

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**Caracterização clínico genética e através de métodos avançados de neuroimagem das  
Paraparesias Espásticas Hereditárias**

HELENA FUSSIGER

Porto Alegre

2024

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**Caracterização clínico genética e através de métodos avançados de neuroimagem das  
Paraparesias Espásticas Hereditárias**

HELENA FUSSIGER

Orientador: Prof. Dr. Jonas Alex Morales Saute.  
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito  
parcial para a obtenção do título de doutora em Ciências  
Médicas.

Porto Alegre

2024

### CIP - Catalogação na Publicação

Fussiger, Helena  
Caracterização clínico genética e através de métodos avançados de neuroimagem das Paraparesias Espásticas Hereditárias / Helena Fussiger. -- 2024. 192 f.  
Orientador: Jonas Alex Morales Saute.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Paraparesias espásticas hereditárias. 2. Xantomatose cerebrotendínea. 3. SPG76. 4. Doenças relacionadas ao gene ENTPD1. 5. Tractografia. I. Morales Saute, Jonas Alex, orient. II. Título.

*“The final common path”*  
*This last link in the chain, e.g. the motor neurone . . . is the sole path which all impulses, no matter*  
*whence they come, must take if they are to act on the muscle-fibres to which it leads.*  
—Charles Sherrington ([1906](#), p. 117)

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, minha mãe, Neli C. S. Fussiger, meu pai, Lauro Fussiger, que inúmeras vezes ouviram minhas “lamúrias” e me ajudaram cuidando da minha filha para que pudesse escrever, além de serem os principais alicerces da minha formação, tanto pessoal quanto profissional. À minha amiga/irmã, Daniela Taffarel de Oliveira, que abdicou de vários de seus finais de semana, cuidando de sua afilhada, proporcionando-me horas para conseguir me dedicar a minha tese, presto meus agradecimentos.

Agradeço ao meu orientador, Dr Jonas Saute, que não desistiu deste trabalho após todo este tempo e me orientou com maestria e paciência. Também agradeço aos colegas do NeMUG, em especial a Diana Maria Cubillos, Gabriela Giordani, Samantha Brighente e Alice Hoefel, pelo incentivo a continuar com o trabalho e pela amizade.

Por fim, mas talvez o mais especial, agradeço ao meu marido, Pedro Henrique Rigotti Soares, que esteve ao meu lado este tempo todo, sempre me apoiando apesar de todo o cansaço pela carga de trabalho, nunca me deixando desistir, com uma paciência invejável. Jamais teria conseguido não fosse tua companhia. Também agradeço a minha filha, Angelina, que me motiva simplesmente por sua existência.

## RESUMO

**Introdução:** As paraparesias espásticas hereditárias (PEH) constituem um grupo de doenças neurodegenerativas monogênicas com grande heterogeneidade clínica e genética. Existem pelo menos 91 *loci* associados a essas doenças, que podem ser herdadas de forma autossômica dominante, autossômica recessiva, ligada ao X ou mitocondrial. A principal característica clínica das PEHs é a espasticidade dos membros inferiores, frequentemente acompanhada por hiperreflexia e sinal de Babinski. Clinicamente as PEHs são classificadas em formas não complicadas (ou puras) e em formas complicadas (PEH-C). Embora sejam condições raras, estudos populacionais recentes sugerem que sua prevalência é similar à de outras doenças neurológicas mais conhecidas, como as ataxias hereditárias e a esclerose lateral amiotrófica (ELA). No entanto, a epidemiologia dos subtipos mais frequentes de PEH na população brasileira e latino-americana ainda é limitada e precisa ser atualizada. Apesar de se entender que a principal característica clínica, a síndrome piramidal, ocorre devido à degeneração do trato corticoespinal (TCS), essa assertiva ainda não está completamente clara na literatura. Há a possibilidade de envolvimento de outros tratos no surgimento das manifestações da doença. Através de estudos com neuroimagem multimodal, como a tractografia, é possível realizar estudos *in vivo* das PEHs e buscar novos biomarcadores para futuros ensaios clínicos randomizados (ECR). **Métodos:** A partir da atualização de dados da coorte de pacientes com fenótipo de PEH acompanhados no ambulatório de neurogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) foi realizada análise molecular através de MLPA dos genes *SPAST* e *ATL1* em pacientes sem diagnóstico. Três subtipos específicos de PEH com epidemiologia peculiar em nossa população – xantomatose cerebrotendínea (CTX), SPG64 (ou desordens do neurodesenvolvimento relacionadas ao gene *ENTPD1* - *ENTPD1*-NDD) e SPG76 – foram detalhados através da busca de dados clínicos associados a outros centros do Brasil (CTX) e revisão sistemática da literatura (*ENTPD1*-NDD e SPG76). Pacientes com diagnóstico de SPG4, *ENTPD1*-NDD e SPG76, além de controles, realizaram tractografia do TCS, comparando os achados de fração de anisotropia (FA) e difusividade média entre os subtipos, controles e dados clínicos. **Resultados:** A atualização dos dados epidemiológicos mostrou que a SPG4 continua sendo a forma mais prevalente em nossa população e que a SPG7 é a forma autossômica recessiva mais comum. A CTX e a SPG76 representaram cada uma 6% do total de casos, e a *ENTPD1*-NDD foi responsável por 3% do total de casos. Não foram encontradas CNVs nos genes *SPAST* ou *ATL1*. O estudo multicêntrico de CTX descreveu 38 casos no Brasil, identificou três novas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas, e encontrou uma maior prevalência de manifestações neuropsiquiátricas e neuropatia desmielinizante. A revisão dos casos de *ENTPD1*-NDD do nosso centro revelou uma paciente com esplenomegalia, uma manifestação extraneurológica descrita pela primeira vez na literatura. A revisão

sistemática da literatura, que incluiu 39 casos, mostrou início mais precoce em pacientes com variantes de perda de função. A fraqueza e o sinal de Babinski, acompanhados de hipo ou arreflexia em muitos pacientes, sugerem um acometimento diferenciado do TCS e do trato corticoreticuloespinal (TCRE) nesses casos. A revisão sistemática de SPG76 incluiu 112 pacientes e mostrou a associação de início precoce com a presença de variantes *missense*, achados de hipersinal junto aos cornos occipitais dos ventrículos laterais como um achado de neuroimagem por ressonância nuclear magnética frequente, e uma variante mais comum com possível efeito fundador em nossa população. Os achados multimodais de tractografia mostraram uma correlação inversa entre os valores de FA do TCS e a duração da doença nos casos agrupados de PEH. **Conclusão:** Nosso estudo mostrou que as prevalências dos principais subtipos de PEH em nossa população são semelhantes às encontradas na população mundial, mas não foram detectadas CNVs nos genes *SPAST*, algo observado em outras populações. Descrevemos a maior série de casos de CTX no Brasil, e uma das maiores mundiais, proporcionando um melhor entendimento da evolução da doença, e relatamos pela primeira vez achados extraneurológicos nas *ENTPD1-NDD*. Publicamos a revisão mais abrangente de casos de SPG76 no mundo até o momento. Os resultados da tractografia sugerem que os valores de FA do TCS podem ser um biomarcador potencial da doença.

**PALAVRAS-CHAVE:** paraparesia espástica hereditária, CNV, SPG4, xantomatose ccerebrotendinea, CTX, *ENTPD1-NDD*, SPG64, SPG76, tractografia, trato corticoespinal, trato corticoreticuloespinal.

## ABSTRACT

**Introduction:** Hereditary spastic paraplegias (HSPs) constitute a group of monogenic neurodegenerative diseases with significant clinical and genetic heterogeneity. There are at least 91 associated *loci*, and these diseases can be inherited in an autosomal dominant, autosomal recessive, X-linked, or mitochondrial manner. The main clinical feature of HSPs is lower limb spasticity, often accompanied by hyperreflexia and the Babinski sign. Clinically, HSPs are classified into uncomplicated (or pure) forms and complicated forms (HSP-C). Although they are rare conditions, recent population studies suggest that their prevalence is similar to other more well-known neurological diseases, such as hereditary ataxias and amyotrophic lateral sclerosis. However, the epidemiology of the most frequent HSP subtypes in the Brazilian and Latin American populations is still limited and needs updating. Despite the understanding that the main clinical feature, pyramidal syndrome, occurs due to degeneration of the corticospinal tract (CST), this assertion is not yet fully clear in the literature. There is a possibility of involvement of other tracts in the onset of disease manifestations. Through multimodal neuroimaging studies, such as tractography, it is possible to perform *in vivo* studies of HSPs and seek new biomarkers for future randomized clinical trials (RCTs).

**Methods:** Based on updated data from a cohort of patients with the HSP phenotype followed at the neurogenetics clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), molecular analysis using MLPA of the *SPAST* and *ATL1* genes was performed in undiagnosed patients. Three specific HSP subtypes with peculiar epidemiology in our population – cerebrotendinous xanthomatosis (CTX), SPG64 (or neurodevelopmental disorders related to the *ENTPD1* gene - *ENTPD1-NDD*), and SPG76 – were detailed through the search for clinical data from other centers in Brazil (CTX) and systematic literature review (*ENTPD1-NDD* and SPG76). Patients diagnosed with SPG4, *ENTPD1-NDD*, and SPG76, as well as controls, underwent CST tractography, comparing findings of fractional anisotropy (FA) and mean diffusivity between subtypes, controls, and clinical data.

**Results:** The update of epidemiological data showed that SPG4 remains the most prevalent form in our population and that SPG7 is the most common autosomal recessive form. CTX and SPG76 each accounted for 6% of the total cases, and *ENTPD1-NDD* was responsible for 3% of the total cases. No CNVs were found in the *SPAST* or *ATL1* genes. The multicenter study of CTX described 38 cases in Brazil, identified three new pathogenic or likely pathogenic variants, and found a higher prevalence of neuropsychiatric manifestations and demyelinating neuropathy. The review of *ENTPD1-NDD* cases from our center revealed one patient with splenomegaly, an extraneurological manifestation described for the first time in the literature. The systematic literature review, which included 39 cases, showed an earlier onset in patients with loss-of-function variants. The characteristic weakness and Babinski sign with hypo- or areflexia in many patients suggested a differential involvement of the CST and corticoreticulospinal tract (CRST)

in these cases. The systematic review of SPG76 included 112 patients and showed an association of early onset with the presence of missense variants, hyperintense signal findings near the occipital horns of the lateral ventricles as a frequent magnetic resonance imaging finding, and revealed a more common variant with a possible founder effect in our population. The multimodal tractography findings showed an inverse correlation between FA values of CST and disease duration in grouped HSP cases. Conclusion: Our study showed that the prevalence of the main HSP subtypes in our population is similar to that found in the global population, but no CNVs were detected in the *SPAST* gene, something observed in other populations. We described the largest series of CTX cases in Brazil, and one of the largest worldwide, providing a better understanding of disease progression, and reported extraneurological findings in ENTPD1-NDD for the first time. We published the most comprehensive review of SPG76 cases in the world to date. The tractography results suggest that FA values of CST may be a potential biomarker of the disease.

**Keywords:** hereditary spastic paraplegia, CNV, SPG4, cerebrotendinous xanthomatosis, CTX, ENTPD1-NDD, SPG64, SPG76, tractography, corticospinal tract, corticoreticulospinal tract.

