

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE

Direttore: Ch.mo Prof. Stellini Edoardo

UOC NEURORADIOLOGIA

Direttore: Dott. Francesco Causin

TESI DI LAUREA

**Analisi dello Spessore Corticale nella Primary
Familial Brain Calcification (PFBC) mediante Risonanza
Magnetica. Studio Caso-Controllo.**

Relatore: Prof. Renzo Manara

Laureanda: Anna Fabris

Anno Accademico 2023/2024

Sommario

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. LA PFBC: DEFINIZIONE E STORIA	1
1.2. DIAGNOSI	3
1.3. PATOGENESI	7
1.4. MANIFESTAZIONI CLINICHE.....	12
1.5. DIAGNOSTICA PER IMMAGINI.....	13
1.5.1. Caratteristiche radiologiche	13
1.5.2. Valutazione dello spessore corticale	18
1.5.3. Cenni di neuroanatomia.....	20
1.6. TRATTAMENTO	24
2. SCOPO DELLO STUDIO.....	25
3. MATERIALI E METODI	25
3.1. PAZIENTI	25
3.2. ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI A RISONANZA MAGNETICA	26
3.3. ELABORAZIONE DEI DATI DI IMAGING A RISONANZA MAGNETICA.....	26
3.4. ANALISI STATISTICA	29
4. RISULTATI.....	29
4.1. DESCRIZIONE DELLA COORTE DI PAZIENTI PFBC.....	29
4.2. DISTRIBUZIONE DELLO SPESSORE CORTICALE NEI PAZIENTI PFBC E NEI CONTROLLI SANI HC.....	32
4.3. PATTERN DI ALTERAZIONE CORTICALE NEI PAZIENTI CON PFBC vs HC	33
4.4. STUDI DI CORRELAZIONE PER SOTTOGRUPPI CLINICI	36
4.4.1. Correlazione tra pattern corticale e parkinsonismo	36
4.4.2. Correlazione tra pattern corticale e sintomi cognitivi.....	37
4.4.3. Correlazione tra pattern corticale e assenza di sintomatologia.....	40
5. DISCUSSIONE	42
6. CONCLUSIONI.....	46
7. BIBLIOGRAFIA.....	47

RIASSUNTO

- **PRESUPPOSTO DELLO STUDIO**

La PFBC, Primary Familial Brain Calcification, è un raro disturbo neurodegenerativo ad esordio in età adulta, caratterizzato dal riscontro in TC di calcificazioni encefaliche bilaterali a livello dei gangli della base ma spesso coinvolgenti anche altre aree cerebrali e cerebellari. La diagnosi richiede l'esclusione di cause secondarie e si avvale di test genetici, che risultano positivi nel 50% dei casi. Il quadro clinico è estremamente eterogeneo e le manifestazioni cliniche e la loro severità sono indipendenti dal grado di estensione delle calcificazioni. Alcuni soggetti possono essere asintomatici mentre altri presentano disturbi motori, cognitivi o psichiatrici fortemente invalidanti. Ad oggi non esistono farmaci in grado di cambiare il decorso della malattia e le terapie proposte sono principalmente di tipo sintomatico. È quindi necessario uno studio più approfondito del coinvolgimento encefalico in questa patologia che possa identificare marcatori in grado di spiegare l'eterogeneità clinica e radiologica.

- **SCOPO DELLO STUDIO**

Investigare tramite RM eventuali alterazioni dello spessore corticale cerebrale in una coorte di pazienti affetti da PFBC rispetto ad un gruppo di controlli sani e l'eventuale relazione rispetto ai diversi sottogruppi clinici.

- **MATERIALI E METODI**

Questo è uno studio caso-controllo costituito da 47 pazienti affetti da PFBC e 67 controlli sani appaiati per età e sesso.

Casi e controlli sono stati sottoposti ad una risonanza magnetica cerebrale 3T.

Al fine di evidenziare il pattern di alterazione corticale le immagini di risonanza magnetica strutturale (T1) sono state elaborate utilizzando FreeSurfer

I dati ottenuti sono stati correlati con le informazioni inerenti alle manifestazioni cliniche (disturbi del movimento, disturbi cognitivi).

Le analisi statistiche sono state implementate utilizzando Python (librerie pandas e statsmodels).

La valutazione motoria è stata condotta utilizzando la scala MDS-UPDRS. La valutazione cognitiva, condotta da un team esperto di neuropsicologhe, si è avvalsa dei test MMSE e/o MoCA.

- **RISULTATI**

Confrontando i 47 pazienti affetti da PFBC con i controlli sani, è stata rilevata una riduzione statisticamente significativa dello spessore della corteccia premotoria dell'emisfero cerebrale sinistro ($p < 0,05$). Tuttavia, confrontando i sottogruppi di pazienti con PFBC affetti da parkinsonismo e quelli con diagnosi di lieve compromissione cognitiva (MCI) rispetto ai controlli sani, non sono emerse altre aree con riduzioni dello spessore corticale di rilevanza statistica. Al contrario, il sottogruppo di pazienti asintomatici ha mostrato caratteristiche corticali sovrapponibili a quelle del gruppo di controllo sano.

- **CONCLUSIONI**

Pazienti sintomatici affetti da PFBC presentano un pattern specifico di alterazione della corteccia con riduzione dello spessore nell'area premotoria sinistra. Ulteriori studi sono pertanto necessari per chiarire il ruolo di queste alterazioni morfometriche cerebrali nella patogenesi dei deficit e dei sintomi nella PFBC:

ABSTRACT

- **BACKGROUNDS**

PFBC, Primary Familial Brain Calcification, is a rare neurodegenerative disorder with adult onset, characterized by the presence of bilateral brain calcifications on CT scans, primarily affecting the basal ganglia but often involving other cerebral and cerebellar areas. Diagnosis requires the exclusion of secondary causes and is supported by genetic testing, which is positive in 50% of cases. The clinical presentation is highly heterogeneous, and the severity of symptoms is independent of the extent of calcifications. Some individuals may be asymptomatic, while others experience severely disabling motor, cognitive, or psychiatric disturbances. Currently, no drugs are available to alter the course of the disease, and treatment is primarily symptomatic. Therefore, further investigation of brain involvement in this condition is needed to identify markers that can explain the clinical and radiological heterogeneity.

- **AIM OF THE STUDY**

To investigate possible alterations in cerebral cortical thickness using MRI in a cohort of patients with PFBC compared to a group of healthy controls, and to explore the potential relationship with different clinical subgroups.

- **MATERIALS AND METHODS**

This is a case-control study consisting of 47 patients with PFBC and XX healthy controls matched for age and sex. Both cases and controls underwent 3T brain magnetic resonance imaging. To highlight the pattern of cortical alteration, structural magnetic resonance images (T1) were processed using FreeSurfer. The obtained data were correlated with information regarding clinical manifestations (movement disorders, cognitive disturbances). Statistical analyses were implemented using Python (pandas and statsmodels libraries). Motor assessment was conducted using the

MDS-UPDRS scale. Cognitive evaluation, carried out by an experienced team of neuropsychologists, utilized the MMSE and/or MoCA tests.

- **RESULTS**

In comparing the 47 patients with PFBC to healthy controls, a statistically significant reduction in cortical thickness was observed in the left premotor cortex ($p < 0.05$). However, when comparing the subgroups of PFBC patients with parkinsonism and those diagnosed with mild cognitive impairment (MCI) to healthy controls, no other cortical areas showed statistically significant reductions in thickness. Conversely, the subgroup of asymptomatic patients exhibited cortical characteristics fully comparable to those of the healthy control group.

- **CONCLUSIONS**

Symptomatic patients with PFBC exhibit a specific pattern of cortical alteration, with a reduction in thickness in the left premotor area. Further studies are therefore needed to clarify the role of these cerebral morphometric alterations in the pathogenesis of deficits and symptoms in PFBC.

1. INTRODUZIONE

1.1. LA PFBC: DEFINIZIONE E STORIA

La Primary Familial Brain Calcification (PFBC), precedentemente nota malattia di Fahr, è un raro disturbo neurologico ad esordio adulto a carattere neurodegenerativo, che si contraddistingue per la presenza di calcificazioni cerebrali bilaterali a carico dei gangli della base, con possibile coinvolgimento di altre regioni cerebrali e cerebellari (talami, sostanza bianca, corteccia, nuclei dentati, tronco encefalico), in assenza di cause secondarie di calcificazioni.

Nel 50% dei casi circa è possibile individuare una eziologia genetica; ad oggi sono noti otto geni responsabili di malattia, a trasmissione autosomica dominante o recessiva.

Il quadro clinico può essere estremamente eterogeneo e comprende disturbi del movimento (prevalentemente parkinsonismo), disturbi cognitivi e/o disturbi psichiatrici, da soli o in variabile associazione, oltre a casi asintomatici indipendentemente dall'estensione delle calcificazioni.

La prevalenza della patologia è stimata tra 2.1-6.6 per 1000 persone [1], in aumento negli anni grazie all'uso routinario della TC encefalo; si ritiene tuttavia che il dato sia ancora sottostimato a causa della difficoltà nell'identificazione di pazienti asintomatici che con minor probabilità giungono all'attenzione del neurologo.

L'età media di esordio clinico nei soggetti sintomatici è stimata tra i 40 e 50 anni [1]; alcuni studi hanno riportato una maggior prevalenza di malattia nel sesso maschile [2,3], ma la recente revisione sistematica effettuata dalla Movement Disorders Society (MDS) [4], condotta su oltre 500 pazienti, non ha evidenziato differenze di genere.

Il termine PFBC è stato coniato nel 2013. Il precedente nome della patologia, "morbo di Fahr" risale agli studi del neuropatologo tedesco Karl T. Fahr [5] che negli anni '30 descrisse il caso clinico di un paziente anziano con decadimento cognitivo, problemi motori e rilevamento post-mortem di estesi depositi di calcio dei gangli della base, nello striato e nella sostanza bianca, che egli ipotizzò essere provocata da anomalie del metabolismo fosfo-calcico. Successivamente un gruppo di neuropatologi tedeschi, guidati dal dott. G Liebaltdt, intorno agli anni '60, si interrogò sulla presenza in due reperti autoptici di depositi di calcio a livello del sistema nervoso centrale, non

associati a fenomeni necrotici. Vennero analizzate post mortem le caratteristiche fisiologico-chimiche e di angio-stuttura delle calcificazioni cerebrali in due pazienti con storia di epilessia, disturbi del movimento, cefalea, confrontandole con calcificazioni associate a necrosi; mentre il reperto calcifico su base necrotica venne descritto come un “semplice meccanismo di riempimento”, i depositi calcifici (definiti inizialmente come “calcoli cerebrali”) simulavano una “prestazione attiva del tessuto” con carattere progressivo, in assenza di alterazioni metaboliche. Arrivarono quindi a descrivere come idiopatiche le calcificazioni bilaterali a livello del SNC di origine non arteriosclerotica [6], ipotizzando anche i fattori sistemici e locali che possono concorrere a determinare questo tipo di calcificazioni dei vasi cerebrali, come riportato in Figura 1.

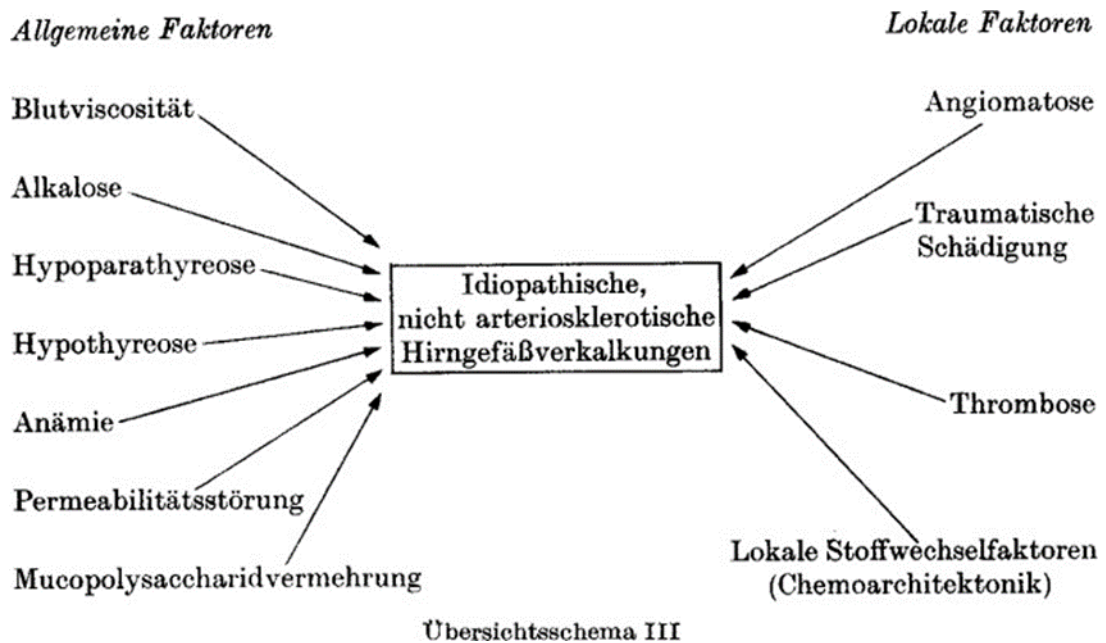


Figura 1: Fattori locali e sistemici che concorrono alla formazione di calcificazioni "idiopatiche"

Fahr ed i neuropatologi tedeschi, tuttavia, non furono davvero i primi a incontrare questa patologia. Già nel 1850, infatti, Delacour osservò un primo riscontro autoptico di calcificazioni dei gangli della base in una donna con rigidità, ipostenia degli arti inferiori e tremore [7], e in seguito Bamberger nel 1855 documentò tramite indagini istopatologiche delle calcificazioni microvascolari in una donna con disabilità intellettiva ed epilessia [8].

La possibile eziologia genetica venne postulata successivamente nel 1977 da Boller

[9] che descrisse una famiglia con nove pazienti appartenenti a tre generazioni, con reperto radiografico di calcificazioni bilaterali a livello dei gangli della base, con pattern di trasmissione dominante. Clinicamente tre membri presentavano corea, decadimento cognitivo e disturbi del linguaggio dalla terza decade, mentre gli altri sei membri (più giovani di 25 anni) erano asintomatici. Nessun paziente riportava alterazioni di tipo endocrinologico né anomalie somatiche. L'autore espresse quindi la necessità di differenziare questo quadro "idiopatico" con forme radiologicamente analoghe associate a ipoparatiroidismo e pseudoipoparatiroidismo.

Nel tempo questa patologia è stata descritta con diversi termini tra cui Idiopathic Basal Ganglia Calcification (IBGC) [10], Bilateral Striato-Pallido-Dentate Calcinosis Disease (BSPCD) [11], e infine dal 2013 con l'acronimo PFBC, che si utilizza attualmente nei casi di reperto di calcificazioni bilaterali a livello dei gangli della base comprovate mediante imaging cerebrale, in assenza di cause secondarie di deposizione di fosfato di calcio di natura metabolica, infettiva, tossica o traumatica [12].

1.2. DIAGNOSI

La diagnosi di PFBC è posta sulla base dell'evidenza in TC di calcificazioni bilaterali dei gangli della base e l'esclusione di cause secondarie di deposizione di fosfato di calcio a livello cerebrale.

È pertanto fondamentale l'esecuzione di:

- imaging cerebrale per identificazione o conferma della presenza di calcificazioni striatali simmetriche bilaterali;
- esami ematochimici per esclusione di cause secondarie.

Gli esami ematochimici indicati per la diagnosi differenziale di PFBC includono valutazione completa del metabolismo fosfo-calcico (paratormone PTH, vitamina D, livelli di calcio e fosfato, calcitonina, funzionalità renale), acido lattico, LDH, e CPK (che possono aumentare nelle patologie mitocondriali).

La diagnosi differenziale deve tenere conto delle caratteristiche specifiche del singolo paziente: età, storia clinica antecedente, esame obiettivo neurologico e generale, risultati degli esami di laboratorio e dell'imaging cerebrale. In particolare, è noto che modeste calcificazioni isolate a carico dei globi pallidi interni possono essere un reperto "age-related", stimato come parafisiologico nel 15-20% della popolazione

anziana senza alcuna correlazione clinica di disfunzione dei gangli della base [13]. Fondamentale per orientare il sospetto diagnostico è inoltre la storia familiare del paziente, in particolare per disturbi del movimento, disturbi cognitivi e psichiatrici, inclusa storia di suicidio in famiglia. È indicato costruire un albero genealogico familiare ed indagare la provenienza dei genitori del paziente per escludere una eventuale consanguineità, che avvalorerebbe la diagnosi di una patologia genetica ed ereditaria.

Le principali patologie che entrano in diagnosi differenziale con la PFBC sono:

1. Alterazioni del metabolismo del calcio: nei pazienti adulti la principale diagnosi differenziale è con quadri di ipoparatiroidismo, in cui si osservano bassi livelli circolanti dell'ormone paratiroideo (PTH) con ipocalcemia e iperfosfatemia e conseguente deposizione di cristalli di fosfato di calcio. L'ipoparatiroidismo può essere idiopatico o secondario a rimozione delle paratiroidi in corso di tiroidectomia [14]. L'ipoparatiroidismo di tipo iatrogeno è stato riportato fino all'1,5% dei pazienti sottoposti a tiroidectomia parziale o totale [15]. I principali sintomi correlati ad ipoparatiroidismo e ipocalcemia includono parestesie, crampi muscolari, spasmi, rallentamento psicomotorio, crisi epilettiche ed aritmie. Fino al 74% dei pazienti con ipoparatiroidismo idiopatico sviluppa calcificazioni cerebrali alla TC encefalo, potenzialmente indistinguibili da quelle associate a PFBC, che possono inoltre essere associate agli stessi sintomi [16].

Lo pseudo-ipoparatiroidismo è un disturbo su base genetica (mutazioni a carico dei geni GNAS e STX16) che comporta una resistenza periferica al PTH per cui sussiste una ipocalcemia nonostante livelli normali o elevati di PTH. Clinicamente si manifesta con disabilità intellettive e possibile osteodistrofia di Albright (bassa statura, obesità, calcificazione tissutale sistemica, ipogonadismo, ipotiroidismo) con esordio in giovane età.

2. Infezioni: le infezioni del gruppo TORCH (toxoplasmosi, rosolia, citomegalovirus e herpes simplex), cisticercosi e neurobrucellosi possono causare calcificazioni cerebrali irregolari e grossolane, in particolare in caso di infezioni intrauterine e in aree endemiche. Anche le infezioni da HIV sono potenzialmente associate a calcificazioni sistemiche e cerebrali; in particolare calcificazioni a carico dei gangli della base sono rare nel soggetto adulto ma possono essere riscontrate nel 30% dei pazienti pediatrici [17].

