

**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 CLINICA NEUROLOGICA

*Direttore: Ch.mo Prof. Maurizio Corbetta*

TESI DI LAUREA

**Caratterizzazione radiologica di pazienti affetti da PFBC:  
il ruolo della risonanza magnetica cerebrale**

Relatore: Prof. Angelo Antonini

Correlatori: Dott.ssa Miryam Carecchio

Prof. Renzo Manara

Dott.ssa Giulia Bonato

Laureanda: Matilde Corazza

Anno Accademico 2023/2024



## SOMMARIO

<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
1.1. LA PFBC, <i>PRIMARY FAMILIAL BRAIN CALCIFICATION</i> : DEFINIZIONE E STORIA.....	1
1.2. DIAGNOSI .....	3
1.3. BASI GENETICHE E MECCANISMI PATOLOGICI .....	8
1.4. MANIFESTAZIONI CLINICHE .....	14
1.5. CARATTERISTICHE RADIOLOGICHE .....	15
1.6. MANAGEMENT CLINICO .....	19
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO.....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>22</b>
3.1. ANALISI CLINICA .....	22
3.1.1. <i>Analisi delle caratteristiche motorie</i> .....	22
3.1.2. <i>Analisi delle caratteristiche non motorie</i> .....	23
3.2. ANALISI GENETICA .....	24
3.3. ANALISI RADIOLOGICA .....	25
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>27</b>
4.1. DESCRIZIONE DELLA COORTE DEI PAZIENTI PFBC.....	27
4.1.1. <i>Descrizione genetica</i> .....	27
4.1.2. <i>Descrizione fenotipica: aspetti motori</i> .....	30
4.1.3. <i>Descrizione fenotipica: aspetti non motori</i> .....	31
4.2. DESCRIZIONE NEURORADIOLOGICA DELLE CALCIFICAZIONI PFBC IN RM.....	32
4.3. STUDI DI CORRELAZIONE .....	38
4.3.1. <i>Correlazioni genetico- cliniche</i> .....	38
4.3.2. <i>Correlazione tra compromissione dei centri semiovali e disturbo cognitivo</i> .....	41
4.3.3. <i>Correlazione tra compromissione dei centri midollari cerebellari e disturbo cognitivo</i> .....	42
4.3.4. <i>Correlazione tra compromissione dei nuclei dentati e sintomi clinici</i>	43
4.3.5. <i>Correlazione tra calcificazioni bulbari puntiformi in SWI – MYORG – disartria</i> .....	44
4.3.6. <i>Correlazione tra genetica e interessamento dei nuclei dentati</i> .....	47
4.3.7. <i>Correlazione tra genetica e coinvolgimento della corteccia calcarina in SWI</i> .....	48
4.3.8. <i>Correlazione tra genetica e coinvolgimento dei centri semiovali</i> .....	48
4.3.9. <i>Correlazione tra numero di aree coinvolte in RM, genetica e sintomatologia</i> .....	48
<b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....</b>	<b>51</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>56</b>



## RIASSUNTO

- PRESUPPOSTO DELLO STUDIO

La PFBC, *Primary Familial Brain Calcification*, è un raro disturbo neurodegenerativo ad esordio adulto. Il sospetto diagnostico emerge dal riscontro in TC di calcificazioni bilaterali a livello dei gangli della base, in particolare nei globi pallidi, ma ulteriori aree cerebrali e cerebellari possono essere coinvolte. Esistono numerose condizioni patologiche, neurologiche e non, che possono causare calcificazioni dei gangli della base, le quali possono anche essere un riscontro parafisiologico “age-related”. La diagnosi differenziale di calcificazioni dei gangli della base si avvale della raccolta anamnestica, dell’esame obiettivo neurologico e generale, dell’esclusione di cause secondarie di tipo endocrinologico (tramite l’esecuzione di esami ematochimici) e di eventuali test genetici, che risultano positivi nel 50% dei casi. I geni noti responsabili di malattia sono otto, ma una negatività al test genetico non esclude la malattia PFBC. Il quadro clinico è estremamente eterogeneo: oltre ai casi asintomatici, si possono riscontrare disturbi del movimento, disturbi cognitivi e/o disturbi psichiatrici in varie combinazioni. Le manifestazioni cliniche e la loro severità sono indipendenti dall’estensione delle calcificazioni. La prevalenza di malattia è stimata tra 2.1 - 6.6 per 1000 ed è in aumento grazie all’uso routinario della TC encefalo. Si ritiene tuttavia che il dato sia sottostimato data la difficoltà di identificare i pazienti asintomatici. Data la natura neurodegenerativa della malattia, le calcificazioni tendono ad aumentare nel tempo provocando l’insorgenza di sintomi. Si rende quindi necessaria l’identificazione di uno strumento sufficientemente sensibile nel descrivere le calcificazioni e non nocivo per i pazienti e i loro familiari che intraprendono un percorso diagnostico-assistenziale, anche lungo ed articolato.

- SCOPO DELLO STUDIO

Caratterizzare una coorte di pazienti affetti da PFBC che afferiscono all'Azienda Ospedaliera di Padova, con particolare attenzione allo studio neuroradiologico tramite risonanza magnetica cerebrale, e correlare i dati ottenuti con i dati genetici e clinici.

- MATERIALI E METODI

45 pazienti affetti da PFBC sono stati arruolati e sottoposti ad una risonanza magnetica cerebrale che è stata analizzata per caratterizzare in maggiore dettaglio le calcificazioni. I dati ottenuti sono stati correlati con i risultati del test genetico e con le informazioni inerenti alle manifestazioni cliniche (disturbi del movimento, disturbi cognitivi, disturbi psichiatrici). 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

Il 63.4% dei pazienti ha ricevuto diagnosi genetica. Il 67% dei pazienti risulta sintomatico, senza differenze di genere, presentando principalmente disturbi del movimento (parkinsonismo, tremore) e cognitivi. Alla valutazione cognitiva, il 33% dei pazienti ha ricevuto diagnosi di disturbo cognitivo lieve o di demenza. I test neuropsicologici MMSE e MoCA hanno fornito una media degli score pari a 27.76 e 24.13 punti rispettivamente. Alla valutazione neuroradiologica le sequenze SWI e FLAIR sono risultate particolarmente sensibili nella identificazione delle calcificazioni cerebrali nei pazienti PFBC. Le calcificazioni della sostanza bianca, cerebrale e cerebellare, visibili soprattutto in FLAIR, correlano significativamente con i disturbi cognitivi in quanto i test MMSE e MoCA hanno dato risultati inferiori nei pazienti con tale coinvolgimento neuroradiologico. Le

calcificazioni dei nuclei dentati correlano non solo con la sintomatologia cerebellare, ma anche con l'alterazione delle funzioni cognitive ed emotivo-comportamentali, avvalorando la teoria del ruolo extra-motorio del cervelletto. Sono state identificate calcificazioni puntiformi nella regione bulbare nei pazienti portatori di mutazioni bialleliche del gene *MYORG*, in cui è elevata la prevalenza di disartria, suggerendo una correlazione tra reperto neuroradiologico e questa specifica manifestazione clinica. È presente una correlazione statisticamente significativa tra il numero delle aree calcifiche e la presenza di sintomi, con mediana di 7 aree coinvolte nei sintomatici e 4.5 negli asintomatici. Le calcificazioni dei nuclei dentati sono maggiori nei pazienti con genetica positiva, suggerendo la necessità di eseguire test genetico prioritario nei pazienti con tali calcificazioni identificate in SWI. I pazienti con portatori di mutazioni dei geni *MYORG* e *PDGFB* mostrano una maggiore tendenza a presentare calcificazioni della corteccia calcarina.

- CONCLUSIONI

Questo studio propone la risonanza magnetica cerebrale come strumento fondamentale per il percorso diagnostico-assistenziale dei pazienti affetti da PFBC, offrendo un'alternativa alla TC. Questo strumento diagnostico appare particolarmente utile in caso di pazienti giovani e in fase di follow-up, e altamente sensibile nell'identificare e caratterizzare le aree calcifiche ed altre alterazioni della sostanza bianca che possono accompagnare le calcificazioni. La risonanza magnetica cerebrale permette quindi di qualificare le manifestazioni radiologiche di alcune specifiche forme genetiche di PFBC.

## ABSTRACT

- **BACKGROUNDS**

PFBC, Primary Familial Brain Calcification, is a rare adult-onset neurodegenerative disorder. Diagnostic suspicion emerges from the finding on CT scan of bilateral calcifications at the level of the basal ganglia, particularly in the globus pallidus, but additional brain and cerebellar areas may be involved. There are numerous pathological conditions, neurological and otherwise, that can cause basal ganglia calcifications, which may also be a paraphysiological "age-related" finding. The differential diagnosis of basal ganglia calcifications makes use of clinical history, neurological and general physical examination, exclusion of endocrinological secondary causes (by performing laboratory screening) and possible genetic testing, which is positive in 50 percent of cases. There are eight known disease-causing genes, but a negative genetic test does not exclude PFBC disease. The clinical presentation is extremely heterogeneous: in addition to asymptomatic cases, movement disorders, cognitive disorders, and/or psychiatric disorders can be found in various combinations. Clinical manifestations and their severity are independent of the extent of calcifications. The prevalence of disease is estimated between 2.1 - 6.6 per 1000 and is increasing due to the routine use of brain CT. However, the figure is believed to be underestimated given the difficulty in identifying asymptomatic patients. Given the neurodegenerative nature of the disease, calcifications tend to increase over time causing the onset of symptoms. Therefore, there is a need to identify an instrument that is sufficiently sensitive in describing calcifications and not harmful to patients and their families as they embark on a diagnostic-care pathway, even a long and articulated one.

- **AIM OF THE STUDY**

To characterize a cohort of PFBC patients attending the Hospital of Padua, with an emphasis on neuroradiological study by brain MRI, and to correlate the data obtained with genetic and clinical data.



- MATERIALS AND METHODS

Forty-five patients with PFBC were enrolled and underwent brain MRI, which was analyzed to characterize the calcifications in greater detail. The data obtained were correlated with genetic test results and information inherent in clinical manifestations (movement disorders, cognitive disorders, psychiatric disorders). Motor assessment was conducted using the MDS-UPDRS scale. Cognitive assessment, conducted by an experienced team of neuropsychologists, used MMSE and/or MoCA tests.

- RESULTS:

63.4% of patients were genetically diagnosed. 67% of patients were symptomatic, with no gender differences, presenting mainly with movement disorders (parkinsonism, tremor) and cognitive disorders. During cognitive evaluation, 33% of patients were diagnosed with either mild cognitive impairment or dementia. The neuropsychological tests MMSE and MoCA provided mean scores of 27.76 and 24.13 points, respectively. In neuroradiological evaluation, the SWI and FLAIR sequences were particularly sensitive in identifying brain calcifications in PFBC patients. White matter, cerebral, and cerebellar calcifications, especially seen in FLAIR, correlated significantly with cognitive impairment, as the MMSE and MoCA tests yielded lower results in patients with such neuroradiological involvement. Calcifications of the cerebellar dentate nuclei correlated not only with cerebellar symptomatology but also with altered cognitive and emotional-behavioral functions, supporting the theory of the extra-motor role of the cerebellum. Pons calcifications have been identified in the bulbar region in patients carrying biallelic MYORG gene mutations, in whom the prevalence of dysarthria is high, suggesting a correlation between this neuroradiological finding and this specific clinical manifestation. There is a statistically significant correlation between the number of calcified areas and the presence of symptoms, with a median of

7 areas involved in symptomatic patients and 4.5 in asymptomatic patients. Calcifications of the dentate nuclei are greater in patients with positive genetic tests, suggesting the need for priority genetic testing in patients with such calcifications identified in SWI. Patients with MYORG and PDGFB gene mutations show a greater tendency to have calcifications in the calcarine cortex.

- CONCLUSIONS

This study proposes brain MRI as a key tool in the diagnostic-care pathway of PFBC patients, offering an alternative to CT. This diagnostic tool appears particularly useful in cases of young patients and for follow-ups, and is highly sensitive in identifying and characterizing calcified areas and other white matter changes that may accompany calcifications. Brain MRI thus allows for the qualification of radiological manifestations of some specific genetic forms of PFBC.

## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1. LA PFBC, *PRIMARY FAMILIAL BRAIN CALCIFICATION*: 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.

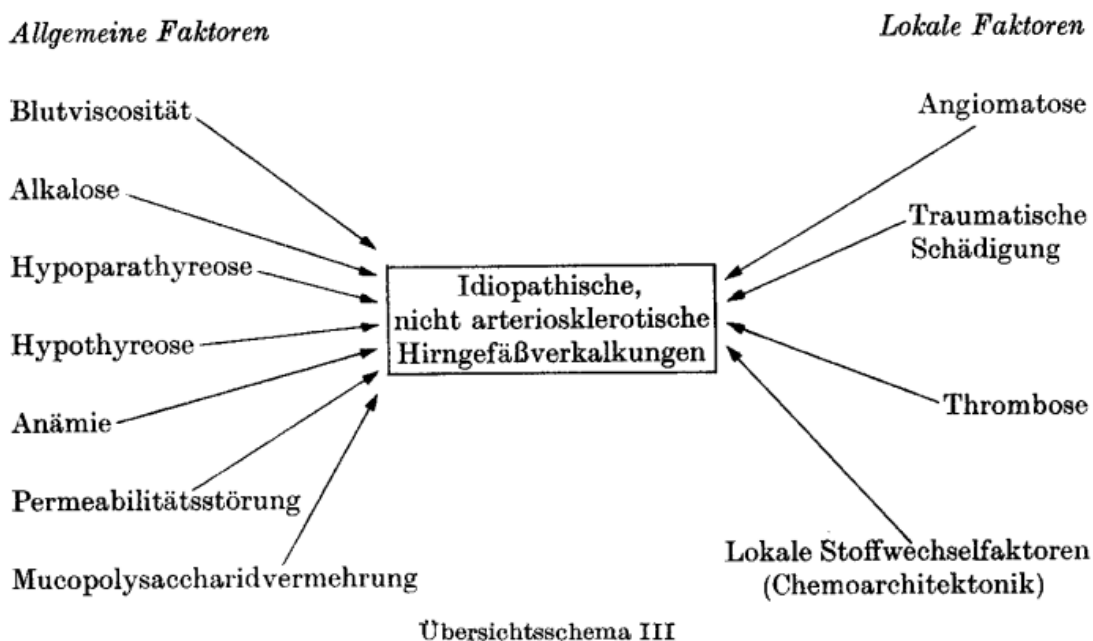
Il quadro clinico può essere estremamente eterogeneo e comprende disturbi del movimento (prevalentemente parkinsonismo), disturbi cognitivi e/o disturbi psichiatrici, da soli o in variabile associazione, oltre a casi asintomatici indipendentemente dall'estensione delle calcificazioni.