## **LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

**Figura 1:** fluxograma de seleção de artigos da revisão sistemática sobre tractografia do CST nas PEH

**Figura 2:** trato corticorreticuloespinal

**Tabela 1:** artigos que avaliaram o TCRE em pacientes com PEH

**Tabela 2:** artigos selecionados através de revisão sistemática sobre tractografia do CST nas PEH

## LISTA DE ABREVIATURAS:

ACM: artéria cerebral média  
AD: autossômica dominante  
AD: difusividade axial  
ADC: apparent diffusion coefficient  
AFD: apparent fiber density  
AR: autossômica recessiva  
AVE: acidente vascular encefálico  
bTRE: trato reticuloespinal bulbar  
CNV: copy number variations  
CTS: corticospinal tract  
CTX: xantomatose cerebrotendinea  
DSI: diffusion spectrum imaging  
DTI: diffusion tensor imaging  
DTT: diffusion tensor tractography  
ECR: ensaio clínicos randomizado  
ELA: esclerose lateral amiotrófica  
ENMG: eletroneuromiografia  
*ENTPD1*-NDD: neurodevelopment disorders related to *ENTPD1*  
FA: fração de anisotropia  
FBA: fixels-based analysis  
FC: entrecruzamento de fibras  
FD: densidade de fibras  
FDC: mapa de densidade e entrecruzamento de fibras  
FOD: fiber orientation density  
GFA: generalized fractional anisotropy  
HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
MD: difusividade média  
MD: difusividade média  
MEPs: motor evoked potentials  
MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification  
MPS: sequenciamento massivo paralelo  
PEH: paraparesias espásticas hereditárias  
PEH-C: paraparesia espástica complicada  
PEH-NC: paraparesia espástica não complicada  
PEM: potencial evocado motor  
pTRE: trato reticuloespinal pontino  
RD: difusividade radial  
RNM: ressonância nuclear magnética  
ROI: região de interesse  
rTMS: estimulação magnética transcraniana repetitiva  
SARA: Scale for Assessment and Rating of Ataxia  
SAS: startle acoustic stimulus  
SB: substância branca  
SBMA: atrofia muscular espinhal e bulbar

SC: substância cinzenta  
SPRS: spastic paraplegia rating scale  
TBSS: tract-based spatial statistic  
TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido  
TCR: trato corticorreticular  
TCRE: trato corticorreticuloespinal  
TCS: trato corticoespinal  
TER: trato reticuloespinal  
TFAS:tractwise fractional anisotropy statistics  
TUG: timed-up and go  
VBA: voxel-based analysis  
WES: whole exome sequencing  
WGS: whole genome sequencing  
10MWT:10 minutes walking test

**SUMÁRIO:**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	As paraparesias espásticas hereditárias (PEH).....	<b>15</b>
<b>2.1.1</b>	Aspectos clínicos.....	<b>15</b>
<b>2.1.2</b>	Fisiopatologia.....	<b>17</b>
<b>2.1.3</b>	Epidemiologia e aspectos moleculares.....	<b>21</b>
<b>2.2</b>	Subtipos específicos de PEH com peculiaridades em nossa população.....	<b>23</b>
<b>2.2.1</b>	Xantomatose Cerebrotendinea.....	<b>23</b>
<b>2.2.2</b>	<i>ENTPD1</i> -NDD / <i>SPG64</i> .....	<b>25</b>
<b>2.2.3</b>	<i>SPG76</i> .....	<b>26</b>
<b>2.3</b>	Biomarcadores nas PEH.....	<b>27</b>
<b>2.3.1</b>	Aspectos de RNM multimodal.....	<b>28</b>
<b>2.3.2</b>	Revisão sistemática de tractografia do trato corticoespinhal nas PEH.....	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>MAPA CONCEITUAL</b> .....	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
<b>5.1</b>	Objetivo geral.....	<b>38</b>
<b>5.2</b>	Objetivos específicos.....	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>ARTIGOS</b> .....	<b>55</b>
<b>7.1</b>	Artigo 1.....	<b>55</b>
<b>7.2</b>	Artigo 2.....	<b>63</b>
<b>7.3</b>	Artigo 3.....	<b>63</b>
<b>7.4</b>	Artigo 4.....	<b>63</b>
<b>7.5</b>	Artigo 5.....	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>PPERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>68</b>

## 1. INTRODUÇÃO:

As paraparesias espásticas hereditárias (PEH) constituem um grupo de doenças neurodegenerativas monogênicas, caracterizadas por axonopatias distais progressivas que afetam principalmente o trato corticoespinal (TCS) (Blackstone et al., 2011). Essas condições apresentam grande heterogeneidade clínica e genética, com pelo menos 91 *loci* associados (<https://omim.org/entry/620538>), e podem ser herdadas de forma autossômica dominante, autossômica recessiva, ligada ao X ou mitocondrial (Lo Giudice et al., 2014)(Schüle et al., 2016)(Wali et al., 2018). A fisiopatologia das PEH está relacionada a variantes genéticas que causam perda ou alterações na função de proteínas essenciais para o transporte de macromoléculas e organelas pelos axônios, remodelamento de microtúbulos e citoesqueleto, função mitocondrial, organização e formação do retículo endoplasmático liso e função lisossomal (Salinas et al., 2008)(Blackstone et al., 2011)(Awuah et al., 2024).

A principal característica clínica das PEHs é a espasticidade dos membros inferiores, acompanhada por hiperreflexia e sinal de Babinski. Também são comuns a fraqueza muscular crural, urgência/incontinência urinária e redução da sensibilidade vibratória distal nos membros inferiores (Fink, 2023). Clinicamente, as PEHs são classificadas em formas não complicadas ou puras (PEH-NC), nas quais apenas os achados piramidais e de sensibilidade vibratória são observados, e formas complicadas (PEH-C), onde os achados piramidais são acompanhados por disfunção de outros sistemas neurológicos ou sistêmicos (Harding, 1983). Embora sejam condições raras, estudos populacionais recentes sugerem que sua prevalência é similar à de outras condições neurológicas mais estudadas, como as ataxias hereditárias e a esclerose lateral amiotrófica (Ruano et al., 2014). A SPG4 é a forma mais frequente com herança autossômica dominante, enquanto a SPG11 e SPG7 são as formas mais comuns com herança autossômica recessiva (Ruano et al., 2014)(Burguez et al., 2017)(Awuah et al., 2024)(Schüle et al., 2016)(Ortega Suero et al., 2023). No entanto, a epidemiologia dos subtipos de PEH mais frequentes na população brasileira e latino-americana ainda é limitada e precisa de atualização.

Apesar dos avanços significativos no entendimento dos aspectos moleculares das PEH e das vias celulares envolvidas, a aplicação desses conhecimentos na busca por tratamentos modificadores da doença enfrenta um desafio crítico: a falta de clareza sobre quais desfechos clínicos e biomarcadores são mais adequados como desfechos relevantes para futuros ensaios clínicos randomizados (ECR). Por esse motivo, na última década, estudos têm explorado métodos multimodais de Ressonância Nuclear Magnética (RNM) em pacientes com PEH, tanto para auxiliar no diagnóstico diferencial quanto na identificação de novos biomarcadores. Destacam-se os estudos que utilizaram imagens por tensor de

difusão (DTI) e volumetria para avaliar pacientes com PEH. Alterações em diferentes regiões cerebrais e na medula espinhal, analisadas por parâmetros de DTI, espessura cortical e aferições de área medular, foram correlacionadas à gravidade motora da doença na SPG4 e SPG11(Rezende et al., 2015)(Lindig et al., 2015) e à gravidade das alterações cognitivas na SPG11 (Faber et al., 2018). No entanto, poucos estudos avaliaram especificamente o TCS através de tractografia nesse grupo de pacientes, especialmente no que diz respeito às correlações clínicas.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi atualizar os dados epidemiológicos das PEH na população do Rio Grande do Sul (RS) e no Brasil, detalhando aspectos clínicos e genéticos (incluindo a complementação de abordagens genéticas diagnósticas), a progressão até a incapacidade significativa, bem como achados qualitativos de neuroimagem nos subtipos de maior relevância para nossa população. Além disso, realizamos revisões sistemáticas de relatos e séries de casos para descrever essas condições em nível global. Por fim, avaliamos o envolvimento do TCS no desenvolvimento dos principais sinais clínicos das PEH, através de um estudo de tractografia cerebral por RNM, com foco neste trato, em subtipos puros e complicados, e em indivíduos controles.

Os resultados do presente estudo contribuem para um melhor entendimento e caracterização fenotípica e genética das PEH, com base em dados clínicos e de neuroimagem, especialmente nos subtipos com epidemiologia peculiar na nossa população. Além disso, os achados multimodais de RNM de crânio poderão ser avaliados como possíveis biomarcadores para PEH em estudos futuros. Ressaltamos que essas informações são fundamentais para o delineamento adequado de futuros ECR para terapias modificadoras dessas doenças. Atualmente, não estão disponíveis terapias curativas ou que modifiquem o curso progressivo das PEH. O delineamento adequado dos futuros ECR otimizará o processo de busca por tratamentos e, conseqüentemente, poderá acelerar a descoberta de terapias que melhorem o cuidado e a qualidade de vida dos indivíduos com PEH.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 As Paraparesias espásticas hereditárias:**

#### **2.1.1 Aspectos clínicos:**

As PEH são um grupo de doenças neurodegenerativas monogênicas caracterizadas por uma axonopatia distal progressiva que envolve principalmente os axônios mais longos do TCS(Blackstone et al., 2011). Há grande heterogeneidade clínica e genética com pelo menos 91 *loci* associados (<https://omim.org/entry/620538>)(Awuah et al., 2024), com padrões de herança que podem ser autossômicos dominantes, autossômicos recessivos, ligados ao X ou mitocondriais, mas casos

esporádicos por mutações *de novo*, genealogia desconhecida, mutações dominantes não-penetrantes ou filho único de parentesco não conhecido são comuns (Schüle et al., 2016). A classificação conforme padrão de herança, *locus* e/ou mutação causal iniciou na década de 90, sendo os *loci* denominados SPG e estes numerados respeitando a ordem de descoberta dos mesmos (Depienne et al., 2007) (Fink, 2013).

A primeira descrição desse grupo de doenças data de 1880, feita pelo neurologista Ernst Adolf Gustav Gottfried von Strümpell. Pouco depois, em 1898, Maurice Lorrain publicou estudos anatômicos e clínicos detalhados sobre essa condição (Faber et al., 2017). Após essas publicações, as PEHs também ficaram conhecidas como doença de Strümpell-Lorain. A principal característica clínica é a espasticidade dos membros inferiores, com hiperreflexia e sinal de Babinski. Também podem ocorrer fraqueza muscular crural, urgência/incontinência urinária e redução da sensibilidade vibratória distal nos membros inferiores. Os músculos mais acometidos são o quadríceps femoral, o tibial anterior e o iliopsoas (Lo Giudice et al., 2014). Os sintomas são menos evidentes (quando não nulos) nos membros superiores (Faber et al., 2014). No entanto, sabe-se que, além destes sintomas, existe uma grande variedade de apresentações fenotípicas. Por este motivo, em 1983, Harding sugeriu a classificação das PEHs em formas puras (sinais piramidais em membros inferiores isolados, distúrbios esfinterianos e perda de sensibilidade profunda, não excluindo casos com disdiadococinesia leve e amiotrofia em membros superiores) e complicadas (síndrome piramidal com algum outro sinal ou sintoma neurológico e/ou sistêmico adicional, como ataxia, crises epiléticas, declínio cognitivo, demência, amiotrofia, sinais extrapiramidais, neuropatia periférica e surdez; anormalidades visuais; alterações cutâneas, entre outros) (Harding, 1983). As formas puras geralmente são autossômicas dominantes, enquanto as complicadas são geralmente autossômicas recessivas (Coutinho et al., 1999).

A idade de início dos sintomas das PEH é bastante variável, mesmo dentro de um mesmo subtipo e/ou família, podendo ocorrer desde a infância precoce até a oitava década de vida (Awuah et al., 2024). As formas puras que começam na adolescência ou na vida adulta geralmente apresentam um curso lentamente progressivo. Em contraste, as formas que têm início na infância precoce costumam ter um quadro clínico geralmente estático (não progressivo) (Fink, 2023). As formas complicadas, em geral, manifestam-se em idades mais precoces e sua evolução é mais rápida, resultando em maior incapacidade e dependência funcional em comparação às formas puras (Schüle et al., 2016).

### **2.1.2 Fisiopatologia**

Como dito previamente, as PEHs pertencem a um grupo de doenças neurodegenerativas caracterizadas por uma axonopatia distal progressiva que envolve principalmente os axônios mais

longos do TCS. Fibras ascendentes (tratos espinocerebelares e fascículo grácil) também estão frequentemente envolvidos. Estes axônios são equipados com um complexo citoesqueleto de microtúbulos ao longo do qual proteínas motoras mediam o transporte seletivo de componentes (Blackstone, 2018). A maioria das proteínas codificadas pelos genes associados as PEHs caem em algumas categorias principais relacionadas ao funcionamento dos axônios: tráfego de membrana, transporte axonal, modelamento de organelas, mielinização, função mitocondrial/ estresse oxidativo, sinalização celular anormal na morfogênese de proteínas, metabolismo de lipídios, formação de vesículas, degradação de DNA, autofagia, desenvolvimento axonal(Blackstone, 2018)(Awuah et al., 2024).

Em uma publicação de 2014, Fink revisou os achados neuropatológicos até então conhecidos. Ele destacou que os principais achados são a degeneração axonal envolvendo o trato corticoespinhal lateral no funículo lateral da medula, sendo mais graves no nível torácico do que no cervical e, em alguns casos, chegando até a cápsula interna, além da redução de células de Betz. Embora danos mielínicos também sejam encontrados, eles são mais atribuídos à própria degeneração axonal. O acometimento do fascículo grácil também é prevalente. No entanto, o autor ressalta que a maioria desses estudos foi realizada em casos sem diagnóstico molecular de alguma PEH específica e que, como as PEH não reduzem a sobrevida dos pacientes, as publicações se referem a pacientes que apresentam alterações relacionadas ao processo de envelhecimento ou, até mesmo, a outras doenças neurodegenerativas. Além disso, ele discute a hipótese de que as PEH são axonopatias, considerando que fibras não tão longas também são acometidas e que variantes em genes relacionados a oligodendrócitos, e não a neurônios, também causam PEH(Fink, 2013). A partir de 2014, apenas um estudo com achados neuropatológicos em um paciente com SPG11, que faleceu aos 44 anos em decorrência de pneumonia, foi publicado. Na macroscopia da medula, foi vista atrofia mais marcada em raízes espinhais ventrais e medula torácica. Na microscopia, o TCS, o trato espinocerebelar posterior, cordão posterior (incluindo fascículo Grácil) e o funículo anterolateral mostraram redução da mielina e marcação axonal, assim como perda neuronal marcada e gliose no corno anterior da medula, núcleo de Onuff, coluna de Clarke e núcleos cranianos hipoglosso e facial. Em todos os núcleos cranianos motores, observaram-se inclusões eosinofílicas grosseiras. Nas pirâmides bulbares apresentavam atrofia e perda mielínica e axonal, enquanto os pedúnculos cerebrais tinham apenas um sulco mediano. No giro pré-central, havia moderada perda neuronal e gliose, com redução de fibras radiais com células de Betz muito atroficas (Hayakawa et al., 2022).