3. Sindromi congenite: due patologie genetiche ad esordio precoce, geneticamente determinate, si associano a calcificazioni dei gangli della base, la sindrome di Cockayne e la sindrome di Aicardi-Goutieres (AGS). La sindrome di Cockayne è una patologia recessiva causata da mutazioni bialleliche in geni che regolano la riparazione del DNA, quali ERCC6 e ERCC8, le cui manifestazioni in parte si sovrappongono a quelle dello Xeroderma pigmentosum. È classificata tra le leucodistrofie ad esordio pediatrico ed è caratterizzata da una diffusa ipomielinizzazione della sostanza bianca encefalica e da calcificazioni di putamen, cervelletto e corteccia cerebrale [18]. Clinicamente si associa a ritardo di sviluppo, disabilità intellettiva, degenerazione retinica (retinite pigmentosa), fotosensibilità cutanea, tratti dismorfici, neuropatia periferica, sordità neurosensoriale, atassia e spasticità.

La AGS è una encefalopatia pediatrica appartenente alla famiglia delle interferonopatie di tipo I, un gruppo geneticamente eterogeneo di malattie autoinfiammatorie caratterizzati da linfocitosi ed elevate concentrazioni di INF α a livello del liquido cerebrospinale; la patologia è sottesa da mutazioni in molteplici geni (ADAR, RNASEH2A, IFIH1, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1 e TREX1), con trasmissione recessiva. Le principali caratteristiche neuroradiologiche sono calcificazioni dei gangli della base, leucodistrofia e atrofia cerebrale. Le manifestazioni cliniche, solitamente severe, possono includere ritardo nello sviluppo, disturbi neuromuscolari, epilessia, segni piramidali, febbre e alterazioni vasculo-cutanee a livello degli arti [19].

Altre patologie ad esordio pediatrico-giovanile sindromiche con presenza di calcificazioni cerebrali, seppur con quadri più complessi, includono la microangiopatia cerebro-retinica con calcificazioni e cisti, una patologia causata da mutazioni autosomiche recessive di CTC1, associata a ritardo nella crescita, essudati retinici, malformazioni scheletriche, deterioramento cognitivo, convulsioni, tetraparesi spastica e segni cerebellari, con calcificazioni intracraniche diffuse e formazione di cisti parenchimali. Anche nella Sclerosi Tuberosa, patologia autosomica dominante (geni TSC1 e TSC2) caratterizzata da anomalie cutanee, tubercoli corticali e noduli subependimali cerebrali, epilessia, disabilità intellettiva, angiomiolipomi/cisti renali, rhabdomioma cardiaco, possono esservi calcificazioni cerebrali a carico dei tipici tubercoli. Infine, nella sindrome di Down sono riportate calcificazioni a carico dei gangli della base, in particolare a carico dello striato [20].

4. Malattie mitocondriali: sono patologie multisistemiche, che coinvolgono principalmente i tessuti ad alta richiesta energetica, quali sistema nervoso centrale e periferico, muscoli e organi endocrini, con spettro fenotipico molto variabile, frequentemente associate ad elevati valori di acido lattico e enzimi muscolari e alla presenza di “ragged red fibers” a livello muscolare. Possono essere causate da mutazioni del DNA mitocondriale ma anche da mutazioni a carico del DNA nucleare in geni coinvolti nel mantenimento del DNA mitocondriale o nella produzione di subunità della catena respiratoria mitocondriale. Occasionalmente nelle malattie mitocondriali si possono riscontrare calcificazioni cerebrali, in particolare a carico del globo pallido interno, presenti fino al 13% dei casi, in particolare in 3 malattie mitocondriali: la MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), la MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibres) e la sindrome di Kearns-Sayre [21]. Anamnesi e una accurata valutazione dei sintomi sistemici e neurologici associati sono fondamentali nella discriminazione dalla PFBC.

5. Patologie associate ad accumulo cerebrale di sostanze metalliche: alcune patologie genetiche rare ad esordio in età variabile associate a deposito a livello dei gangli della base di ferro o manganese entrano in diagnosi differenziale con la PFBC in quanto i metalli presentano caratteristiche radiologiche simili al calcio se indagati con RM encefalo. Clinicamente si possono manifestare con distonia, parkinsonismo e possibili disturbi cognitivi-neuropsichiatrici. In questa categoria figura in particolare la famiglia delle NBIA (neurodegeneration with brain iron accumulation), in particolare la PKAN (pantothenate-kinase associated neurodegeneration, da mutazione del gene PANK2) e la BPAN (Beta-Propeller Associated Neurodegeneration, da mutazioni del gene WDR45), nelle quali sono stati peraltro descritti dei casi caratterizzati dalla presenza di modesti depositi di calcio sovrainposti all'accumulo di ferro [22, 23]. Vi è inoltre la sindrome distonia-parkinsonismo-iperpermanesemia, che si caratterizza per iperintensità ai gangli della base nelle sequenze T1 alla RM encefalo, causata da mutazioni bialleliche del gene SLC30A10. L'esecuzione di TC encefalo, come pure le caratteristiche cliniche, in primis l'età di esordio dei sintomi (più giovanile in caso di accumulo di metalli e più avanzata in media nei soggetti con PFBC) possono essere dirimenti.

6. Altri disturbi neurodegenerativi ad esordio adulto: rari disturbi neurodegenerativi possono presentare calcificazioni cerebrali, tra cui SCA20 (atassia dominante con deposito isolato di calcio a livello del nucleo dentato cerebellare senza

coinvolgimento dei gangli della base), neuroferritinopatie (corea o distonia progressiva con possibili disturbi cognitivi e presenza alla RM di accumulo di ferro o degenerazione cistica putaminale, da mutazioni del gene FTL a trasmissione autosomica dominante), osteodisplasia lipomembranosa policistica con leucoencefalopatia sclerosante (malattia di Nasu Hakola, caratterizzata da lesioni ossee policistiche, fratture, demenza giovanile e calcificazioni putaminali bilaterali, da mutazioni dei geni TYROBP e TREM2, a trasmissione autosomica recessiva) e grovigli neurofibrillari diffusi con calcificazioni (disturbo di Kosaka-Shibayama), l'atrofia dentato-rubro- pallido-luisiana (DRPLA, caratterizzata da atassia della marcia, disartria, corea, mioclono, epilessia, psicosi e demenza, da espansione CAG nel gene ATN1).

7. Altro: alcune patologie autoimmuni si associano a calcificazioni sporadiche encefaliche, tra cui il neurolupus e la malattia celiaca; anche l'esposizione a sostanze tossiche è stata riportata in associazione a calcificazioni cerebrali, in particolare mercurio e CO.

1.3. PATOGENESI

Le basi genetiche della PFBC sono eterogenee. Ad oggi sono noti otto geni responsabili di malattia, quattro a trasmissione autosomica dominante (SLC20A2, PDGFRB, PDGFB, XPR1), quattro a trasmissione autosomica recessiva (MYORG, JAM2, CMPK2, NAA60).

1. SLC20A2: è stato il primo gene causativo di malattia ad essere identificato nel 2012 [24], con trasmissione autosomica dominante. Si localizza sul cromosoma 8 e codifica per un trasportatore transmembrana responsabile dell'uptake di fosfato nelle cellule altamente espresso a livello di globo pallido, talamo e cervelletto: la proteina type III sodium-dependent inorganic phosphate (Pi) transporter (PiT2). SLC20A2 è il gene più frequentemente responsabile di PFBC: varianti in eterozigosi sono state identificate in oltre il 60% dei pazienti PFBC geneticamente confermati [4], prevalentemente con mutazioni di tipo missenso. La perdita di funzione da parte del trasportatore PiT2 determina una alterazione delle concentrazioni ioniche di Ca e Pi con accumulo di Pi nell'ambiente extracellulare e la conseguente facilitazione alla precipitazione di cristalli di fosfato di calcio negli spazi perivascolari extracellulari. I livelli elevati di Pi potrebbero inoltre avere un ruolo nell'alterata funzione e

differenziazione cellulare. Sono stati riscontrati inoltre elevati livelli di fosfato nel liquor in soggetti affetti portatori di mutazioni a carico di questo gene [25].

2. PDGFRB: identificato nel 2013 [26], si localizza sul cromosoma 5 e codifica per il recettore β del platelet-derived growth factor (PDGF-R β), un recettore tirosin chinasi di superficie con elevata affinità per PDGF-B e PDGF-D ed è altamente espresso a livello delle cellule che compongono l'unità neurovascolare (NVU) e la barriera emato-encefalica (BEE): neuroni, cellule muscolari lisce vascolari (SCMs) e periciti. In particolare ha un'elevata espressione a livello dei gangli della base e del nucleo dentato del cervelletto. La trasduzione del segnale mediata da questo recettore e i suoi ligandi promuove la proliferazione e la migrazione delle cellule SCMs e un adeguato reclutamento dei periciti durante l'angiogenesi e di conseguenza la corretta formazione e omeostasi della BEE. Le varianti in eterozigosi di PDGFRB sono state riscontrate nel 5% dei pazienti PFBC geneticamente confermati [4] e sono prevalentemente di tipo missenso. La perdita di funzione di questo recettore determina disfunzione dei periciti che a sua volta impatta sulla integrità della BEE e comporta secondariamente il deposito di calcio nella parete dei vasi e nello spazio perivascolare. Un alterato signaling del pathway PDGFB-PDGFRB comporta inoltre una alterata differenziazione cellulare in senso osteogenico (Figura 2).

3. PDGFB: identificato nel 2013 [27], localizzato sul cromosoma 22, codifica per il precursore proteico di PDGF-B, il principale ligando di PDGF-R β . È espresso a livello dei neuroni e delle cellule endoteliali dell'encefalo ed è un importante fattore di crescita per le cellule mesenchimali. Gioca quindi un ruolo chiave nella proliferazione e nel reclutamento dei periciti e delle cellule SMCs, nel mantenimento dell'integrità della BEE. Le varianti in eterozigosi di PDGFB sono state riscontrate nel 12% dei pazienti PFBC geneticamente confermati [4] e sono prevalentemente di tipo missenso. La perdita di funzione di questa proteina compromette l'integrità della BEE via PDGF-R β ; studi modelli animali hanno infatti evidenziato una riduzione dell'espressione di podociti, con conseguente aumento di permeabilità della BEE e alterazioni dei normali processi di scambio di sostanze. Studi di immunistochemica su modello murino hanno inoltre dimostrato che la presenza di mutazioni a carico del gene PDGFB, e quindi alterazione del pathway PDGFB-PDGFRB nella PFBC, comporta una alterazione della differenziazione cellulare neuronale a livello della unità neurovascolare (NVU), con espressione di marcatori tipici della matrice ossea, sia in senso osteoblastico (osteocalcina, osteopontina e collagene I) che osteoclastico

(Tartrate-Resistant Acid Phosphatase TRAP). Analogamente, a carico delle cellule encefaliche calcificate e nelle vicinanze dei depositi calcifici sono stati rilevati anche la proteasi Catepsina K, il recettore attivante fattori nucleari RANK, il fattore di trascrizione RUNX2 e la Fosfatasi Alcalina Tessuto Non-Specifica (ALPL), tutti implicati nel signaling nel tessuto osseo. Tali risultati hanno confermato che le calcificazioni associate ai vasi cerebrali dei pazienti con PFBC sono associate ad un ambiente osteogenico. È stata inoltre rilevata la presenza di marker di attivazione degli astrociti e microglia circostanti le calcificazioni, con espressione di proteine del complemento (C3), marker di neurotossicità, lipocalina 2 (proteina secreta dagli astrociti con effetto dannoso sui neuroni), e 2- ω -carbossiletirpido (CEP, marker di infiammazione). È stato quindi documentato non solo un ambiente osteogenico, ma anche una attivazione reattiva infiammatoria e neurotossica, con segni di danno ossidativo (Figura 2), che si traducono nel modello murino nei sintomi clinici compatibili con PFBC (aumentata ansia e ridotte abilità psicomotorie).

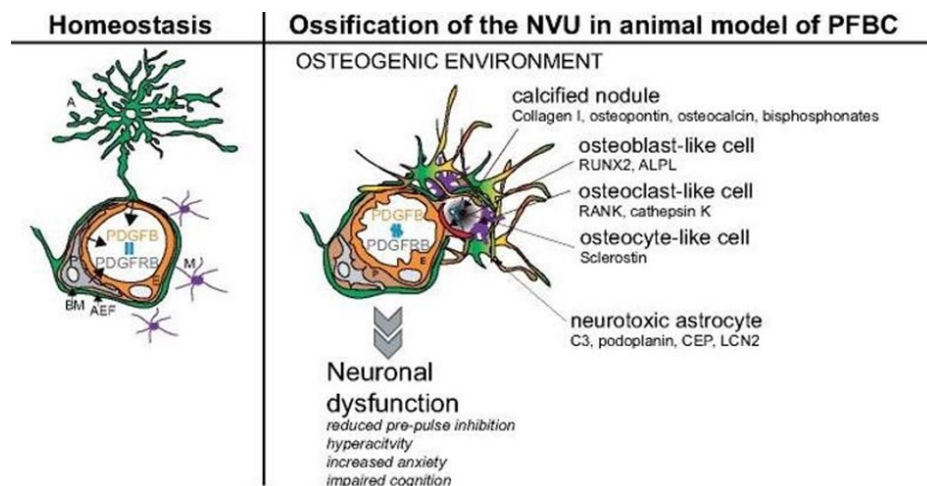


Figura 2: Alterazioni dell'unità neuro-vascolare associate alle calcificazioni vascolari nel modello murino di PFBC conseguente ad alterazione della pathway PDGFB/PDGFRB (destra). A sinistra normale omeostasi dell'unità neurovascolare (Zarb et al., 2019b)

4. XPR1: identificato nel 2015 [28], localizzato sul cromosoma 1, codifica per la proteina xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1 (XPR1), che media l'efflusso di Pi dalle cellule. Le varianti in eterozigosi di XPR1 sono state riscontrate nel 6% dei

pazienti PFBC geneticamente confermati [4] e sono prevalentemente di tipo missenso. Le varianti di XPR1 determinano un accumulo intracellulare di Pi favorendo pertanto la formazione di depositi di calcio fosfato. È stato inoltre ipotizzato un ruolo sinergico con PDGFRB, come pure un ruolo nella migrazione dei macrofagi e differenziazione della microglia [29]

5. MYORG: identificato nel 2018 [30], localizzato sul cromosoma 9 è il primo e il più comune gene autosomico recessivo responsabile della PFBC. Codifica per una glicosidasi, la myogenesis-regulating glycosidase (MYORG), che regola la glicosilazione di diverse proteine, tra cui i prodotti proteici di SLC20A2, PDGFB, PDGFRB, XPR1 [31]. È altamente espresso nel reticolo endoplasmatico degli astrociti, in particolare nel cervelletto. Le varianti bialleliche del gene MYORG sono state identificate nel 13% dei pazienti PFBC geneticamente confermati nella recente review MDS [4] e sono prevalentemente di tipo missenso. È stato supposto che mutazioni del gene MYORG determinino la perdita della sua funzione con conseguente alterata glicosilazione proteica post-traduzionale e trasporto delle proteine sulla superficie cellulare, in particolare con disfunzione degli astrociti e compromissione della NVU, che portano infine alla presenza di calcificazioni.

6. JAM2: identificato nel 2020 [32], localizzato sul cromosoma 21, codifica per la proteina giunzionale junctional-adhesion-molecule-2 (JAM2), che gioca un ruolo cruciale nella regolazione della polarità cellulare, della permeabilità endoteliale, della migrazione dei leucociti e della funzione e integrità della BEE, altamente espressa nelle cellule endoteliali e negli astrociti. Le varianti bialleliche del gene JAM2, prevalentemente di tipo nonsense, sono state identificate nel 2% dei pazienti PFBC geneticamente confermati [4] e causano la perdita delle adesioni tra cellule endoteliali e alterazione del passaggio di soluti, con conseguente promozione di precipitazione di fosfato di calcio.

7. CMPK2: identificato nel 2022 [33], localizzato sul cromosoma 2, codifica per una proteina chinasi (uridine monophosphate-cytidine monophosphate kinase 2, UMP-CMPK2) che interviene nelle reazioni di fosforilazione a livello mitocondriale, altamente espressa a livello di ippocampo e cervelletto. Al momento sono state riportate mutazioni bialleliche di questo gene esclusivamente in due famiglie PFBC originarie della Cina, in cui è stata dimostrata una riduzione nel numero di copie di DNA mitocondriale, downregolazione dell'espressione di proteine mitocondriali e nella produzione di ATP, con alterazioni nella morfologia delle creste mitocondriali e

compromissione dell'omeostasi energetica delle cellule con associata disregolazione delle concentrazioni di Ca e Pi.

8. NAA60: gene identificato nel 2024 [34] e localizzato sul cromosoma 16, codifica per la proteina NatF, appartenente alla famiglia delle N-terminal acetyltransferases (NATs), responsabile della acetilazione N-terminale di diverse proteine transmembrana. Questo gene è stato recentemente individuato in 10 soggetti affetti da PFBC appartenenti a 7 famiglie con ereditarietà autosomica recessiva, appartenenti a una coorte di pazienti affetti da PFBC con test genetico negativo per i geni precedentemente noti, mediante sequenziamento esomico. Mutazioni bialleliche sono associate a esordio clinico precoce, dall'età pediatrica alla III decade, con severe calcificazioni diffuse in caso di mutazioni nonsense e calcificazioni minori per mutazioni missenso. È stato dimostrato mediante test funzionali in vitro che le mutazioni a carico del gene NAA60 comportano una perdita delle modificazioni post-traduzionali del trasportatore dei fosfati codificato da SLC20A2, con conseguente ridotta localizzazione dello stesso a livello della superficie cellulare. La perdita di funzione di NAA60 quindi sarebbe causa di PFBC poiché altererebbe il pathway di omeostasi del fosfato.