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'utilizzo routinario della TC encefalo sta portando negli anni ad un aumento della prevalenza di patologia.

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” (*Nekrosekalkfällungen*), i depositi calcifici (definiti inizialmente come “calcoli cerebrali”) simulavano una “prestazione attiva del tessuto” (*aktive Gewebeleitung*) 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  $INF\alpha$  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 *CTCI*, 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, rabdomioma 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 NBIAs (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-iperemanganesemia, 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 dei 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 *ATNI*).

7. Altro: alcune patologie autoimmuni si associano a calcificazioni sporadiche encefaliche, tra cui il neuro lupus 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. BASI GENETICHE E MECCANISMI PATOLOGICI

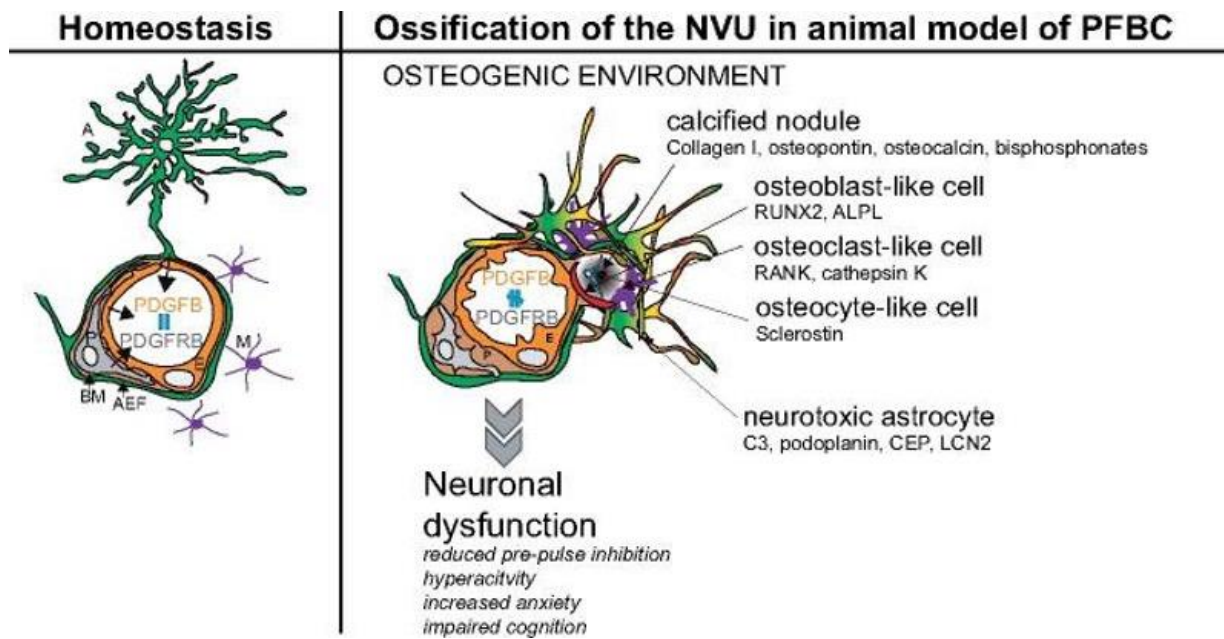
Le basi genetiche della PFBC sono eterogenee. Ad oggi sono noti otto geni responsabili di malattia, quattro a trasmissione autosomica dominante (*SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB*, *XPR1*), quattro a trasmissione autosomica recessiva (*MYORG*, *JAM2*, *CMPK2*, *NAA60*).

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  $\beta$  del platelet-derived growth factor (PDGF-R $\beta$ ), 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 $\beta$ . 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 $\beta$ ; 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 immunohistochimica 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- $\omega$ -carbossilettilpirrolo (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 favoriscono 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.

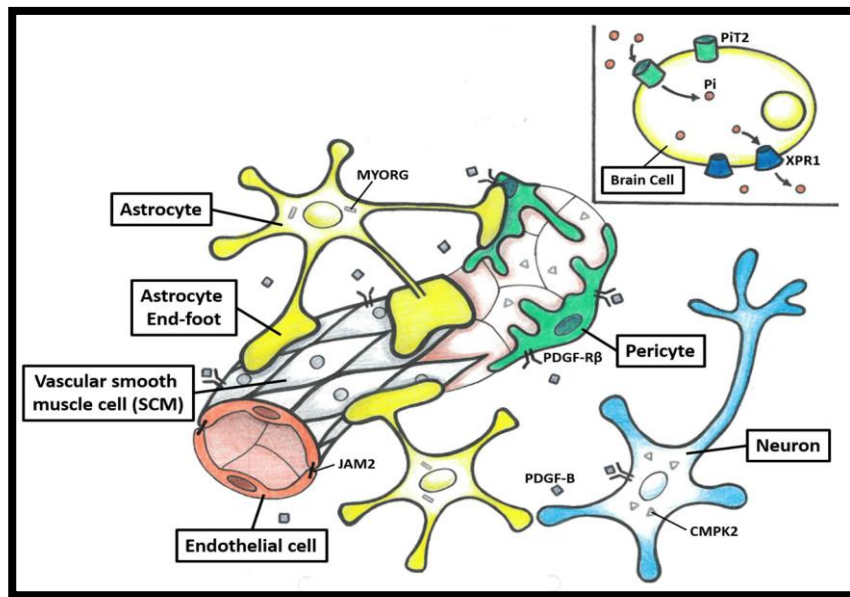
6. *JAM2*: identificato nel 2020 [32], localizzato sul cromosoma 21, codifica per la proteina giunzionale junctional-adhesion-molecule-2 (JAM2), che gioca un ruolo cruciale nella regolazione della polarità cellulare, della permeabilità endoteliale, della migrazione dei leucociti e della funzione e integrità 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 acetyl-transferases (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 *XPRI* 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. 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 para-fisiologiche correlabili all'invecchiamento, con microcalcificazioni di piccole dimensioni, sfumate, puntiformi e generalmente limitate ai pallidi interni riscontrabili fino al 20% dei soggetti anziani [37].

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.

## **1.6. MANAGEMENT CLINICO**

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**

Lo scopo del presente studio è quello di fornire una descrizione dettagliata di una coorte di pazienti affetti da PFBC provenienti da tutta Italia e che afferiscono o hanno afferto alla UOC Clinica Neurologica di Padova.

Lo studio si è concentrato su:

- Descrizione fenotipica e genotipica dei pazienti affetti da PFBC e valutazione delle principali caratteristiche cliniche con approccio sistematico, in quanto in letteratura non sono presenti dei protocolli definiti.
- Descrizione radiologica dei pazienti affetti da PFBC, in particolare mediante applicazione di un protocollo di risonanza magnetica cerebrale, per valutare l'efficacia delle diverse sequenze nell'identificazione e nella caratterizzazione delle calcificazioni cerebrali. Attualmente infatti non sono presenti in letteratura studi sistematici sull'utilizzo della risonanza nella descrizione delle calcificazioni cerebrali, che spesso possono essere confuse con depositi di altre sostanze paramagnetiche. La risonanza magnetica cerebrale rappresenta uno strumento ampiamente utilizzato in ambito diagnostico neurologico, privo di rischio di irradiazione, pertanto una sua applicazione nel percorso diagnostico e di follow-up dei pazienti affetti da PFBC potrebbe rappresentare un supporto utile e alternativo all'uso ripetuto di TC encefalo.
- Ricerca di correlazioni genotipo-fenotipo sia dal punto di vista clinico che radiologico, allo scopo di individuare eventuali fattori prognostici o manifestazioni tipiche di malattia.

Questo lavoro può offrire un supporto per la gestione clinica dei pazienti e dei loro familiari che intraprendono un percorso diagnostico-assistenziale, in seguito al riscontro di calcificazioni cerebrali. Questo reperto radiologico presenta una prevalenza in aumento nel corso degli anni grazie all'impiego routinario di esami neuroradiologici, ed è caratterizzato da un andamento clinico ancora poco definito per l'assenza di chiari fattori prognostici.

### **3. MATERIALI E METODI**

Da una coorte di 85 pazienti con diagnosi di PFBC afferenti alla Clinica Neurologica dell'Azienda Ospedale Università di Padova, 45 pazienti (età media  $57,1 \pm 12,5$  anni; 24 pazienti di sesso femminile) hanno eseguito la risonanza magnetica cerebrale entro giugno 2024. I restanti pazienti PFBC non sono stati inclusi in quanto non hanno fatto in tempo ad eseguire la risonanza magnetica o perché hanno preferito non partecipare per condizioni cliniche e/o geografiche. Tutti i pazienti PFBC, a seguito di riscontro di calcificazioni cerebrali alla TC, in particolare a livello dei gangli della base, erano stati preliminarmente sottoposti ad un iter diagnostico finalizzato ad escludere cause secondarie di calcificazioni cerebrali quali quadri di ipoparatiroidismo e patologie neuromuscolari. In particolare erano stati analizzate le concentrazioni plasmatiche di PTH, calcio, vitamina D, CPK, LDH e la funzione renale ed erano state effettuate analisi genetica mirata, valutazioni clinica e neuropsicologica.

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.

#### **3.1. ANALISI CLINICA**

I principali dati clinici raccolti retrospettivamente per singolo paziente hanno incluso: storia familiare, sintomatologia motoria e non, evoluzione clinica ed efficacia di eventuale terapia con Levodopa nel controllo dei sintomi motori.

##### **3.1.1. Analisi delle caratteristiche motorie**

La valutazione motoria è stata effettuata utilizzando la scala MDS-UPDRS in tutti i pazienti. Per quanto riguarda la scala MDS-UPDRS è stata valutata la parte III, specifica per l'aspetto motorio della malattia, essendo state le altre parti sostanzialmente esaurite con le domande specifiche poste ai pazienti durante la valutazione clinica. I segni e sintomi motori che sono stati valutati sono: parkinsonismo, tremore, segni piramidali, segni cerebellari, distonia, quadri ipercinetici di corea, disartria, tendenza alle cadute.



### **3.1.2. Analisi delle caratteristiche non motorie**

Sono stati investigati i seguenti segni e sintomi non motori: ansia/depressione, psicosi/OCD, cefalea, crisi epilettiche, disturbi del sonno, allucinazioni/deliri, stipsi, iposmia, incontinenza. La diagnosi cognitiva, eseguita da un team di neuropsicologhe, ha permesso di definire i pazienti come sani (definiti controlli - CNT), e pazienti con disturbo cognitivo lieve (mild cognitive impairment - MCI) o pazienti affetti da demenza. I pazienti sono stati sottoposti ai principali test per la determinazione del funzionamento cognitivo globale, ovvero MMSE (Mini- Mental State Examination) e/o MoCA (Montreal Cognitive Assessment). Il test MoCA è lo strumento di valutazione cognitiva più efficace nei pazienti con MCI ed Alzheimer (cut-off 25 punti) e si basa sull'analisi di sette categorie: abilità esecutive e visuospatiali, denominazione, memoria, attenzione, linguaggio, capacità di astrazione ed orientamento. Quest'ultimo è risultato in numerosi studi lo strumento più sensibile ed adatto per valutare il declino cognitivo nel paziente con malattia di Parkinson: il cut-off che permette di eseguire una diagnosi è di 25 punti. Per quanto riguarda invece il MMSE il cut-off più comunemente utilizzato è < 26 punti. I pazienti sono stati inoltre sottoposti a una 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. Sono stati inoltre valutati mediante appositi questionari la presenza di ansia, depressione, apatia, discontrollo degli impulsi, autonomia funzionale e qualità della vita (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).

### 3.2. ANALISI GENETICA

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a test genetico per l'identificazione delle mutazioni a carico di 7 degli 8 geni associati a PFBC. Il pannello non ha incluso il gene NAA60 (scoperto a febbraio 2024) in quanto tutti i pazienti avevano eseguito il test precedentemente ed i primer per l'amplificazione ed il sequenziamento del suddetto gene non sono attualmente disponibili presso l'UOC Genetica Medica ed Epidemiologia Clinica dell'Azienda Ospedaliera di Padova, presso cui il test è stato effettuato. I test genetici sono stati eseguiti a partire dal DNA estratto da leucociti da sangue periferico, mediante Next Generation Sequencing (NGS) su piattaforma Illumina NextSeq con kit Agilent SureSelect; il pannello personalizzato comprende oltre 100 geni correlati ai disturbi del movimento e geni legati alla deposizione di calcio nel sistema nervoso centrale (*Tabella I*).