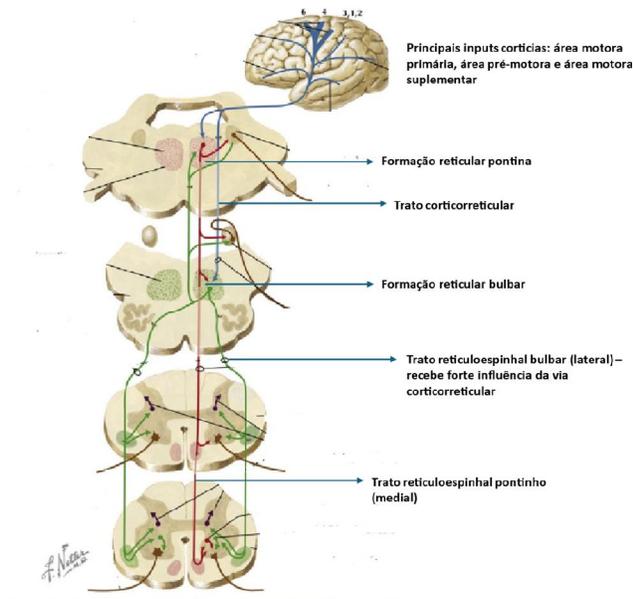
Apesar de os estudos neuropatológicos terem encontrado sinais de degeneração tanto do cordão lateral da medula a nível cervical, torácico e lombar, em ordem decrescente, quanto do tronco

encefálico, principalmente nas pirâmides bulbares, não há uma clara diferenciação entre quais tratos localizados nestas regiões estariam acometidos (Deluca et al., 2004) (Behan & Maia, 1974). Lesões do TCS são associadas à síndrome piramidal, ou de neurônio motor superior, que por sua vez é caracterizada por fraqueza e espasticidade, além dos sinais de hiperreflexia, clônus, sinal de Babinski e seus sucedâneos, Hoffmann, Rossolimo, entre outros (Campbell, 2013). No entanto, o quanto toda esta constelação de manifestações ocorre em decorrência apenas do acometimento do TCS é discutível em humanos, nos quais ainda indagamos sobre o papel das chamadas vias parapiramidais (aqui referentes aos tratos de origem tegumental com terminação espinal) (de Oliveira-Souza, 2012). Este termo foi descrito pela primeira vez em 1898, por Johann Pruss, ao perceber que lesões no TCS não inibiam manifestações epiléticas motoras (Lee & Muzio, 2024).

As principais vias parapiramidais são os tratos reticuloespinal, rubroespinal, vestibuloespinal e tectoespinal (Lee & Muzio, 2024). Tanto a anatomia como as funções destas diferentes projeções não são bem conhecidas em humanos, justamente pela dificuldade de avaliação *in vivo* destes sistemas. Por isso, muito do que se acredita atualmente foi baseado em estudos com animais. Em 2012, Oliveira-Souza, ao revisar evidências sobre as funções das vias parapiramidais em humanos, levantou a hipótese de que, como estas são apenas vestigiais na nossa espécie, diferentemente do observado em outros vertebrados, a síndrome piramidal seria sim explicada completamente por lesões corticoespinhais (de Oliveira-Souza, 2015). Esta afirmação é controversa, visto que evidências tanto em animais quanto em humanos sugerem que, principalmente o trato corticoreticuloespinal (TCRE) possa estar envolvido no desenvolvimento da espasticidade.

O TCRE é o mais importante trato parapiramidal, sendo fundamental para locomoção e postura. É composto de duas principais vias: a corticoreticular (TCR), que se origina principalmente no córtex pré-motor e termina na formação reticular no tronco encefálico (ponte e bulbo) e a reticuloespinal (TRE), que é dividida em duas porções, a medial ou pontinha (pTRE), que se origina na formação reticular pontina (nuclei pontis caudalis e oralis) e se projeta para a medula pelo funículo posterior ipsilateral até a porção ventromedial, onde estão presentes neurônios motores alfa e gama de músculos extensores (une-se ao fascículo longitudinal medial e envia fibras ao corno anterior da medula pela fissura ventral), e a dorsal/lateral, ou bulbar (bTRE), que se origina na formação reticular bulbar (*nucleus gigantocellularis*), cruzando imediatamente a linha média e ocupando uma posição medial em relação ao *genu* interno facial e ao ângulo olivestiforme onde entra no trato tegumentar central e se projeta aos neurônios motores via funículo lateral da medula, mas de forma bilateral (Caminero & Cascella, 2024) (Yeo et al., 2012) (Lee & Muzio, 2024). O pTRE recebe fraca influência cortical (recebe principalmente informações sensoriais trigeminais e somatossensoriais), tendo ação

excitatória nos reflexos espinais extensores, enquanto que o bTRE é altamente modulado por *inputs* facilitadores do córtex motor e área motora suplementar e pré-motora (Netter's Atlas of Neuroscience, 2016), que por sua vez suprime os reflexos espinais extensores e facilita os flexores (D. Wang, 2009)(Boyne et al., 2022)(Li et al., 2019) (figura 2). É importante lembrar que além da influência do corticoreticular, o trato reticuloespinal também recebe influências de colaterais do trato corticoespinal.



**Figura 2:** vias corticoreticuloespinhais (adaptado de Netter's Atlas of Neuroscience, 2016).

Para estudar o trajeto do TCR, em 2012, Yeo et al usou imagens de tractografia de 24 sujeitos saudáveis, colocando a região *seed* na formação reticular do bulbo e duas outras áreas de interesse (ROI): tegumento do mesencéfalo e o cortex pré-motor (area 6 de Brodmann). Para confirmar os limites da formação reticular usaram o trato espinotalâmico (bulbo posterolateral) e o leminisco medial (bulbo anteromedial) como referências, com o ROI alvo localizado no cortex somatossensorial. Para comparar o trajeto do TCR com o do TCS, os ROI foram colocados nas pirâmides bulbares e no cortex motor primario. O trajeto encontrado foi: origem no cortex pre-motor, seguindo pela coroa radiada, braço posterior da capsula interna (anterior ao TCS), passando pelo tegumento mesencefalico na direção posteromedial, formação reticular pontina e, então, na formação reticular pontobulbar (Yeo et al., 2012). Em 2015, Jang e Seo avaliaram 33 sujeitos saudáveis com tractografia também com o intuito de descrever a localização desta via. Aqui utilizaram também a colocação do ROI *seed* na formação reticular pontobulbar, o primeiro ROI alvo no tegumento mesencefalico e o

segundo na áreas 6 de Brodmann. Viram que a via é localizada anteromedialmente ao corticoespinhal no centro semioval, coroa radiada e braço posterior da capsula interna, com uma distância média entre as duas vias de 6-12mm(Jang & Seo, 2015).

Para o entendimento da funcionalidade deste trato em humanos, vários estudos utilizaram como modelo pacientes com paralisia supranuclear progressiva (PSP), por ser uma doença que cursa com degeneração da formação reticular e consequentemente do TRE, e com acidente vascular encefálico (AVE). Através de neurofisiologia, pelo estudo do reflexo *startreact* após emissão de estímulo acustico de *startle* (SAS), pode-se demonstrar que provavelmente as estruturas corticais exercem uma função inibitória sobre este trato romboencefalico, ao encontrarem redução deste reflexo na PSP e exacerbação em pacientes com AVE em território de artéria cerebral média (ACM) (Rothwell et al., 1994)(Voordecker et al., 1997). Além disso, durante a recuperação motora após isquemia cerebral, nas fases espásticas (fases 2 a 5 de Brunnstrom), os pacientes apresentam SAS exacerbado, enquanto nas fases de flacidez e de recuperação, há normalização ou redução do mesmo(Li et al., 2014). Chen et al também demonstraram aumento da atividade motora de overflow (ativação de musculatura sinérgica no hemicorpo hemiparetico após tarefa motora no lado não lesionado) em pacientes após AVE, principalmente nos com maior espasticidade(Y. T. Chen et al., 2018). Estas evidências sugerem que o TCR estaria envolvido na manifestação clínica de espasticidade, principalmente pela perda da inibição central que ocorre em condições normais(Y. T. Chen et al., 2019). Uma série de estudos sobre a integridade do reflexo de *startle* após emissão de SAS em pacientes com PEH puras levantou a hipótese de que, nestes pacientes, que apresentam importante espasticidade, há preservação do TRE (**tabela 1**). Conseguiram mostrar que, em tarefas motoras de ativação oligo articular, o SAS normalizava a velocidade de execução das tarefas. No caso de tarefas multiarticulares, como a caminhada, viram que a ativação excitatória (tibial anterior) era exacerbada, mas não a inibitória (soleo), sugerindo talvez diferentes integridades dos tratos reticuloespinhais dorsais versus mediais (van Lith et al., 2018). Como o principal segmento ativado através do SAS é o pTRE, seria principalmente esta porção, que cursa na medula localização mais afastada do CST (diferentemente do bTRE) e que tem principalmente atividade excitatória, a mais envolvida na exacerbação do reflexo de estiramento.

**Tabela 1:** estudos que avaliaram a integridade do TCRE em pacientes com PEH

	<b>Sujeitos</b>	<b>Métodos</b>	<b>Resultados</b>
<b>Lith et al, 2018</b> (van Lith et al., 2018)	PEH pura AD (n=12)	Efeito <i>StartReact</i> após SAS, associando dados de ENMG	Efeito igualava achados da ENMG dos pacientes ao dos controles após emissão de SAS

<b>Nonnekes et al, 2014</b> (Nonnekes et al., 2014)	PEH pura AD (n=12, sendo 4 SPG4 e 1 SPG8)	Efeito <i>StartReact</i> após SAS, associando dados de ENMG	Efeito igualava achados da ENMG dos pacientes ao dos controles após emissão de SAS
<b>Fisher et al, 2013</b> (Fisher et al., 2013)	SPG31 (n=2)	PEM e efeito <i>StartReact</i> após SAS, associando dados de ENMG	Aumento da resposta do TCRE em membros superiores de paciente PEM alterado, apesar de clínica normal
<b>Nonnekes et al, 2013</b> (Nonnekes et al., 2013)	PEH pura AD (n= 18, sendo 11 SPG4, 1 SPG8 e 1 SPG3A)	Efeito <i>StartReact</i> após SAS e <i>pull test</i> , associando dados de ENMG	Respostas posturais do tibial anterior e reto femoral normalizavam após SAS <i>StartReact</i> no <i>pull test</i> , enquanto estavam alteradas sem o estímulo SAS