Riassumendo, i meccanismi patogenetici principali alla base della PFBC sono:

1. Alterazioni nell'omeostasi del fosfato, correlate principalmente all'alterazione delle funzioni di trasporto di SLC20A2 e XPR1 e dall'azione di NAA60 su SLC20A2;
2. Compromissione della NVU, costituita da neuroni, astrociti, cellule muscolari lisce vascolari, periciti e cellule endoteliali, e con essa dell'integrità della BEE. Questo meccanismo è correlato prevalentemente a mutazioni di PDGFRB, PDGFB, MYORG e JAM2;
3. Alterata differenziazione cellulare con creazione di ambiente osteogenico, proinfiammatorio e neurotossico, correlato alla pathway PDGFB-PDGFRB come pure alla possibile funzione di mis-differenziazione data dalla alterata concentrazione di Pi.
4. Compromissione della funzione mitocondriale, che a sua volta influisce sulle concentrazioni di Ca e Pi, ipotesi supportata dal ruolo delle mutazioni sul gene CMPK2 e dalla presenza di calcificazioni cerebrali associate ad alcune malattie mitocondriali.

Si riporta di seguito la Figura 3 che riassume la patofisiologia molecolare alla base dello sviluppo delle calcificazioni cerebrali tipiche di PFBC.

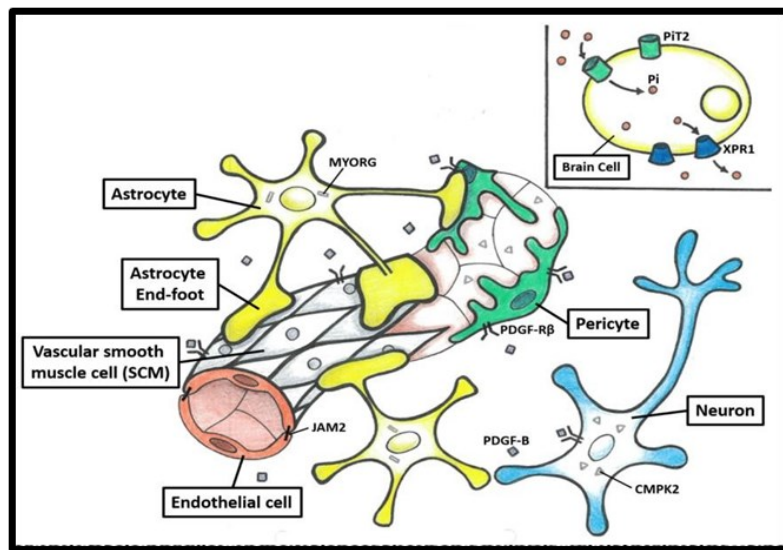


Figura 3: Patofisiologia molecolare di PFBC

1.4. MANIFESTAZIONI CLINICHE

I pattern di presentazione clinica della PFBC sono principalmente tre: disturbi del movimento, disturbi cognitivi e disturbi psichiatrici. Tuttavia dalla recente review MDS, effettuata su 516 soggetti con PFBC geneticamente determinata, è emerso che più di un terzo dei pazienti può essere asintomatico nonostante calcificazioni cerebrali estese [4]. Infatti mentre la penetranza radiologica delle mutazioni genetiche correlate a PFBC è del 100%, la penetranza clinica non è completa e varia in base al gene coinvolto [31]. In particolare i geni PDGFRB, MYORG e JAM2 hanno la più alta penetranza clinica (superiore all'85%); seguono i geni XPR1 e SLC20A (rispettivamente 70% e 60%). Al contrario, il PDGFB presenta la più bassa penetranza clinica (46%), con età di insorgenza solitamente inferiore rispetto alla media degli altri geni, che si aggira attorno ai 43 anni [4].

La presenza di disturbi del movimento è stata documentata in circa un terzo dei pazienti sintomatici, con associati sintomi non motori nel 42% dei casi (stato ansioso, psicosi, declino cognitivo e cefalea) [4]. Tra i disturbi del movimento, il parkinsonismo è la manifestazione più frequente, in particolare con fenotipo acinetico-rigido, riportato nel 27% dei pazienti sintomatici [4], prevalentemente in

portatori di varianti in SLC20A2 e PDGFB. Altri sintomi motori riportati nella recente review MDS in minor misura includono tremore, distonia, corea, mioclono, tics e atassia, isolati o variamente associati. I disturbi del linguaggio (prevalentemente disartria) rappresentano una frequente complicanza di PFBC [4], con una prevalenza del 26%. La disartria è pressoché patognomonica nei pazienti sintomatici portatori di mutazioni bialleliche del gene MYORG, con una prevalenza del 78%. Le mutazioni del gene MYORG sono infatti state associate ad un fenotipo severo di malattia, caratterizzato, oltre che da disartria, anche da elevata prevalenza di atassia e compromissione cognitiva; sono stati inoltre descritti pazienti con un fenotipo clinico simile alla paralisi sopranucleare progressiva (PSP), caratterizzata da parkinsonismo con precoce compromissione posturale e frequenti cadute, paralisi dello sguardo verticale, progressivo declino cognitivo [35]. Analogamente anche i pazienti portatori di mutazioni negli altri geni recessivi sembrano avere un fenotipo severo con estese calcificazioni cerebrali, tuttavia il numero di casi attualmente noti è insufficiente per permettere delle chiare correlazioni.

Per quanto riguarda i sintomi non motori, dalla recente revisione sistematica effettuata dall'MDS [4], è risultato che deficit cognitivi (mild cognitive impairment, demenza o alterazioni mnesiche) si presentano nel 34% dei casi. I disturbi psichiatrici sono invece riportati nel 28% dei pazienti sintomatici, prevalentemente sindrome depressiva (13%), seguita da psicosi (9%) e stato d'ansia (6%). Nei pazienti portatori delle varianti di PDGFB è stata inoltre documentata un'elevata frequenza di cefalea. Crisi epilettiche ed epilessia sono una manifestazione infrequente, riportate in letteratura senza particolari correlazioni genetiche.

1.5. DIAGNOSTICA PER IMMAGINI

1.5.1. Caratteristiche radiologiche

Attualmente il migliore strumento radiologico per identificare le calcificazioni cerebrali, e quindi per poter porre diagnosi, è la TC encefalo senza mezzo di contrasto. La TC permette di visualizzare i depositi di calcio come lesioni iperintense, della medesima intensità della teca cranica. Nel 2013 Nicolas et al. hanno proposto una scala chiamata Total Calcification Score (TCS) per

valutare in modo semiquantitativo l'entità delle calcificazioni [36]. Questa valutazione classifica l'entità delle calcificazioni con una scala da 0 a 5: 0 (calcificazione assente); 1 (calcificazione punteggiata); 2 (calcificazione debole, definita da una piccola area calcificata e da una densità apparente intermedia); 3 (calcificazione moderata, definita da una densità apparente massima (che appare omogeneamente iperdensa) ma che non copre un'ampia porzione della sede); 4 (calcificazione grave, definita da una densità apparente massima che copre un'ampia porzione della sede); 5 (grave (definita come il punteggio 4) e confluyente con almeno una calcificazione grave di una sede adiacente). Le calcificazioni correlate a PFBC sono tipicamente bilaterali simmetriche e, da definizione diagnostica, in tutti i casi vi è un coinvolgimento dei nuclei striati, prevalentemente a livello dei globi pallidi interni, con aspetto grossolano e diffuso [31]; altre aree frequentemente interessate sono il nucleo dentato cerebellare, il talamo, la sostanza bianca sottocorticale e meno frequentemente la corteccia cerebrale e il tronco encefalico [4]. Nicolas ha definito inoltre delle soglie di TCS per distinguere i reperti patologici da forme parafisiologiche correlabili all'invecchiamento, con microcalcificazioni di piccole dimensioni, sfumate, puntiformi e generalmente limitate ai pallidi interni riscontrabili fino al 20% dei soggetti anziani [37].

Ad Agosto 2024 è stato pubblicato un nuovo articolo che indaga su un campione di 40 pazienti affetti da PFBC una possibile versione di TCS modificato, ad esempio aggiungendo la calcificazione dell'ippocampo, e che varia da 0 a 95 punti concludendo come possa essere uno strumento di eccellente riproducibilità della quantità complessiva di calcificazioni cerebrali [70].

Alcuni pattern radiologici peculiari sono stati descritti in letteratura in associazione a mutazione di specifici geni.

Nei pazienti MYORG è infatti considerato patognomonico l'interessamento del tronco encefalico, in particolare del ponte a livello centrale, associato a vari gradi di atrofia cerebellare [38]. In particolare è stato descritto un interessamento degli emisferi cerebellari (nuclei dentati e folia) nel 75% dei casi, della sostanza bianca sottocorticale nel 50%, calcificazioni centrali pontine nel 33% dei casi e un coinvolgimento talamico nel 50% dei casi [35].

Nei pazienti JAM2 si osservano invece frequentemente calcificazioni bilaterali confluenti a livello corticale (lobi parietale, temporale e occipitale) [39].

I pazienti portatori di varianti bialleliche nei geni recessivi MYORG e JAM2 tendono ad avere aree di calcificazione più estese rispetto ai pazienti portatori di varianti dominanti [4]. Portatori di singole varianti monoalleliche in geni recessivi possono presentare lievi calcificazioni (principalmente a livello dei globi pallidi interni), suggerendo che le mutazioni monoalleliche nei geni recessivi correlati alla PFBC possono essere radiologicamente rilevanti e presentare pertanto un pattern di ereditarietà di tipo semi-dominante con ridotta penetranza clinica [31], con circa un terzo dei pazienti sintomatico in forma lieve. In particolare per il gene MYORG è stata proposta l'ipotesi di un fenotipo di tipo dose-dipendente [11, 35].

Per quanto riguarda la presenza di calcificazioni corticali, esse sono state riscontrate prevalentemente in pazienti con mutazioni a carico dei geni recessivi o di SLC20A2, senza chiare correlazioni cliniche, come pure la presenza di calcificazioni vermiane [11,36].

Da un punto di vista di distribuzione delle calcificazioni, solo un terzo dei soggetti sembra presentare calcificazioni isolate in una singola area cerebrale, mentre è frequente il coinvolgimento contemporaneo di plurime regioni; il numero di aree coinvolte correla con l'età (sia alla valutazione che all'esordio), oltre che alla presenza di mutazioni in geni recessivi [4, 36]. Globalmente è stato inoltre riportato una maggior frequenza e rischio di manifestazioni cliniche e di fenotipo severo in relazione ad una maggiore estensione delle calcificazioni in termini di numero di aree coinvolte anche nel caso di geni dominanti, con aumento del rischio di sintomi del 139% per ogni area aggiuntiva coinvolta e riduzione dell'età di esordio di circa 4.7 anni [4, 36]. Non è tuttavia possibile effettuare delle chiare predizioni di esordio.

In particolare lo studio condotto da Nicolas nel 2013 [36] ha rilevato TCS maggiori nei pazienti portatori di mutazioni nel gene SLC20A2, rispetto ai soggetti con mutazioni in PDGFRB, più frequentemente asintomatici. I soggetti sintomatici infatti a parità di genotipo tendono a presentare un maggior carico di calcificazioni rispetto agli asintomatici. È stata inoltre individuata una correlazione positiva con l'età alla valutazione, facendo

supporre un andamento lentamente progressivo dell'accumulo di calcificazioni. In altre coorti analizzate successivamente [40] non è stato possibile definire una correlazione tra sede specifica e sintomo specifico, per esempio tra interessamento dei nuclei dentati e la presenza o meno di sintomi cerebellari, pertanto al momento non è possibile effettuare chiare predizioni sulla base dei dati radiologici.

Per quanto riguarda l'applicazione di tecniche di imaging funzionale, la PET-FDG effettuata su un numero limitato di casi ha rilevato un ipometabolismo a livello dei gangli della base e in parte a livello corticale, soprattutto nei pazienti con declino cognitivo [41]. Per quanto riguarda il DAT-SCAN, i dati in letteratura, raccolti da singoli casi, sono contrastanti, tuttavia sono stati descritti alcuni casi di pazienti affetti da PFBC e parkinsonismo in cui l'esame ha documentato una alterazione della via dopaminergica nigrostriatale [42, 43]. La variabilità nell'imaging funzionale potrebbe dipendere da diversi pattern di deposizione di calcio e di neuroplasticità e adattamento cerebrale [44].

La risonanza magnetica (MRI) è in grado di descrivere più accuratamente l'anatomia delle calcificazioni rispetto alla TC, con il rischio però di sovrastimare l'entità delle lesioni o di confondere il calcio con altri depositi di metallo. La letteratura riporta un aspetto variabile delle calcificazioni cerebrali in RM, con un segnale ipointenso nelle sequenze T2 e iperintenso in T1 a basse concentrazioni o ipointenso ad alte concentrazioni; in particolare l'eterogeneità del segnale risulta più marcata nel cervelletto e nella sostanza bianca profonda, dove le calcificazioni possono apparire come segnale iperintenso in T1 e T2, per un possibile ruolo della gliosi reattiva [45].

Le nuove sequenze di RM, come la SWI (susceptibility-weighted imaging), sfruttano la suscettibilità magnetica dei diversi composti e si prestano bene a una descrizione spaziale e anatomica più accurata dei reperti di calcificazione. La letteratura scientifica è carente di studi che descrivano le caratteristiche neuroradiologiche in RM delle calcificazioni associate a PFBC, come pure altri eventuali correlati. Attualmente è nota la presenza di leucoencefalopatia a carico della sostanza bianca in pazienti portatori di mutazioni del gene PDGFB. Uno studio RM effettuato mediante voxel based morphometry in pazienti affetti da mutazioni del gene MYORG ha inoltre rilevato la presenza

di atrofia cerebellare. Tuttavia nessuno studio si è soffermato sulla caratterizzazione specifica delle calcificazioni, né su dati di spessore corticale o maggior definizione della sostanza bianca.

Uno studio di Wu et al. del 2011 ha valutato 16 pazienti affetti da Sindrome di Sturge-Weber, una facomatosi non ereditaria, e ha classificato l'entità delle tipiche calcificazioni a livello corticale in sequenza SWI utilizzando una scala semiquantitativa assegnando un punteggio da 0 a 2 in base all'estensione delle calcificazioni corticali [46], in modo simile al TCS, che tuttavia non è mai stato applicato in RM. L'utilizzo della RM encefalo è fondamentale nei pazienti pediatrici, rari in caso di PFBC ma con potenziale implicazione per il counseling familiare, in quanto non comporta esposizione a radiazioni. A questo proposito si cita anche il paper di Tonduti et. al del 2018 [47] che verte sullo studio clinico, neuroradiologico e genetico di pazienti pediatrici con quadro di encefalopatia precoce (esordio prima dei 18 anni) associata a calcificazione cerebrale di eziologia sconosciuta. Lo studio in RM delle calcificazioni e di altre alterazioni (in particolare del coinvolgimento della sostanza bianca) è stato associato alla ricerca genetica delle mutazioni note associate a sindromi che potessero giustificare il quadro clinico e neuroradiologico, comprese AGS e PFBC, con un caso possibilmente imputabile a mutazione di XPR1. Uno studio di confronto di RM e TC encefalo in pazienti pediatrici con calcificazioni cerebrali ha rilevato che seppur la RM non abbia permesso una completa definizione delle calcificazioni nel 14% dei casi, nel 19% dei casi avrebbe permesso di evitare l'esecuzione di TC encefalo ripetute, in particolare in corso di follow-up [48]. Attualmente l'esecuzione di TC encefalo di controllo per monitorare l'evoluzione delle calcificazioni non è strettamente necessaria nei pazienti con PFBC, non essendovi terapie chelanti specifiche; tuttavia in futuro la RM potrebbe offrire la possibilità di valutare l'evoluzione clinico-radiologica e l'eventuale risposta terapeutica con una metodica non invasiva e priva di radiazioni ionizzanti.

1.5.2. Valutazione dello spessore corticale

Sul piano clinico, la manifestazione di deficit cognitivi (mild cognitive impairment o demenza) nei pazienti PFBC si presenta nel 34% dei casi, rendendo la valutazione dello spessore corticale in ambito radiologico un possibile marcatore di malattia utile anche per una possibile diagnosi precoce. Lo spessore corticale è la misura della distanza tra la superficie esterna della corteccia cerebrale e il suo confine interno con la sostanza bianca sottostante. È una delle dimensioni principali che caratterizzano la corteccia cerebrale e viene misurato in millimetri. Lo spessore medio su tutto il cervello è di circa 2,5-3 mm e all'interno dello stesso varia da circa 2 mm nel punto più sottile della corteccia calcarina fino a 4 mm o più nelle regioni più spesse del giro precentrale, dei lobi frontali superiori e dei lobi temporali superiori [68][69].

La corteccia cerebrale è suddivisa in due emisferi cerebrali ciascuno dei quali è ulteriormente suddiviso in lobi ed è composta da sei strati principali di neuroni, che si distinguono per la loro composizione e funzione:

- Strato I - Strato Molecolare: contiene principalmente dendriti di neuroni e fibre nervose. È lo strato più esterno della corteccia e ha una densità relativamente bassa di corpi cellulari. Funge da area di integrazione con altre aree corticali e da strutture sottocorticali.
- Strato II - Strato Granulare Esterno: contiene piccoli neuroni granulari (neuroni a cellule stellate) e alcune fibre nervose. È coinvolto nella ricezione e nell'elaborazione delle informazioni sensoriali da altre aree della corteccia e da strutture sottocorticali.
- Strato III - Strato Piramidale Esterno: contiene neuroni piramidali. Trasmette informazioni tra diverse aree della corteccia cerebrale e ha un ruolo importante nella comunicazione corticale.
- Strato IV - Strato Granulare Interno: contiene neuroni granulari più piccoli. È un importante centro di ricezione per le informazioni sensoriali che arrivano dalla corteccia.
- Strato V - Strato Piramidale Interno: contiene grandi neuroni piramidali che inviano proiezioni verso strutture sottocorticali come i nuclei

della base e il midollo spinale. Ha un ruolo fondamentale nell'invio di segnali motori e nella modulazione dell'attività motoria.

- Strato VI - Strato Multiforme: contiene neuroni di diverse forme e dimensioni, e molte fibre nervose che si dirigono verso altre aree corticali e sottocorticali.