**Tabella I:** *Pannello di geni analizzati nel test genetico proposto alla coorte di pazienti PFBC:*

AARS; ABCA1; ABCC6; ACTA2; ACTB; ADA2; ADAR; ADCY5; AFG3L2; ALAD; ALAS2; ALS2; AMT; ANG; ANO10; ANO3; ANXA11; APOA1; APOB; APOE; APP; APTX; ARX; ATAD1; ATM; ATP13A2; ATP1A2; ATP1A3; ATP6AP2; ATP7A; ATP7B; AUTS2; BCAP31; C19ORF12; CACNA1A; CACNB4; CAMK2B; CCM2; CFAP410; CHCHD10; CHCHD2; CHD6; CHD8; CHMP2B; CLPX; **CMPK2**; COASY; COL4A1; COL4A2; COQ4; COQ8A; CP; CPOX; CRAT; CSF1R; CSMD1; CST3; CTC1; CTSA; CYP27A1; DCAF17; DCTN1; DDC; DHCR24; DHDDS; DHX30; DNAJC12; DNAJC13; DNAJC5; DNAJC6; DRD2; ECHS1; EIF2AK2; EIF4G1; ENPP1; ERBB4; FA2H; FBXO7; FECH; FIG4; FLVCR1; FOXC1; FOXF2; FOXG1; FRRS1L; FTL; FUS; FXN; GBA; GCH1; GCSH; GLA; GLB1; GLDC; GLE1; GLRA1; GLRB; GM2A; GNAL; GNAO1; GNE; GPR88; GRID2; GRIN1; GRM1; GRN; GUCY1A1; HIBCH; HMBS; HNRNPA1; HPCA; HTRA1; IFIH1; IMPDH2; ITM2B; **JAM2**; JAM3; KCNA1; KCNK18; KCNMA; KCTD17; KIAA1244; KMT2B; KRIT1; LDLR; LDLRAP1; LINGO4; LPL; LRP10; LRRK2; MAPT; MATR3; MECR; MED27; MICU1; MORC2; MRE11; MSL3; MTPAP; MTPP; **MYORG**; NEK1; NKX2-1; NOTCH3; NPC1; NPC2; NT5E; NUP62; OCLN; OPTN; PAK1; PANK2; PARK7; PCDH12; PCSK9; PDCD10; PDE10A; PDE2A; PDE8B; **PDGFB**; **PDGFRB**; PFN1; PGK1; PINK1; PITX2; PLA2G6; PNKD; PNKP; PNPT1; POLG; PPOX; PPP2R5D; PRKN; PRKRA; PRNP; PRRT2; PSEN1; PSEN2; RAB39B; REPS1; RNASEH2A; RNASEH2B; RNASEH2C; RNASET2; SACS; SAMHD1; SCN1A; SCN2A;

Per allineamento e individuazione delle varianti è stato utilizzato come riferimento il Genome Reference Consortium Human Build 37 (hg19). La regione target per il sequenziamento comprendeva l'intera regione codificante +/-10 nucleotidi di ciascun gene ed è stata coperta con una profondità di sequenziamento di almeno 20x per oltre il 99% del target. L'analisi bioinformatica delle CNV è stata eseguita in tutti i casi, utilizzando il software Agilent SureCall con il "Default Haloplex Copy-Number Method". L'analisi delle varianti è stata eseguita utilizzando il software Variant Studio 3.0 ed il software IGV. Sono state filtrate ed escluse le varianti con profondità di lettura <10x, gli artefatti noti dal nostro database interno e le varianti con bassa qualità di lettura (<255 reads). Le varianti sono state quindi interpretate in base alla frequenza allelica (escludendo le varianti con MAF>1% in GnomAD 2.1), alla ricerca in letteratura, agli strumenti di predizione in silico (compresi Sift, Polyphen e MutationTester) e alle caratteristiche cliniche, e classificate secondo le linee guida ACMG. Tutte le varianti novel riportate nel presente studio sono state considerate verosimilmente patogenetiche per le caratteristiche radiologiche e/o cliniche riscontrate nei pazienti e sulla base della frequenza della variante nella popolazione e della predizione di patogenicità. Nei casi in cui è stato possibile, è stato anche effettuato il test di segregazione nei famigliari per confermare la patogenicità delle varianti.

### **3.3. ANALISI RADIOLOGICA**

Tutti i 45 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= 1x1x1mm<sup>3</sup>; 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).

Nello specifico la sequenza T1 fornisce importanti informazioni anatomiche dell'encefalo, la sequenza FLAIR è particolarmente sensibile alla leucopatia sovra e sottotentoriale mentre la sequenza SWI è particolarmente sensibile alle disomogeneità magnetiche e permette di rilevare sostanze aventi differente suscettività magnetica rispetto al background tissutale. Tra queste sostanze vi sono il sangue deossigenato, i prodotti di degradazione del sangue e i depositi di calcio. Per ogni sequenza di risonanza magnetica sono state indagate e descritte le calcificazioni nelle seguenti aree note per essere frequentemente coinvolte in TC nella PFBC: globi pallidi, putamen, nuclei caudati, pulvinar, nucleo subtalamico, sostanza bianca sottocorticale (centri semiovali, corona radiata, capsula interna), nuclei dentati del cervelletto, centri midollari del cervelletto, ponte e corteccia calcarina. Si è inoltre valutato il trofismo degli emisferi cerebellari nella sequenza T1 ed il coinvolgimento della sostanza bianca in FLAIR. Sono state valutate sede, caratteristiche di segnale delle calcificazioni (iso-iper-ipo intensità rispetto al tessuto dove venivano riscontrate) e dimensione.

La valutazione è stata effettuata per le sequenze T1, FLAIR e, come ultima valutazione, SWI in modo che le alterazioni riscontrate in quest'ultima non influenzassero la valutazione delle precedenti.

La valutazione di tutte le RM è stata effettuata congiuntamente dalla sottoscritta e da un neuroradiologo esperto in coinvolgimento cerebrale in malattie rare. Discordanze di valutazione sono state discusse fino al raggiungimento di consenso.

## **4. RISULTATI**

### **4.1. DESCRIZIONE DELLA COORTE DEI PAZIENTI PFBC**

La coorte di pazienti inclusi in questa tesi comprende 45 pazienti affetti da PFBC provenienti da 43 famiglie diverse, di cui 21 individui di sesso maschile e 24 di sesso femminile. L'età media dei pazienti è pari a  $57,1 \pm 12,3$  anni con un range variabile da 30 ad 82 anni. Al momento dell'esordio della patologia, considerando esclusivamente i pazienti sintomatici per PFBC, l'età media era pari a  $44,6 \pm 18,6$  anni con un minimo di 23 e un massimo di 75 anni. Sono stati considerati sintomatici i pazienti con almeno un sintomo tra i seguenti: disturbo del movimento (parkinsonismo, tremore, distonia, disturbo cerebellare o altro disturbo ipercinetico) e/o disturbo cognitivo. I pazienti sintomatici sono risultati 30/45, pari al 67% della coorte. La durata di malattia in questi pazienti è pari, in media, a  $9,5 \pm 10,4$  anni, con un intervallo compreso tra 3 e 47 anni. Due pazienti hanno iniziato a manifestare sintomi prima di 30 anni di età.

Tra i 45 pazienti inclusi, 23 non presentavano una familiarità per morbo di Parkinson, demenza, disturbi psichiatrici o PFBC. In questa coorte quattro pazienti appartengono a due famiglie: due fratelli e una coppia di madre e figlia.

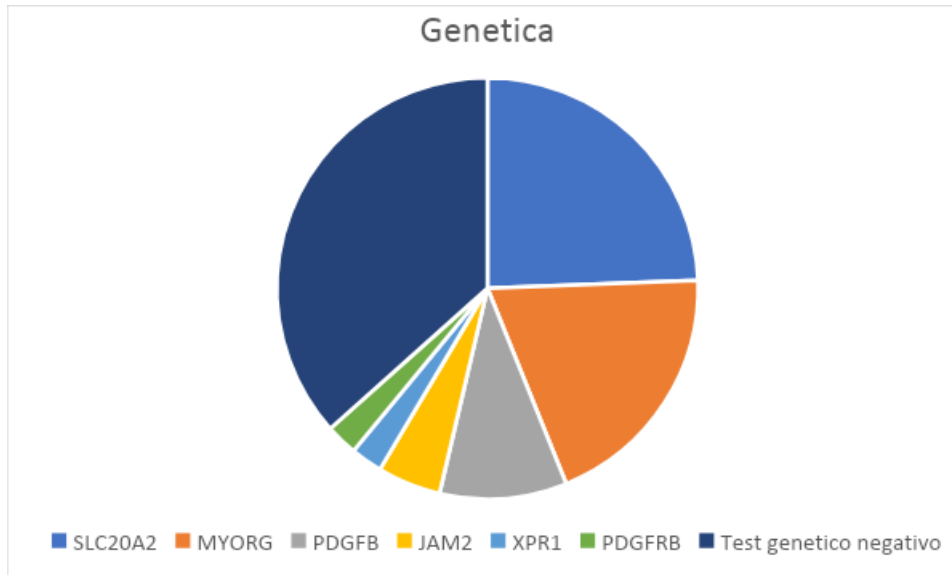
#### ***4.1.1. Descrizione genetica***

Della coorte di 45 pazienti, quattro pazienti non hanno eseguito test genetico in quanto ancora da programmare o in attesa di risultati. Dei 41 pazienti sottoposti a test genetico in 15 casi (36.6%) non sono state rinvenute mutazioni nei geni noti associati a PFBC. Nei rimanenti 26 casi (63.4%), la genetica ha evidenziato mutazioni nei seguenti geni:

- *SLC20A2* in 10 pazienti (38% dei pazienti con mutazione nota, 24.4% dei pazienti con genetica disponibile);
- *MYORG* in 8 pazienti (31%; 19.5% dei pazienti con genetica disponibile);
- *PDGFB* in 4 pazienti (15%; 9.7% dei pazienti con genetica disponibile);
- *PDGFRB* in 1 paziente (4%; 2.4% dei pazienti con genetica disponibile);

- *JAM2* in 2 pazienti (8%; 4.8% dei pazienti con genetica disponibile);
- *XPR1* in 1 paziente (4%; 2.4% dei pazienti con genetica disponibile).

Si riporta di seguito la *Figura 4* che descrive con un grafico a torta i risultati ottenuti dal test genetico effettuato su 41 pazienti.



**Figura 4:** Risultati del test genetico dei pazienti PFBC

In due casi sono state rinvenute una mutazione nota su un gene dominante e una VUS (variante di significato incerto) su un altro gene correlato a PFBC; in questi casi si è considerata come patogena solo la mutazione sul gene dominante.

In *Tabella II* sono riportate le mutazioni causative di malattia nella coorte. In 12 pazienti dei 26 con genetica positiva è stato eseguito lo studio di segregazione che ha permesso di confermare la patogenicità delle varianti. Delle 32 mutazioni identificate al test genetico, per i 7 geni causativi di malattia indagati, 24 mutazioni (75%) sono risultate “novel” mentre 8 mutazioni (33%) erano già note in letteratura. In *Tabella II* sono riportati gli studi di riferimento.

**Tabella II:** Mutazioni causative di malattia identificate nella nostra coorte descritte per gene interessato, esone coinvolto, studi di riferimento per le mutazioni “non-novel”. Si riporta inoltre lo studio di segregazione.

Paziente	Gene	Esone	Mutazione	Segregazione	Novel	Riferimenti
SLC20A2_pz1	SLC20A2	8	pSer578Cysfs*20; c.1733_1734delCA	SI	SI	
SLC20A2_pz2	SLC20A2	2	Leu127ArgfsTer44; c.380delT	SI	SI	
SLC20A2_pz3	SLC20A2	6	p.His399Pro; c.1196A>C	NO	NO	Rubino et al. (2017) [56]
SLC20A2_pz4	SLC20A2	2	p.Thr122Ile; c.365C>T	SI	SI	
SLC20A2_pz5	SLC20A2	2	c.380delT	SI	SI	
SLC20A2_pz6	SLC20A2	2	p.Arg71Hist; c.212G>A	NO	NO	Lemos et al. (2015) [57]
SLC20A2_pz7	SLC20A2	1	p.(Asp28Glu); c.84T>A	SI	SI	
SLC20A2_pz8	SLC20A2	1	p.(Asp28Glu); c.84T>A	SI	SI	
SLC20A2_pz9	SLC20A2	2	p.(Arg181Trp);c.541C>T	SI	NO	Lamquet et al. (2019) [58]
SLC20A2_pz10	SLC20A2	8	p.Gln491Arg; c.1472A>G	SI	SI	
MYORG_pz1	MYORG	2;2	p.Arg441Alafs*65; c.1321delC / p.Leu614Pro; c.1841T>C	NO	SI	
MYORG_pz2	MYORG	2;2	p.Arg635Ser; c.1903C>A / p.Val243Leu; c.727G>T	SI	SI / SI	
MYORG_pz3	MYORG	2;2	p.Leu225Pro; c.674T>C / p.Asp288Tyr; c.862G>T	NO	SI / SI	
MYORG_pz4	MYORG	2	p.(Trp426Cysfs*11); c.1270_1277dupCGCTGGT G	NO	NO	Bonato et al. (2024) [59]
MYORG_pz5	MYORG	2;2;2	p.Trp229*; c.686G>A/ p.Tyr397Asn; c.1189T>A/ p.Ala440Thr; c.1318G>A	SI	SI / SI / SI	
MYORG_pz6	MYORG	2	p.Thr49Pro; c.1471A>C	NO	SI	
MYORG_pz7	MYORG	2;2	p.(Leu225Pro); c.674T>C / p.(Asp288Tyr); c.862G>T	NO	SI / SI	
MYORG_pz8	MYORG	2;2	p.Ala440Thr; c.1318G>A / p.Tyr397Asn; c.1189T>A	NO	SI / SI	
PDGFB_pz1	PDGFB	1	p.(Arg100Cys); c.298C>T	SI	NO	Shen et al. (2022) [60]
PDGFB_pz2	PDGFB	1	p.Cys134Tyr; c.410G>A	NO	SI	
PDGFB_pz3	PDGFB	1	p.(Arg100Cys); c.298C>T	SI	NO	Shen et al. (2022) [60]
PDGFB_pz4	PDGFB	1	c.457-1G>C	NO	NO	Sekine et al. (2019) [61]
JAM2_pz1	JAM2	4	p.(Trp291Ser); c.872G>C	NO	NO	Andretta et al. (2024) [62]
JAM2_pz2	JAM2	3	p.(Val2444Ile);c.730G>A	NO	SI	
XPR1_pz1	XPR1	1	p.(Glu65Gly); c.194A>G	NO	SI	
PDGFRB_pz1	PDGFR B	10	p.Cys684Phe; c.2015G>T	NO	SI	

#### 4.1.2. Descrizione fenotipica: aspetti motori

Segni piramidali sono stati evidenziati all'esame obiettivo neurologico in 21 pazienti (47%), risultando il reperto obiettivo più frequente. Il secondo reperto più frequente è rappresentato dal tremore, presente in 20 pazienti (44%); seguono parkinsonismo, presente in 19 pazienti (42%). Tra questi, 12 pazienti (27%) sono in terapia con Levodopa e 7 tra questi (58,3%) ne traggono o ne hanno tratto beneficio soggettivo e oggettivo. Tra gli altri segni e sintomi motori, 10 pazienti (22%) presentano distonia in vari distretti corporei, 9 pazienti (20%) segni cerebellari, 6 pazienti (13%) hanno corea o altri disturbi ipercinetici. 10 pazienti presentavano disartria (22%) e infine 6 pazienti avevano una storia di cadute in anamnesi (13%). Si riportano i dati nella *Tabella III*.

