, increased circulating alkaline phosphatase level and increased circulating magnesium level [7]. Finally, calcification on the eyes and optic nerve in *Slc20a2* KO mice was also reported by Wallingford et al. (2016) [4].

Further findings in skin and hair have also been described in PFBC patients. Microcalcifications in small vessels, pericytes and thickening of the basal membrane have also been described and were seen in skin biopsies from carriers of mutations in *PDGFB*, *PDGFRB* and *XPR1* genes [5,6]. Intriguingly, one of the studies identified a novel mutation in *PDGFB* gene (c.3G > C) in a family where all mutation carriers had brain calcification and white matter involvement, suggesting that

WMH precede the appearance of calcifying lesions in the brain [5]. Thickening of the basal membrane was also described in this case. Finally, results from a hair analysis of patients with PFBC demonstrated that bioelements such as calcium, copper, and phosphate were in low concentration in those samples, suggesting a metabolic and heterogeneous disorder [8].

Prior to the elucidation and description of the genetic mechanisms underlying PFBC's pathology, reports of alterations in the CSF of patients presenting with brain calcifications suggestive of PFBC had already been made. These included reports of significant increases in copper, iron, magnesium and zinc in the CSF of suspected patients when compared to healthy controls [9]. Similarly, CSF lactate levels were moderately elevated in a 68 year-old Japanese patient, in addition to him having T1DM as a comorbidity [10]. Although neither of the studies mentioned above have reported any information on CSF-Pi levels, they are still relevant as a representation of added evidence that PFBC can interfere with CSF composition.

While the search for new phenotypic variations in PFBC is important, the findings from a single individual reported in the letter from Paucar and collaborators (2017) should be taken cautiously due the patient's comorbidities, including hormonal changes in parathormone and Vitamin D levels, that the authors associate with another kidney condition presented by the patient [2]. The authors do, however, bring potentially important data citing high CSF-Pi levels and WMH in the presence of calcifications in the basal ganglia, thalamus, cerebellum and midbrain, and these seem rather promising as relevant medical findings in PFBC patients.

Combined, these data suggest that PFBC has more systemic presentations than previously thought. Thus, we argue that the search of non-neurological features in PFBC is strongly indicated, especially through the application of systematic analysis in other tissues than the brain (i.e. skin, eyes, and hair) where the subjects studied have the least amount of comorbidities possible. Such initiatives will contribute to a more thorough description of signs and symptoms seen in PFBC patients, as well as resulting in marked improvements in determining prognostic features seen in this condition.

#### Authors' contributions

L.D.F. and R.L.B.-M. drafted the manuscript. J.R.M.O. conceived the study, reviewed the manuscript, and gave the final approval of the version to be submitted.

#### Disclosures

The authors have no competing financial interests to declare.

#### Acknowledgements

L.D.F. and R.L.B.-M. received fellowships from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

**APÊNDICE F**

## Resumo Apresentação Poster

Simpósio Internacional de Diagnóstico e Terapias (SINATER) - 2017

**TITLE: SEARCHING FOR NEW GENES LINKED TO PRIMARY BRAIN CALCIFICATIONS**

Lemos R.R.<sup>1</sup>, Pimentel, L.F.<sup>1</sup>, Ferreira, J.B.<sup>1</sup>, Borges-Medeiros, R.L.<sup>1</sup>, Ferreira, L.D.<sup>1</sup>, Santos-Junior, E.F.<sup>1</sup>, Cantanhede, I.G.<sup>1</sup>, Oliveira, J.R.M.<sup>1,2\*</sup>

1- Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA – UFPE.

2- Departamento de Neuropsiquiatria, CCS – UFPE.