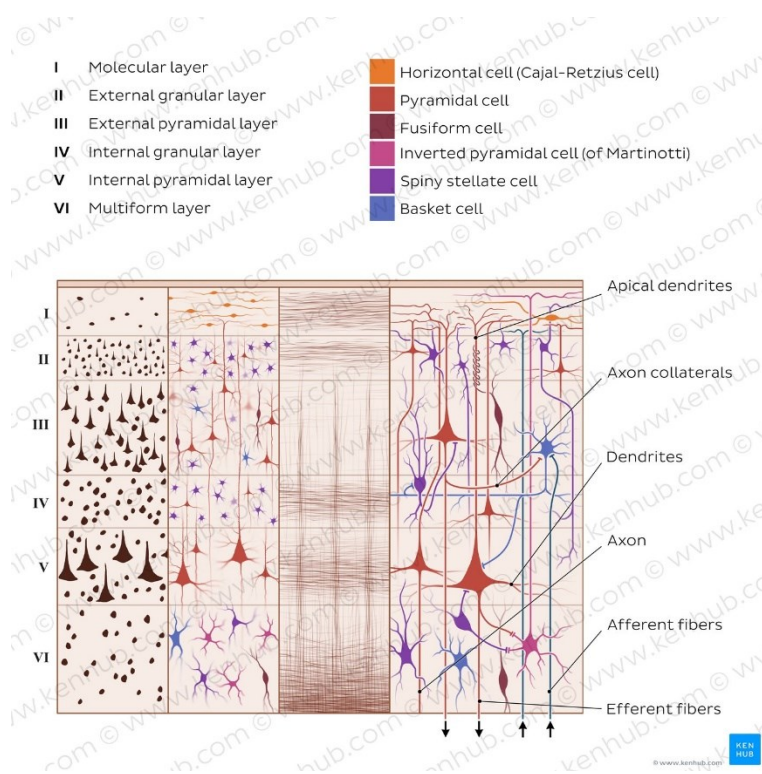


Figura 4: Struttura corteccia cerebrale

Durante lo sviluppo cerebrale lo spessore corticale può variare: nei bambini e negli adolescenti lo spessore aumenta con l'acquisizione di nuove competenze e abilità cognitive mentre con l'età può ridursi [67].

Modifiche nello spessore corticale sono state correlate a condizioni neurodegenerative come l'Alzheimer [66], oltre che ad altre patologie di carattere psichiatrico come nella schizofrenia dove uno studio del 2024 ha dimostrato che diminuzioni dello spessore corticale a livello della corteccia orbitofrontale sinistra e della corteccia temporale bilaterale portavano rispettivamente ad un maggior rischio di sviluppo di ADHD (disturbo da deficit di attenzione) o di ASD (disturbo dello spettro autistico) [68].

Lo spessore della corteccia può quindi essere una misura utile per valutare la progressione della malattia, identificare le regioni cerebrali colpite ed eventuali diversità a seconda delle manifestazioni cliniche eterogenee, ed in ultima analisi sviluppare un possibile trattamento personalizzato.

Utilizzando le tecniche di risonanza magnetica attuali, è possibile misurare lo spessore corticale in-vivo.

Il gold standard per la misura in vivo dello spessore corticale attualmente prevede la misura della distanza tra il confine di interfaccia interno (sostanza bianca/grigia) della corteccia e il confine di interfaccia esterno (sostanza grigia/pia) della corteccia utilizzando la pipeline-FreeSurfer applicata alle acquisizioni volumetriche strutturali MPRAGE pesate in T1 in RM [69].

1.5.3. Cenni di neuroanatomia

1.5.3.1. Area motoria primaria

L'area motoria primaria (M1), identificata anche come area 4 di Brodmann, si localizza nel giro precentrale sulla superficie dorsale degli emisferi e nella porzione anteriore del lobulo paracentrale sulla superficie mediale degli stessi. Questa circonvoluzione viene anche identificata come prerolandica vista la localizzazione appena anteriore all'omonimo solco. Quest'area è la sede delle cellule piramidali giganti di Betz, localizzate nel quinto (piramidale interno) dei sei strati che caratterizzano la citoarchitettura della corteccia. Le cellule piramidali sono il primo motoneurone e con i loro assoni contribuiscono a formare il fascio detto piramidale, o corticospinale. L'area motoria primaria ha un'organizzazione somatotopica peculiare in cui la rappresentazione della metà controlaterale del corpo è illustrata dalla celebre immagine dell'homunculus motorio.

Alla luce delle conoscenze attuali questa rappresentazione della corteccia motoria appare un po' semplicistica: i diversi muscoli del corpo in realtà sono rappresentati come un mosaico di interconnessioni che rendono possibile per la corteccia organizzare combinazioni di movimenti. Ogni muscolo è rappresentato da una colonna di neuroni i cui assoni prendono

connessione con una rete di neuroni analoghi. Queste connessioni sono quasi assenti nelle colonne neuronali che controllano i muscoli distali, che così possono godere di una maggior grado di indipendenza nei loro movimenti [82].

Le fibre costituite dagli assoni delle cellule piramidali della M1, assieme a quelle dell'area premotoria, sono la componente principale del fascio corticospinale che decussa quasi interamente a livello delle piramidi bulbari decorrendo poi nel cordone laterale fino alla sinapsi col secondo motoneurone situato nelle corna anteriori del midollo.

Le funzioni specifiche di quest'area sono:

1. Codificare gli input provenienti da altre aree della corteccia, motorie e non, e tradurli in output motori che determinano: a) quali muscoli devono contrarsi, b) la forza di contrazione di tali muscoli e c) la durata della contrazione. I comandi motori provenienti dalla corteccia motoria primaria svolgono la loro azione sull'emicorpo controlaterale a causa della decussazione dei fasci corticospinali a livello delle piramidi bulbari. I movimenti delle porzioni distali del corpo sono rappresentati da un'area corticale maggiore rispetto a quelli coinvolgenti le porzioni prossimali, determinando il caratteristico aspetto caricaturale dell'homunculus motorio. Questa rappresentazione suggerisce un ruolo preponderante della corteccia motoria nei movimenti distali. La maggior parte delle cellule corticali, anzichè innervare i motoneuroni responsabili dell'esecuzione di un singolo movimento, innervano i motoneuroni deputati all'esecuzione di movimenti sinergici. La forza di contrazione è determinata dalla frequenza di scarica dei neuroni corticali mentre la durata della contrazione è determinata dalla durata dell'attività elettrica di tali neuroni, entrambe specificate dal programma motorio. L'attività elettrica dei neuroni inizia 60 millisecondi prima della contrazione muscolare.
2. Informare altre regioni cerebrali, come il cervelletto e i gangli della base, sul movimento in via di esecuzione.
3. Partecipare al tono muscolare e ai riflessi muscolotendinei.

1.5.3.2. Area motoria supplementare

Le due aree motorie supplementari sono localizzate sia sulla superficie mediale che dorsale della porzione posteriore dei giri frontali superiori, nella porzione mediale dell'area 6 di Brodmann, appena anteriormente dell'area motoria primaria.

L'area supplementare motoria (SMA) è coinvolta in due funzioni:

1. Regola la coordinazione tra input e output della corteccia motoria primaria.
2. Crea i programmi motori per le sequenze rapide di movimenti, come suonare il pianoforte.

Durante l'esecuzione di compiti che richiedono una sequenza ordinata di movimenti fini (come appunto suonare uno strumento musicale, parlare o scrivere), a differenza dell'area motoria primaria, la SMA si attiva bilateralmente. L'attivazione dei neuroni di quest'area è associata solo ad alcuni particolari aspetti della programmazione motoria, dal momento che non si attiva in caso di movimenti ripetitivi che non richiedano una sequenza pianificata. Un altro elemento a supporto del fatto che quest'area sia coinvolta nella pianificazione è che la SMA si attiva anche se il movimento viene soltanto pensato e non eseguito.

Nella SMA si possono identificare due regioni distinte: la pre-SMA anteriormente e la SMA propriamente detta caudalmente.

- Pre-SMA: non è direttamente connessa con il midollo spinale, mentre la sua connessione con la M1 è oggetto di osservazioni discordanti [83]. È invece fortemente connessa con diverse regioni della corteccia prefrontale. Inoltre riceve afferenze da domini non motori del globus pallidus e del cervelletto. Sulla base di queste connessioni, per Akkal la pre-SMA andrebbe anatomicamente considerata come una regione della corteccia prefrontale. La pre-SMA è coinvolta in processi di ordine superiore come la pianificazione e la preparazione del movimento, maggiore è la complessità del movimento e maggiore è la sua attivazione [84]. La sua attivazione è massima per movimenti in via di apprendimento, mentre diminuisce fino a scomparire quando i movimenti diventano automatizzati [85].

- SMA propriamente detta: dà proiezioni sia alla M1 che al midollo spinale. Alla SMA arrivano input dai domini motori dei gangli della base e, anche se in minor parte, dal cervelletto [83]. Proiezioni dirette dall'area motoria supplementare al midollo controllano i muscoli prossimali, mentre per i muscoli distali le proiezioni sono mediate dalla corteccia motoria primaria. La SMA è coinvolta principalmente nel movimento iniziato spontaneamente, ma anche nel movimento in risposta ad uno stimolo, in cui viene però maggiormente attivata l'area premotoria laterale. Studi funzionali infatti hanno dimostrato che sia nel movimento autoindotto che in quello in risposta ad uno stimolo si attiva una rete neurale comune comprendente la SMA, la corteccia cingolata, la M1, l'area parietale superiore e la corteccia dell'insula. Durante la fase di preparazione del movimento autoindotto la SMA risulta attiva tra 1 e 2 secondi prima dell'inizio dello stesso [84].

Mentre lesioni della M1 causano paralisi o paresi, lesioni della SMA determinano aprassia.

1.5.3.3. Corteccia premotoria

Con corteccia premotoria si intende la porzione laterale dell'area 6A β , localizzata sulla superficie laterale del lobo frontale appena anteriormente all'area motoria primaria. I neuroni che la compongono svolgono la loro funzione nel comporre nuovi programmi motori e nell'iniziare, modificare e inibire il movimento. La corteccia premotoria prende parte quindi alla preparazione del movimento [86] e si attiva bilateralmente nella fase precedente all'esecuzione dei movimenti complessi o nuovi [85]. Lesioni di quest'area determinano aprassia.

Una componente sostanziale delle proiezioni corticospinali prende origine dall'area premotoria. Le aree premotorie hanno un collegamento diretto al midollo spinale e quindi possono controllare il movimento anche indipendentemente dalla corteccia motoria primaria [87].

1.6. TRATTAMENTO

Ad oggi non esistono farmaci in grado di cambiare il decorso della malattia e le terapie proposte sono principalmente di tipo sintomatico. Il follow-up radiologico via RM o TC ha limitato valore nella pratica decisionale in quanto nessuna decisione terapeutica viene intrapresa sulla base del quadro radiologico e sembra

non esserci una correlazione tra l'entità delle calcificazioni e la prognosi. L'analisi e il counselling genetici, che possono tardare dato il mismatch tra quadro radiologico e clinico, sono utili soprattutto per predire il rischio di trasmissione delle mutazioni note alla prole. Diversi farmaci sono stati proposti nel trattamento della PFBC.

La Nimodipina, un bloccante dei canali del calcio a livello del SNC, è stata utilizzata senza successo per attenuare i sintomi tipici da PFBC [49]. Per i Bisfonati, utilizzati nel trattamento dell'osteoporosi, è stato riportato un miglioramento sintomatologico in singoli casi, senza una effettiva diminuzione dell'entità delle calcificazioni alla TC [50]. In una serie di sette pazienti, Oliveira et al. hanno osservato la stabilizzazione della progressione di malattia dopo la somministrazione di Alendronato (bifosfonato) senza importanti effetti collaterali, ma non sono state osservate modifiche nell'entità delle calcificazioni e non sono stati utilizzati controlli per il confronto [51]. Il Fingolimod, un modulatore del recettore sfingosina-1-fosfato, è stato proposto per ridurre il circolo periferico dei linfociti T ed è stata dimostrata una riduzione del loro traffico anche a livello centrale. In un recente studio su animali, nei topi SLC20a2 -/- sono stati evidenziati ridotti depositi calcifici a seguito della somministrazione intraperitoneale di Fingolimod per tre mesi [52].

Ad oggi come terapia sintomatica possono essere proposti antipsicotici e antidepressivi per i disturbi di tipo neuropsichiatrico [50]. Nei pazienti con parkinsonismo la L-Dopa ha sortito risposta variabile. Casi di importante miglioramento sono stati riportati in pazienti con un imaging DaT-Scan alterato [52, 53], mentre non sono stati riportati miglioramenti clinici in pazienti con segni cerebellari, disturbi atipici e disturbi nella marcia [54, 55].

2. SCOPO DELLO STUDIO

Nella PFBC il quadro clinico è estremamente eterogeneo ed indipendente dal grado di estensione delle calcificazioni. Nonostante la TC rimanga il gold standard per l'identificazione delle calcificazioni cerebrali, indagare la malattia tramite risonanza magnetica in un'ampia coorte di pazienti potrebbe permettere di valutare e identificare altri possibili marcatori di malattia che chiariscano meglio i meccanismi patogenetici che portano alla comparsa dei sintomi e permettano un trattamento mirato che ne migliori la gestione clinica. Allo stato attuale della letteratura non sono presenti studi sistematici sulle alterazioni in risonanza magnetica nella PFBC.

In questo studio verranno analizzate le alterazioni dello spessore corticale in relazione alla malattia e alle diverse presentazioni cliniche.

3. MATERIALI E METODI

3.1. PAZIENTI

Sono stati reclutati 47 pazienti con PFBC afferenti alla Clinica Neurologica dell'Azienda Ospedale Università di Padova, sottoposti preliminarmente ad un iter diagnostico finalizzato ad escludere cause secondarie di calcificazioni cerebrali che prevede: TC cerebrale, valutazione delle concentrazioni plasmatiche di PTH, calcio, vitamina D, CPK, LDH e funzione renale, analisi genetica mirata, valutazioni clinica e un'approfondita valutazione neuropsicologica che ha incluso almeno 2 test per ognuno dei 5 domini funzionali cognitivi valutati: funzioni esecutive, linguaggio, attenzione e working memory, abilità visuospatiali.

La terza parte dell'UPDRS (UPDRS-III) è stata utilizzata per valutare la gravità dei sintomi motori, mentre per la componente cognitiva e affettiva oltre ad una valutazione neuropsicologica sono stati utilizzati MMSE (Mini- Mental State Examination), MoCA (Montreal Cognitive Assessment), Beck Depression Inventory BDI-II, Starkstein's apathy scale SAS, State-Trait Anxiety Inventory STAI-Y 1-2, Barratt Impulsiveness Scale BIS-11, Questionnaire for Impulsive-Compulsive Disorders Rating Scale QUIP-RS, Symptom Checklist SCL-90, Activities of Daily

Living ADL, Instrumental Activities of Daily Living IADL, EuroQol 5-Dimension 5-level questionnaire EQ-5D-5L on quality of life.

Per quanto riguarda i controlli sani, sono stati reclutati 67 volontari con età e sesso corrispondenti, senza patologie neurologiche, punteggi normali del MMSE, MoCA ≥ 26 e esami cognitivi e neurologici normali.

La partecipazione allo studio è avvenuta esclusivamente previa firma di specifico consenso informato per l'esecuzione della risonanza magnetica e il trattamento, in forma aggregata e anonima, dei dati clinici, laboratoristici e radiologici.

3.2. ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI A RISONANZA MAGNETICA

Tutti i 47 pazienti hanno eseguito una TC cerebrale, essenziale per la diagnosi, che è stata descritta secondo il modello e scala semiquantitativa di Nicolas [36]. I pazienti sono stati sottoposti a risonanza magnetica cerebrale (Philips Ingenia 3T, Best the Netherlands) con bobina di quadratura dedicata a 32 canali. Il protocollo di studio includeva le seguenti sequenze:

- 3D-T1 magnetization prepared rapid gradient echo sequence nel piano sagittale (TR/TE= 6676ms/3ms; FOV= 240mm; flip-angle= 8°; resolution=1x1x1mm³; reconstructed slice thickness: 3 mm),
- 3D-fluid attenuated inversion recovery (FLAIR; TE: 360ms, TR: 8000 ms, TI: 2400 ms, acquisition voxel size 1.12 mm; reconstructed slice thickness: 3 mm),
- 2D susceptibility weighted imaging (SWI; TE: 7.2ms, TR: 31ms, slice thickness: 2mm).

3.3. ELABORAZIONE DEI DATI DI IMAGING A RISONANZA MAGNETICA

Al fine di evidenziare il pattern di alterazione corticale le immagini di risonanza magnetica strutturale (T1) sono state elaborate utilizzando FreeSurfer (versione 7.4.1), uno strumento open-source ampiamente utilizzato per l'analisi morfometrica

delle strutture cerebrali corticali e sottocorticali. La pipeline di FreeSurfer, recon-all, si compone di una serie di passaggi standardizzati che trasformano un'immagine MRI T1w in dati di spessore corticale utilizzabili per analisi quantitative. I dettagli del flusso di elaborazione sono riportati nella documentazione ufficiale di FreeSurfer (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/fswiki/ReconAllDevTable>) e seguono metodiche validate in studi precedenti (Dale et al., 1999; Fischl et al., 1999; Fischl & Dale, 2000).

Il flusso di elaborazione inizia con la co-registrazione dell'immagine T1w all'atlante MNI305 attraverso una trasformazione affine che porta a voxel isotropici di dimensioni 1 mm³. Successivamente, le immagini sono sottoposte a correzione della disomogeneità del campo magnetico (bias field) e vengono segmentate per eliminare il cuoio capelluto e altri tessuti esterni al cervello. Durante questa fase di skull stripping, un template ellissoidale viene deformato per adattarsi alla superficie interna del cranio e rimuovere i voxel esterni a questa superficie (Dale et al., 1999).

La correzione del bias field, un artefatto smooth a bassa frequenza, è fondamentale per garantire una corretta segmentazione e analisi delle immagini MRI (Sled et al., 1998). In questo studio, è stato utilizzato l'algoritmo N4ITK (Tustison et al., 2010), una versione migliorata del metodo N3 (Sled et al., 1998), che è implementata in FreeSurfer a partire dalla versione 7.1 e successive (inclusa la 7.4.1). Questo algoritmo corregge iterativamente il bias field residuo, migliorando l'accuratezza rispetto all'N3, che invece stima il bias field totale a ogni iterazione.

Le immagini MRI preprocessate sono segmentate in materia grigia e bianca sottocorticale, utilizzando un'analisi basata sull'intensità dei voxel e sulle condizioni al contorno definite dai voxel adiacenti (Fischl et al., 2002). Per separare gli emisferi cerebrali e rimuovere le strutture sottocorticali, vengono applicati due piani di taglio. Successivamente, viene generata una mesh sulla superficie della materia bianca, con correzione automatica della topologia (Fischl et al., 2001). Questa mesh viene poi deformata per trovare la superficie piaie, seguendo i gradienti di intensità per posizionare correttamente sia l'interfaccia tra la materia grigia e bianca che la superficie piaie stessa.