<i>Tabella III: caratteristiche motorie dei pazienti PFBC</i>		
VARIABILE	NR. SOGGETTI	PERCENTUALE
Parkinsonismo	19	42%
Tremore	20	44%
Segni piramidali	21	47%
Distonia	10	22%
Segni cerebellari	9	20%
Corea/dis. mov. ipercinetico	6	13%
Disartria	10	22%
Cadute	6	13%

Il punteggio medio ottenuto alla scala MDS-UPDRS III nei 45 pazienti è pari a 7,89 punti (range 0-55). Il punteggio medio della scala Hoehn & Yahr nei 45 pazienti è pari a 0,87 con valori da 0 a 3 e si colloca quindi tra lo stadio 0 (asintomatico) e 1 (coinvolgimento monolaterale) di malattia.



#### 4.1.3. Descrizione fenotipica: aspetti non motori

Dal punto di vista della sintomatologia non motoria 29 pazienti (64%) presentano un quadro di ansia e/o depressione; 3 pazienti (7%) presentano psicosi e/o disturbo ossessivo compulsivo (OCD); 15 pazienti (33%) cefalea; 4 pazienti (9%) manifestano o hanno manifestato crisi epilettiche. Per quanto riguarda i disturbi del sonno 10 pazienti (22%) 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 (27%) riferiscono stipsi, 7 (16%) iposmia, 1 solo paziente (2%) ipoacusia, 6 pazienti (13%) incontinenza urinaria e solo un paziente (2%) ha in anamnesi un quadro di ipotensione/disautonomia. Si riportano i dati in *Tabella IV*.

<i>Tabella IV: caratteristiche non-motorie dei pazienti PFBC</i>		
VARIABILI	NR. PAZIENTI	PERCENTUALE
Ansia/depressione	29	64%
Psicosi/OCD	3	7%
Cefalea	15	33%
Crisi epilettiche	4	9%
Insonnia	10	22%
RBD	6	13%
Allucinazioni/deliri	2	4%
Stipsi	12	27%
Iposmia	7	16%
Ipoacusia	1	2%
Incontinenza	6	13%

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: 14 pazienti (32%) hanno ricevuto diagnosi di disturbo cognitivo lieve (mild cognitive impairment - MCI); solo un paziente (2%) ha ricevuto diagnosi di demenza e i rimanenti 28 pazienti (32%) hanno riportato risultati fisiologici per età e sono considerati controlli sani (CNT).

Alla valutazione neuropsicologica sono state valutate le seguenti 5 abilità:

- Memoria: alterata in 8 pazienti (18%);
- Funzioni esecutive: alterate in 9 pazienti (20%);
- Linguaggio: alterato in 13 pazienti (29%);
- Attenzione e working memory: alterate in 10 pazienti (22%);
- Abilità visuo-spaziali: alterate in 15 pazienti (33%).

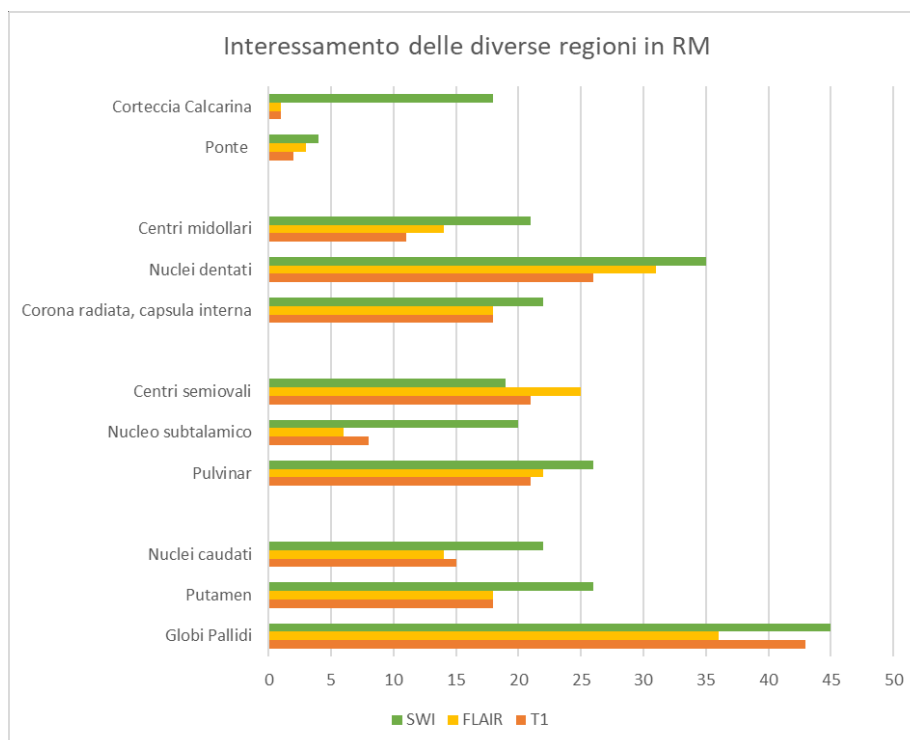
I test neuropsicologici MMSE e MoCA, somministrati rispettivamente a 43 e 44 pazienti, hanno fornito una media degli score pari a 27,76 e 24,13 punti rispettivamente.

#### **4.2. DESCRIZIONE NEURORADIOLOGICA DELLE CALCIFICAZIONI PFBC IN RM**

Ogni distretto cerebrale è stato valutato in tre sequenze di risonanza magnetica (T1, FLAIR, SWI) e le calcificazioni, se presenti, sono state descritte come ipointense o iperintense, rispetto al parenchima circostante, e come omogenee o disomogenee, a seconda che il segnale dato dalla calcificazione si mantenesse costante (sempre ipointenso o sempre iperintenso) o meno per tutta l'area coinvolta. Le aree che sono state valutate sono 11 e corrispondono a: globi pallidi, putamen, nuclei caudati, pulvinar, nucleo subtalamico, centri semiovali, corona radiata e capsula interna, nuclei dentati, centri midollari, ponte e corteccia calcarina. In sequenza T1 si è valutata inoltre la presenza di eventuale atrofia cerebellare. Per la descrizione completa si rimanda alla *Tabella V*. Si riporta di seguito la *Figura 2* con grafico a barre rappresentante il coinvolgimento delle 11 aree cerebrali per le sequenze T1, FLAIR e SWI di RM.

**Tabella V:** Tabella con i dati percentuali che descrivono il coinvolgimento e le caratterizzazioni delle calcificazioni nelle 11 aree cerebrali per le tre sequenze analizzate (T1, FLAIR, SWI)

		Globi Pallidi	Putamen	Caudati	Pulvinar	Nucleo subtalamico	Centri semiovali	Corona radiata e capsula	Dentati	Centri midollari	Ponte	Corteccia calcarina
<b>T1</b>	Coinvolgimento	96%	40%	33%	47%	18%	47%	40%	58%	24%	4%	2%
	Ipointensità	98%	72%	53%	5%	63%	62%	33%	54%	91%	50%	0%
	Iperintensità	2%	28%	47%	95%	37%	38%	67%	46%	9%	50%	100%
	Segnale omogeneo	86%	61%	27%	67%	88%	58%	50%	46%	27%	0%	0%
	Segnale disomogeneo	14%	39%	73%	33%	12%	42%	50%	54%	73%	100%	100%
<b>FLAIR</b>	Coinvolgimento	80%	40%	33%	49%	13%	56%	40%	69%	31%	7%	2%
	Ipointensità	97%	72%	73%	100%	83%	8%	0%	94%	29%	67%	100%
	Iperintensità	3%	28%	27%	0%	17%	92%	100%	6%	71%	33%	0%
	Segnale omogeneo	50%	61%	53%	82%	83%	60%	39%	55%	29%	67%	100%
	Segnale disomogeneo	50%	33%	47%	18%	17%	40%	61%	45%	71%	33%	0%
<b>SWI</b>	Coinvolgimento	100%	58%	33%	58%	44%	42%	49%	78%	47%	9%	40%
	Ipointensità	100%	100%	95%	100%	100%	89%	77%	100%	95%	100%	100%
	Iperintensità	0%	0%	5%	0%	0%	11%	23%	0%	5%	0%	0%
	Segnale omogeneo	98%	77%	77%	81%	90%	58%	55%	86%	67%	100%	100%
	Segnale disomogeneo	2%	23%	23%	19%	10%	42%	45%	14%	33%	0%	0%

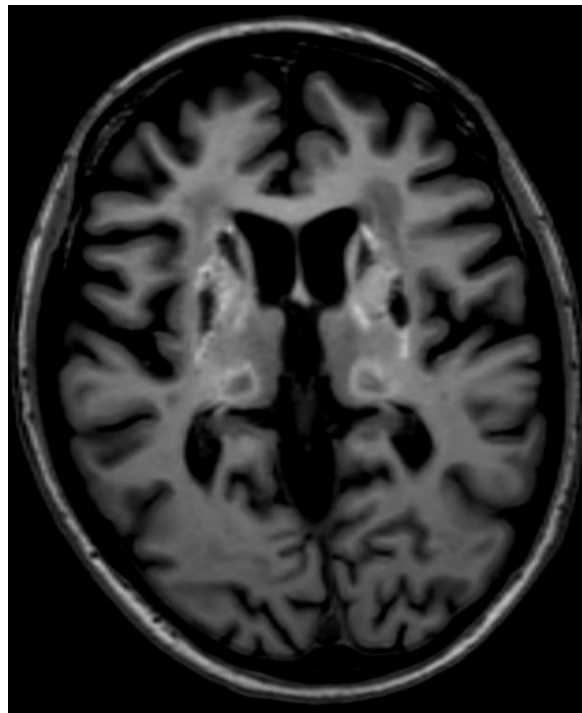


**Figura 5:** Coinvolgimento delle 11 aree cerebrali nelle sequenze T1, FLAIR e SWI di RM

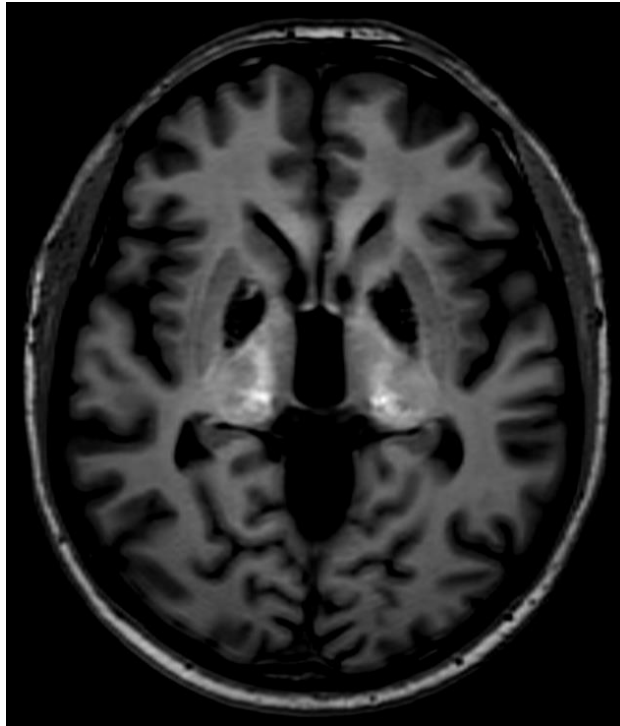
I globi pallidi sono di frequente coinvolti in T1 (98% dei casi) e le calcificazioni presentano prevalentemente un aspetto ipointenso ed omogeneo. In SWI i globi pallidi sono sempre coinvolti e le calcificazioni hanno aspetto sempre ipointenso e prevalentemente omogeneo.

Il pulvinar risulta coinvolto in circa il 50% dei casi in tutte le sequenze. In T1 prevale il carattere di iperintensità, mentre in SWI le calcificazioni appaiono sempre ipointense.

Si riporta di seguito la *Figura 6*, esemplificativa dell'interessamento del pulvinar in T1, che di frequente si presenta disomogeneo, di forma anulare, con iperintensità ai margini e ipointensità centrale. In un caso (*Figura 7*) si è riscontrato un caratteristico coinvolgimento ad "hockey-stick", termine indicato solitamente per il coinvolgimento di questo distretto cerebrale nel reperto di RM tipico della malattia di Creutzfeld-Jacob, dove solitamente il coinvolgimento di pulvinar e talamo è più mediale.