PEH: paraparesia espástica hereditária

AD: autossômica dominante

ENMG: eletroneuromiografia

PEM: potencial evocado motor

SAS: *startling acoustic stimulus*

### 2.1.3 Epidemiologia

Os dados mais recentes sobre a prevalência global da doença foram estimados por Ruano et al, em 2014, através de revisão sistemática, chegando ao valor de 4,4:100.000 habitantes entre Europeus, japoneses e em países do norte da África (Ruano et al., 2014). Este artigo mostrou que o subtipo mais frequente de PEH é a SPG4, de herança autossômica dominante, que representa entre 37-46% dos casos com herança dominante na Europa, e que entre as PEH de herança autossômica recessiva (PEH-AR), a SPG11 é descrita como a forma mais frequente (entre 15-21% dos casos). Desde então, estudos sobre dados epidemiológicos foram publicados referentes a diferentes regiões geográficas: Suero et al, em 2019, estimaram prevalência na Espanha de 2,24/100.000 (0,93 para formas AD e 0,43 para AR), mostrando que o subtipo AD mais comum era SPG4 (64% dentre os casos AD e 26,7% do total de casos), seguido da SPG17, e o subtipo AR mais frequente era a SPG7 (51,8% dentre os casos AR e 19% do total da amostra), seguida de SPG11 (Ortega Suero et al., 2023). Um estudo em Mali avaliou 10 casos-índice com fenótipo de PEH após *survey* em 170 pacientes com quadro neurodegenerativos, encontrando diagnóstico molecular, até então, em três famílias, de SPG10, SPG11 e SPG35.(Diarra et al., 2023). Em 2022, Péric et al avaliou 65 pacientes índice com diagnóstico de PEH de início adulto através de painel de 13 genes (incluindo análise por *multiplex ligation-dependent probe amplification* – MLPA - para SPG4, SPG11 e SPG7), chegando ao diagnóstico molecular em 75% das famílias de herança AD e 25% das AR, sendo os subtipos mais comuns a SPG4, seguida de SPG11 e SPG7.(Perić et

al., 2022). Em 2021, Salem et al avaliou pacientes canadenses, incluindo 100 casos-índice adultos com fenótipo de PEH, chegando a prevalência, com confirmação molecular, de 4,1/100000, igualmente distribuída entre herança AD e AR, sendo a SPG4 a forma AD mais comum (seguida de SPG3A) e a AR mais comum foi a SPG7, seguida da SPG11(Haj Salem et al., 2021). Schiavone et al estudou 47 casos de PEH pediátrica na Itália, encontrando maior prevalência de SPG3A nesta população(Schiavoni et al., 2020). Kadnikova et al, avaliou 69 famílias de PEH AD e 53 esporádicas, através de painel de genes e incluindo análise por MLPA, chegando ao diagnóstico de SPG4 em 30% da amostra, seguida de SPG3A.(Ryzhkova et al., 2022). O consorcio japonês (JASPAC) também mostrou maiores prevalências de SPG4, seguida de SPG3A, SPG31, SPG11 e SPG10(Koh et al., 2018). Estudo húngaro, de 2016, avaliou 58 pacientes, chegando ao diagnóstico molecular em 20 destes, com a forma mais comum sendo SPG4, seguida de SPG7(Balicza et al., 2016). Em 2016, Schule et al, avaliaram 519 famílias com diagnóstico de PEH (43% AD, 10% AR e 47% esporádicos), através de sequenciamento massivo paralelo (MPS) e MLPA chegando ao diagnóstico molecular em 46% dos casos, com a SPG4 sendo a forma mais comum, principalmente nos casos com herança AD, seguida de SPG3A, e as famílias AR com principal diagnóstico sendo a SPG7, seguida de SPG11 e SPG5(Schüle et al., 2016). Na Grécia, a forma AD mais comum também é a SPG4, mas seguida de SPG30, e as AR são SPG11 e xantomatose cerebrotendínea (CTX)(Lynch et al., 2016). Na Toscana, SPG4 e SPG7 também foram as formas mais comuns(Orsucci et al., 2014).

Dados referentes ao Brasil datam de 2014, em estudo colaborativo no país que mostrou que variantes no *SPAST/SPG4* foram responsáveis por 35% dos casos de PEH-NC (M. C. J. França et al., 2014). Estudo realizado no Rio Grande do Sul em 2017 por nosso grupo de pesquisa, também apresentou a SPG4 como responsável por 60% dos casos de PEH com herança claramente autossômica dominante e a SPG11 representando 26,3% dos casos de PEH-AR atendidos no estado, seguida da SPG7 e SPG5, diagnosticadas em 10,5% e 5,2% das famílias (Burguez et al., 2017). Em 2021, foi conduzido no Brasil um estudo multicêntrico na busca de dados epidemiológicos de casos pediátricos de PEH (106 indivíduos de 83 famílias). A SPG4 foi a forma mais comum diagnosticada, seguida de SPG3A e SPG11(Giordani et al., 2021).

A atualização dos dados epidemiológicos das PEH após 2014 (data da revisão sistemática de Ruano e colaboradores), momento em que o uso do MPS se tornou mais disseminado para o diagnóstico de PEH, sugere que a SPG7 seria mais a forma mais prevalente de PEH com herança AR em algumas populações. Além disso, alguns estudos, acima descritos, avaliaram os pacientes através de MPS e por MLPA, encontrando casos de SPG4 e SPG3A causados por variações no número de cópias (CNVs), sendo que esta técnica não foi utilizada na investigação dos casos em nenhuma das coortes brasileiras,

motivando uma atualização dos nossos dados epidemiológicos incluindo a busca de CNVs nos genes *SPAST* e *ATL1* por MLPA.

O **Artigo 1** da presente tese, que será apresentado mais adiante, descreve revisão sistemática da literatura sobre diagnóstico molecular de SPG4 e SPG3A através de investigação por MLPA, atualiza os dados epidemiológicos da coorte do Rio Grande do Sul e investiga presença de CNVs nos genes *SPAST* e *ATL1*. Desta forma, optamos por não colocar a revisão sistemática de forma repetida na revisão da literatura da tese. Após a conclusão deste primeiro estudo, foi observado que dois subtipos raros de PEH ao redor do mundo, a SPG76 e CTX, representavam 6% do total de famílias, uma frequência similar a SPG11. Além disso auxiliamos na descrição da associação gene fenótipo de outro subtipo, presente em 3% dos casos índices, os distúrbios do desenvolvimento relacionados ao gene *ENTPD1*, ou SPG64 (*ENTPD1*-NDD/SPG64), que apesar de ultra-rara tem achados clínicos atípicos, como a presença de fraqueza muscular e sinal de Babinski, acompanhada de arreflexia e tônus normal ou diminuído. A ausência de neuropatia periférica, sugere que os achados da condição devam estar relacionados a envolvimento exclusivo do TCS, parte da via ortopiramidal, ou de envolvimento do TCS acompanhando de alterações de desenvolvimento dos tratos reticuloespinhais, em especial o medial (pontino), impedindo o aparecimento de espasticidade e hiperreflexia que em geral ocorrem devido a efeito compensatório deste trato quando há lesões no CST. A discussão sobre a participação do TCS e das vias parapiramidais no desenvolvimento das manifestações clínicas das PEH, sejam subtipos geralmente puros, ou complicados, fez com que buscássemos entender melhor o envolvimento de tais tratos *in vivo* através de RMN.

## **2.2 Subtipos específicos de PEH com peculiaridades em nossa população:**

### **2.2.1 Xantomatose cerebrotendínea**

A Xantomatose Cerebrotendinosa (CTX) é uma rara desordem autossômica recessiva de armazenamento de lipídios relacionada às vias de biossíntese de ácidos biliares, causada por variantes patogênicas bialélicas no gene *CYP27A1*, que codifica a esteroide 27-hidroxiase, uma enzima do sistema de oxidação do citocromo P450 com um papel importante no metabolismo do colesterol e na síntese de ácidos biliares (Nóbrega et al., 2022). A atividade reduzida dessa enzima devido a variantes de perda de função leva a uma formação aumentada e armazenamento de conteúdo lipídico anormal, consistindo principalmente de colestanol, em vários tecidos, especialmente tendões, cristalino e sistema nervoso periférico e central (Islam et al., 2021). Apesar de ser considerada rara, a CTX foi recentemente reconhecida como uma doença consideravelmente subdiagnosticada, um fato que

pode estar relacionado a uma clínica altamente heterogênea com grande variação de sintomas, gravidade e idades de início(Appadurai et al., 2015).

As manifestações típicas incluem xantomas tendinosos, sintomas neuropsiquiátricos progressivos, catarata, osteoporose e doença coronariana(Nóbrega et al., 2022). As perturbações neurológicas compreendem neuropatia periférica, sinais piramidais (como paraparesia espástica), ataxia cerebelar, comprometimento cognitivo e distúrbios do movimento(Islam et al., 2021)(Koyama et al., 2021). Na infância e adolescência, as principais descobertas são catarata juvenil bilateral, diarreia crônica e deficiência intelectual(Appadurai et al., 2015). Uma das primeiras manifestações da CTX é a icterícia colestática neonatal, uma condição que, embora autolimitada e não complicada na maioria dos casos, ocasionalmente progride para uma forma grave com necessidade de transplante de fígado e alta letalidade(Stelten et al., 2021). O fenótipo neurológico clássico se apresenta com sintomas neurológicos e psiquiátricos relacionados ao córtex cerebral, cerebelo e/ou tronco cerebral, com várias manifestações sistêmicas típicas, enquanto o fenótipo espinhal é caracterizado por sinais de envolvimento do trato corticoespinhal e coluna dorsal da medula espinhal sem outras síndromes neurológicas no momento da apresentação espinhal(Koyama et al., 2021). O terceiro fenótipo é o fenótipo não neurológico. A xantomatose cerebrotendínea é uma condição importante de reconhecer devido à possibilidade de tratamento com ácido quenodesoxicólico (CDCA), que inibe o acúmulo de colestanol, reduzindo a produção de ácidos biliares(Haj Salem et al., 2021). O tratamento visa estabilizar a progressão das manifestações neurológicas, mas também pode levar à melhora dos sintomas em alguns pacientes, especialmente quando iniciado precocemente no curso da doença(Stelten et al., 2021). Atualmente, a prevalência de CTX nos Estados Unidos foi estimada entre 1:72.000 e 1:150.000, e a frequência da doença entre pacientes de Israel foi estimada em 6 por 70.000(Pramparo et al., 2023). Esses números provavelmente estão subestimados devido ao subdiagnóstico. No entanto, há poucas séries de casos e estudos observacionais incluindo um número significativo de pacientes latino-americanos, tornando esta uma população notavelmente subrepresentada. Além disso, embora a ataxia seja geralmente considerada a principal alteração da marcha apresentada por pacientes com CTX, achados piramidais são mais frequentes do que sinais cerebelares e casos de xantomatose espinhal, às vezes caracterizada como formas puras de paraparesia espástica, têm sido relatados na literatura (Nóbrega et al., 2022). Desde o relato do nosso grupo de Burguez et al., que encontrou casos de CTX entre pacientes com PEH complicada investigados com painel de genes por MPS (em que o gene relacionado a CTX foi incluído devido a um relato de caso local da xantomatose espinhal –(Saute et al., 2015) - sem haver esta suspeita prévia), o nosso centro tem realizado a triagem de *CYP27A1* na investigação de pacientes com suspeita de PEH.

Consideramos a CTX como um subtipo de PEH e consideramos o fenótipo de PEH complicada como o fenótipo neurológico principal desta condição.

No **artigo 2**, apresentamos uma coorte brasileira multicêntrica de pacientes com CTX, destacando seu fenótipo clínico (incluindo progressão para incapacidade significativa), variantes genéticas recorrentes e analisando possíveis correlações genótipo-fenótipo.

### **2.2.2      *ENTPD1-NDD/SPG64***

A *ENTPD1-NDD/SPG64* foi descrita em 2014 por Novarino et al (Novarino G, Fenstermaker AG, Zaki MS, 2014) após realizar sequenciamento completo do exoma em 55 famílias com fenótipo de PEH-AR e encontrar dois casos índices, de fenótipos complexos, com variantes em homozigose no gene *ENTPD1*. Desde então poucos casos haviam sido descritos na literatura, sendo o gene considerado como de significado incerto (GUS, da sigla do inglês). Em 2022 foi publicada a maior serie de casos, com revisão dos casos anteriormente descritos (D. G. Calame et al., 2022)(D. Calame et al., 2021) e confirmando a associação gene-fenótipo, tendo sido incluídas quatro casos de três famílias do Rio Grande do Sul com esta condição. A partir de então o fenótipo complexo desta enfermidade começou a ser mais bem delineado como uma condição de início muito precoce, caracterizado por atraso ou regressão de neurodesenvolvimento, associado a deficiência intelectual e sinais de acometimento de neurônio motor superior e, por vezes, inferior. O autor sugeriu então a denominação distúrbios do neurodesenvolvimento relacionados ao gene *ENTPD1* (*ENTPD1-NDD*). Além disso, a presença de sinais de hipomielinização na ressonância nuclear magnética (RNM) de crânio, principalmente no braço posterior da cápsula interna, atrofia cerebelar e de corpo caloso foram descritas em uma parcela expressiva dos casos(D. G. Calame et al., 2022). O gene *ENTPD1* codifica proteína da membrana plasmática que hidrolisa adenosina difosfato (ADP) e adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato (AMP), chamada ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1, que modula a sinalização por receptores P2 ao controlar as concentrações extracelulares de nucleotídeos (Munkonda et al., 2007). Um possível mecanismo associado as manifestações da doença estaria relacionado com a ação dos nucleosídeos na neuroplasticidade e desenvolvimento cerebral (Thauerer et al., 2012). Como já dito, na descrição dos pacientes com *ENTPD1-NDD/SPG64* realizada por Calame et al em 2022, quatro pacientes femininas de três famílias provenientes do nosso estado foram descritas. Naquele momento, o fenótipo apresentado por estas pacientes era superponível aos encontrados nos outros casos, ou seja, apenas com manifestações neurológicas, tanto que, em sua discussão, os autores questionam o porquê da falta de sintomas sistêmicos tendo em vista função celular da proteína, sua expressão ubíqua e modelos animais com perda de função do *ENTPD1* mostrando distúrbio de

homeostase, disfunção plaquetária e resistência insulínica hepática(D. G. Calame et al., 2022). No entanto, recentemente, uma das nossas pacientes cursou com esplenomegalia, necessitando de esplenectomia.