**INTRODUCTION:** Primary brain calcification (PBC) is a rare neuropsychiatric condition that might be inherited in an autosomal dominant pattern or even caused by *de novo* mutations. Symmetrical and bilateral calcifications located mainly in basal ganglia, thalamus and cerebellum are detected through neuroimaging screening. The symptoms are unspecific and might include parkinsonism, psychosis, depression, and ataxia. Recent studies found mutations in four genes (*SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB* and *XPR1*), however they represent only 60% of all familial cases, suggesting that additional genes remain to be elucidated **OBJECTIVE:** We report our progress in screening new candidate genes (*SLC20A1*, *PDGFA*, *PDGFC*, *PDGFD*, *PDGFRA* and *PCDH12*), variants and endophenotypes in 24 patients without mutations at the 4 genes linked to PBC. **METHODOLOGY:** The exons and intron-exons boundaries sequencing of intended genes was performed using a 3500 Genetic Analyzer and CLC Main Workbench software for the assembly **RESULTS:** Only benign variants were found in the genetic results available thus far. In total, eleven patients were screened for *PDGFA* and *PDGFC*, twelve for *PDGFD*, one for *PDGFRA*, seven for *PCDH12*, and five for *SLC20A1*. Clinically, four patients presented psychiatric symptoms, such as hallucinations and repetitive-obsessive behavior. The same amount of patients suffered with movement disorder, and three have cognitive impairment. Four out of the 24 patients report suffering from convulsions in their lifetime. Two people reported hand tremors, and one declares suffering from recurrent migraines. Interestingly, when analyzing for comorbidities, two patients report having Lupus, one reports having diabetes, and one has a likely diagnosis of Hashimoto's disease. **CONCLUSION:** Even though no pathogenic mutations have been detected in any of the patients, it is important to address that the sample size does not allow a final conclusion yet. Samples are constantly undergoing further analyses, in the hopes of increasing sample size and obtaining more results.

**KEYWORDS:** primary brain calcification; mutations

**FINANCIAL SUPPORT:** Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

**APÊNDICE G**

## Resumo Apresentação Oral

Simpósio Internacional de Diagnóstico e Terapias (SINATER) - 2018

**TITLE: LIGHTNING STRIKES TWICE? SEARCHING FOR PRIMARY FAMILIAL BRAIN CALCIFICATION PATIENTS WITH MULTIPLE PATHOGENIC VARIANTS**Rayssa Leal Borges de Medeiros<sup>1</sup>, João Ricardo Mendes de Oliveira<sup>1,2</sup>

1- Laboratory of Immunopathology Keizo Asami/LIKA – UFPE Brazil.

2- Neuropsychiatric Department – UFPE, Brazil.

**INTRODUCTION:** Primary familial brain calcification (PFBC) is a neurodegenerative disorder characterized by symmetrical and bilateral brain calcification. Notable features of PFBC patients are parkinsonism, psychotic symptoms and ataxia. However, these manifestations can be extremely diverse, ranging from asymptomatic patients to patients with multiple manifestations, even in individuals within same family. Four genes (*SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1*) are described to be associated with PFBC. Nevertheless, the genetic basis of the heterogeneity of PFBC is not understood, though we hypothesized that single nucleotide variants (SNV) in the genes unlinked to PFBC etiology might contribute to the wide phenotypic spectrum **OBJECTIVE:** To screen whether multiple variants could participate as a genetic modulator of PFBC **METHODOLOGY:** We screened seven individuals, originally from four unrelated families. The exons and intron-exons boundaries analysis of intended genes was performed by Sanger sequencing. *In silico* splicing analysis was made using HSF software **RESULTS:** We identified 26 SNVs in all four genes. Among all variants, one was at 3' UTR, eight were exonic, and 17 were intronic. Regarding the clinical significance, the 3' UTR is a variant of unknown significance (VUS), and except two variants, that are a benign non-synonymous variant, all exonic variants were synonymous. Additionally, 12 intron variants were VUS, and five classified as benign. However, the rs246391 (c.3137+4A>G), located close to canonical splice site and identified in four patients, predicts to alters the wild type donor splice site, most probably affecting splicing (MaxEntScan score: -17.67) and may disrupt spliceosomal recognition of splice sites **CONCLUSION:** Although multiple pathogenic variants were not identified yet, the screening of all four gene are necessary to define the role in which the SNVs might contribute in pathology, disease progression and/or heterogeneity of PFBC. Finally, functional studies will be performed to clarify the role of these SNV in PFBC patients.