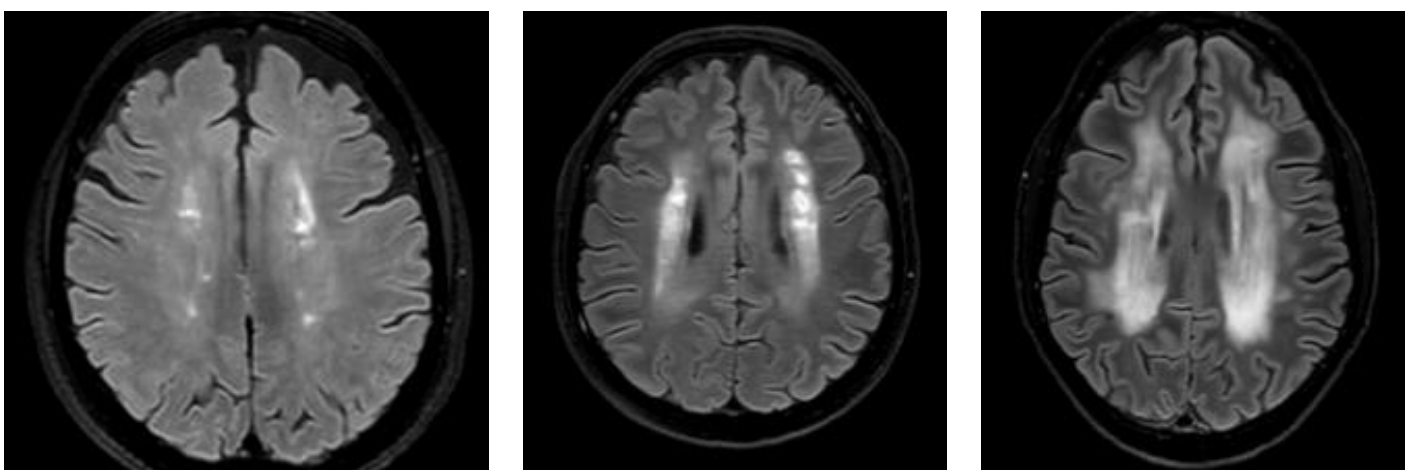


**Figura 6:** Calcificazioni del pulvinar in paziente con mut. PDGFB



**Figura 7:** Calcificazioni del pulvinar in paziente con mut. MYORG

La sequenza che si presta meglio a descrivere le calcificazioni della sostanza bianca (centri semiovali, corona radiata, capsula interna) è la sequenza FLAIR, in cui prevale il carattere di iperintensità, mentre non c'è prevalenza tra segnale omogeneo o disomogeneo. Si riporta di seguito la *Figura 8* contenente tre immagini in sequenza FLAIR di grave compromissione dei centri semiovali.

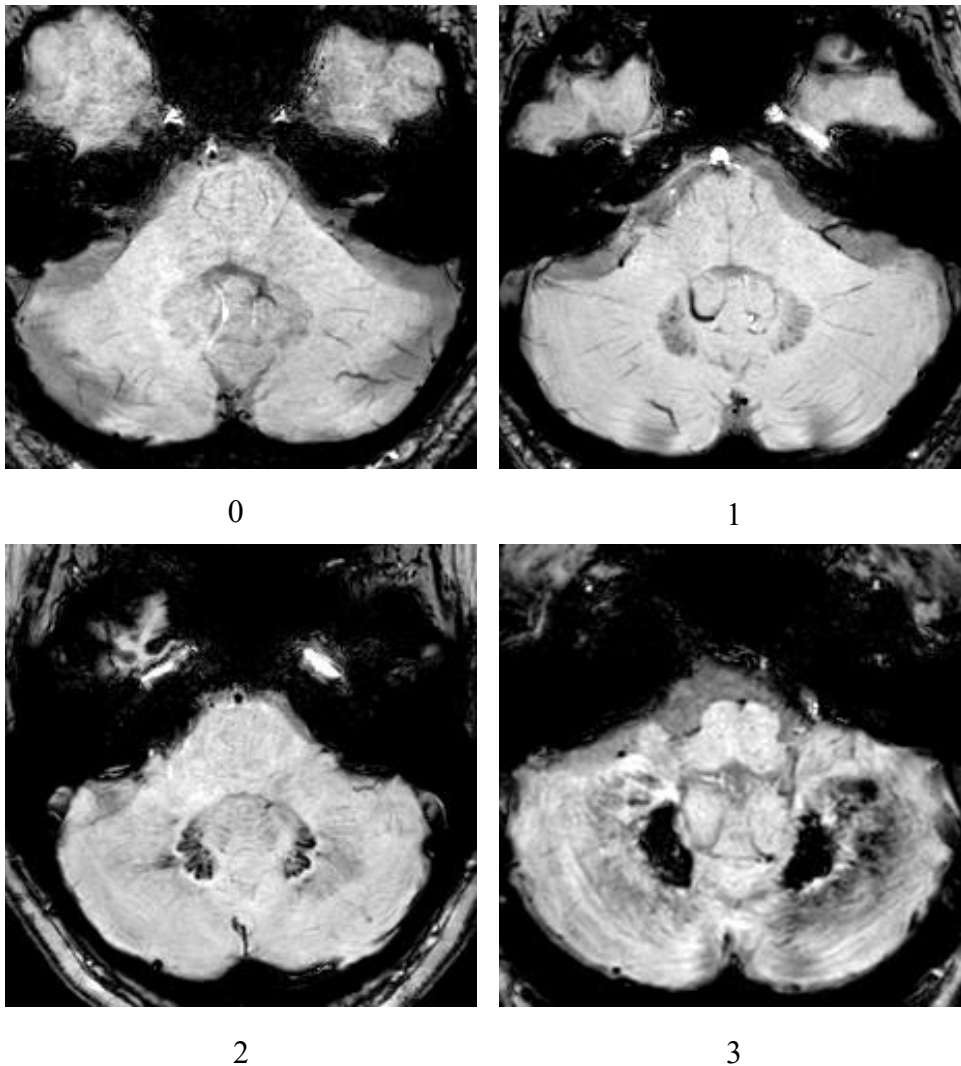


**Figura 8:** coinvolgimento della sostanza bianca in FLAIR in paziente con genetica (da sinistra a destra): negativa; MYORG; PDGFB

Le calcificazioni dei nuclei dentati si caratterizzano bene con la sequenza SWI, in cui si presentano sempre ipointense e con segnale prevalentemente omogeneo. In questa sequenza i nuclei dentati sono stati valutati con una scala semiquantitativa per quantificare l'entità delle calcificazioni. I punteggi sono stati assegnati come di seguito indicato:

- 0: nessuna calcificazione;
- 1: calcificazioni sfumate;
- 2: calcificazioni evidenti, di modeste dimensioni;
- 3: calcificazioni massive.

Si riporta di seguito la *Figura 9* contenente i 4 esempi di valutazione.



**Figura 9:** Esempi di valutazione del coinvolgimento dei nuclei dentati in SWI

Il ponte nella nostra coorte di pazienti risulta raramente coinvolto (4% in T1, 9% in SWI). Le calcificazioni si caratterizzano bene in SWI dove appaiono sempre ipointense e con segnale ipointenso.

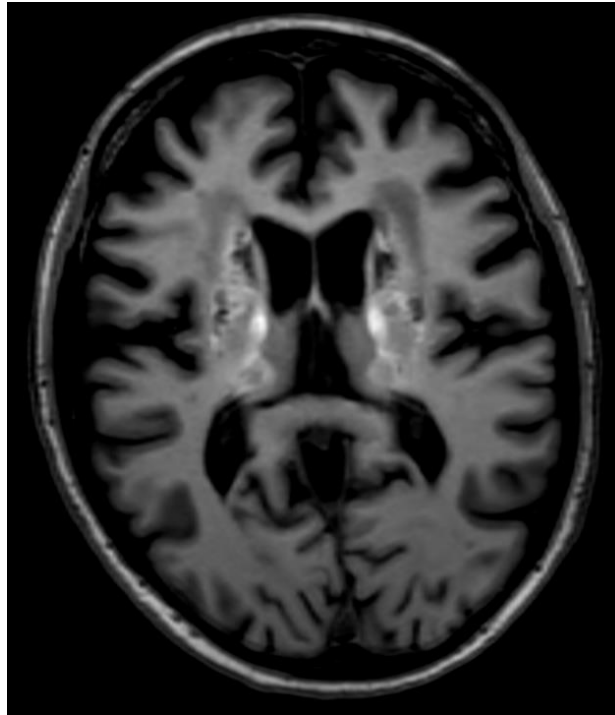
La corteccia calcarina è risultata calcifica nel 40% dei casi in sequenza SWI, sempre con carattere di ipointensità e con segnale omogeneo. Si riporta la *Figura 10*, esemplificativa del coinvolgimento della corteccia calcarina in SWI.



*Figura 10: Coinvolgimento della corteccia calcarina in SWI*

L'atrofia cerebellare è stata valutata in sequenza T1 ed è stata riportata in 26 pazienti (58%).

Il coinvolgimento talamico è stato riscontrato in 5 pazienti (11%). Le calcificazioni sono risultate visibili in tutte le sequenze in tutti i casi, in particolare con prevalente carattere di iperintensità e omogeneità in T1 ed ipointensità e omogeneità in SWI. Si riporta la *Figura 11* rappresentante le calcificazioni talamiche iperintense in T1.



**Figura 11:** Coinvolgimento del talamo in paziente con mut. PDGFB in sequenza T1

### 4.3. STUDI DI CORRELAZIONE

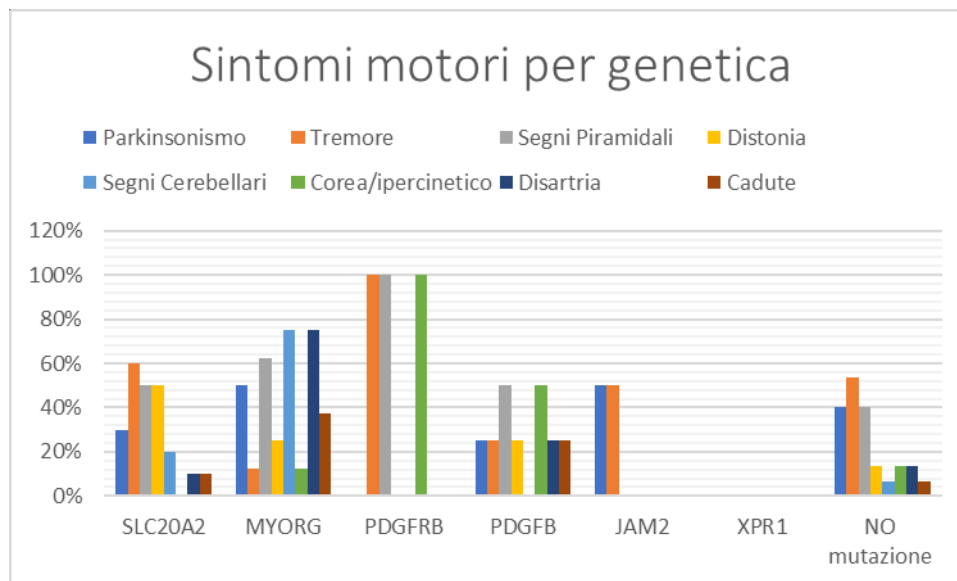
#### 4.3.1. Correlazioni genético- cliniche

Considerando i 26 pazienti con genetica positiva, si riportano di seguito le percentuali di pazienti sintomatici per genetica:

- *SLC20A2*: 6 pazienti su 10 sintomatici (60%);
- *MYORG*: 7 pazienti su 8 sintomatici (87,5%);
- *PDGFB*: 3 pazienti su 4 sintomatici (75%);
- *PDGFRB*: l'unico paziente della nostra coorte è sintomatico (100%);
- *JAM2*: tutti e due i pazienti della nostra coorte sono sintomatici (100%);
- *XPRI*: l'unico paziente della nostra coorte è asintomatico (0%).

Si riportano di seguito la *Figura 12* e la *Figura 13* che riportano la distribuzione per genetica dei sintomi rispettivamente motori e non motori.

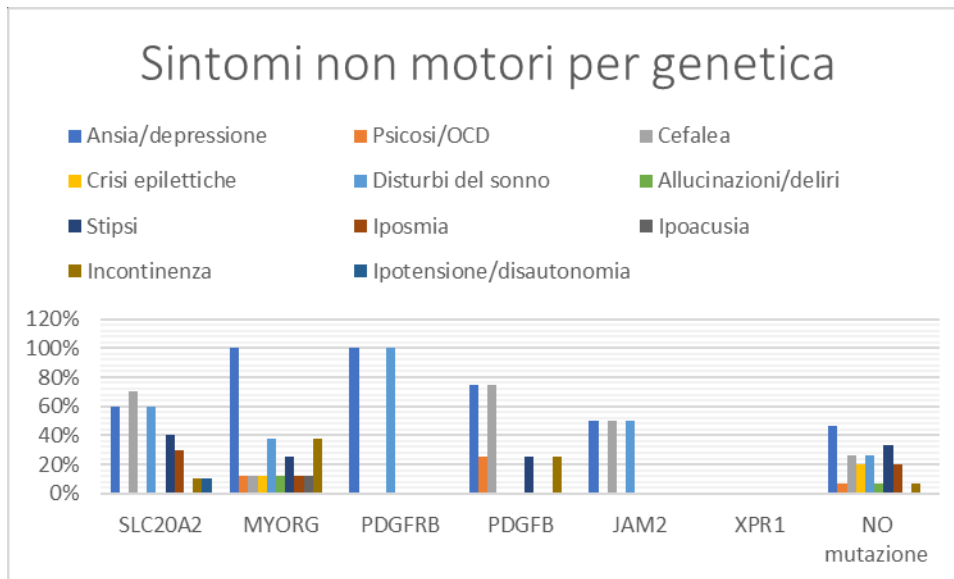




**Figura 12:** Grafico a barre raffigurante distribuzione dei sintomi motori per genetica

Valutando i sintomi motori sulla base delle mutazioni genetiche si è osservato che:

- I pazienti con genetica *MYORG* presentano più frequentemente parkinsonismo, segni cerebellari, disartria rispetto ai pazienti con genetica negativa e i pazienti con genetica *SLC20A2*. La correlazione tra genetica *MYORG* vs genetica *SLC20A2* e parkinsonismo non è statisticamente significativa nonostante ci sia una tendenza ( $p=0.06$ ). La correlazione tra genetica *MYORG* e segni cerebellari è risultata statisticamente significativa ( $p=0.02$ ) rispetto ai pazienti con mutazioni in altri geni o geneticamente negativi. La correlazione tra genetica *MYORG* e disartria è risultata altamente significativa ( $p=0.001$ ) rispetto ai pazienti con mutazioni in altri geni o geneticamente negativi.
- I pazienti con genetica *SLC20A2* presentano più frequentemente distonia (in particolare tremore distonico) rispetto ai pazienti con genetica negativa e i pazienti con genetica *MYORG*, tuttavia la correlazione non è risultata statisticamente significativa ( $p=0.07$ ) dato il campione numericamente limitato.