Dessa forma, no **artigo 3** descrevemos o caso desta paciente, atualizamos os dados das outras três pacientes, incluindo novas neuroimagens, e realizamos uma busca na literatura procurando novos casos descritos de *ENTPD1-NDD/SPG64* para averiguar a descrição de sintomas extraneurológicos e descrever curvas de sobrevida livre de incapacidade.

### **2.2.3 SPG76**

A SPG76 é uma forma ultrarrara de PEH descrita por Gan-Or et al (Gan-Or et al., 2016) em 2016, concomitantemente com Wang et al (Y. Wang et al., 2016), que relataram sete casos índice (oito sujeitos de três famílias e cinco sujeitos de quatro famílias, respectivamente) da doença. O quadro descrito foi de uma PEH de herança autossômica recessiva de início tardio que se manifesta com os achados vistos nas formas puras, mas frequentemente também com ataxia de marcha, disartria, dismetria e outros achados cerebelares(Gan-Or et al., 2016)(Y. Wang et al., 2016). A primeira descrição da SPG76 no Brasil foi feita em 2018, em que 12 pacientes de 04 famílias, 3 da região sudeste e 1 do Rio Grande do Sul, foram descritos, após terem sido diagnosticados por sequenciamento completo do exoma(Melo et al., 2018).

A SPG76 é causada por variantes patogênicas bi-alélicas no gene *CAPN1* (Y. Wang et al., 2016)(Gan-Or et al., 2016), que codifica a proteína calpaína-1, um membro da família de proteases de cisteína ativadas por cálcio principalmente expressas no sistema nervoso central (SNC), juntamente com a calpaína-2. A calpaína-1 é a subunidade catalítica da  $\mu$ -Calpaína, que interage com uma pequena subunidade reguladora, chamada CAPNS1, e forma um complexo heterodimérico convencionalmente chamado de  $\mu$ -Calpaína (Rahimi Bidgoli et al., 2021). Estudos prévios de calpaína-1 em *C. elegans* mostraram que a redução da expressão dos ortólogos de *CAPN1* levou à paralisia associada à degeneração dos neurônios motores (Gan-Or et al., 2016). Em *zebra-fish* (*Danio rerio*), a redução da expressão de *CAPN1* foi associada à desregulação de microtúbulos e do desenvolvimento cerebral, possivelmente causada por alterações na acetilação da tubulina, que está associada à fragilidade e degeneração dos microtúbulos(Gan-Or et al., 2016). Em modelos mamíferos knockout de *Capn1*, a calpaína-1 foi necessária para a maturação e manutenção de axônios, bem como para a plasticidade sináptica(Rahimi Bidgoli et al., 2021).

O **artigo 4** descreve os achados clínicos dos pacientes com SPG76, associando com as apresentações encontradas nos estudos até então descritos sobre esta condição. A revisão sistemática de casos de SPG76 reportados na literatura encontra-se no artigo.

### **2.3 Biomarcadores nas PEH**

O termo biomarcador refere-se a um indicador objetivo relacionado a um estado de saúde. Estes podem ser utilizados tanto para auxiliar no diagnóstico quanto para o acompanhamento da evolução da doença e avaliação de resposta a alguma terapêutica. Nas PEH, alguns biomarcadores já foram estudados, sendo a escala clínica SPRS (*Spastic Paraplegia Rating Scale*) o desfecho de avaliação clínica mais utilizado nos estudos (Siow et al., 2023). Outras escalas utilizadas foram SPATAX-EUROSPA, SARA (*Scale for Assessment and Rating of Ataxia*), ALSFRS-R (*Amyotrophic Lateral Sclerosis rating scale revised*). Mesmo as escalas clínicas sendo, como grupo, as mais utilizadas como biomarcadores nas PEH, estudos longitudinais são escassos, sendo que apenas um mostrou sensibilidade para detectar eficácia de intervenção (Paparella et al., 2020), quando combinando toxina botulínica com fisioterapia (a maior parte usou a escala para comparar com outros biomarcadores em estudo). Vale ainda ressaltar que Cubillos-Arcila et al (Cubillos-Arcila et al., 2022), após 18 meses de acompanhamento, não conseguiu demonstrar sensibilidade a mudança da SPRS ou de testes de desempenho (10MWT (*10 minutes walking test*), 6MWT (*6 minutes walk test*) e TUG (*Timed-Up and Go*). Em estudo subsequente, foram observadas mudanças nos testes de desempenho após 3 anos, e mudanças na SPRS apenas após 4,5 anos de follow-up (Cubillos Arcila et al., 2023). Alguns estudos com potencial evocado motor, sensitivo, visual e de tronco e eletroneuromiografia já foram realizados, correlacionando os achados com a severidade da doença, mas não de forma longitudinal (Brighente et al., 2021). Questionários sobre qualidade de vida, como SF-36 (*Short Form Health Survey-36*) e EQ-5D (*EuroQoL-5 Dimensions*), BDI-V (*Beck Depression Inventory*), *Zung depression score*, *brief pain inventory*, *modified fatigue impact scale and multidimensional fatigue inventory* também já foram avaliados, porém sem conseguir mostrar diferença entre pacientes e controles de forma consistente (Siow et al., 2023). Com relação a biomarcadores molhados, os neurofilamentos de cadeia leve, tanto séricos quanto líquóricos, conseguiram diferenciar casos de controles, mas a correlação com a SPRS permanece incerta (Siow et al., 2023). Para SPG5, os marcadores 25 e 27-hidroxicolesteróis mostraram sensibilidade a intervenção (Schöls et al., 2017).

Avaliação de volumetria e DTI de encéfalo e medula parecem ter correlação com a SPRS e conseguir diferenciar pacientes de controles, mas dados consistentes longitudinais também são escassos na literatura, com evidência apenas para formas específicas (Sarret et al., 2016). Dessa forma, fica claro que a busca por biomarcadores de mais fácil acesso, menor custo, com menor probabilidade de viés

de aferição e que sejam sensíveis para detectar a progressão da doença, e conseqüentemente possam ser utilizados para avaliar a resposta a possíveis terapias é fundamental.

### **2.3.1 Aspectos de Ressonância Nuclear Magnética multimodal**

A neuroimagem por ressonância nuclear magnética (RNM) é uma importante ferramenta para avaliar o sistema nervoso central *in vivo*. A RNM possibilita obter imagens anatômicas e funcionais tridimensionais, quantitativas e de forma não-invasiva sem exposição à radiação ionizante. Neste sentido, a MRI tem sido usada largamente para identificar estruturas cerebrais envolvidas em doenças neurológicas, no neurodesenvolvimento e no processo de envelhecimento.

As imagens de RNM baseiam na propriedade física de mesmo nome, ressonância magnética, a qual é exibida por núcleos de determinados elementos que, quando submetidos a um campo magnético forte e excitados por ondas de rádio em determinada frequência (frequência de Larmor), emitem um radiossinal que pode ser captado por uma antena e transformado em imagem (Duning et al., 2010) (Hage & Iwasaki, 2009). O hidrogênio é considerado o núcleo adequado para obtenção de imagens por ser o mais abundante nos tecidos e ter maior momento magnético. Quando o paciente é posicionado no interior do magneto e fica sob ação de um campo magnético, os prótons de hidrogênio irão se orientar de acordo com a direção do campo aplicado. A interação dessa magnetização tissular intrínseca com as propriedades físicas e químicas do meio que envolve o núcleo excitado e com as propriedades magnéticas de outros núcleos que conferirão as diferentes intensidades de sinal vistas nas sequências convencionais de RNM, as constantes de tempo T1 e T2, diferenciando substância branca (SB), substância cinzenta (SC), líquido, tecido adiposo, ossos etc. (Hage & Iwasaki, 2009).

#### *Imagens ponderadas por difusão*

A difusão é um processo físico caracterizado pelo movimento translacional randômico das moléculas em uma solução (movimento Browniano). Este movimento é influenciado pelo peso molecular, interações intermoleculares e temperatura do meio. Várias barreiras também influenciam a mobilidade das moléculas ao criar vários compartimentos (intracelular, extracelular, neurônios, células gliais e axônios). O coeficiente de difusão aferido nas imagens por tensor de difusão (DTI) na RNM (chamado de ADC – *apparent coefficient diffusion*) leva em consideração as interações da molécula difusível, na maioria das vezes água, com estruturas celulares em um determinado tempo (Beaulieu, 2002) (Alexander et al., 2007). Em um líquido puro, onde não há obstáculos para a difusão ou onde as barreiras não são coerentemente orientadas, a difusão é a mesma em todas as orientações, sendo

chamada de difusão isotrópica. Já em uma amostra onde há barreiras, a difusão é anisotrópica (Beaulieu, 2002) (Alexander et al., 2007). Na SB cerebral, pelas observações de importantes variações de ADC, propõe-se que as moléculas de água se difundem ao longo dos axônios, aprisionadas por barreiras como a bainha de mielina (difusão anisotrópica). Já a SC, que não tem fibras orientadas de maneira estruturada, não exhibe a difusão anisotrópica (Beaulieu, 2002) (Alexander et al., 2007). Dessa forma, uma redução na fração de anisotropia (FA), que afere em que grau a difusão de água tem a mesma orientação, caracteriza dano à estrutura da SB cerebral. Já a difusividade média (MD) corresponde a magnitude da difusão da água. A difusividade axial (AD) mede a difusividade ao longo da principal direção da difusão, sendo considerada marcadora de dano axonal, já a difusividade radial (RD) afere a difusão ortogonal à direção principal da difusão, indicando dano mielínico (M. C. França et al., 2012). Ou seja, o método de avaliação por difusão na RNM transformou-se em uma das principais ferramentas para o estudo da SB. Achados de FA e MD, quando analisado de forma conjunta, podem ser considerados um bom marcador para diferenciar pacientes com PEHs de controles (Martinuzzi et al., 2016). É importante lembrar que vários fatores influenciam a difusividade da água na substância branca, como diâmetro da fibra, quantidade (densidade) de fibras, permeabilidade da membrana, mielinização e a organização direcional de seus limites (Figley et al., 2021), de forma que o valor destes diferentes parâmetros são afetados, em maior ou menor grau, por estes fatores, devendo ser interpretados com cautela. Algumas regiões cerebrais apresentam alto grau de entrecruzamento de fibras (mais de um feixe de fibras passando pelo mesmo voxel), chamado de “crossing fiber problem”, prejudicando a interpretação dos resultados (Schilling et al., 2017). Fibras que mudam de direção, dobram-se ou dissipam-se em “leque” também entram nesta mesma questão (Schilling et al., 2017). Considerando que cada voxel tem em média cerca de 2-3 mm e que o diâmetro de uma axônio mede micrometros e feixes de fibras menos no do que alguns milímetros, é estimado que pelo menos 1/3 de cada voxel cerebral tenha pelo menos dois conjuntos de fibras (Behrens et al., 2007), acreditando-se atualmente que até 90% do cérebro apresenta esta característica (Jeurissen et al., 2013). Na aquisição das imagens, uma técnica que tem maior capacidade de avaliar fibras entrecruzadas é a DSI (diffusion spectrum imaging) (Meng & Zhang, 2014)

#### *Técnicas de pós-processamento:*

Após a aquisição das imagens, ocorre o pós-processamento dos dados para extrair os valores multiparamétricos das fibras em estudo. Isto pode ser realizado de duas principais formas: análise de voxels, chamada *voxel-wised*, com o mapeamento podendo ser feito por métodos de *voxel-based-analysis* (VBA) ou por regiões, chamada de baseadas em atlas (*atlas-based analysis*); e por tractografia, que interpreta os sinais de difusão local em termos de direção de fibras e integra estas informações

em voxels gerando as vias de fibras que conectam as diferentes regiões cerebrais(Schreiber et al., 2014).

Pelo método voxel-wise, as análises podem ser realizadas por ROI, onde as regiões de interesse são desenhadas manualmente pelo investigador ou por segmentação baseada em regiões anatômicas, sendo uma técnica mais time-consuming(Chanraud et al., 2010); ou por whole brain, sendo a *A tract-based spatial statistics* (TBSS) é considerada uma das principais abordagens para análises de dados de SB por aquisições em DTI baseados em voxels, também sendo possível análise de ROI. Mapas de FA que cada indivíduo incluído no estudo são registrados para construir um mapa de FA media. Este mapa é esqueletizado para obter as regiões com maiores valores de FA. Após, os valores de FA de cada sujeito são projetados neste esqueleto e uma estatística baseada em voxels (volume formado pelo pixel e a profundidade do corte) é aplicada. Este método detecta alterações de FA em todo o cérebro, e não apenas em algum trato de interesse. (Mukherjee et al., 2008).