Il calcolo dello spessore corticale (cortical thickness) viene effettuato come la minima distanza tra la superficie della materia bianca e la superficie piaie (Fischl & Dale, 2000). L'area associata a ciascun vertice della superficie è calcolata come la media dell'area dei triangoli di cui il vertice stesso fa parte. Per determinare il volume delle regioni d'interesse (ROI), viene eseguito un preliminare processo di labeling cerebrale tramite funzioni di probabilità (Fischl et al., 2002). Una volta completata l'etichettatura volumetrica, il volume di ogni ROI viene calcolato semplicemente contando il numero di voxel assegnati, ciascuno di dimensione 1 mm^3 .

Le misure di spessore corticale per ciascuna ROI sono state estratte utilizzando il comando `aparstats2table` di FreeSurfer, sia per l'emisfero sinistro (lh) che per l'emisfero destro (rh). La parcellizzazione corticale è stata eseguita utilizzando l'atlante di Desikan-Killiany-Tourville (DKT) (Klein & Tourville, 2012), che suddivide ciascun emisfero in 31 regioni specifiche (includendo sia giri che solchi adiacenti). Il DKT è stato scelto per la sua combinazione di accuratezza e dettagli anatomici.

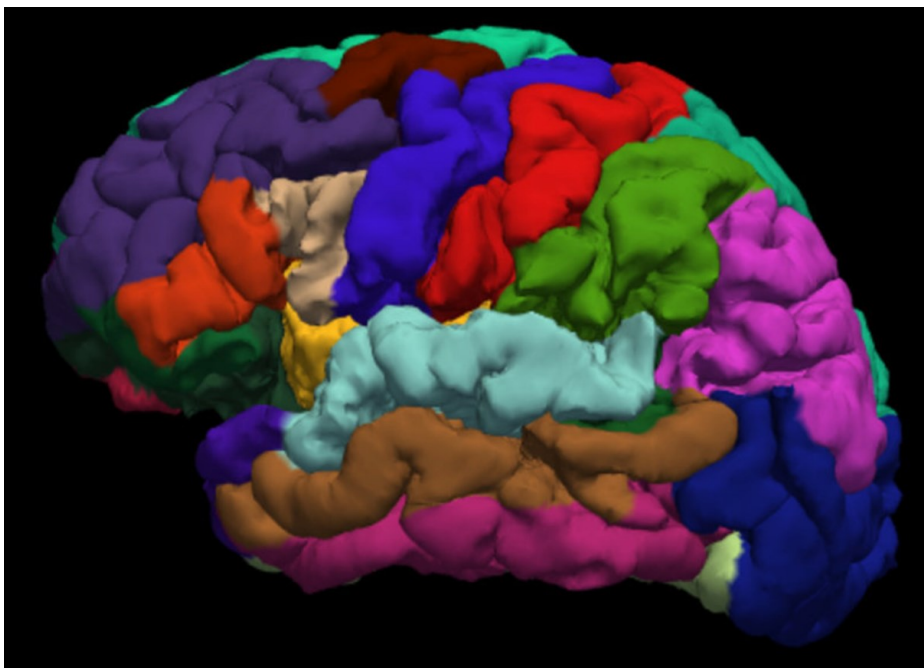


Figura 5: Parcellizzazione secondo Desikan-KillianyTourville (DSK)

3.4. ANALISI STATISTICA

Dopo che FreeSurfer ha calcolato lo spessore corticale per ciascuna regione di interesse (ROI), i dati sono stati esportati per l'analisi statistica. Questa analisi è stata condotta utilizzando un modello lineare per confrontare le differenze nello spessore corticale tra il gruppo dei pazienti e quello dei controlli, controllando per l'effetto dell'età e del volume intracranico stimato (eTIV).

Per ciascuna ROI, è stato utilizzato un modello lineare con la seguente formula:

$$\text{Spessore Corticale} = \beta_0 + \beta_1 \cdot \text{Gruppo} + \beta_2 \cdot \text{Età} + \beta_3 \cdot \text{eTIV} + \varepsilon$$

dove:

β_0 è l'intercetta del modello.

β_1 rappresenta la differenza media nello spessore corticale tra pazienti e controlli.

β_2 rappresenta l'effetto dell'età sullo spessore corticale.

β_3 rappresenta l'effetto del volume intracranico stimato (eTIV).

ε è l'errore residuo.

Le analisi statistiche sono state implementate utilizzando Python (librerie pandas e statsmodels). I valori p associati al coefficiente del gruppo (β_1) sono stati corretti per confronti multipli utilizzando la procedura di Benjamini-Hochberg (FDR) per controllare il tasso di falsi positivi (Benjamini & Hochberg, 1995).

4. RISULTATI

4.1. DESCRIZIONE DELLA COORTE DI PAZIENTI PFBC

La coorte di pazienti inclusi in questa tesi comprende 47 pazienti affetti da PFBC provenienti da 44 famiglie diverse, di 25 di sesso femminile. L'età media dei pazienti è pari a 57.8 ± 12.7 anni con un range da 30 ad 82 anni. Al momento dell'esordio della sintomatologia, l'età media era pari a $46,4 \pm 18.1$ anni con un minimo di 23 e un massimo di 75 anni. Sono stati considerati sintomatici i pazienti con almeno un

sintomo tra: disturbo del movimento (parkinsonismo, tremore, distonia, disturbo cerebellare o altro disturbo ipercinetico) e/o disturbo cognitivo. I pazienti sintomatici sono risultati 32/47, pari al 67% della coorte.

Tra i 47 pazienti inclusi, 24 non presentavano una familiarità per morbo di Parkinson, demenza, disturbi psichiatrici o PFBC. In questa coorte sei pazienti appartengono a tre famiglie: due coppie di fratelli e una coppia di madre e figlia.

Il gruppo di controlli sani inclusi comprende 67 controlli di cui 34 di sesso femminile. L'età media dei controlli è pari a 65.6 ± 10.5 anni con un range variabile da 28 a 80 anni.

Nei pazienti: segni piramidali sono stati evidenziati in 22 pazienti (47%), risultando il reperto obiettivo neurologico più frequente. Seguono a pari frequenza il tremore, presente in 21 pazienti (45%) e il parkinsonismo, presente in 21 pazienti (45%). Tra questi, 14 pazienti (30%) sono in terapia con Levodopa e 7 tra questi (50%) ne traggono o ne hanno tratto beneficio soggettivo e oggettivo. Tra gli altri segni e sintomi motori, 10 pazienti (21%) presentano distonia in vari distretti corporei, 11 pazienti (23%) segni cerebellari, 6 pazienti (13%) hanno corea o altri disturbi ipercinetici. 11 pazienti presentavano disartria (23%) e infine 7 pazienti avevano una storia di cadute in anamnesi (15%). Si riportano i dati nella *Tabella I*.

<i>Tabella I: caratteristiche motorie dei pazienti PFBC</i>		
VARIABILE	NR. SOGGETTI	PERCENTUALE
Parkinsonismo	21	45%
Tremore	21	45%
Segni piramidali	22	47%
Distonia	10	21%
Segni cerebellari	11	23%
Corea/dis. mov. ipercinetico	6	13%
Disartria	11	23%
Cadute	7	15%

Il punteggio medio ottenuto alla scala MDS-UPDRS III nei 47 pazienti è pari a 8,49 punti \pm 11.4 (range 0-55). Il punteggio medio della scala Hoehn & Yahr nei 47 pazienti è pari a 0,94 \pm 1.03 con valori da 0 a 3 e si colloca quindi tra lo stadio 0 (asintomatico) e 1 (coinvolgimento monolaterale) di malattia.

Dal punto di vista della sintomatologia non motoria 29 pazienti (62%) presentano un quadro di ansia e/o depressione; 3 pazienti (6%) presentano psicosi e/o disturbo ossessivo compulsivo (OCD); 15 pazienti (32%) cefalea; 4 pazienti (9%) manifestano o hanno manifestato crisi epilettiche. Per quanto riguarda i disturbi del sonno 10 pazienti (21%) hanno riportato insonnia e 6 pazienti (13%) hanno riportato RBD (REM sleep behaviour disorder). Solo due pazienti (4%) hanno in anamnesi allucinazioni e delirio. Tra gli altri disturbi, 12 pazienti (26%) riferiscono stipsi, 8 (17%) iposmia, 1 solo paziente (2%) ipoacusia, 7 pazienti (15%) incontinenza urinaria e solo un paziente (2%) ha in anamnesi un quadro di ipotensione/disautonomia. Si riportano i dati in *Tabella II*.

<i>Tabella II: caratteristiche non-motorie dei pazienti PFBC</i>		
VARIABILI	NR. PAZIENTI	PERCENTUALE
Ansia/depressione	29	62%
Psicosi/OCD	3	6%
Cefalea	15	32%
Crisi epilettiche	4	9%
Insonnia	10	21%
RBD	6	13%
Allucinazioni/deliri	2	4%
Stipsi	12	26%
Iposmia	8	17%
Ipoacusia	1	2%
Incontinenza	7	15%

La valutazione cognitiva è stata condotta in tutti i pazienti tranne uno in quanto non valutabile per presenza di barriera linguistica. La valutazione ha dato i seguenti

risultati: 17 pazienti (36%) hanno ricevuto diagnosi di disturbo cognitivo lieve (mild cognitive impairment - MCI); solo un paziente (2%) ha ricevuto diagnosi di demenza e i rimanenti 29 pazienti (62%) hanno riportato risultati fisiologici per età.

Di questi 17 pazienti con diagnosi di MCI la totalità presenta anche sintomi motori.

Alla valutazione neuropsicologica sono stati riscontrati deficit nei seguenti domini:

- Memoria: alterata in 8 pazienti (17%);
- Funzioni esecutive: alterate in 11 pazienti (23%);
- Linguaggio: alterato in 14 pazienti (30%);
- Attenzione e working memory: alterate in 11 pazienti (23%);
- Abilità visuo-spaziali: alterate in 17 pazienti (36%).

I test neuropsicologici MMSE e MoCA, somministrati a 46 pazienti, hanno fornito una media degli score pari a $27,3 \pm 3,22$ e $23.1 \pm 4,36$ punti rispettivamente.

4.2. DISTRIBUZIONE DELLO SPESSORE CORTICALE NEI PAZIENTI PFBC E NEI CONTROLLI SANI HC

Il grafico a dispersione (scatter plot) rappresenta la distribuzione dello spessore corticale nei pazienti affetti da PFBC e nei soggetti di controllo in relazione all'età. Dal grafico emerge una chiara tendenza alla riduzione dello spessore corticale con l'aumentare dell'età (figura 6)

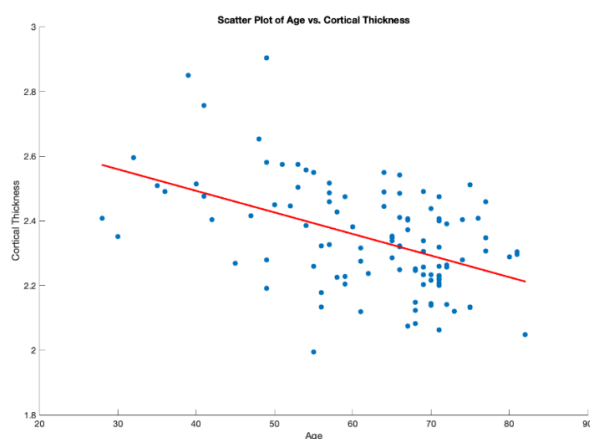


Figura 6: Scatterplot di correlazione tra età e spessore corticale

La tabella III mostra i valori di spessore corticale medio nelle regioni poi risultate statisticamente significative nel confronto tra la totalità dei pazienti PFBC e il gruppo di controlli sani.

	EMISFERO DESTRO			EMISFERO SINISTRO		
	Giro precentrale	Giro postcentrale	Lobo paracentrale	Giro precentrale	Giro postcentrale	Lobo paracentrale
Pfbc	2.38 ± 0.15	1.95 ± 0.12	2.31 ± 0.15	2.40 ± 0.18	1.98 ± 0.14	2.32 ± 0.14
Controlli	2.37 ± 0.12	1.92 ± 0.10	2.29 ± 0.12	2.41 ± 0.11	1.95 ± 0.09	2.31 ± 0.14

Tabella III: Valori medi di spessore corticale (\pm deviazione standard)

4.3. PATTERN DI ALTERAZIONE CORTICALE NEI PAZIENTI CON PFBC vs HC

Nel confronto tra la totalità dei pazienti affetti da PFBC e i soggetti sani, numerose aree sono risultate significativamente alterate; di queste peraltro solo una regione è sopravvissuta alla correzione per confronti multipli. Tale area è situata all'interno della corteccia premotoria nell'emisfero cerebrale sinistro ed è evidenziata in rosso nelle immagini presentate.

La *figura 9* è un'elaborazione cerebrale inflated che offre una vista superiore del cervello, mentre la *figura 7* raffigura l'emisfero sinistro con l'analisi preliminare, eseguita prima dell'applicazione della correzione per confronti multipli, che tiene conto di variabili quali l'età e il volume cerebrale. La *figura 8* infine, mostra i risultati dopo l'applicazione della suddetta correzione evidenziando l'area statisticamente significativa in seguito all'applicazione. L'ipotesi formulata per determinare la significatività statistica si basava sull'assunto che lo spessore corticale nei soggetti di controllo sani fosse superiore rispetto a quello osservato nei pazienti con PFBC

In nessuna regione i pazienti hanno presentato spessore corticale aumentato rispetto ai controlli sani.

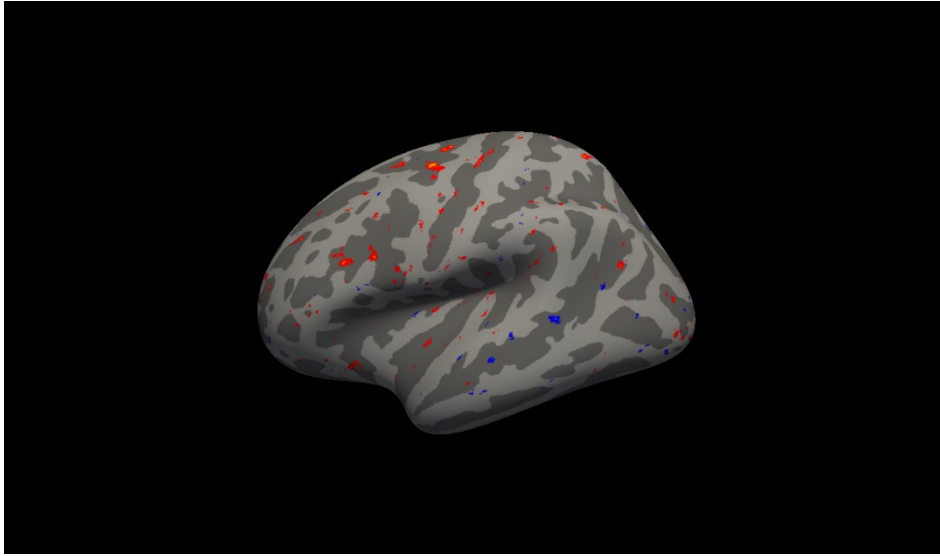


Figura 7: Immagine inflated dell'emisfero sinistro senza correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto ai pazienti PFBC

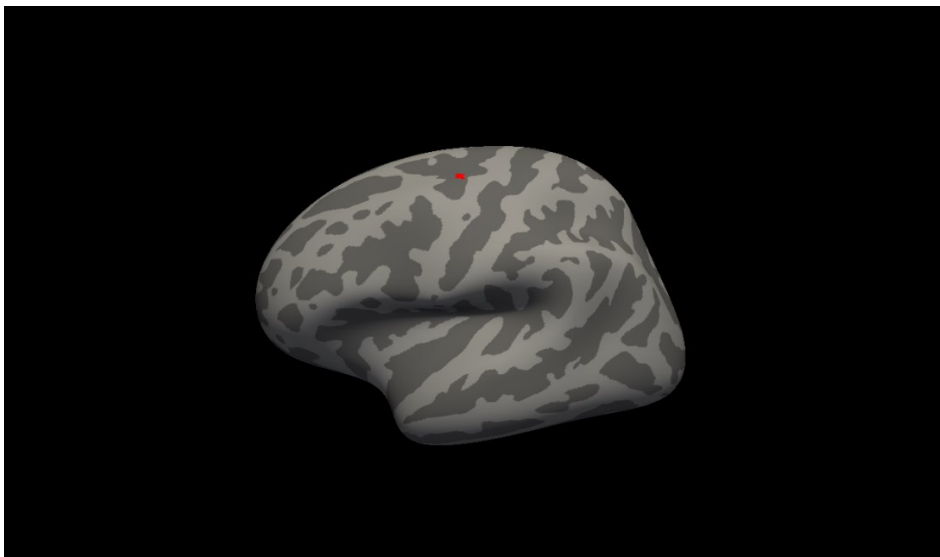


Figura 8: Immagine inflated dell'emisfero sinistro dopo correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto ai pazienti PFBC. L'area indicata in rosso rappresenta la zona con una differenza statisticamente significativa e quindi con uno spessore corticale minore nei pazienti affetti da PFBC



Figura 9: Immagine inflated con visione dall'alto dopo correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto ai pazienti PFBC. L'area indicata in rosso rappresenta la zona con una differenza statisticamente significativa e quindi con uno spessore corticale minore nei pazienti affetti da PFBC



Figura 10: Immagine inflated dell'emisfero destro dopo correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto ai pazienti PFBC. Non riporta nessuna area con una differenza statisticamente significativa.

4.4. STUDI DI CORRELAZIONE PER SOTTOGRUPPI CLINICI

4.4.1. Correlazione tra pattern corticale e parkinsonismo

Le analisi condotte sul sottogruppo di pazienti affetti da parkinsonismo, confrontato con il gruppo di controlli sani, non hanno rivelato ulteriori aree di significatività statistica oltre a quella già precedentemente esaminata (*figura 11 e 12*). L'ipotesi formulata per determinare la significatività statistica si basava sull'assunto che lo spessore corticale nei soggetti di controllo sani fosse superiore rispetto a quello osservato nei pazienti con PFBC.



Figura 11: Immagine inflated con visione dall'alto dopo correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto al sottogruppo di pazienti che presentano parkinsonismo. L'area indicata in rosso rappresenta la zona con una differenza statisticamente significativa, sovrapponibile a quella identificata con l'analisi comprendente la totalità dei pazienti PFBC.