**Figura 13:** Grafico a barre raffigurante distribuzione dei sintomi non motori per genetica

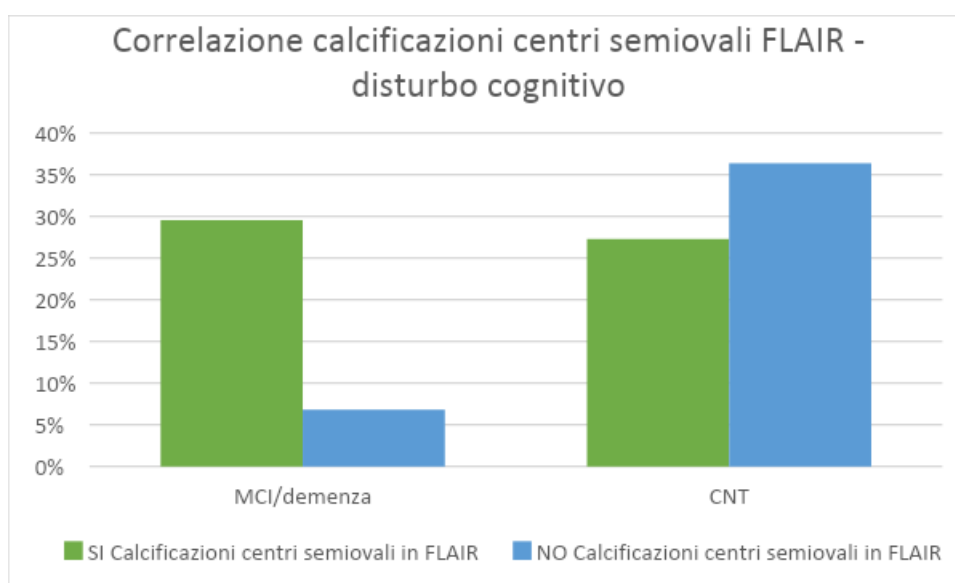
Valutando i sintomi non motori sulla base delle mutazioni genetiche si è osservato che:

- I pazienti con genetica *PDGFB* presentano più frequentemente cefalea rispetto ai pazienti con genetica negativa e pazienti con mutazioni in geni recessivi. La correlazione non è risultata statisticamente significativa ( $p=0,06$ ) a causa della limitatezza campionaria. Nella nostra coorte i pazienti con genetica *PDGFB* presentano la più alta prevalenza di cefalea (75%) rispetto a pazienti con genetica *SLC20A2* (56%), *MYORG* (13%), o geneticamente negativi (27%);
- I sintomi di ansia e/o depressione sono un reperto frequente in tutta la popolazione PFBC geneticamente determinata e sono risultati pressoché costanti nei pazienti con genetica *MYORG*. La correlazione è risultata statisticamente significativa ( $p=0,03$ ).
- I pazienti con genetica *MYORG* presentano disturbi di incontinenza più frequentemente dei pazienti con genetica negativa. La correlazione non è risultata statisticamente significativa ( $p=0,1$ ), dato il campione numericamente limitato.

#### 4.3.2. Correlazione tra compromissione dei centri semiovali e disturbo cognitivo

Si è indagata una possibile correlazione tra l'interessamento calcifico dei centri semiovali, strutture profonde di sostanza bianca con ruolo di connessione e di integrazione delle informazioni tra i due emisferi, composte da fibre mieliniche proiettive, associative e commissurali, e la compromissione delle funzioni cognitive. I pazienti sono stati divisi in due gruppi: gruppo dei pazienti con disturbo cognitivo (MCI e demenza) e gruppo di pazienti senza disturbo cognitivo (CNT). Solo un paziente è stato escluso dall'indagine in quanto non valutabile per barriera linguistica. Le calcificazioni dei centri semiovali sono state valutate in FLAIR, sequenza più sensibile alle leucopatie.

La correlazione è risultata statisticamente significativa ( $p=0,02$ ) con un OR=5,7 (95% IC 1,3-24,9). La compromissione delle strutture profonde di associazione ed integrazione correla con un quadro di alterazione delle funzioni cognitive. Si riporta di seguito la *Figura 14* con il grafico a barre che descrive tale correlazione.



**Figura 14:** Grafico a barre raffigurante la correlazione tra disturbo cognitivo e compromissione dei centri semiovali in FLAIR

È inoltre emersa una differenza statisticamente significativa alle valutazioni cognitive, con MMSE medio inferiore nei pazienti con coinvolgimento della sostanza bianca (MMSE medio= 26.4 vs. 29.1;  $p=0.017$ ). L'analisi è risultata

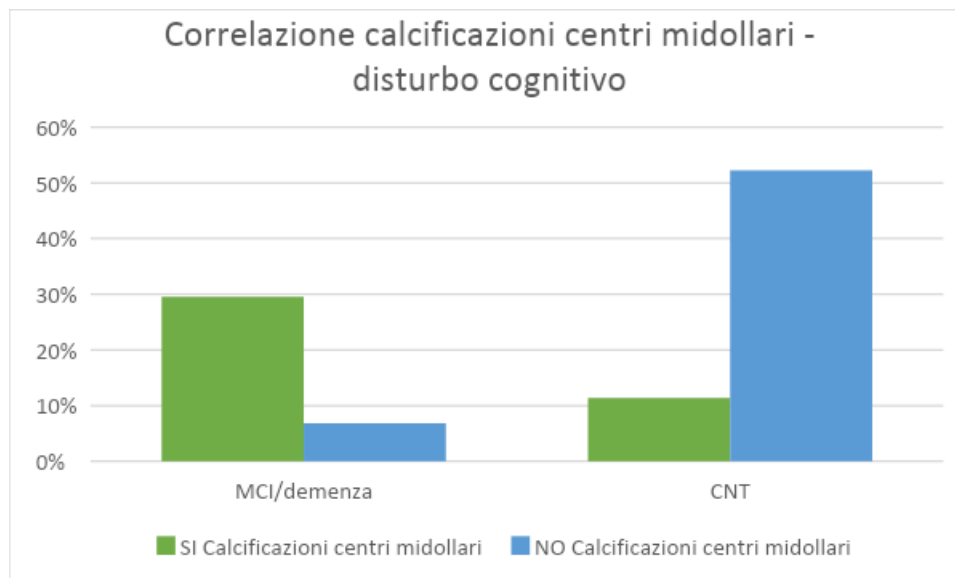
significativa anche per il confronto del MoCA test: MoCA medio = 21.7 vs 26;  $p=0.001$ .

#### ***4.3.3. Correlazione tra compromissione dei centri midollari cerebellari e disturbo cognitivo***

Si è indagata la correlazione tra l'alterazione delle funzioni cognitive e la compromissione dei centri midollari, masse compatte di sostanza bianca che contengono fibre afferenti per la corteccia cerebellare e fibre efferenti dirette ai nuclei profondi e ai nuclei del tronco encefalico. Anche in questo caso i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi: quelli con disturbi cognitivi (MCI o demenza) e quelli sani (CNT). Anche in questo caso un paziente non è stato incluso nell'indagine in quanto non valutabile per barriera linguistica. Le calcificazioni dei centri midollari sono state indagate in FLAIR, sequenza di RM più sensibile alle leucopatie.

La correlazione è risultata statisticamente significativa ( $p<0,002$ ) con un OR=19,9 (95% IC= 4.0 – 97.2). La compromissione delle strutture cerebellari profonde di associazione ed integrazione correla con un quadro di alterazione delle funzioni cognitive. Si riporta di seguito la *Figura 15* con il grafico a barre che descrive tale correlazione.

La correlazione tra il test MMSE e il coinvolgimento in FLAIR dei centri midollari non è risultato statisticamente significativo. Mentre il confronto mediante test MoCA ha rivelato valori statisticamente inferiori nei pazienti con il coinvolgimento dei centri midollari (MOCA medio = 20.8 vs 26;  $p= 0.004$ ).



**Figura 15:** Grafico a barre raffigurante la correlazione tra disturbo cognitivo e compromissione dei centri midollari in FLAIR

#### 4.3.4. Correlazione tra compromissione dei nuclei dentati e sintomi clinici

Si è indagata una possibile correlazione tra la sintomatologia cerebellare e la compromissione in SWI dei nuclei dentati, che rappresentano l'output delle informazioni cerebellari e partecipano ai circuiti di controllo del movimento. I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi: quelli manifestanti segni cerebellari e quelli non manifestanti segni cerebellari. Per ogni paziente è stata valutata l'entità delle calcificazioni dei nuclei dentati in sequenza SWI e per ciascuno caso è stato attribuito un punteggio da 0 a 3, dove 0 indica l'assenza di calcificazioni e 3 indica il massimo grado di compromissione dei nuclei dentati. Esempi iconografici di questa valutazione semiquantitativa sono stati già riportati in *Figura 9*. Per lo studio statistico di correlazione, si sono creati due gruppi: un gruppo composto da tutti i casi con un punteggio  $\leq 2$  e un gruppo composto da tutti i casi a cui è stato attribuito il punteggio massimo ( $>2$ ), indicante la presenza di calcificazioni massive.

La correlazione è risultata statisticamente significativa ( $p=0,03$ ) con OR= 0,16 (al 95% IC= 0.033 - 0.77) ma non così forte, indicando che la presenza di calcificazioni massive del cervelletto è poco tollerata dal tessuto circostante e determina la presenza di segni cerebellari, ma la sola presenza di calcificazioni, sfumate o evidenti, non è dirimente per la clinica. La presenza di poche calcificazioni a livello

dei nuclei dentati potrebbe rappresentare un fattore protettivo per lo sviluppo di segni cerebellari.

Si è inoltre valutata la correlazione tra calcificazioni a livello dei nuclei dentati in SWI e funzioni cognitive, in particolare valutando i risultati dei due test neuropsicologici, MMSE e MoCA. Il risultato non è risultato statisticamente significativo né per quanto riguarda la frequenza di disturbo cognitivo né per quanto riguarda i punteggi medi di MMSE e MoCA, nonostante vi sia una tendenza nei pazienti con coinvolgimento dei nuclei dentati ad ottenere valori inferiori al test MoCA (23.2 vs 25.5;  $p=0.1$ ). Probabilmente l'assenza di significatività statistica è da correlare alla scarsità di pazienti privi di calcificazioni dei nuclei dentati in SWI nella nostra statistica.

La correlazione tra compromissione dei dentati e funzioni cognitive è stata studiata anche suddividendo i pazienti in due categorie: pazienti con compromissione dei dentati in scala semiquantitativa con punteggio  $\leq 2$  e pazienti con compromissione dei dentati con punteggio  $>2$ . Per quanto riguarda il test MMSE, la correlazione non è risultata statisticamente significativa, ma con valore di p-value borderline ( $p=0,06$ ), con valori inferiori nei pazienti con estensivo coinvolgimento dei dentati (MMSE medio= 25.6 vs 27.7).

Il confronto dei risultati ottenuti al test MoCA, più preciso, è risultato statisticamente significativo, con valori inferiori nei pazienti con estensivo coinvolgimento dei dentati (MoCA medio= 20.6 vs 24.5,  $p=0.01$ ).

Si è valutata anche la prevalenza di diagnosi di ansia e/o depressione rispetto al coinvolgimento dei dentati in SWI (score  $\leq 2$  vs. score  $>2$ ). La correlazione è risultata statisticamente significativa ( $p=0.03$ ).

#### ***4.3.5. Correlazione tra calcificazioni bulbari puntiformi in SWI – MYORG – disartria***

Durante la valutazione in sequenza SWI della regione bulbo-pontina, sono stati riscontrati in 5 casi due calcificazioni puntiformi simmetriche, ipointense e omogenee, occupanti un'area ben definita nello spazio. Queste alterazioni hanno inizio cranialmente al passaggio bulbo-puntino e si sviluppano caudalmente per una estensione di quasi un centimetro nella regione bulbare, dove si trovano distalmente

rispetto al collicolo del nervo facciale (nucleo del VI nervo cranico). Un interessamento così definito e circoscritto nello spazio ha portato a supporre il coinvolgimento di una specifica popolazione cellulare.

Analizzando i 5 pazienti con questo reperto neuroradiologico si è osservato che:

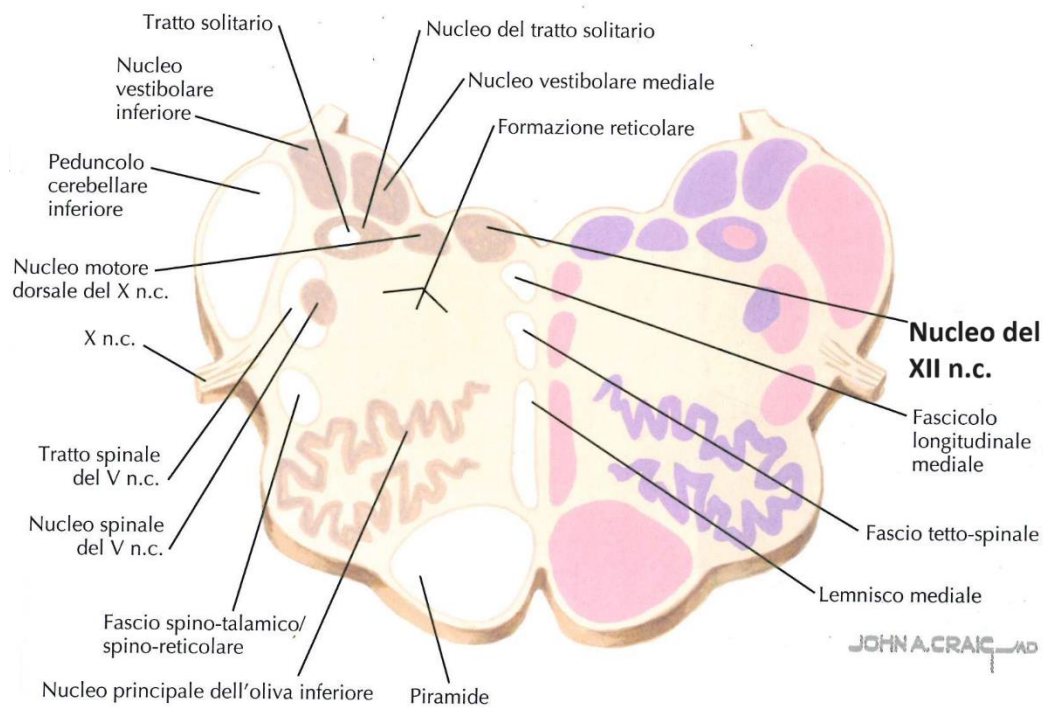
- tutti presentano genetica positiva per *MYORG*;
- 4 pazienti (80%) presentano disartria.