Já pelo método *fiber tracking* e tractografia, a técnica de *3D fiber tracking* serve para avaliar a microestrutura de um trato específico através da criação de região de interesse 3D baseada nos voxels pelos quais o feixe de fibras passa. Os algoritmos de tractografia podem ser probabilísticos (estima a direção de uma possível via) ou determinísticos (segue a direção de fibras mais provável), além de outros métodos, como plausibilidade(Schreiber et al., 2014).

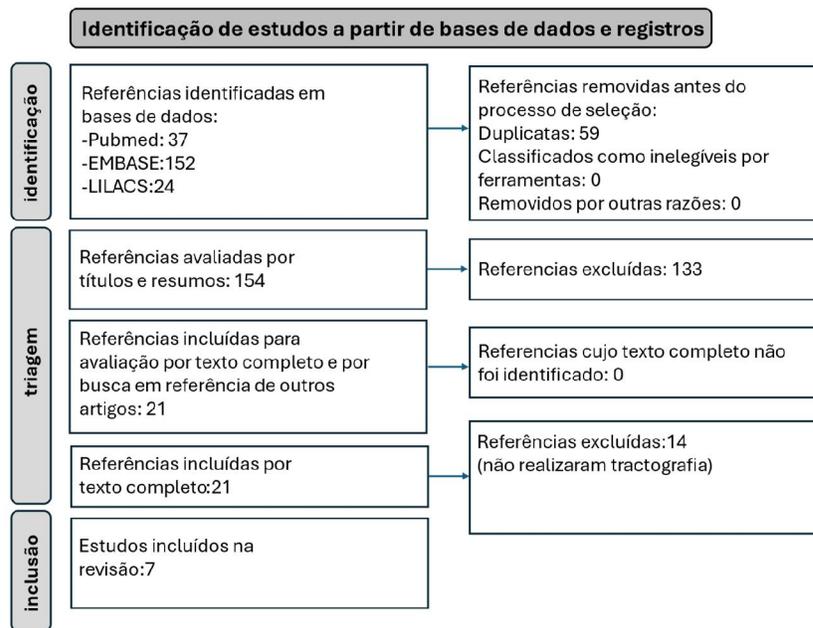
Análises que englobam tanto o método voxel-wise quando fiber ou network tracking é a fiber orientation density (FOD), que a quantidade de fibras como uma função de orientação, também chamada de apparent fiber density (AFD), informando valores de densidade de fibras (FD), entrecruzamento de fibras (FC) e mapas de densidade e entrecruzamento de fibras (FDC). Também é chamada de *fixels-based analysis (FBA)*, (Raffelt et al., 2017).

Como o TCS é uma das regiões com poucas fibras entrecruzadas(Figley et al., 2021) e é uma das principais estruturas degeneradas nas PEH, optamos por realizar análises deste trato específico, através de DTI 3D fiber tracking, correlacionando os valores encontrados de volume, número de fibras, FA e MD entre pacientes e controles no **Artigo 5**. Além disso, optamos por apresentar a revisão sistematizada da literatura para o referencial teórico da tese relativa aos estudos de tractografia do trato corticoespinal como veremos a seguir.

### **2.3.2 Revisão sistemática de tractografia do trato corticoespinal nas PEH**

Uma revisão sistemática da literatura foi realizada para buscar publicações que descreveram os achados de tractografia do TCS em pacientes com PEH, incluindo artigos publicados até maio de 2024. A busca foi realizada nas bases de dados PUBMED/MEDLINE, EMBASE e LILCAS, sendo incluídos artigos

nas línguas inglês, português e espanhol. Os termos utilizados para a busca foram: (Pyramidal Tract OR Tract, Pyramidal OR Tracts, Pyramidal OR Decussation, Pyramidal OR Pyramidal Decussation OR Corticospinal Tracts OR Corticospinal Tract OR Tract, Corticospinal OR Tracts, Corticospinal) AND (MRI OR Magnetic resonance imaging OR diffusion tensor imaging or DTI MRI OR Diffusion Tractography OR Multiparametric Magnetic Resonance Imaging OR Multiparametric MRI OR Diffusion Magnetic Resonance Imaging) AND (Spastic Paraplegia, Hereditary OR Hereditary Spastic Paraplegia\*). Ao final da revisão, sete artigos foram incluídos, conforme especificado na **figura 1 e tabela 1**.



**Figura 1:** fluxograma de seleção de artigos através de revisão sistemática.

**Tabela 1:** artigos encontrados sobre avaliação do CST nas PEHs através de tractografia

	<b>Sujeitos</b>	<b>Scanner</b>	<b>Resultados</b>	<b>Correlação clínica</b>
<b>Unrath et al, 2010</b>	24 pacientes (6 com SPG4), comparados com controles	Siemens 1,5T-DTI	Redução significativa de FA no CST bilateral	NA
<b>Muller et al, 2012</b>	20 pPEH(19 AD e 6 com diagnóstico de SPG4) e 12 com chsp (sem dx molecular)	Siemens 1,5T-DTI	Redução significativa de FA no CST	NA

<b>Pan et al, 2013</b>	5 SPG11 e 10 controles	Siemens 3T-DSI	Redução progressiva da GFA entre a capsula interna e as pirâmides	NA
<b>Rezende et al, 2015</b>	SPG4 (n=11) e 23 controles	Phillips 3T-DTI	FA reduzida em TCS (parecendo menor em pacientes com mutações nonsense e frameshift); MD, RD e AD sem alterações significativas	Não encontraram correlação entre os dados clínicos (idade, duração de doença, sexo e SPRS) e a tractografia
<b>Fukui et al, 2018</b>	6 SBMA; 7 PEH (sem dx molecular) e 38 ELA e 8 controles	Siemens 3T-DTI	Sem diferença de FA ou MD comparados com controles	NA
<b>Navaz-Sánchez et al, 2022</b>	12 SPG4 e 12 controles	Siemens 1,5T-DTI	Redução de FDC e FC bilateral e de FD à direita	Correlação negativa entre duração de doença e valores de FDC, FC e FD bilateralmente e FDC e FC com a SPRS bilateralmente e de FD à esquerda. Redução de valores de FDC vão reduzindo em direção caudal-cranial conforme a gravidade da doença.
<b>Chen et al, 2023</b>	1 SPG11 e 1 controle	Siemens 3T-DTI	FA reduzida e aumento de MD e RD no CST	NA

pPEH: formas puras de PEH

SBMA: spinal-bulbar muscular atrophy

ELA: esclerose lateral amiotrófica

GFA: generalized fractional anisotropy

FDC, FC, FD: mapas de densidade e entrecruzamento de fibras; entrecruzamento de fibras; densidade de fibras

Em 2010, Unrath et al, avaliaram pacientes com esclerose lateral primária (n=25), PEH (n=24) e doença de Kennedy (n=20), e comparam com controles (mesmo n por cada subgrupo) através de DTI obtida em scanner Siemens 1,5T, obtendo valores de FA e MD. Dos 24 pacientes, 19 apresentavam herança AD e seis tinham diagnóstico molecular de SPG4. Não houve diferenciação entre fenótipos puros ou complicados. Inicialmente fizeram uma análise *Whole-brain voxel-wise* e após tractografia com colocação manual de *seeds* a partir dos resultados encontrados na análise anteriores. As análises destes resultados foram feitas através de *tractwise fractional anisotropy statistics* (TFAS), reportando

então apenas valores de FA. Encontraram redução significativa de FA em comparação com controles nos três subtipos de doença no TCS (Unrath et al., 2010).

Muller et al, em 2012, fizeram comparações entre grupos de pacientes com doenças de neurônio motor: ELA (n=20), esclerose lateral primária (n=20) e PEH (20 pHSP, sendo 19 AD -6 destes com diagnóstico de SPG4, e 12 com cHSP, sem diagnóstico molecular). Realizaram DTI a partir do scanner Siemens 1.5T, inicialmente fizeram análise Whole-brain voxel-wise e após tractografia com colocação manual dos *seed* ROI a partir dos achados encontrados na análise de *wholebrain*, com análises estatísticas destes resultados por TFAS, apenas resultados de FA. Houve redução significativa de FA entre pacientes e controles no TCS bilateralmente. Estas diferenças foram observadas nas comparações com controles entre todos os grupos de doença, incluindo entre as PEH puras e complicadas(Müller et al., 2012).

Em 2013, Pan et al avaliaram 5 pacientes, provenientes de duas famílias, com diagnóstico molecular de SPG11, e compararam com 10 controles. O scanner utilizado foi Siemens 3T e a, invés de DTI, utilizaram DSI e obtiveram valores de anisotropia fracionada generalizada (GFA), ao invés de FA, um valor que depende da coerência direcional, atenuação e mielinização das fibras. Inicialmente fizeram análises por TBSS e posteriormente também com ROIs, incluindo TCS (giro pré-central e pirâmides bulbares). A partir daí fizeram tractografia. Encontraram correlação negativa dos valores de GFA, indicando redução progressiva da capsula interna até as pirâmides bulbares. Um interessante achado neste estudo foi maior distúrbio de fibras de associação e comissurais do que as de projeção, algo que associado com a redução progressiva da GFA em direção craniocaudal do TCS, corrobora com a hipótese de *dying-back pathology*. (Pan et al., 2013).

Em 2015, Rezende et al incluíram em seu estudo 11 pacientes com diagnóstico molecular de SPG4 e 23 controles. As imagens foram adquiridas em um aparelho Philips 3T. A espessura cortical foi avaliada através do *freesurfer*, a microestrutura da substância branca por TBSS e *spineseg* para morfologia da medula cervical. Pela relevância para a doença, realizaram tractografia determinística das vias piramidais, desenhando os ROIs *seed* manualmente. A tractografia mostrou valores de FA reduzidos bilateralmente e em média no CST dos pacientes. Os valores de MD, RD e AD não foram diferentes. Perceberam correlação significativa entre mutações *nonsense e frameshift* com menores valores de FA, bilateralmente, mesmo com sujeitos tendo idades e durações de doença semelhantes. Não encontraram correlações clínicas (idade de início, duração da doença e SPRS), na tractografia; apenas na TBSS. Concluem também que os achados de aumento de RD com AD “normal” sugerem que, na SPG4, a lesão no TCS seja desmielinizante.(Rezende et al., 2015)

No estudo de Fukui et al, de 2018, o objetivo foi fazer comparações entre achados de DTI focada da medula cervical (C5) em pacientes com ELA (n=38, divididos em total, espinhal ou bulbar) e usar como controles negativos pacientes com atrofia muscular espinhal e bulbar (SBMA) (n=6) e controles positivos pacientes com PEH (n=7), além de oito controles saudáveis. Não há descrição sobre o diagnóstico molecular destes pacientes, padrão de herança ou divisão entre fenótipos puros ou complicados. O scanner utilizado foi Siemens 3T. Foram colocados manualmente ROIs nos funículos laterais da medula. Comparam valores de FA e MD entre os grupos e também achados de potenciais evocados motores (MEPs) com as características clínicas e valores de FA. Encontraram redução de FA apenas nos pacientes com ELA do grupo total e espinhal, mas não nos outros subgrupos, incluindo nos PEH. Na comparação entre os grupos de pacientes, houve redução significativa de FA entre os grupos ELA total e espinhal em comparação com SBMA. Os valores de MD não estavam reduzidos(Fukui et al., 2018).

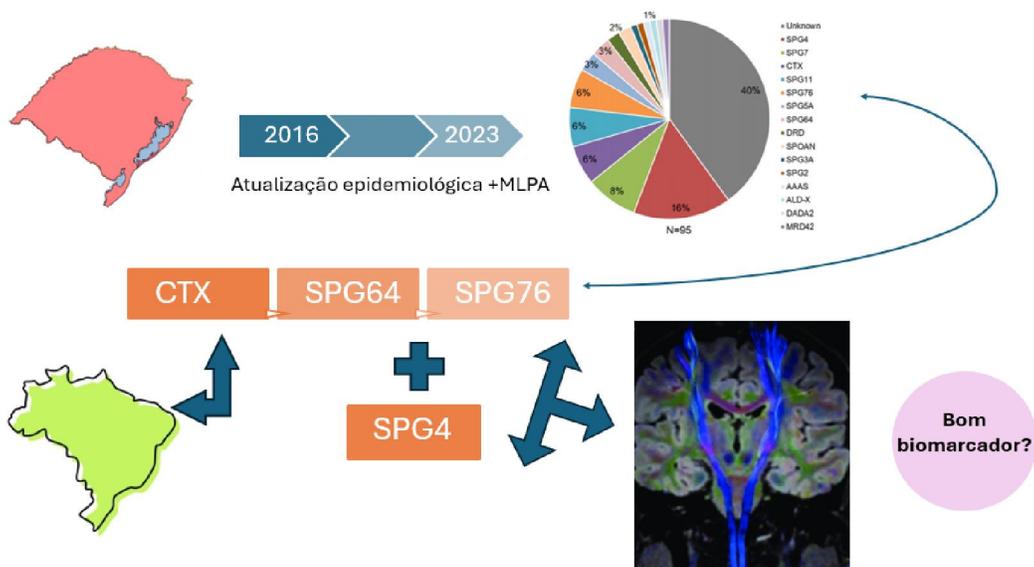
Navaz-Sanchez et al, 2022, recrutaram 12 pacientes (8 mulheres) com fenótipo puro, padrão de herança AD e diagnóstico molecular de SPG4, e 22 controles. A avaliação clínica dos pacientes foi realizada com SPRS para graduar a gravidade da doença (dividindo-os em dois grupos, leve e severo) e aplicação de minimental e SARA como critério de exclusão. As imagens foram adquiridas em um aparelho Philips 1,5 T. Fizeram FBA Whole-brain e também por tractografia probabilística do TCS. Com esta técnica, segmentaram o TCS em 7 regiões, das pirâmides até o córtex. Avaliaram também a espessura cortical pelo freesurfer, especificamente dos giros pre e pos-central, mas também por análise Whole-brain. Redução de FDC bilateral do TCS, pedúnculos cerebelares, cíngulo, corpo caloso e fascículo longitudinal superior esquerdo. Redução de FD bilateral em TCS, cíngulo, corpo caloso e fascículo longitudinal superior esquerdo. Redução de FC bilateral em regiões caudais do TCS e esplênio do corpo caloso. Na tractografia do CST por FBA, encontraram redução de FDC e FC bilateralmente, e de FD apenas à direita. Encontraram correlações negativas significativas de FDC, FC e FD com o TCS bilateralmente e a duração da doença e de FDC e FC com o escore de SRPRS bilateralmente (de FD apenas a esquerda). Na comparação entre grupos divididos pela SPRS, os com escores mais leves apresentavam valor de FDC de regiões mais superiores do TCS semelhante ao dos controles, enquanto que os mais severos apresentavam valores menores de FDC.(Navas-Sánchez et al., 2022) .