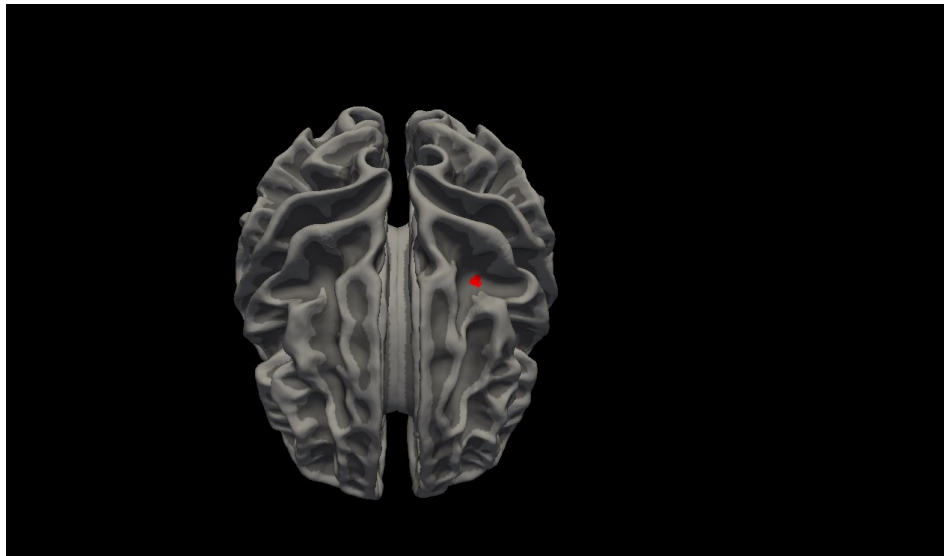


Figura 12: Immagine non inflated con white pattern con visione dall'alto dopo correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto al sottogruppo di pazienti che presentano parkinsonismo. L'area indicata in rosso rappresenta la zona con una differenza statisticamente significativa, sovrapponibile a quella identificata con l'analisi comprendente la totalità dei pazienti PFBC.

4.4.2. Correlazione tra pattern corticale e sintomi cognitivi

Le analisi condotte sul sottogruppo di pazienti con diagnosi di MCI (mild cognitive impairment), confrontato con il gruppo di controlli sani, non hanno rivelato ulteriori aree di significatività statistica oltre a quella già precedentemente esaminata (*figura 16*). L'ipotesi formulata per determinare la significatività statistica si basava sull'assunto che lo spessore corticale nei soggetti di controllo sani fosse superiore rispetto a quello osservato nei pazienti con PFBC.

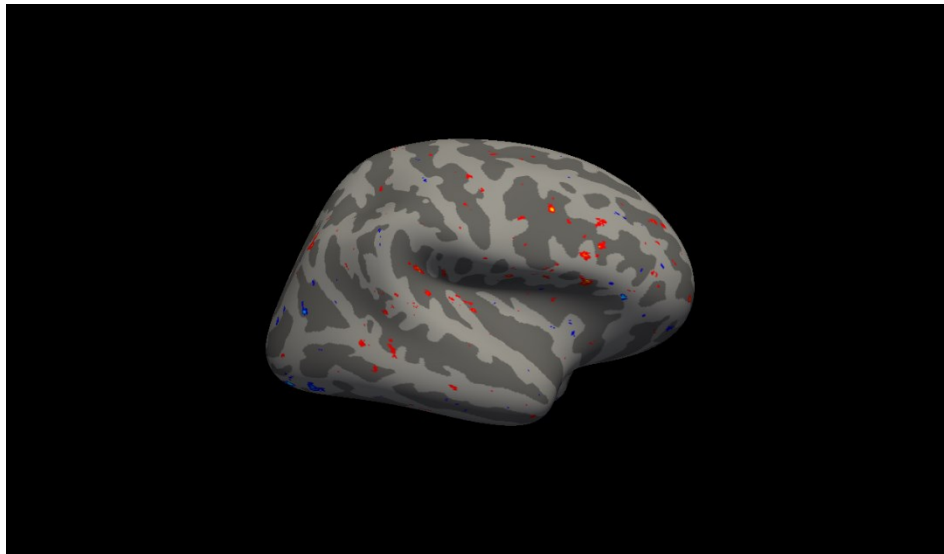


Figura 13: Immagine inflated dell'emisfero destro senza correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto al sottogruppo di pazienti che presentano diagnosi di MCI.



Figura 14: Immagine inflated dell'emisfero destro dopo correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto al sottogruppo di pazienti che presentano diagnosi di MCI. Non riporta nessuna area con una differenza statisticamente significativa.

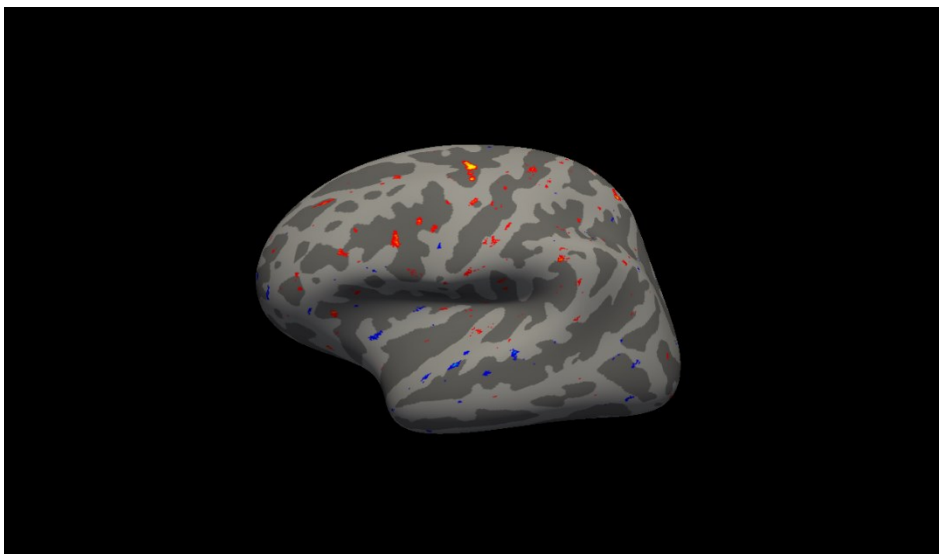


Figura 15: Immagine inflated dell'emisfero sinistro senza correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto al sottogruppo di pazienti che presentano diagnosi di MCI.

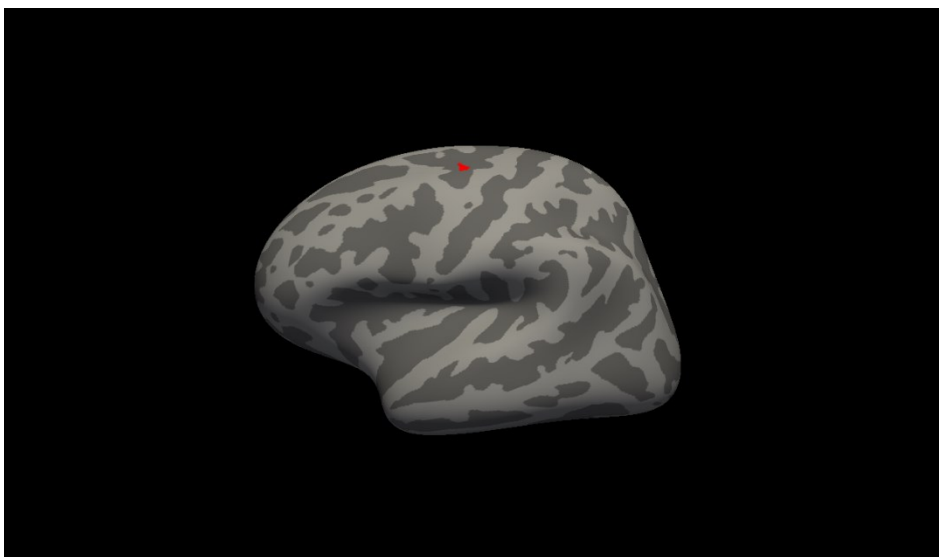


Figura 16: Immagine inflated dell'emisfero sinistro dopo correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto al sottogruppo di pazienti che presentano diagnosi di MCI. L'area indicata in rosso rappresenta la zona con una differenza statisticamente significativa, sovrapponibile a quella identificata con l'analisi comprendente la totalità dei pazienti PFBC.

4.4.3. Correlazione tra pattern corticale e assenza di sintomatologia

Le analisi condotte sullo spessore corticale tra i soggetti asintomatici e il gruppo di controlli sani, considerando come ipotesi per la significatività statistica che lo spessore corticale sia maggiore nei controlli sani rispetto ai pazienti affetti da PFBC, non hanno rilevato differenze significative tra i due gruppi (*figura 17, 18, 19*).

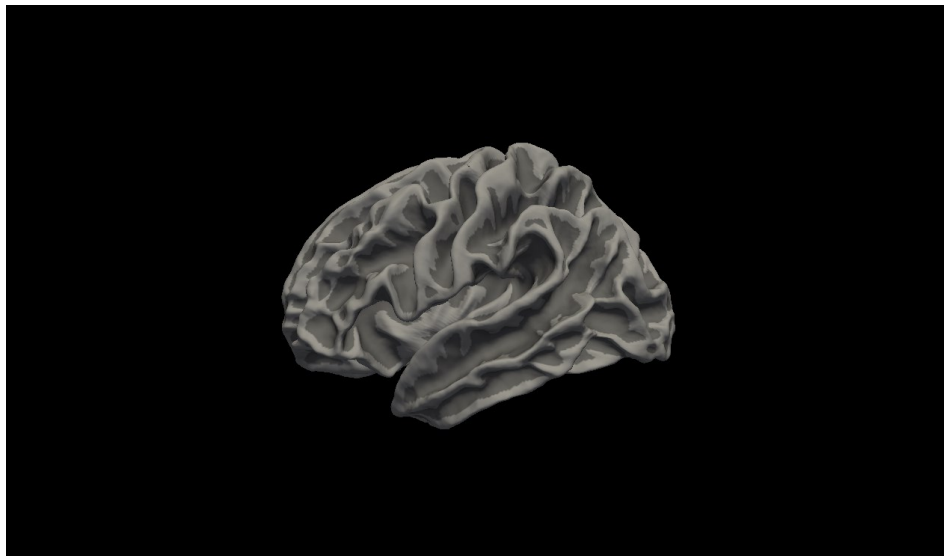


Figura 17: Immagine non inflated con white pattern dell'emisfero sinistro dopo correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto al sottogruppo di pazienti asintomatici. Non vi è nessuna differenza statisticamente significativa.

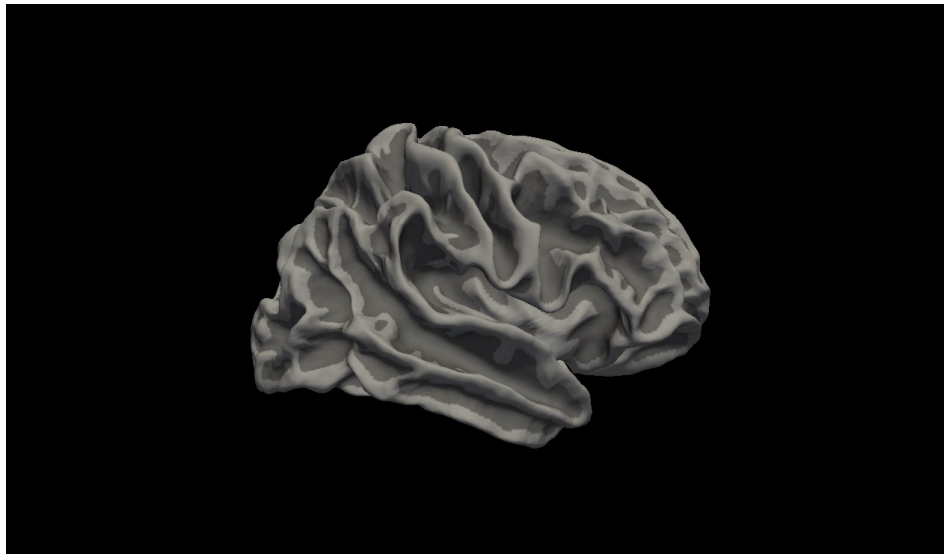


Figura 18: Immagine non inflated con white pattern dell'emisfero destro dopo correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto al sottogruppo di pazienti asintomatici. Non vi è nessuna differenza statisticamente significativa.



Figura 19: Immagine inflated con visione dall'alto dopo correzione per confronti multipli e con analisi basata sull'ipotesi di distribuzione dello spessore corticale maggiore nei controlli sani rispetto al sottogruppo di pazienti asintomatici. Non vi è nessuna differenza statisticamente significativa.

5. DISCUSSIONE

Questo studio di risonanza magnetica (RM) cerebrale condotto su un ampio campione di pazienti affetti da PFBC ha rilevato una riduzione significativa dello spessore corticale in una regione all'interno dell'area premotoria dell'emisfero cerebrale sinistro rispetto ai controlli sani. Tale alterazione si è confermata nei pazienti sintomatici mentre non è stata riscontrata nei pazienti asintomatici.

Il confronto del pattern corticale dei due sottogruppi clinici di pazienti affetti da PFBC, quelli con diagnosi di decadimento cognitivo lieve (MCI) e quelli con parkinsonismo, ha rivelato un pattern comune di alterazione morfostrutturale della corteccia con riduzione dello spessore corticale sovrapponibile a quanto osservato nell'intera coorte di pazienti. Questo risultato, presente sia se si considera il coinvolgimento motorio sia quello cognitivo, potrebbe essere in parte dovuto alla discreta sovrapposizione fra i due sottogruppi (la totalità dei pazienti con deficit cognitivi presentavano anche compromissione motoria sia piramidale che, soprattutto, extrapiramidale). La localizzazione dell'alterazione nell'ambito dell'area premotoria sembra infatti suggerire un preminente ruolo della compromissione motoria nel determinare lo specifico coinvolgimento corticale.

Tale osservazione è coerente sia con i dati numerici della nostra coorte, in cui i segni piramidali sono il reperto più frequente (47%), seguiti da parkinsonismo e tremore (45%), sia con i risultati riportati in una recente revisione del 2021 [4].

La riduzione dello spessore corticale implica un assottigliamento di uno o più dei 6 strati che costituiscono la corteccia con coinvolgimento di un numero elevato di colonne orientate radialmente rispetto alla sua superficie. I meccanismi noti che possono determinare la riduzione dello spessore della neocortex sono la deafferentazione [88], la perdita di neuroni e l'alterazione di sviluppo.

Sebbene il parkinsonismo sia classicamente associato a disfunzioni a livello dei gangli della base o della substantia nigra, risulta sempre più evidente che la corteccia frontale, inclusa la corteccia premotoria, giochi un ruolo cruciale nella manifestazione di questi sintomi. In particolare, un recente articolo del 2023 ha indagato la correlazione tra i sintomi motori nei pazienti affetti da malattia di Parkinson e lo

spessore corticale, rilevando un'associazione statisticamente significativa, soprattutto in relazione alla rigidità muscolare [80].

La corteccia premotoria non è solo coinvolta nella pianificazione dei movimenti volontari complessi, ma anche nella coordinazione dei movimenti automatici e sequenziali, che possono risultare alterati nel parkinsonismo. Un eventuale danno a questa area corticale potrebbe ridurre la capacità dei pazienti di avviare o modulare correttamente i movimenti, contribuendo così alla comparsa di bradicinesia. Inoltre, i gangli della base comunicano con la corteccia premotoria attraverso complessi circuiti di feedback; una riduzione dello spessore corticale in questa regione può compromettere tale comunicazione, esacerbando la disfunzione motoria tipica del parkinsonismo. Questo potrebbe spiegare come, nell'articolo del 2023 sopra citato, la rigidità muscolare sia risultata il sintomo maggiormente associato a un'alterazione del pattern corticale.

Un ulteriore studio del 2018 ha sottolineato come crescano le evidenze nella letteratura scientifica riguardo al fatto che la fisiopatologia della malattia di Parkinson non sia limitata al sistema dopaminergico nigrostriatale, ma coinvolga l'intera rete neurale cortico-ganglia-basale-talamo-corticale [81].

Questo concetto si traduce anche su un possibile risvolto terapeutico. Un articolo del 2021 indaga infatti come i metodi di neurostimolazione che modulano l'attività di M1 (corteccia motoria primaria) migliorino la funzione motoria nei pazienti con Parkinson, dimostrando che la neuromodulazione mirata di M1 è una terapia realistica [82].

Il presente studio evidenzia come anche nella PFBC il coinvolgimento corticale sia presente in relazione alla presenza di compromissione clinica. Tali evidenze supportano il ruolo potenziale della RM cerebrale nell'identificazione di marcatori di malattia utili per differenziare i diversi sottogruppi clinici, orientandoli verso trattamenti più personalizzati. In questo contesto, la misurazione dello spessore corticale potrebbe consentire di identificare i sottogruppi di pazienti con maggiore coinvolgimento corticale rispetto ai gangli della base o viceversa, permettendo una stratificazione clinica e una terapia più mirata. È importante notare infatti come in un articolo del 2017 si riporti l'attenzione sul fatto che, sebbene il motivo esatto non sia

chiaro, la risposta alla terapia con L-dopa nel sottogruppo PFBC con parkinsonismo varia tra i pazienti. Questo è coerente anche col dato riportato nella nostra coorte in cui sulla totalità di pazienti sottoposti alla terapia parkinsoniana più del 50% non presenta alcun beneficio e rende interessante in studi futuri indagare possibili differenze corticali tra i due sottogruppi.

D'altra parte, la letteratura riporta studi che evidenziano riduzioni dello spessore corticale in specifiche aree cerebrali nei pazienti con deficit cognitivi. In particolare, un articolo del 2023 conclude che la presenza di deterioramento cognitivo nei pazienti anziani affetti da sclerosi multipla è associata a una riduzione dello spessore di più regioni corticali, in particolare della corteccia fusiforme e cuneiforme [89]. Questo risultato non è in linea con i nostri dati, i quali mostrano che anche nel sottogruppo di pazienti con diagnosi di decadimento cognitivo lieve (MCI) l'alterazione sembra ristretta alla regione premotoria. Il primario coinvolgimento dei nuclei della base nella PFBC potrebbe spiegare differenze rispetto a patologie con preminente coinvolgimento della sostanza bianca. Dal momento che nella PFBC vi sono dei sottotipi con marcata leucopatia, sarà interessante ampliare il gruppo di studio in modo da avere sufficiente numerosità che permetta di identificare altri pattern di coinvolgimento corticale in coloro che presentano un'associata alterazione severa dei centri semiovali.