Queste osservazioni hanno portato ad indagare una eventuale correlazione tra genetica *MYORG*, disartria e le calcificazioni puntiformi e hanno stimolato uno studio anatomico-radiologico allo scopo di identificare la regione anatomica corrispondente alle alterazioni sopra descritte.

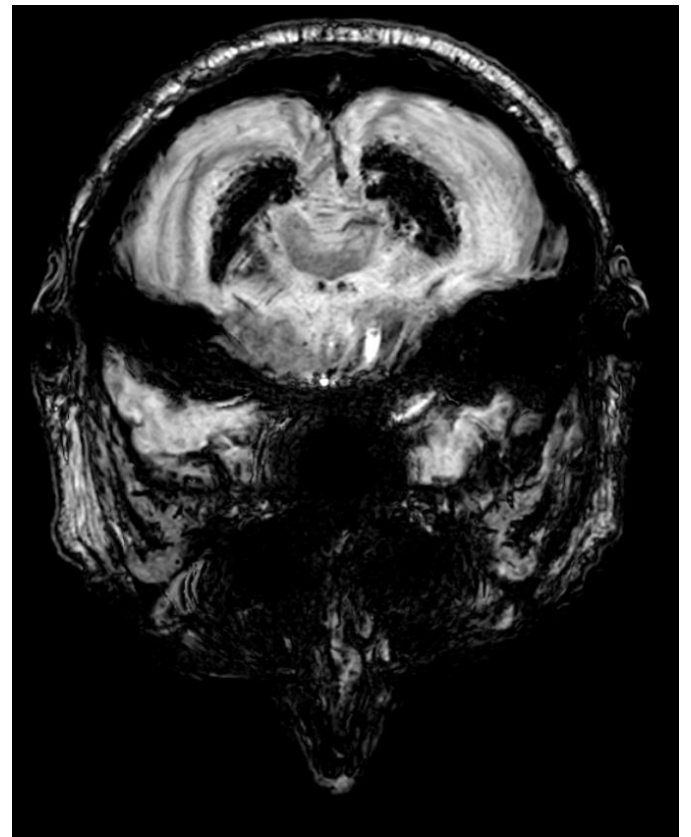
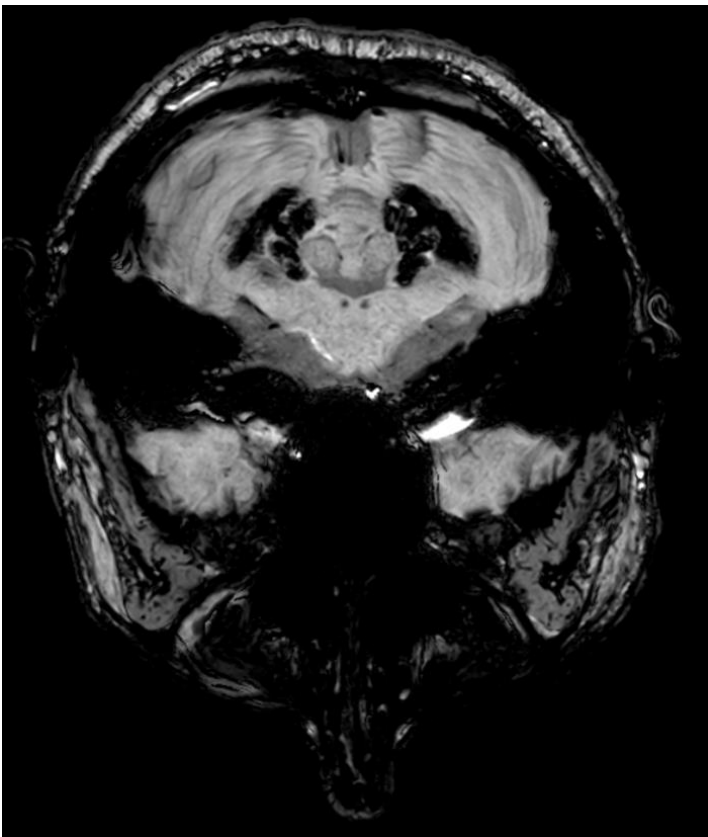
Dopo una attenta analisi, svolta sia sulle immagini di risonanza che sulle tavole anatomiche dell'Atlante di Neuroscienze di Netter [63], si è ipotizzata come sede anatomica il nucleo del nervo ipoglosso, XII nervo cranico. Si riporta la *Figura 16* l'immagine in sezione del confine bulbo-pontino, a livello dei nuclei cocleari, dell'atlante Netter. L'indagine di correlazione statistica ha dato risultati significativi per entrambe le correlazioni:

1. calcificazioni puntiformi – disartria ( $p=0,0062$ ; OR= 22.7, al 95% IC= 2.1 – 230)
2. calcificazioni puntiformi – *MYORG* ( $p < 0,001$ ; OR= 105, al 95% IC = 4.7 – 233)

Da queste correlazioni non è possibile definire se le calcificazioni puntiformi siano un reperto da associare alla disartria o alla genetica *MYORG* (data l'elevata prevalenza di disartria nei pz *MYORG*), visto il numero limitato di pazienti a nostra disposizione. Si riporta di seguito la *Figura 17* con due immagini in SWI raffiguranti le calcificazioni puntiformi bulbari.



**Figura 16:** Immagine in sezione del confine bulbo-pontino, a livello dei nuclei cocleari. Si evidenzia la posizione del nucleo del XII n.c. (Atlante di Neuroscienze di Netter", IV edizione (2022))



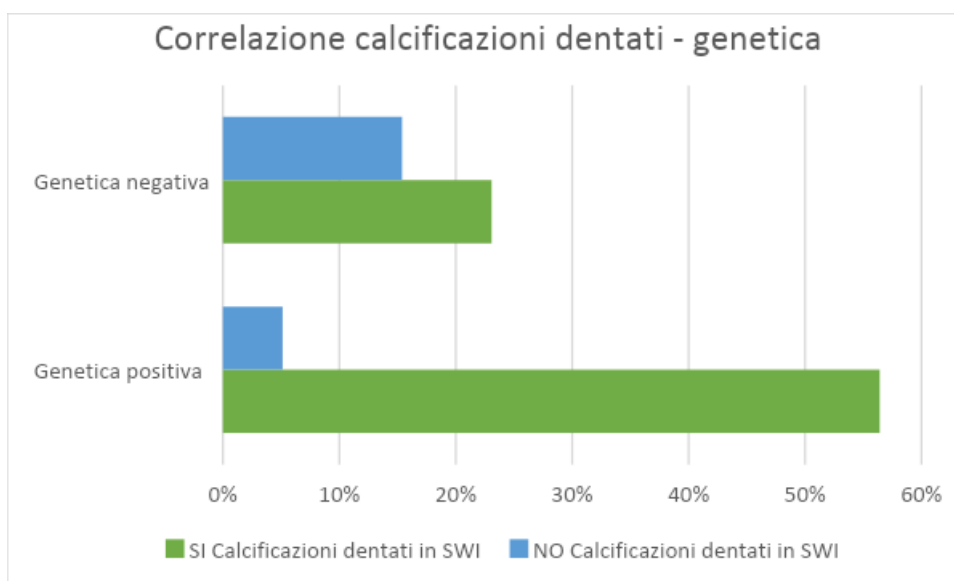
**Figura 17:** Immagini in SWI che evidenziano le calcificazioni puntiformi bulbari in pazienti



#### 4.3.6. Correlazione tra genetica e interessamento dei nuclei dentati

Si è voluta indagare una possibile correlazione tra la genetica positiva e l'interessamento dei nuclei dentati. I pazienti della coorte sono stati suddivisi in due categorie: pazienti con genetica positiva (ad esclusione del gene *JAM2*, per cui non è possibile ad oggi formulare una diagnosi genetica certa in presenza di mutazioni monoalleliche) e pazienti con genetica negativa. In tutti i pazienti è stato valutato l'interessamento calcifico dei nuclei dentati in SWI.

La correlazione è risultata statisticamente significativa ( $p=0.03$ ) con OR= 7.3 (al 95% IC compreso tra 1.2 e 43). Questo risultato permette di affermare che in caso di riscontro di calcificazioni in SWI di pazienti con sospetta PFBC è fortemente consigliata l'esecuzione di un test genetico, che risulterà con più probabilità positivo e avvalorerà la diagnosi. Si riporta in *Figura 18* il grafico a barre raffigurante la correlazione.



**Figura 18:** Grafico a barre raffigurante la correlazione statistica tra le calcificazioni dei nuclei dentati in SWI e i risultati di test genetico

#### ***4.3.7. Correlazione tra genetica e coinvolgimento della corteccia calcarina in SWI***

Non emergono differenze statisticamente significative al confronto tra la percentuale di soggetti con calcificazioni calcarine in SWI in base al gene mutato ( $p=0.38$ ), tuttavia i pazienti con mutazioni del gene *MYORG* e *PDGFB* hanno evidenziato una tendenza a presentare più frequentemente questo riscontro (50% dei pazienti *MYORG*, 75% dei pazienti con *PDGFB*). Ugualmente dal confronto tra pazienti che hanno ricevuto una diagnosi genetica e pazienti con diagnosi PFBC non geneticamente definita non sono emerse differenze in merito al coinvolgimento della corteccia calcarina ( $p=0.40$ ).

#### ***4.3.8. Correlazione tra genetica e coinvolgimento dei centri semiovali***

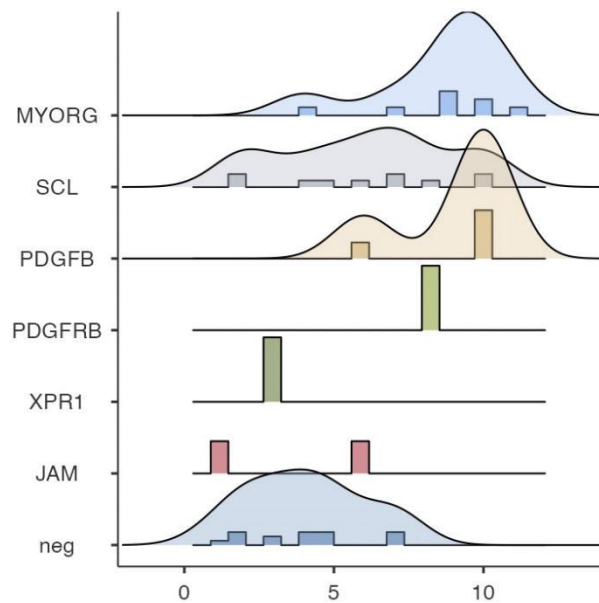
Si è studiata la correlazione tra la genetica e il coinvolgimento dei centri semiovali in FLAIR. Questa correlazione non è risultata statisticamente significativa ( $p=0.09$ ). Si osserva che nei pazienti *MYORG* c'è una tendenza maggiore ad avere coinvolgimento dei centri semiovali (87.5%) rispetto a pz portatori di mutazioni in geni dominanti (50% *SLC20A2*; 75% *PDGFB*). Nei pz con mutazione monoallelica di *JAM2* è stata riscontrata coinvolgimento dei centri semiovali nel 50%.

#### ***4.3.9. Correlazione tra numero di aree coinvolte in RM, genetica e sintomatologia***

Si è voluta indagare una possibile correlazione tra il numero di aree cerebrali e cerebellari coinvolte in sequenza SWI di RM e la genetica. Si è studiata inoltre la distribuzione statistica del numero di aree coinvolte all'interno dei due gruppi di pazienti, gli asintomatici ed i sintomatici. La presenza di calcificazioni è stata studiata nei distretti indicati nella *Tabella V* per cui per ogni paziente è stato possibile attribuire da un minimo di 1 area coinvolta ad un massimo di 11 aree coinvolte.

Dallo studio di correlazione tra numero di aree coinvolte e la genetica, è emerso che la genetica *PDGFB* e la genetica *MYORG* presentano un maggior numero di sedi

coinvolte rispetto alle altre categorie ( $p=0.01$ ). La significatività statistica è risultata borderline ( $p=0.05$ ) per il confronto tra la genetica *MYORG* e la genetica *SLC20A2*. Si riporta di seguito la *Figura 19* con l'istogramma a densità, in cui si evidenzia come si distribuisce la densità di aree coinvolte per genetica.