Em 2023, Chen et al, avaliaram uma paciente com SPG11 através da aplicação de estimulação magnética transcraniana repetitiva (rTMS). As avaliações clínicas utilizadas foram escala de Ashworth, Berg balance score, TUG e 10MWT. O scanner utilizado para realização da DTI foi Siemens 3T. Após análise inicial Whole-brain, manualmente coloram ROI nos pedúnculos cerebrais, capsula interna e área motora primária para reconstrução do TCS e avaliaram valores médios de FA, MD e RD. Os

resultados mostraram redução marcada de FA e aumento de RD e MD bilateralmente. Após a TMS, os autores observaram aumento de FA e redução de MD e RD(S. Chen et al., 2023).

Em conclusão, dos sete estudos incluídos, apenas um não encontrou valores reduzidos de FA no TCS de pacientes com PEH versus controles, sendo que foi o único que realizou tractografia a nível cervical (com marcação manual de ROI no funículo lateral da medula) com o desenho de estudo para avaliar as alterações em pacientes com ELA, usando os casos de PEH como controle positivos, mas sem diagnóstico molecular(Fukui et al., 2018). O número máximo de pacientes com diagnóstico molecular foi de 12, todos SPG4(Navas-Sánchez et al., 2022) e apenas dois fizeram correlações clínicas e/ou moleculares com os achados de neuroimagem(Navas-Sánchez et al., 2022)(Rezende et al., 2015). Apenas um estudo analisou os achados de FA dividindo os pacientes em fenótipos puros e complicados, mostrando diferença significativa de FA entre as duas formas no teste de Tukey (FA significativamente menor nos fenótipos puros ) (Müller et al., 2012). Estes achados mostram que alterações microestruturais do TCS pode ser um possível biomarcador a ser analisado em pacientes com PEH, mas que dados mais robustos ainda são necessários, tanto para avaliar se esta alteração está presente em todos, como um grupo, ou se em subtipos moleculares específicos ou com fenótipos específicos. Além disso, não encontramos estudos que avaliaram pacientes com SPG76 ou *ENTPD1*-NDD/SPG64.

### 3. MAPA CONCEITUAL:



#### 4. JUSTIFICATIVA:

As paraparesias espásticas hereditárias são um grupo de doenças neurodegenerativas heterogêneas tanto do ponto de vista molecular quanto fenotípico. Em menos de 10 anos, diferenças epidemiológicas podem ser observadas nas diferentes populações. Apesar de o subtipo mais comum ser a SPG4 em praticamente todas as diferentes origens étnicas reportadas na literatura, a prevalência de outros subtipos, assim como frequência de variantes variam conforme as regiões geográficas estudadas. Este conhecimento, das peculiaridades de cada população, são fundamentais para o melhor entendimento destas moléstias.

Não há tratamentos modificadores de seu curso progressivo. Apesar de o conhecimento dos aspectos moleculares das PEH ter possibilitado grandes avanços no entendimento destas condições, a aplicação destes conhecimentos na busca de tratamentos modificadores da doença irá esbarrar no desconhecimento sobre quais os desfechos clínicos e quais biomarcadores são mais adequados como desfechos relevantes para os futuros ensaios clínicos randomizados.

O número de estudos que avaliou parâmetros de neuroimagem por ressonância nuclear magnética em pacientes com PEH é pequeno. Os principais achados foram feitos através de análise *voxel-wise*, TBSS ou espessura cortical, encontrando alterações na substância branca e cinzenta, em especial nas vias relacionados ao TCS, que em alguns estudos correlacionaram-se com a gravidade clínica da doença. Estudos que analisaram o TCS através de tractografia, principalmente correlacionando os achados multiparamétricos com dados clínicos, são escassos na literatura. Além disso, a maioria avaliou subtipos específicos de PEH, sendo que, idealmente, um biomarcador que pudesse ser utilizado para os diferentes subtipos da doença far-se-ia mais proveitoso.

Desta forma, nosso objetivo foi o de atualizar os dados epidemiológicos da coorte de pacientes que fazem acompanhamento no serviço de neurogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), incluindo análises por técnicas moleculares diferentes das previamente realizadas para investigar os genes relacionados às formas AD mais frequentes na nossa população. Além disso, caracterizamos três subtipos de PEH com número de casos expressivos em nossa população, com o intuito de melhor caracterizar o fenótipo destes pacientes. Estes foram também analisados através de tractografia do TCS, principal estrutura comprometida na doença, correlacionado com características clínicas e moleculares. Os resultados do presente estudo contribuem para um melhor entendimento e caracterização fenotípica das PEH, além de ter avaliado um possível biomarcador para futuros ECRs. Desta forma podemos considerar que o presente estudo tem caráter inovador, sendo justificada sua realização no contexto não apenas local, mas da literatura internacional.

## 5. OBJETIVOS:

### 5.1 Objetivos Gerais:

Atualizar a epidemiologia das PEH na população do Rio Grande do Sul, estudar aspectos clínicos e moleculares das mesmas e estudar o papel de métodos multimodais por RNM como biomarcadores das PEH.

### 5.2 Objetivos Específicos:

- 5.2.1 Atualizar os dados epidemiológicos nos pacientes com PEH acompanhados no serviço de genética médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, único serviço de doenças raras no Rio Grande do Sul
- 5.2.2 Descrever aspectos moleculares e clínicos, de forma multicêntrica no Brasil, da Xantomatose Cerebrotendínea.
- 5.2.3 Atualizar dados clínicos neurológicos e extraneurológicos de pacientes com *ENTPD1-NDD/SPG64* e comparar com outros casos descritos através de revisão sistemática da literatura e contanto com autores.
- 5.2.4 Descrever aspectos moleculares, de neuroimagem e clínicos e comparar com dados da literatura, através de revisão sistemática, da SPG76.
- 5.2.5 Avaliar dados multiparamétricos de tractografia do TCS em diferentes grupos de pacientes com PEH (SPG4, *ENTPD1-NDD/SPG64* e SPG76).
- 5.2.6 Comparar dados multiparamétricos de tractografia entre os casos de PEH, como um grupo, com controles.
- 5.2.7 Comparar dados mutliparamétricos de tractografia do TCS dos diferentes subtipos de PEH com dados clínicos e moleculares.

## 6. REFERÊNCIAS:

- Agarwal, A., Oinam, R., Goel, V., Sharma, P., Faruq, M., Garg, A., & Srivastava, A. K. (2023). "Ear of the Lynx" Sign in Hereditary Spastic Paraparesis (HSP) 76. *Movement Disorders Clinical Practice*, 10(1), 120–123. <https://doi.org/10.1002/mdc3.13606>
- Alecu, J. E., Saffari, A., Jumo, H., Ziegler, M., Strelko, O., Brownstein, C. A., Gonzalez-Heydrich, J., Rodan, L. H., Gorman, M. P., Sahin, M., & Ebrahimi-Fakhari, D. (2022). Novel CAPN1 missense variants in complex hereditary spastic paraplegia with early-onset psychosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 9(4), 570–576. <https://doi.org/10.1002/acn3.51531>
- Alexander, A. L., Lee, J. E., Lazar, M., & Field, A. S. (2007). Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4(3), 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.05.011>
- Alkhalifa, A., Chen, S., Hasiloglu, Z. I., Filosto, M., Cali, E., Houlden, H., Sgobbi de Souza, P., Alavi, A.,

- Goizet, C., Stevanin, G., Taithe, F., Nicita, F., Vasco, G., Tozza, S., Cocozza, S., Carboni, N., Figus, A., Wu, J., Basak, A. N., ... La Piana, R. (2023). White matter abnormalities in 15 subjects with SPG76. *Journal of Neurology*, *270*(12), 5784–5792. <https://doi.org/10.1007/s00415-023-11918-5>
- Appadurai, V., DeBarber, A., Chiang, P.-W., Patel, S. B., Steiner, R. D., Tyler, C., & Bonnen, P. E. (2015). Apparent underdiagnosis of Cerebrotendinous Xanthomatosis revealed by analysis of ~60,000 human exomes. *Molecular Genetics and Metabolism*, *116*(4), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.10.010>
- Awuah, W. A., Tan, J. K., Shkodina, A. D., Ferreira, T., Adebusoye, F. T., Mazzoleni, A., Wellington, J., David, L., Chilcott, E., Huang, H., Abdul-Rahman, T., Shet, V., Atallah, O., Kalmanovich, J., Jiffry, R., Madhu, D. E., Sikora, K., Kmyta, O., & Delva, M. Y. (2024). Hereditary spastic paraplegia: Novel insights into the pathogenesis and management. *SAGE Open Medicine*, *12*, 20503121231221940. <https://doi.org/10.1177/20503121231221941>
- Balicza, P., Grosz, Z., Gonzalez, M. A., Bencsik, R., Pentelenyi, K., Gal, A., Varga, E., Klivenyi, P., Koller, J., Züchner, S., & Molnar, J. M. (2016). Genetic background of the hereditary spastic paraplegia phenotypes in Hungary - An analysis of 58 probands. *Journal of the Neurological Sciences*, *364*, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.03.018>
- Baviera-Muñoz, R., Carretero-Villarroya, L., Vázquez-Costa, J. F., Morata-Martínez, C., Campins-Romeu, M., Muelas, N., Sastre-Bataller, I., Martínez-Torres, I., Pérez-García, J., Sivera, R., Sevilla, T., Vilchez, J. J., Jaijo, T., Espinós, C., Millán, J. M., Bataller, L., & Aller, E. (2022). Diagnostic Efficacy of Genetic Studies in a Series of Hereditary Cerebellar Ataxias in Eastern Spain. *Neurology: Genetics*, *8*(6), e200038. <https://doi.org/10.1212/NXG.000000000200038>
- Beaudin, M., Matilla-Dueñas, A., Soong, B. W., Pedroso, J. L., Barsottini, O. G., Mitoma, H., Tsuji, S., Schmahmann, J. D., Manto, M., Rouleau, G. A., Klein, C., & Dupre, N. (2019). The Classification of Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias: a Consensus Statement from the Society for Research on the Cerebellum and Ataxias Task Force. *Cerebellum*, *18*(6), 1098–1125. <https://doi.org/10.1007/s12311-019-01052-2>
- Beaulieu, C. (2002). The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. *NMR in Biomedicine*, *15*(7–8), 435–455. <https://doi.org/10.1002/nbm.782>
- Behan, W. M., & Maia, M. (1974). Strümpell's familial spastic paraplegia: genetics and neuropathology. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *37*(1), 8–20. <https://doi.org/10.1136/jnnp.37.1.8>
- Behrens, T. E. J., Berg, H. J., Jbabdi, S., Rushworth, M. F. S., & Woolrich, M. W. (2007). Probabilistic diffusion tractography with multiple fibre orientations: What can we gain? *NeuroImage*, *34*(1),