È verosimile che l'estrema eterogeneità clinica dei pazienti affetti da PFBC ostacoli l'identificazione di specifici pattern di coinvolgimento corticale, dal momento che la variabilità fenotipica potrebbe comportare un'eccessiva variabilità nella distribuzione delle alterazioni dello spessore corticale tra i diversi pazienti.

È interessante notare che il 62% dei pazienti della nostra coorte presenta una diagnosi di ansia o depressione ed in letteratura, sono state documentate evidenze che suggeriscono come i pazienti con diagnosi di disturbo depressivo maggiore possano mostrare alterazioni del pattern corticale, con aumenti dello spessore corticale in alcune regioni cerebrali [90]. Questo rinforza la teoria della variabilità del pattern corticale nel senso sia di incrementi sia di riduzioni dello spessore corticale. Inoltre un lavoro del 2023, che ha esaminato la correlazione tra alterazioni della corteccia cerebrale e manifestazioni cliniche nella Corea di Huntington, ha riportato un aumento dello spessore corticale nel giro latero-occipitale dell'emisfero destro,

associato a deficit cognitivi specifici nel dominio della memoria e dell'attenzione [91]. L'evidenza che alterazioni motorie e psico-cognitive possano risultare sia in aumento che in riduzione dello spessore corticale potrebbe fornire una spiegazione ulteriore per la mancanza di significatività statistica nell'analisi dei dati senza per questo escludere un più o meno importante coinvolgimento corticale nella PFBC. Ulteriori studi che analizzino il metabolismo o l'integrità delle reti neurali potrebbero integrare i dati ottenuti con la valutazione dello spessore corticale offrendo importanti suggerimenti sui meccanismi patogenetici che portano alle manifestazioni cliniche della nostra popolazione.

Dal confronto tra pazienti asintomatici e controlli sani, la distribuzione dello spessore corticale è risultata invece totalmente sovrapponibile. Questo conferma ulteriormente la significatività di associazione tra l'area premotoria identificata e il sottogruppo di soggetti sintomatici. Un articolo del 2021 riportava la possibile utilità dello spessore corticale come marker predittivo di conversione da MCI (mild cognitive impairment) a demenza nei pazienti affetti da Parkinson [92]. L'assenza di alterazioni corticali nel gruppo asintomatico potrebbe da una parte indicare che tali alterazioni compaiono solo in fasi tardive di malattia o, al contrario, che i soggetti asintomatici sono destinati a rimanere tali anche lungo il decorso della malattia. La valutazione longitudinale della nostra coorte ci aiuterà a capire meglio questa situazione ed il ruolo dello spessore corticale nel differenziare soggetti vulnerabili verso un'evoluzione negativa dal punto di vista cognitivo-motorio.

Si rendono inoltre necessari ulteriori studi per comprendere perché, a parità di calcificazioni cerebrali, alcuni soggetti sviluppano una sintomatologia grave mentre altri rimangono completamente asintomatici.

Come ultimo aspetto, è opportuno sottolineare che l'analisi dello spessore corticale sia nei pazienti PFBC che nei controlli sani dimostra una relazione inversa con l'età con diminuzione dello spessore corticale all'aumentare dell'età. Questo è coerente coi dati della letteratura [93] e supporta da un lato la corretta esecuzione dell'analisi nel nostro studio e dall'altro che i pazienti non differiscono dalla popolazione generale per quanto riguarda i fenomeni di invecchiamento corticale.

6. CONCLUSIONI

Questo studio pilota mediante RM, pur includendo la casistica numericamente più ricca in assoluto e pur avendo utilizzato tecniche di indagine avanzate come la valutazione della cortical thickness, rivela la presenza di significative alterazioni corticali encefaliche nei pazienti sintomatici affetti da PFBC. L'ampia eterogeneità fenotipica richiede di proseguire il reclutamento di pazienti per poter definire pattern specifici di coinvolgimento corticale nei diversi sottogruppi clinici mentre la relativa omogeneità del coinvolgimento corticale osservato suggerisce la necessità di introdurre ulteriori analisi funzionali e metaboliche per meglio definire i meccanismi patogenetici alla base del profondo coinvolgimento cognitivo e motorio nei pazienti affetti da PFBC.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1) Nicolas G, Charbonnier C, Campion D, Veltman JA. Estimation of minimal disease prevalence from population genomic data: Application to primary familial brain calcification. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2018 Jan;177(1):68-74. doi: 10.1002/ajmg.b.32605. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29152850.
- 2) Tadic V, Westenberger A, Domingo A, Alvarez-Fischer D, Klein C, Kasten M. Primary familial brain calcification with known gene mutations: a systematic review and challenges of phenotypic characterization. *JAMA Neurol.* 2015 Apr;72(4):460-7. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.3889. PMID: 25686319.
- 3) Manyam BV, Walters AS, Narla KR. Bilateral striopallidodentate calcinosis: clinical characteristics of patients seen in a registry. *Mov Disord.* 2001 Mar;16(2):258-64. doi: 10.1002/mds.1049. PMID: 11295778.
- 4) Balck A, Schaake S, Kuhnke NS, Domingo A, Madoev H, Margolesky J, Dobricic V, Alvarez-Fischer D, Laabs BH, Kasten M, Luo W, Nicolas G, Marras C, Lohmann K, Klein C, Westenberger A. Genotype-Phenotype Relations in Primary Familial Brain Calcification: Systematic MDSGene Review. *Mov Disord.* 2021 Nov;36(11):2468-2480. doi: 10.1002/mds.28753. Epub 2021 Aug 25. PMID: 34432325.
- 5) Fahr T (1930) Idiopathische Verkalkungen der Hirngefäße.
- 6) G. Liebaltd, 1964, Idiopathische (nicht arteriosklerotische) Verkalkungsvorgiinge im Zentralnervensystem.
- 7) Delacour A (1850) Ossification des capillaires du cerveau. *Ann Med Psychol* 2:458–461
- 8) Bamberger, H., 1855. Beobachtungen und bemerkungen uber hirnkrankheiten.
- 9) Familial idiopathic cerebral calcifications Francois Boller (1977)
- 10) Caraceni T, Broggi G, Avanzini G. Familial idiopathic basal ganglia calcification exhibiting "dystonia musculorum deformans" features. *Eur Neurol.* 1974;12(5-6):351-9. doi: 10.1159/000114632. PMID: 4448193
- 11) Smits MG, Gabreëls FJ, Thijssen HO, 't Lam RL, Notermans SL, ter Haar BG, Prick JJ. Progressive idiopathic strio-pallido-dentate calcinosis (Fahr's disease) with autosomal recessive inheritance. Report of three siblings. *Eur Neurol.* 1983;22(1):58-64. doi: 10.1159/000115537. PMID: 6840142.
- 12) Ramos EM, Oliveira J, Sobrido MJ, Coppola G. Primary Familial Brain Calcification. 2004 Apr 18 [updated 2017 Aug 24]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024. PMID: 20301594.
- 13) Yalcin A, Ceylan M, Bayraktutan OF, Sonkaya AR, Yuce I. Age and gender related prevalence of intracranial calcifications in CT imaging; data from 12,000 healthy subjects. *J Chem Neuroanat.* 2016 Dec;78:20-24. doi: 10.1016/j.jchemneu.2016.07.008. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27475519.
- 14) Abate EG, Clarke BL. Review of Hypoparathyroidism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017 Jan 16;7:172. doi: 10.3389/fendo.2016.00172. PMID: 28138323; PMCID: PMC5237638.

- 15) Asari R, Passler C, Kaczirek K, Scheuba C, Niederle B. Hypoparathyroidism after total thyroidectomy: a prospective study. *Arch Surg.* 2008 Feb;143(2):132-7; discussion 138. doi:10.1001/archsurg.2007.55. PMID: 18283137.
- 16) Goswami R, Sharma R, Sreenivas V, Gupta N, Ganapathy A, Das S. Prevalence and progression of basal ganglia calcification and its pathogenic mechanism in patients with idiopathic hypoparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012 Aug;77(2):200-6. doi: 10.1111/j.1365-2265.2012.04353.x. PMID: 22288727.
- 17) Safriel YI, Haller JO, Lefton DR, Obedian R. Imaging of the brain in the HIV-positive child. *Pediatr Radiol.* 2000 Nov;30(11):725-32. doi: 10.1007/s002470000338. PMID: 11100486.
- 18) Karikkineth AC, Scheibye-Knudsen M, Fivenson E, Croteau DL, Bohr VA. Cockayne syndrome: Clinical features, model systems and pathways. *Ageing Res Rev.* 2017 Jan;33:3-17. doi: 10.1016/j.arr.2016.08.002. Epub 2016 Aug 6. PMID: 27507608; PMCID: PMC5195851
- 19) Uggetti C, La Piana R, Orcesi S, Egitto MG, Crow YJ, Fazzi E. Aicardi- Goutieres syndrome: neuroradiologic findings and follow-up. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009 Nov;30(10):1971-6. doi: 10.3174/ajnr.A1694. Epub 2009 Jul 23. PMID: 19628626; PMCID: PMC7051307.
- 20) Takashima S, Becker LE. Basal ganglia calcification in Down's syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1985 Jan;48(1):61-4. doi: 10.1136/jnnp.48.1.61. PMID: 3156213; PMCID: PMC1028184.
- 21) Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, Remes AM, Salmela PI, Kärppä M, Majamaa-Voltti KA, Rusanen H, Sorri M, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet.* 1998 Aug;63(2):447-54. doi: 10.1086/301959. PMID: 9683591; PMCID: PMC1377301.
- 22) Fasano A, Shahidi G, Lang AE, Rohani M. Basal ganglia calcification in a case of PKAN. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017 Mar;36:98-99. doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.12.016. Epub 2016 Dec 21. PMID: 28024710.
- 23) Van Goethem G, Livingston JH, Warren D, Oojageer AJ, Rice GI, Crow YJ. Basal ganglia calcification in a patient with beta-propeller protein- associated neurodegeneration. *Pediatr Neurol.* 2014 Dec;51(6):843-5. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2014.08.017. Epub 2014 Sep 6. PMID: 25301227.
- 24) Wang C, Li Y, Shi L, Ren J, Patti M, Wang T, de Oliveira JR, Sobrido MJ, Quintáns B, Baquero M, Cui X, Zhang XY, Wang L, Xu H, Wang J, Yao J, Dai X, Liu J, Zhang L, Ma H, Gao Y, Ma X, Feng S, Liu M, Wang QK, Forster IC, Zhang X, Liu JY. Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat Genet.* 2012 Feb 12;44(3):254-6. doi: 10.1038/ng.1077. PMID: 22327515.
- 25) Jensen N, Autzen JK, Pedersen L. Slc20a2 is critical for maintaining a physiologic inorganic phosphate level in cerebrospinal fluid. *Neurogenetics.* 2016 Apr;17(2):125-30. doi: 10.1007/s10048-015-0469-6. Epub 2015 Dec 12. PMID: 26660102; PMCID: PMC4794525.
- 26) Nicolas G, Pottier C, Maltête D, Coutant S, Rovelet-Lecrux A, Legallic S, Rousseau S, Vaschalde Y, Guyant-Maréchal L, Augustin J, Martinaud O, Defebvre L, Krystkowiak P, Pariente J, Clanet M, Labauge P, Aygnac X, Lefaucheur R, Le Ber I, Frébourg T, Hannequin D, Campion D. Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology.* 2013 Jan 8;80(2):181-7. doi: 10.1212/WNL.0b013e31827ccf34. Epub 2012 Dec 19. PMID: 23255827.

- 27) Keller A, Westenberger A, Sobrido MJ, García-Murias M, Domingo A, Sears RL, Lemos RR, Ordoñez-Ugalde A, Nicolas G, da Cunha JE, Rushing EJ, Hugelshofer M, Wurnig MC, Kaech A, Reimann R, Lohmann K, Dobričić V, Carracedo A, Petrović I, Miyasaki JM, Abakumova I, Mäe MA, Raschperger E, Zatz M, Zschiedrich K, Klepper J, Spiteri E, Prieto JM, Navas I, Preuss M, Dering C, Janković M, Paucar M, Svenningsson P, Saliminejad K, Khorshid HR, Novaković I, Aguzzi A, Boss A, Le Ber I, Defer G, Hannequin D, Kostić VS, Champion D, Geschwind DH, Coppola G, Betsholtz C, Klein C, Oliveira JR. Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nat Genet.* 2013 Sep;45(9):1077-82. doi: 10.1038/ng.2723. Epub 2013 Aug 4. PMID: 23913003.
- 28) Legati A, Giovannini D, Nicolas G, López-Sánchez U, Quintáns B, Oliveira JR, Sears RL, Ramos EM, Spiteri E, Sobrido MJ, Carracedo A, Castro-Fernández C, Cubizolle S, Fogel BL, Goizet C, Jen JC, Kirdlarp S, Lang AE, Miedzybrodzka Z, Mitarnun W, Paucar M, Paulson H, Pariente J, Richard AC, Salins NS, Simpson SA, Striano P, Svenningsson P, Tison F, Unni VK, Vanakker O, Wessels MW, Wetchaphanphesat S, Yang M, Boller F, Champion D, Hannequin D, Sitbon M, Geschwind DH, Battini JL, Coppola G. Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. *Nat Genet.* 2015 Jun;47(6):579-81. doi: 10.1038/ng.3289. Epub 2015 May 4. PMID: 25938945; PMCID: PMC4516721.
- 29) Meireles, A.M., Shiau, C.E., Guenther, C.A., Sidik, H., Kingsley, D.M., Talbot, W.S., 2014. The Phosphate Exporter *xpr1b* Is Required for Differentiation of Tissue-Resident Macrophages. *Cell Rep.* 8, 1659–1667. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.018>
- 30) Yao XP, Cheng X, Wang C, Zhao M, Guo XX, Su HZ, Lai LL, Zou XH, Chen XJ, Zhao Y, Dong EL, Lu YQ, Wu S, Li X, Fan G, Yu H, Xu J, Wang N, Xiong ZQ, Chen WJ. Biallelic Mutations in MYORG Cause Autosomal Recessive Primary Familial Brain Calcification. *Neuron.* 2018 Jun 27;98(6):1116-1123.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.037. Epub 2018 Jun 14. PMID: 29910000.
- 31) Carecchio M, Mainardi M, Bonato G. The clinical and genetic spectrum of primary familial brain calcification. *J Neurol.* 2023 Jun;270(6):3270-3277. doi: 10.1007/s00415-023-11650-0. Epub 2023 Mar 2. PMID: 36862146; PMCID: PMC10188400.
- 32) Cen Z, Chen Y, Chen S, Wang H, Yang D, Zhang H, Wu H, Wang L, Tang S, Ye J, Shen J, Wang H, Fu F, Chen X, Xie F, Liu P, Xu X, Cao J, Cai P, Pan Q, Li J, Yang W, Shan PF, Li Y, Liu JY, Zhang B, Luo W. Biallelic loss-of-function mutations in JAM2 cause primary familial brain calcification. *Brain.* 2020 Feb 1;143(2):491-502. doi:10.1093/brain/awz392. PMID: 31851307.
- 33) Zhao M, Su HZ, Zeng YH, Sun Y, Guo XX, Li YL, Wang C, Zhao ZY, Huang XJ, Lin KJ, Ye ZL, Lin BW, Hong S, Zheng J, Liu YB, Yao XP, Yang D, Lu YQ, Chen HZ, Zuo E, Yang G, Wang HT, Huang CW, Lin XH, Cen Z, Lai LL, Zhang YK, Li X, Lai T, Lin J, Zuo DD, Lin MT, Liou CW, Kong QX, Yan CZ, Xiong ZQ, Wang N, Luo W, Zhao CP, Cheng X, Chen WJ. Loss of function of CMPK2 causes mitochondria deficiency and brain calcification. *Cell Discov.* 2022 Nov 29;8(1):128. doi: 10.1038/s41421-022-00475-2. PMID: 36443312; PMCID: PMC9705363.
- 34) Chelban V, Aksnes H, Maroofian R, LaMonica LC, Seabra L, Siggervåg A, Devic P, Shamseldin HE, Vandrovцова J, Murphy D, Richard AC, Quenez O, Bonneville A, Zanetti MN, Kaiyrzhanov R, Salpietro V, Efthymiou S, Schottlaender LV, Morsy H, Scardamaglia A, Tariq A, Pagnamenta AT, Pennavaria A, Krogstad LS, Bekkelund ÅK, Caiella A, Glomnes N, Brønstad KM, Tury S, Moreno De Luca A, Boland-Auge A, Olaso R, Deleuze JF, Anheim M, Cretin B, Vona B, Alajlan F, Abdulwahab F, Battini JL, İpek R, Bauer P, Zifarelli G, Gungor S, Kurul SH, Lochmuller H, Da'as SI, Fakhro KA, Gómez-Pascual A, Botia JA, Wood NW, Horvath R, Ernst AM, Rothman JE, McEntagart M, Crow YJ, Alkuraya FS, Nicolas G; SYNAPS Study Group; Arnesen T, Houlden H. Biallelic NAA60 variants with impaired n-terminal acetylation capacity cause autosomal recessive primary familial brain calcifications. *Nat Commun.* 2024 Mar 13;15(1):2269. doi: 10.1038/s41467-024-46354-0. PMID: 38480682; PMCID: PMC10937998.