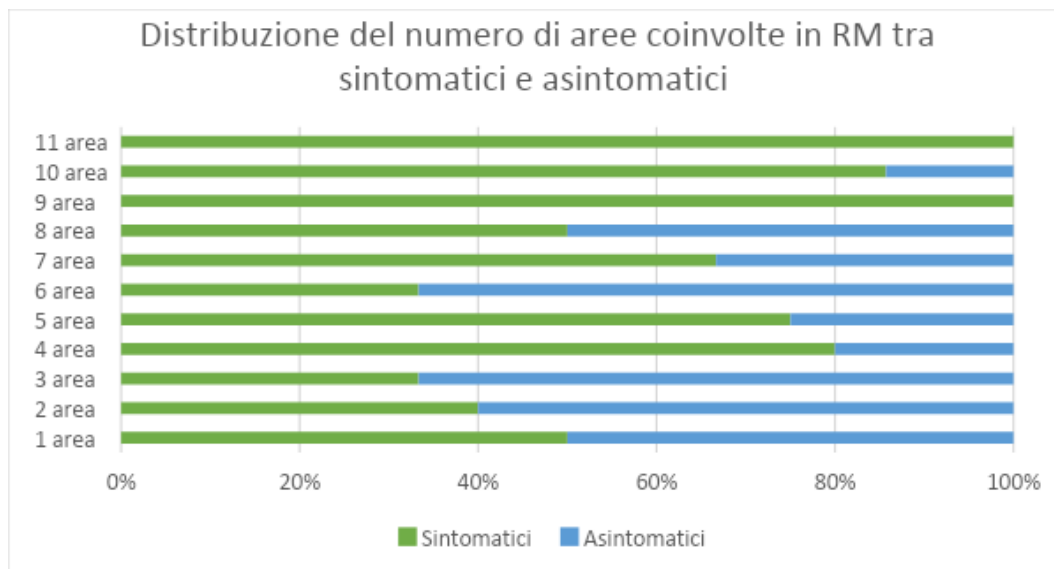
**Figura 19:** Istogramma a densità che riporta la densità di aree cerebrali coinvolte per genetica

Dallo studio di distribuzione del numero di aree coinvolte all'interno dei gruppi di pazienti, asintomatici vs. sintomatici, non è emersa alcuna significatività statistica, anche se il valore di p-value è borderline ( $p=0.05$ ). Esiste una grande variabilità del numero di aree coinvolte, sia tra gli asintomatici che tra i sintomatici. La mediana di aree coinvolte nel gruppo di pazienti sintomatici è risultata pari a 7, mentre la mediana nel gruppo di pazienti asintomatici è risultata pari a 4.5 aree coinvolte.

Nel gruppo dei pazienti sintomatici si è osservato che la genetica *MYORG* e la genetica *PDGFB* presentano più aree calcifiche rispetto alle altre categorie. Nel gruppo dei pazienti asintomatici la genetica *MYORG* corrisponde ad un numero di aree coinvolte minore rispetto alle altre categorie. Per la genetica *MYORG* la mediana di aree coinvolte nel gruppo dei sintomatici è pari a 9, nel gruppo degli asintomatici è pari a 4. Per la genetica *SLC20A2* esiste una grande variabilità di numero di aree coinvolte sia per i pazienti sintomatici che per gli asintomatici; in

entrambi i gruppi la mediana di aree coinvolte è risultata pari a 6. Per la genetica *PDGFRB* è stata riscontrata una mediana elevata sia per il gruppo di pazienti sintomatici (9 aree coinvolte) che per quelli asintomatici (8 aree coinvolte). Nel gruppo di pazienti con genetica negativa, la mediana di aree coinvolte nel gruppo degli asintomatici è pari a 2.5, mentre nel gruppo dei sintomatici è pari a 4 aree coinvolte. È presente un'elevata variabilità di numero di aree coinvolte nel gruppo dei pazienti con genetica negativa, per cui non è possibile trarre delle conclusioni statisticamente significative.

Si riporta di seguito la *Figura 20* con il grafico che riporta la distribuzione delle aree coinvolte nei due gruppi di pazienti.



**Figura 20:** Grafico raffigurante la distribuzione delle aree coinvolte tra sintomatici e asintomatici

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio è stata condotta una caratterizzazione clinica, genetica e neuroradiologica di una coorte di pazienti con diagnosi di PFBC.

Nella coorte in esame, afferente alla Clinica Neurologica dell'Università di Padova, più del 50% dei pazienti ha ricevuto conferma genetica, in linea con i dati di letteratura [31].

Nella presente coorte non si è rilevata una prevalenza di genere, come già riportato nella recente revisione sistematica effettuata dalla Movement Disorders Society (MDS) [4]. Inoltre non è stata rilevata alcuna prevalenza maschile o femminile tra sintomatici ed asintomatici.

Confrontando i dati ottenuti in questo lavoro rispetto a quelli di letteratura [4, 64], *SLC20A2* si conferma come il gene a maggior frequenza mutazionale in coorti di pazienti PFBC. Al secondo posto per frequenza mutazionale si colloca il gene *MYORG*, anche se nel presente studio la sua prevalenza è risultata più del doppio rispetto a quella riportata in letteratura (31% vs. 13%). La prevalenza di mutazioni del gene *PDGFB* in questo studio è risultata comparabile rispetto a quella riportata in letteratura (15% vs. 12%).

È possibile confrontare i risultati di penetranza clinica di questa tesi con quelli riportati in letteratura [4] per i geni *SLC20A2*, *MYORG* e *PDGFB*. Per gli altri 3 geni la rappresentanza campionaria è troppo bassa per trarre conclusioni. La penetranza clinica per *SLC20A2* si conferma intorno al 60% e la penetranza clinica per *MYORG* si conferma superiore all'85%. Per il gene *PDGFB* la penetranza clinica riportata in questo studio (75%) è risultata superiore rispetto a quella della letteratura (46%).

Grazie alla relativa numerosità di pazienti con genetica *MYORG* in questo studio, è stato possibile condurre un confronto delle loro caratteristiche con quelle riportate in letteratura.

Dei pazienti con disartria della nostra coorte, il 60% presenta genetica positiva per il gene *MYORG*. Si è indagata quindi una correlazione tra la presenza di disartria e la genetica *MYORG*, già riportata in letteratura [38]. Nella presente coorte di

pazienti la correlazione è risultata positiva e statisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) con  $OR = 21,8$  (al 95% IC compreso tra 3,2 e 147).

Valutando i casi che presentano calcificazioni pontine in SWI, il 50% presenta genetica positiva per *MYORG*. Nella nostra coorte di pazienti, tuttavia, non è possibile confermare un'associazione statisticamente significativa tra la calcificazione pontina centrale (considerata patognomonica) e la positività all'analisi genetica per mutazioni del gene *MYORG* [35] ( $p = 0.16$ ).

Valutando i casi che riportano atrofia cerebellare, il 31% presenta genetica positiva per *MYORG*. Si è voluta indagare quindi la correlazione tra la genetica *MYORG* e il reperto di atrofia cerebellare, già riportato in letteratura [38]. Anche nella nostra coorte tale correlazione è risultata statisticamente significativa ( $p = 0.02$ ).

Come altro reperto clinico caratteristico per genetica, si è voluta indagare la correlazione tra cefalea e la genetica *PDGFB*, riportata in letteratura [4]. Nel presente studio la correlazione non è risultata statisticamente significativa ( $p = 0.06$ ).

Dal presente studio è emersa una correlazione statisticamente significativa tra compromissione calcifica dei nuclei dentati in RM e genetica positiva ( $p = 0.03$ ). Questo risultato consente di affermare che il riscontro di calcificazioni dei nuclei dentati in RM, oltre alle calcificazioni dei gangli della base, possa fungere da criterio di selezione di pazienti da sottoporre a test genetico in modo prioritario. Le calcificazioni dei nuclei dentati in RM rappresentano un reperto dall'alto valore predittivo positivo per cui possono orientare nella selezione dei pazienti da inviare all'esecuzione del test genetico.

Soffermandosi sulla componente cerebellare, si è voluta indagare la compromissione calcifica dei nuclei dentati con la presenza di sintomatologia cerebellare. La correlazione è risultata statisticamente significativa ( $p = 0.03$ ), ma non così forte, indicando che la presenza di calcificazioni importanti del cervelletto è poco tollerata dal tessuto circostante e determina la presenza di segni cerebellari, ma la sola presenza di calcificazioni, di lieve entità, non è dirimente per la clinica. Il riscontro di calcificazioni a livello dei nuclei dentati in SWI quindi può fungere da fattore orientativo sia per la diagnosi che per il follow-up del paziente, in quanto

un aumento dell'entità delle calcificazioni nel tempo correla con un peggioramento della sintomatologia. Recentemente con l'impiego di RM ad ampio campo vi è stato riscontro di alterazioni di segnale a carico dei nuclei dentati in SWI con caratteristiche simili alle calcificazioni anche in pazienti con altra patologia o in soggetti sani, per cui una prospettiva futura potrebbe essere quella di confrontare le RM dei pazienti PFBC con controlli sani per definire il ruolo del coinvolgimento cerebellare nella patologia.

Di particolare interesse è stato condurre correlazioni tra sintomi extra-motori e il coinvolgimento cerebellare. Il ruolo extra-motorio del cervelletto è stato riconosciuto più ampiamente a partire dagli anni '90. In particolare l'articolo di Schahmann [65] esplora il ruolo cerebellare nel controllo non solo dei movimenti, ma anche delle funzioni cognitive, emotive ed autonome, identificando, oltre alle sindromi cerebellari motoria e vestibolare, la sindrome cognitivo- affettiva cerebellare (*cerebellar cognitive affective syndrome, CCAS*). I tratti distintivi di questa sindrome includono deficit nella funzione esecutiva, nell'elaborazione visiva dello spazio, nelle abilità linguistiche e nella regolazione degli affetti.

Valutando le funzioni cognitive, la correlazione tra compromissione dei nuclei dentati ed esiti al test MMSE non è risultata statisticamente significativa, mentre la correlazione con il test MoCa, più preciso, è risultata statisticamente significativa ( $p=0.01$ ). Questo risultato, oltre ad avvalorare la teoria del ruolo cognitivo del cervelletto, suggerisce che il test MoCa sia più sensibile nel descrivere le alterazioni del cognitivo rispetto al test MMSE, in particolare per quanto riguarda i pazienti con alterazioni cerebellari.

Valutando le funzioni emotive, la correlazione tra compromissione dei nuclei dentati e sintomatologia ansioso-depressiva (prevalentemente ansiosa nella nostra coorte di pazienti) è risultata statisticamente significativa ( $p=0.03$ ), avvalorando la teoria di Schahmann per la quale il cervelletto riveste un ruolo anche nel controllo delle funzioni emotive.

Si considerano ora le calcificazioni puntiformi bulbari che sono state identificate in più del 10% dei pazienti e nel 63% dei pazienti con genetica *MYORG* della nostra coorte. Questo reperto neuroradiologico non è mai stato riportato in letteratura e

un'attenta analisi in risonanza magnetica, con il sussidio di atlanti anatomici, ha permesso di avanzare l'ipotesi che le calcificazioni interessino la popolazione cellulare del nucleo del nervo ipoglosso, XII nervo cranico, rafforzando la già nota correlazione tra genetica *MYORG* e disartria. Da queste correlazioni non è possibile definire se le calcificazioni puntiformi siano un reperto da associare alla disartria o alla genetica *MYORG*, dati l'elevata prevalenza di disartria nei pz *MYORG* e la limitatezza campionaria di questo studio. Tuttavia la correlazione tra il reperto delle calcificazioni bulbari puntiformi e la disartria potrebbe essere avvalorata dal tipico riscontro di disartria nei pazienti con neurodegenerazione dei nuclei dei motoneuroni inferiori (MNI), compresi quelli che innervano la lingua (nervo ipoglosso, XII nervo cranico), la faringe e la laringe (nucleo ambiguo) ed i muscoli facciali (VII nervo cranico). Tale neurodegenerazione può verificarsi in caso di poliomielite bulbare, sclerosi laterale amiotrofica e altre patologie che interessano i MNI. [63]. In conclusione, è possibile affermare che le calcificazioni puntiformi, che potrebbero interessare il nucleo del nervo ipoglosso, possano peggiorare o elicitare la disartria. L'eventuale ampliamento della casistica in futuri studi potrebbe permettere di definire questo reperto neuroradiologico, la genetica sottostante e la correlazione clinica.

Oltre ai risultati incoraggianti ottenuti dal presente studio relativi alla migliore caratterizzazione dei pazienti con calcificazioni cerebrali, la risonanza magnetica cerebrale offre una serie di analisi di parametri morfologici e funzionali dell'encefalo (cortical thickness, quantificazione delle calcificazioni mediante QSM, valutazione dell'integrità della sostanza bianca, mediante tensore, valutazione delle reti neurali etc.), utili per meglio caratterizzare il coinvolgimento cerebrale nella PFBC.

In conclusione, questo lavoro si inserisce in un quadro di crescente attenzione globale rivolta alla malattia PFBC. Nonostante i limiti relativi alla numerosità campionaria, per cui sarà necessario in futuro integrare i risultati di questo lavoro con studi scientifici più ampi, l'obiettivo della presente tesi è quello di proporre la risonanza magnetica cerebrale come strumento di grande ausilio per i clinici nel percorso diagnostico ed assistenziale dei pazienti con sospetta o confermata PFBC. In letteratura non sono presenti studi specifici sull'impiego di RM nella descrizione



delle calcificazioni cerebrali, per cui questo lavoro di tesi si propone come studio pilota per indagini future più ampie in questo campo. La risonanza magnetica cerebrale, data la sua elevata sensibilità, potrebbe identificare anche calcificazioni precliniche e potrebbe rappresentare uno strumento di indagine valido per pazienti con genetica positiva ma ancora privi di calcificazioni in TC. A questi pazienti, che in fase preclinica possono essere anche giovani, può essere evitata la somministrazione di dosi radianti elevate, avvalendosi della RM al posto della TC.

## 6. 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. Liebaldt, 1964, Idiopathische (nicht arteriosklerotische) Verkalkungsvorgänge im Zentralnervensystem.
- 7) Delacour A (1850) Ossification des capillaires du cerveau. *Ann Med Psychol* 2:458–461
- 8) Bamberger, H., 1855. Beobachtungen und bemerkungen über 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, Ayrignac X, Lefaucheur R, Le Ber I, Frébourg T, Hannequin D, Champion 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 Á, Castro-Fernández C, Cubizolle S, Fogel BL, Goizet C, Jen JC, Kirdlar 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, Bonnevalle 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, Olasso 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, Botía 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.0000000000200001. 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, Champion 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 iPSC 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.