**KEYWORDS:** PFBC; single nucleotide variants; brain calcification**FINANCIAL SUPPORT:** This study received support from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE

**APÊNDICE H**

## Resumo Apresentação Oral

Simpósio Internacional de Diagnóstico e Terapias (SINATER) - 2018

**TITLE: PRIMROSE SYNDROME: A CASE REPORT OF A BRAZILIAN PATIENT WITH A RARE DISEASE CAUSED BY HETEROZYGOUS VARIANTS TO *ZBTB20***

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

1- Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

2- Neuropsychiatry Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

**INTRODUCTION:** Primrose syndrome (PRIMS), a rare genetic disorder with several clinical findings including intellectual disability, macrocephaly, typical facial features, and progressive muscle wasting, is caused by *de novo* variations in the *ZBTB20* gene. It has less than 30 cases reported worldwide, and due to its low frequency, it is not widely known by medical professionals. We discuss here the case of a 28-year-old Brazilian male who has a medical history marked by intellectual disability, developmental delays and presents several other clinical features consistent with PRIMS. **OBJECTIVE:** To determine if the patient has a pathogenic variation to the *ZBTB20* gene, therefore confirming a PRIMS diagnosis. **METHODOLOGY:** The patient's mother provided written informed consent for genetic testing, use of clinical pictures and authorized the processing of personal data. Genetic analysis of *ZBTB20* was performed by PCR amplification of coding exons and intron-coding exons boundaries, followed by direct Sanger sequencing. **RESULTS:** Analysis of the patient's medical files showed evidence of a progressive disorder affecting global development. Other signs consistent with PRIMS phenotype included calcified pinnae, basal ganglia calcification and characteristic facial features, besides skeletal and muscle abnormalities. We identified a heterozygous missense variation in the coding exon 4 of *ZBTB20* (c.1873A>G, p.Met625Val). *In silico* assessment suggested the p.Met625Val to be likely pathogenic. **CONCLUSION:** This case of PRIMS highlights the importance of a thorough clinical assessment combined with genetic testing when diagnosing developmental disorders. Additionally, it shows how such disorders are progressive, and how many of its characteristic signs do not appear until later in life. Therefore, additional studies including more patients with Primrose Syndrome are necessary not only to ensure correct clinical descriptions of the syndrome, but also to help determine its true frequency.

**KEYWORDS:** Primrose syndrome; *ZBTB20*; calcified pinnae; developmental delay; brain calcification.

**FINANCIAL SUPPORT:** 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).

## APÊNDICE I

### Resumo Apresentação Poster Rare Disease & Orphan Products Breakthrough Summit - 2018

Borges-Medeiros R.L.<sup>1</sup>, Oliveira J.R.M.<sup>1,2</sup>

1- Laboratory of Immunopathology Keizo Asami/LIKA – UFPE Brazil.

2- Neuropsychiatric Department – UFPE, Brazil.

**ABSTRACT TITLE:** Lightning strikes twice? Searching for primary familial brain calcification patients with multiple pathogenic variants

**ABSTRACT KEYWORDS:** PFBC, single nucleotide variants, brain calcification

**ABSTRACT OBJECTIVE:** Primary familial brain calcification (PFBC) is a rare and neurodegenerative disorder characterized by symmetrical and bilateral brain calcification, mainly in basal ganglia and thalamus. Notable features of patients with PFBC, which is generally attributed to calcium deposits, are parkinsonism, dystonia, ataxia, and migraine. However, these complications can be extremely diverse, ranging from asymptomatic patients to patients with unique or multiple manifestation, even in patients within same family. To date, four genes (*SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1*) are described to be associated with PFBC. Nevertheless, the genetic basis of the clinical heterogeneity of PFBC is not fully understood, though we hypothesized that single nucleotide variants (SNV) in the genes unlinked to PFBC etiology might contribute to the wide phenotypic spectrum. Thus, this study aimed to screen whether multiple pathogenic variants could participate as a genetic modulator of PFBC