- 35) Chelban V, Carecchio M, Rea G, Bowirrat A, Kirmani S, Magistrelli L, Efthymiou S, Schottlaender L, Vandrovcova J, Salpietro V, Salsano E, Pareyson D, Chiapparini L, Jan F, Ibrahim S, Khan F, Qarnain Z, Groppa S, Bajaj N, Balint B, Bhatia KP, Lees A, Morrison PJ, Wood NW, Garavaglia B, Houlden H. MYORG-related disease is associated with central pontine calcifications and atypical parkinsonism. *Neurol Genet.* 2020 Feb 20;6(2):e399. doi: 10.1212/NXG.0000000000000399. PMID: 32211515; PMCID: PMC7073457.
- 36) Nicolas G, Pottier C, Charbonnier C, Guyant-Maréchal L, Le Ber I, Pariente J, Labauge P, Aygnac X, Defebvre L, Maltête D, Martinaud O, Lefaucheur R, Guillin O, Wallon D, Chaumette B, Rondepierre P, Derache N, Fromager G, Schaeffer S, Krystkowiak P, Verny C, Jurici S, Sauvée M, Vérin M, Lebouvier T, Rouaud O, Thauvin-Robinet C, Rousseau S, Rovelet-Lecrux A, Frebourg T, Champion D, Hannequin D; French IBGC Study Group. Phenotypic spectrum of probable and genetically-confirmed idiopathic basal ganglia calcification. *Brain.* 2013 Nov;136(Pt 11):3395-407. doi: 10.1093/brain/awt255. Epub 2013 Sep 24. PMID: 24065723.
- 37) Valdés Hernández Mdel C, Maconick LC, Tan EM, Wardlaw JM. Identification of mineral deposits in the brain on radiological images: a systematic review. *Eur Radiol.* 2012 Nov;22(11):2371-81. doi: 10.1007/s00330-012-2494-2. Epub 2012 Jun 12. PMID: 22688125.
- 38) Grangeon L, Wallon D, Charbonnier C, Quenez O, Richard AC, Rousseau S, Budowski C, Lebouvier T, Corbille AG, Vidailhet M, Méneret A, Roze E, Anheim M, Tranchant C, Favrole P, Antoine JC, Defebvre L, Aygnac X, Labauge P, Pariente J, Clanet M, Maltête D, Rovelet-Lecrux A, Boland A, Deleuze JF; French PFBC study group; Frebourg T, Hannequin D, Champion D, Nicolas G. Biallelic MYORG mutation carriers exhibit primary brain calcification with a distinct phenotype. *Brain.* 2019 Jun 1;142(6):1573-1586. doi: 10.1093/brain/awz095. PMID: 31009047.
- 39) Cen Z, Chen Y, Chen S, Wang H, Yang D, Zhang H, Wu H, Wang L, Tang S, Ye J, Shen J, Wang H, Fu F, Chen X, Xie F, Liu P, Xu X, Cao J, Cai P, Pan Q, Li J, Yang W, Shan PF, Li Y, Liu JY, Zhang B, Luo W. Biallelic loss-of-function mutations in JAM2 cause primary familial brain calcification. *Brain.* 2020 Feb 1;143(2):491-502. doi:10.1093/brain/awz392. PMID: 31851307.
- 40) Tadic V, Westenberger A, Domingo A, Alvarez-Fischer D, Klein C, Kasten M. Primary familial brain calcification with known gene mutations: a systematic review and challenges of phenotypic characterization. *JAMA Neurol.* 2015 Apr;72(4):460-7. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.3889. PMID: 25686319.
- 41) Hempel A, Henze M, Berghoff C, Garcia N, Ody R, Schröder J. PET findings and neuropsychological deficits in a case of Fahr's disease. *Psychiatry Res.* 2001 Nov 30;108(2):133-40. doi: 10.1016/s0165-1781(01)00308-0. PMID: 11738547.
- 42) Paghera B, Caobelli F, Giubbini R. 123I-ioflupane SPECT in Fahr disease. *J Neuroimaging.* 2013 Jan;23(1):157-8. doi: 10.1111/j.1552-6569.2011.00581.x. Epub 2011 Mar 16. PMID: 21410813.
- 43) Paschali A, Lakiotis V, Messinis L, Markaki E, Constantoyannis C, Ellul J, Vassilakos P. Dopamine transporter SPECT/CT and perfusion brain SPECT imaging in idiopathic basal ganglia calcinosis. *Clin Nucl Med.* 2009 Jul;34(7):421-3. doi: 10.1097/RLU.0b013e3181a7d195. PMID: 19542944.
- 44) Donzuso, G., Mostile, G., Nicoletti, A., Zappia, M., 2019. Basal ganglia calcifications (Fahr's syndrome): related conditions and clinical features. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 40, 2251–2263. <https://doi.org/10.1007/s10072-019-03998-x>
- 45) Avrahami, E., Cohn, D.-F., Feibel, M., Tadmor, R., 1994. MRI demonstration and CT correlation of the brain in patients with idiopathic intracerebral calcification. *J. Neurol.* 241, 381–384. <https://doi.org/10.1007/BF02033355>

- 46) Wu J, Tarabishy B, Hu J, Miao Y, Cai Z, Xuan Y, Behen M, Li M, Ye Y, Shoskey R, Haacke EM, Juhász C. Cortical calcification in Sturge-Weber Syndrome on MRI-SWI: relation to brain perfusion status and seizure severity. *J Magn Reson Imaging*. 2011 Oct;34(4):791-8. doi: 10.1002/jmri.22687. Epub 2011 Jul 18. PMID: 21769978; PMCID: PMC3176926.
- 47) Tonduti D, Panteghini C, Pichiecchio A, Decio A, Carecchio M, Reale C, Moroni I, Nardocci N, Campistol J, Garcia-Cazorla A, Perez Duenas B; Cerebral Calcification International Study Group; Chiapparini L, Garavaglia B, Orcesi S. Encephalopathies with intracranial calcification in children: clinical and genetic characterization. *Orphanet J Rare Dis*. 2018 Aug 16;13(1):135. doi: 10.1186/s13023-018-0854-y. PMID: 30111349; PMCID: PMC6094574.
- 48) Tonduti D, Pichiecchio A, Uggetti C, Bova SM, Orcesi S, Parazzini C, Chiapparini L. How to look for intracranial calcification in children with neurological disorders: CT, MRI, or both of them? *Neurol Sci*. 2022 Mar;43(3):2043-2050. doi: 10.1007/s10072-021-05510-w. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34383160.
- 49) Manyam BV. What is and what is not 'Fahr's disease'. *Parkinsonism Relat Disord*. 2005 Mar;11(2):73-80. doi: 10.1016/j.parkreldis.2004.12.001. PMID: 15734663.
- 50) Xu X, Sun H, Luo J, Cheng X, Lv W, Luo W, Chen WJ, Xiong ZQ, Liu JY. The Pathology of Primary Familial Brain Calcification: Implications for Treatment. *Neurosci Bull*. 2023 Apr;39(4):659-674. doi: 10.1007/s12264-022-00980-0. Epub 2022 Dec 5. PMID: 36469195; PMCID: PMC10073384.
- 51) Oliveira JR, Oliveira MF. Primary brain calcification in patients undergoing treatment with the biphosphonate alendronate. *Sci Rep*. 2016 Mar 15; 6:22961. doi: 10.1038/srep22961. PMID: 26976513; PMCID: PMC4792151.
- 52) Ichikawa Y, Tanaka M, Kurita E, Nakajima M, Tanaka M, Oishi C, Goto J, Tsuji S, Chiba A. Novel SLC20A2 variant in a Japanese patient with idiopathic basal ganglia calcification-1 (IBGC1) associated with dopa- responsive parkinsonism. *Hum Genome Var*. 2019 Sep 4; 6:44. doi: 10.1038/s41439-019-0073-7. PMID: 31645982; PMCID: PMC6804589.
- 53) Chen SY, Lin WC, Chang YY, Lin TK, Lan MY. Brain hypoperfusion and nigrostriatal dopaminergic dysfunction in primary familial brain calcification caused by novel MYORG variants: case report. *BMC Neurol*. 2020 Sep 1;20(1):329. doi: 10.1186/s12883-020-01910-1. PMID:32873236; PMCID: PMC7460774.
- 54) Shen J, Shillington A, Espay AJ, Hill EJ. Familial Brain Calcifications With Leukoencephalopathy: A Novel PDGFB Variant. *Neurol Genet*. 2022 May 20;8(4):e200001. doi: 10.1212/NXG.000000000200001. PMID:35747618; PMCID: PMC9210546.
- 55) Parasram M, Levi Chazen J, Sarva H. Primary familial brain calcification. *J Am Osteopath Assoc*. 2020 Aug 7. doi: 10.7556/jaoa.2020.116. Epub ahead of print. PMID: 32776145.
- 56) Rubino E, Giorgio E, Godani M, Grosso E, Zibetti M, Lopiano L, Ferrero P, Duca S, Moretti L, Gallone S, Rainero I, Brusco A. Three novel missense mutations in SLC20A2 associated with idiopathic basal ganglia calcification. *J Neurol Sci*. 2017 Jun 15;377:62-64. doi: 10.1016/j.jns.2017.03.053. Epub 2017 Mar 31. PMID: 28477710.
- 57) Lemos RR, Ramos EM, Legati A, Nicolas G, Jenkinson EM, Livingston JH, Crow YJ, Campion D, Coppola G, Oliveira JR. Update and Mutational Analysis of SLC20A2: A Major Cause of Primary Familial Brain Calcification. *Hum Mutat*. 2015 May;36(5):489-95. doi: 10.1002/humu.22778. Epub 2015 Apr 6. PMID: 25726928.
- 58) Lamquet S, Ramos EM, Legati A, Coppola G, Hemelsoet D, Vanakker OM. A likely pathogenic variant in the SLC20A2 gene presenting with progressive myoclonus. *Ann Clin Transl*

Neurol. 2019 Feb 1;6(3):605-609. doi: 10.1002/acn3.702. PMID: 30911583; PMCID: PMC6414494.

59) G. Bonato, S. Andretta, C. Bertolin, L. Salviati, M. Carecchio. PFBC and dystonia: description of a cohort and peculiar cases [abstract]. *Mov Disord.* 2023; 38 (suppl 1). <https://www.mdsabstracts.org/abstract/pfbc-and-dystonia-description-of-a-cohort-and-peculiar-cases/>. Accessed June 7, 2024.

60) Shen J, Shillington A, Espay AJ, Hill EJ. Familial Brain Calcifications With Leukoencephalopathy: A Novel PDGFB Variant. *Neurol Genet.* 2022 May 20;8(4):e200001. doi: 10.1212/NXG.000000000200001. PMID:35747618; PMCID: PMC9210546.

61) Sekine SI, Kaneko M, Tanaka M, Ninomiya Y, Kurita H, Inden M, Yamada M, Hayashi Y, Inuzuka T, Mitsui J, Ishiura H, Iwata A, Fujigasaki H, Tamaki H, Tamaki R, Kito S, Taguchi Y, Tanaka K, Atsuta N, Sobue G, Kondo T, Inoue H, Tsuji S, Hozumi I. Functional evaluation of PDGFB- variants in idiopathic basal ganglia calcification, using patient-derived iPS cells. *Sci Rep.* 2019 Apr 5;9(1):5698. doi: 10.1038/s41598-019-42115-y. PMID: 30952898; PMCID: PMC6450963.

62) S. Andretta, G. Bonato, M. Mainardi, L. Salviati, A. Antonini, M. Carecchio. Symptomatic brain calcifications in two patients with JAM2 monoallelic variants. [abstract]. *Mov Disord.* 2022; 37 (suppl 2). <https://www.mdsabstracts.org/abstract/symptomatic-brain-calcifications-in-two-patients-with-jam2-monoallelic-variants/>. Accessed June 7, 2024.

63) D. L. Felten, “Atlante di Neuroscienze di Netter”, IV edizione (2022), edizioni Elsevier.

64) Chen SY, Ho CJ, Lu YT, Lin CH, Lan MY, Tsai MH. The Genetics of Primary Familial Brain Calcification: A Literature Review. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 29;24(13):10886. doi: 10.3390/ijms241310886. PMID: 37446066; PMCID: PMC10342144.

65) Schmahmann JD. The cerebellum and cognition. *Neurosci Lett.* 2019 Jan 1;688:62-75. doi: 10.1016/j.neulet.2018.07.005. Epub 2018 Jul 8. PMID:29997061.

66) Chin KS, Gajamange S, Desmond PM, Villemagne VL, Rowe CC, Churilov L, Yassi N, Watson R. Association between amyloid-beta deposition and cortical thickness in dementia with Lewy bodies. *Aust N Z J Psychiatry.* 2023 Apr;57(4):594-602. doi: 10.1177/00048674221081773. Epub 2022 Feb 24. PMID: 35196886.

67) Zhou D, Lebel C, Evans A, Beaulieu C. Cortical thickness asymmetry from childhood to older adulthood. *Neuroimage.* 2013 Dec;83:66-74. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.06.073. Epub 2013 Jul 1. PMID: 23827331

68) Kuramitsu A, Ohi K, Shioiri T. Associations of polygenic risk scores differentiating attention-deficit hyperactivity disorder from autism spectrum disorder with cognitive and cortical alterations in Schizophrenia patients. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2024 Aug 7. doi: 10.1007/s00787-024-02549-w. Epub ahead of print. PMID: 39110189.

69) Fischl, B., & Dale, A. M. (2000). Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 11050–11055. <https://doi.org/10.1073/pnas.200033797>.

70) Snijders BMG, Koek HL, Peters MJL, Mali WPTM, van Beek MM, Betman MJC, Golüke NMS, Kruyswijk T, de Lange SV, Lith BDWT, Pekelharing RM, Roos MJ, Rutgers DR, Uniken Venema SM, Verberne WR, Emmelot-Vonk MH, de Jong PA. Inter-and intrarater agreement of Computed Tomographic brain calcification scoring in Primary Familial Brain Calcification. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2024 Aug 12;ajnr.A8446. doi: 10.3174/ajnr.A8446. Epub ahead of print. PMID: 39134371.

- 71) Dale, A. M., Fischl, B., & Sereno, M. I. (1999). Cortical surface-based analysis: I. Segmentation and surface reconstruction. *Neuroimage*, 9(2), 179-194.
- 72) Fischl, B., Sereno, M. I., Tootell, R. B., & Dale, A. M. (1999). High-resolution intersubject averaging and a coordinate system for the cortical surface. *Human Brain Mapping*, 8(4), 272-284.
- 73) Fischl, B., & Dale, A. M. (2000). Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 11050-11055.
- 74) Fischl, B., et al. (2001). Cortical surface-based analysis: II: Inflation, flattening, and a surface-based coordinate system. *Neuroimage*, 9(2), 195-207.
- 75) Fischl, B., Salat, D. H., Busa, E., Albert, M., Dieterich, M., Haselgrove, C., ... & Dale, A. M. (2002). Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron*, 33(3), 341-355.
- 76) Sled, J. G., Zijdenbos, A. P., & Evans, A. C. (1998). A nonparametric method for automatic correction of intensity nonuniformity in MRI data. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 17(1), 87-97.
- 77) Tustison, N. J., Avants, B. B., Cook, P. A., Zheng, Y., Egan, A., Yushkevich, P. A., & Gee, J. C. (2010). N4ITK: improved N3 bias correction. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 29(6), 1310-1320.
- 78) Klein, A., & Tourville, J. (2012). 101 labeled brain images and a consistent human cortical labeling protocol. *Frontiers in Neuroscience*, 6, 171.
- 79) Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- 80) Almgren H, Hanganu A, Camacho M, Kibreab M, Camicioli R, Ismail Z, Forkert ND, Monchi O. Motor symptoms in Parkinson's disease are related to the interplay between cortical curvature and thickness. *Neuroimage Clin.* 2023;37:103300. doi: 10.1016/j.nicl.2022.103300. Epub 2022 Dec 21. PMID: 36580712; PMCID: PMC9827056.
- 81) Burciu RG, Vaillancourt DE. Imaging of Motor Cortex Physiology in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2018 Nov;33(11):1688-1699. doi: 10.1002/mds.102. Epub 2018 Oct 2. PMID: 30280416; PMCID: PMC6261674.
- 82) Amaral DG: The functional organization of perception and movement. In: *Principles of neural sciences 4th edition*. Kandel ER, Schwartz JH and Jessel TM eds McGraw-Hill publ, New York, United States of America, 2000, pp 338-349
- 83) Akkal D, Dum RP, Strick PL: Supplementary motor area and presupplementary motor area: targets of basal ganglia and cerebellar output. *J Neurosci.* 2007; 27:10659-73.
- 84) Cunnington R, Windischberger C, Moser E: Premovement activity of the pre-supplementary motor area and the readiness for action: studies of time-resolved event-related functional MRI. *Hum Mov Sci.* 2005; 24: 644-56.
- 85) Krakauer J and Ghez C: The functional organization of perception and movement. In: *Principles of neural sciences 4th edition*. Kandel ER, Schwartz JH and Jessel TM eds McGraw-Hill publ, New York, United States of America, 2000, pp 757-782
- 86) Cheney PD: Role of cerebral cortex in voluntary movements. A review. *Phys Ther.* 1985; 65: 624-35.

- 87) Dum RP, Strick PL: The origin of corticospinal projections from the premotor areas in the frontal lobe. *J Neurosci.* 1991;11:667-89.
- 88) Treble A, Juranek J, Stuebing KK, Dennis M, Fletcher JM : Functional Significance of Atypical Cortical Organization in Spina Bifida Myelomeningocele: Relations of Cortical Thickness and Gyrification with IQ and Fine Motor Dexterity. *Cereb Cortex.* 2012 Aug 8.
- 89) Jakimovski D, Zivadinov R, Weinstock Z, Fuchs TA, Bartnik A, Dwyer MG, Bergsland N, Weinstock-Guttman B, Benedict RHB. Cortical thickness and cognition in older people with multiple sclerosis. *J Neurol.* 2023 Nov;270(11):5223-5234. doi: 10.1007/s00415-023-11945-2. Epub 2023 Aug 27. PMID: 37634161
- 90) Qiu L, Lui S, Kuang W, Huang X, Li J, Li J, Zhang J, Chen H, Sweeney JA, Gong Q. Regional increases of cortical thickness in untreated, first-episode major depressive disorder. *Transl Psychiatry.* 2014 Apr 8;4(4):e378. doi: 10.1038/tp.2014.18. PMID: 24713859; PMCID: PMC4012282.
- 91) Rigotto, Alterazioni della corteccia cerebrale e correlati clinici nella Corea di Huntington, 2023, Padua Thesis.
- 92) Shin NY, Bang M, Yoo SW, Kim JS, Yun E, Yoon U, Han K, Ahn KJ, Lee SK. Cortical Thickness from MRI to Predict Conversion from Mild Cognitive Impairment to Dementia in Parkinson Disease: A Machine Learning-based Model. *Radiology.* 2021 Aug;300(2):390-399. doi: 10.1148/radiol.2021203383. Epub 2021 May 25. PMID: 34032515.
- 93) Romano A, Cornia R, Moraschi M, Bozzao A, Chiacchiararelli L, Coppola V, Iani C, Stella G, Albertini G, Pierallini A. Age-Related Cortical Thickness Reduction in Non-Demented Down's Syndrome Subjects. *J Neuroimaging.* 2016 Jan-Feb;26(1):95-102. doi: 10.1111/jon.12259. Epub 2015 May 21. PMID: 25996840.
- 94) Koyama S, Sato H, Kobayashi R, Kawakatsu S, Kurimura M, Wada M, Kawanami T, Kato T. Clinical and radiological diversity in genetically confirmed primary familial brain calcification. *Sci Rep.* 2017 Sep 21;7(1):12046. doi: 10.1038/s41598-017-11595-1. PMID: 28935882; PMCID: PMC5608910.