**ABSTRACT METHODS:** Were included in this study three unrelated families, where each family are comprising of two affected members already diagnosed with PFBC. Of these, two patients were reported with *PDGFB* variant (c.356T>C, p.Leu119Pro) and four subjects with *SLC20A2* variant (c.1483G>A, p.Ala495Thr; c.1187\_1188insT, p.P397Afs\*19). To verify the other genes not evaluated in these PFBC patients, and based on the previous diagnosis results, the exons and intron-exons boundaries sequencing of intended genes was performed using a 3500 Genetic Analyzer and CLC Main Workbench software for the assembly. Splice site variant interpretation was tested *in silico* using Human Splicing Tester Software. This study was approved by the Ethics Committee on Research of Federal University of Pernambuco - Brazil.

**ABSTRACT RESULTS:** We identified 25 different SNVs in all four genes linked to PFBC, two *SLC20A2* variants (rs115993270; c.G1728A), six *PDGFB* variants (rs11704525; rs1800817; rs2239769; rs575757; rs9622979; c.G660A), eleven *PDGFRB* variants (rs2229562; rs2229558; rs1075846; rs112938568; rs1864972; rs56388645; rs740750; rs75732095; rs246391; rs246388; rs246395), and four *XPR1* variants (rs10914123; rs3002117; rs3761904; rs35706835). Among all variants, one was at 3' untranslated region (UTR), seven variants were located at exons, and 15 were intronic. Regarding the clinical significance of these variants, the 3' UTR is a variant of unknown significance (VUS), and except rs2229558, that is a non-synonymous variant classified as benign, all exonic variants are synonymous (rs246388, rs246395, c.G1728A (p.L576L), c.G660A (p.K220K), rs115993270, rs35706835). Additionally, 10 intron variants were VUS (rs10914123; rs11704525; rs1800817; rs2239769; rs3761904; rs5757575; rs1075846; rs112938568; rs1864972; rs56388645), and four classified as benign (rs3002117; rs9622979; rs740750; rs75732095; rs246391). However, the rs246391 variant of *PDGFRB*, located close to canonical splice site and identified in three unrelated patients, predicts to alters the wild type donor splice site, most probably affecting splicing, and creating new site (MaxEntScan score: -17.67). This variant may disrupt spliceosomal recognition of splice sites, but the subject's RNAs was not available for functional studies. **ABSTRACT CONCLUSION:** Although multiple pathogenic variants were not identified yet, the screening of all four gene are necessary to define the role in which the SNVs might contribute in pathology, disease progression and/or heterogeneity of PFBC.

## APÊNDICE J



## Primary Familial Brain Calcification

---

[rarediseases.org/rare-diseases/primary-familial-brain-calcification/](https://rarediseases.org/rare-diseases/primary-familial-brain-calcification/)

*NORD gratefully acknowledges Rayssa Leal Borges-Medeiros and Laura Durão Ferreira, Graduate Program/LIKA-UFPE, and João Ricardo Mendes de Oliveira, MD, PhD, Keizo Asami Laboratory (LIKA)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brazil, for assistance in the preparation of this report.*

### Synonyms of Primary Familial Brain Calcification

---

- Fahr disease, formerly
- familial idiopathic basal ganglia calcification
- striopallidodentate calcinosis
- PFBC

### General Discussion

---

#### Summary

Primary familial brain calcification (PFBC) is a rare neurodegenerative disorder characterized by the presence of abnormal calcium/hydroxyapatite deposits (calcifications) in the brain. The clinical presentations generally attributed to these brain calcifications are highly variable, ranging from asymptomatic patients, to severely affected patients with progressive neuropsychiatric features. To date, pathogenic mutations in five genes have been associated with PFBC: *SLC20A2*, *PDGFB*, *PDGFRB*, *XPR1* and, just recently, *MYORG*.