- 144–155. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.09.018>
- Blackstone, C. (2018). Converging cellular themes for the hereditary spastic paraplegias. *Current Opinion in Neurobiology*, *51*, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.04.025>
- Blackstone, C., O’Kane, C. J., & Reid, E. (2011). Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nature Reviews. Neuroscience*, *12*(1), 31–42. <https://doi.org/10.1038/nrn2946>
- Boyne, P., DiFrancesco, M., Awosika, O. O., Williamson, B., & Vannest, J. (2022). Mapping the human corticoreticular pathway with multimodal delineation of the gigantocellular reticular nucleus and high-resolution diffusion tractography. *Journal of the Neurological Sciences*, *434*, 120091. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2021.120091>
- Brankovic, M., Ivanovic, V., Basta, I., Khang, R., Lee, E., Stevic, Z., Ralic, B., Tubic, R., Seo, G. H., Markovic, V., Bozovic, I., Svetel, M., Marjanovic, A., Veselinovic, N., Mesaros, S., Jankovic, M., Savic-Pavicevic, D., Jovin, Z., Novakovic, I., ... Peric, S. (2024). Whole exome sequencing in Serbian patients with hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics*. <https://doi.org/10.1007/s10048-024-00755-x>
- Brighente, S. F., Vicuña, P., Rodrigues Louzada, A. L., Giordani, G. M., Fussiger, H., Dos Santos, M. A. R., Cubillos-Arcila, D. M., Winckler, P. B., & Saute, J. A. M. (2021). Evoked potentials as biomarkers of hereditary spastic paraplegias: A case-control study. *PloS One*, *16*(11), e0259397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259397>
- Burguez, D., Polese-Bonatto, M., Scudeiro, L. A. J., Björkhem, I., Schöls, L., Jardim, L. B., Matte, U., Saraiva-Pereira, M. L., Siebert, M., & Saute, J. A. M. (2017). Clinical and molecular characterization of hereditary spastic paraplegias: A next-generation sequencing panel approach. *Journal of the Neurological Sciences*, *383*, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.10.010>
- Calame, D. G., Herman, I., Maroofian, R., Marshall, A. E., Donis, K. C., Fatih, J. M., Mitani, T., Du, H., Grochowski, C. M., Sousa, S. B., Gijavanekar, C., Bakhtiari, S., Ito, Y. A., Rocca, C., Hunter, J. V., Sutton, V. R., Emrick, L. T., Boycott, K. M., Lossos, A., ... Lupski, J. R. (2022). Biallelic Variants in the Ectonucleotidase ENTPD1 Cause a Complex Neurodevelopmental Disorder with Intellectual Disability, Distinct White Matter Abnormalities, and Spastic Paraplegia. *Annals of Neurology*, *92*(2), 304–321. <https://doi.org/10.1002/ana.26381>
- Calame, D., Herman, I., Marafie, D., Saadi, N., Saute, J. A. M., Donis, K. C., Bakhtiari, S., Kruer, M., Lossos, A., Skidmore, D., Osmond, M., Marshall, A., Ito, Y., Kernohan, K., Pehlivan, D., Posey, J., & Lupski, J. (2021). Bi-allelic variants in the ectonucleotidase ENTPD1 cause a complex neurological disease consisting of intellectual disability, brain abnormalities, and spastic

- paraplegia (2093). *Neurology*, 96(15\_supplement).  
[https://doi.org/10.1212/wnl.96.15\\_supplement.2093](https://doi.org/10.1212/wnl.96.15_supplement.2093)
- Caminero, F., & Cascella, M. (2024). *Neuroanatomy, Mesencephalon Midbrain*.
- Chanraud, S., Zahr, N., Sullivan, E. V., & Pfefferbaum, A. (2010). MR diffusion tensor imaging: a window into white matter integrity of the working brain. *Neuropsychology Review*, 20(2), 209–225. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9129-7>
- Chen, S., Zhou, Z., Ren, M., Chen, X., Shi, X., Zhang, S., Xu, S., Zhang, X., Zhang, X., Lin, W., & Shan, C. (2023). Case report: High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation for treatment of hereditary spastic paraplegia type 11. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 14, p. 1162149). <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1162149>
- Chen, Y., Cen, Z., Zheng, X., Xie, F., Chen, S., & Luo, W. (2019). A novel homozygous CAPN1 pathogenic variant in a Chinese patient with pure hereditary spastic paraplegia. In *Journal of Clinical Neurology (Korea)* (Vol. 15, Issue 2, pp. 271–272). <https://doi.org/10.3988/jcn.2019.15.2.271>
- Chen, Y. T., Li, S., Magat, E., Zhou, P., & Li, S. (2018). Motor overflow and spasticity in chronic stroke share a common pathophysiological process: Analysis of within-limb and between-limb EMG-EMG coherence. *Frontiers in Neurology*, 9(OCT), 795. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00795>
- Chen, Y. T., Li, S., Zhou, P., & Li, S. (2019). A startling acoustic stimulation (SAS)-TMS approach to assess the reticulospinal system in healthy and stroke subjects. *Journal of the Neurological Sciences*, 399, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.02.018>
- Chinta, V., & Krishnan, P. (2022). A novel mutation of CAPN1 gene causing hereditary spastic Paraplegia-76. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 25(3), 555. [https://doi.org/10.4103/aian.aian\\_977\\_21](https://doi.org/10.4103/aian.aian_977_21)
- Coutinho, P., Barros, J., Zemmouri, R., Guimarães, J., Alves, C., Chorão, R., Lourenço, E., Ribeiro, P., Loureiro, J. L., Santos, J. V., Hamri, A., Paternotte, C., Hazan, J., Silva, M. C., Prud'homme, J. F., & Grid, D. (1999). Clinical heterogeneity of autosomal recessive spastic paraplegias: analysis of 106 patients in 46 families. *Archives of Neurology*, 56(8), 943–949. <https://doi.org/10.1001/archneur.56.8.943>
- Cubillos-Arcila, D. M., Machado, G. D., Sehnem, L., Burguêz, D., Zanardi, A. P. J., Martins, V. F., Peyré-Tartaruga, L. A., & Saute, J. A. M. (2022). Progression of Functional Gait in Hereditary Spastic Paraplegias. *Cerebellum (London, England)*, 21(3), 350–357. <https://doi.org/10.1007/s12311-021-01302-2>
- Cubillos Arcila, D. M., Dariva Machado, G., Martins, V. F., Leotti, V. B., Schüle, R., Peyré-Tartaruga, L.

- A., & Saute, J. A. M. (2023). Long-term progression of clinician-reported and gait performance outcomes in hereditary spastic paraplegias. *Frontiers in Neuroscience*, *17*, 1226479. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1226479>
- de Oliveira-Souza, R. (2012). The human extrapyramidal system. *Medical Hypotheses*, *79*(6), 843–852. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2012.09.004>
- de Oliveira-Souza, R. (2015). Damage to the pyramidal tracts is necessary and sufficient for the production of the pyramidal syndrome in man. *Medical Hypotheses*, *85*(1), 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.04.007>
- Deluca, G. C., Ebers, G. C., & Esiri, M. M. (2004). The extent of axonal loss in the long tracts in hereditary spastic paraplegia. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *30*(6), 576–584. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00587.x>
- Depienne, C., Stevanin, G., Brice, A., & Durr, A. (2007). Hereditary spastic paraplegias: an update. *Current Opinion in Neurology*, *20*(6), 674–680. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3282f190ba>
- Diarra, S., Coulibaly, T., Dembélé, K., Ngouth, N., Cissé, L., Diallo, S. H., Ouologuem, M., Diallo, S., Coulibaly, O., Bagayoko, K., Coulibaly, D., Simaga, A., Sango, H. A., Traoré, M., Jacobson, S., Fischbeck, K. H., Landouré, G., & Guinto, C. O. (2023). Hereditary spastic paraplegia in Mali: epidemiological and clinical features. *Acta Neurologica Belgica*, *123*(6), 2155–2165. <https://doi.org/10.1007/s13760-022-02113-w>
- Dressler, D., Bhidayasiri, R., Bohlega, S., Chana, P., Chien, H. F., Chung, T. M., Colosimo, C., Ebke, M., Fedoroff, K., Frank, B., Kaji, R., Kanovsky, P., Koçer, S., Micheli, F., Orlova, O., Paus, S., Pirtosek, Z., Relja, M., Rosales, R. L., ... Saberi, F. A. (2018). Defining spasticity: a new approach considering current movement disorders terminology and botulinum toxin therapy. *Journal of Neurology*, *265*(4), 856–862. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-8759-1>
- Duning, T., Warnecke, T., Schirmacher, A., Schiffbauer, H., Lohmann, H., Mohammadi, S., Young, P., & Deppe, M. (2010). Specific pattern of early white-matter changes in pure hereditary spastic paraplegia. *Movement Disorders*, *25*(12), 1986–1992. <https://doi.org/10.1002/mds.23211>
- Faber, I., Martinez, A. R. M., de Rezende, T. J. R., Martins, C. R., Martins, M. P., Lourenço, C. M., Marques, W., Montecchiani, C., Orlacchio, A., Pedrosa, J. L., Barsottini, O. G. P., Lopes-Cendes, Í., & França, M. C. (2018). SPG11 mutations cause widespread white matter and basal ganglia abnormalities, but restricted cortical damage. *NeuroImage: Clinical*, *19*, 848–857. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2018.05.031>
- Faber, I., Servelhere, K. R., Martinez, A. R. M., D'Abreu, A., Lopes-Cendes, I., & França, M. C. J. (2014). Clinical features and management of hereditary spastic paraplegia. *Arquivos de Neuro-*

- Psiquiatria*, 72(3), 219–226. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20130248>
- Figley, C. R., Uddin, M. N., Wong, K., Kornelsen, J., Puig, J., & Figley, T. D. (2021). Potential Pitfalls of Using Fractional Anisotropy, Axial Diffusivity, and Radial Diffusivity as Biomarkers of Cerebral White Matter Microstructure. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 799576. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.799576>
- Fink, J. K. (2013). Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathologica*, 126(3), 307–328. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1115-8>
- Fink, J. K. (2023). The hereditary spastic paraplegias. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 196, pp. 59–88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98817-9.00022-3>
- Finsterer, J., Löscher, W., Quasthoff, S., Wanschitz, J., Auer-Grumbach, M., & Stevanin, G. (2012). Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance. *Journal of the Neurological Sciences*, 318(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.03.025>
- Fisher, K. M., Chinnery, P. F., Baker, S. N., & Baker, M. R. (2013). Enhanced reticulospinal output in patients with (REEP1) hereditary spastic paraplegia type 31. In *Journal of Neurology* (Vol. 260, Issue 12, pp. 3182–3184). <https://doi.org/10.1007/s00415-013-7178-6>
- França, M. C. J., Dogini, D. B., D’Abreu, A., Teive, H. A. G., Munhoz, R. P., Raskin, S., Moro, A., Melo, C. C., Gomes, A. P., Saute, J. A. M., Jardim, L. B., & Lopes-Cendes, I. (2014). SPG4-related hereditary spastic paraplegia: frequency and mutation spectrum in Brazil. In *Clinical genetics* (Vol. 86, Issue 2, pp. 194–196). <https://doi.org/10.1111/cge.12252>
- França, M. C., Yasuda, C. L., Pereira, F. R. S., D’Abreu, A., Lopes-Ramos, C. M., Rosa, M. V., Cendes, F., & Lopes-Cendes, I. (2012). White and grey matter abnormalities in patients with SPG11 mutations. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 83(8), 828–833. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2011-300129>
- Fukui, Y., Hishikawa, N., Sato, K., Nakano, Y., Morihara, R., Shang, J., Takemoto, M., Ohta, Y., Yamashita, T., & Abe, K. (2018). Detecting spinal pyramidal tract of amyotrophic lateral sclerosis patients with diffusion tensor tractography. *Neuroscience Research*, 133, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.11.005>
- Fussiger, H., Pereira, B. L. da S., Padilha, J. P. D., Donis, K. C., Siebert, M., Brusius-Facchin, A. C., Baldo, G., & Saute, J. A. M. (2023). Copy number variations in SPAST and ATL1 are rare among Brazilians. *Clinical Genetics*, 103(5), 580–584. <https://doi.org/10.1111/cge.14280>
- Gan-Or, Z., Bouslam, N., Birouk, N., Lissouba, A., Chambers, D. B., Vérièpe, J., Androschuck, A., Laurent, S. B., Rochefort, D., Spiegelman, D., Dionne-Laporte, A., Szuto, A., Liao, M., Figlewicz,

- D. A., Bouhouche, A., Benomar, A., Yahyaoui, M., Ouazzani, R., Yoon, G., ... Bencheikh, B. O. A. (2016). Mutations in CAPN1 Cause Autosomal-Recessive Hereditary Spastic Paraplegia. *American Journal of Human Genetics*, *98*(5), 1038–1046.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.04.002>
- Ganguly, J., Kulshreshtha, D., Almotiri, M., & Jog, M. (2021). Muscle Tone Physiology and Abnormalities. *Toxins*, *13*(4). <https://doi.org/10.3390/toxins13040282>
- Garcia-Berlanga, J. E., Moscovich, M., Palacios, I. J., Banegas-Lagos, A., Rojas-Martinez, A., & Martinez-Ramirez, D. (2019). CAPN1 Variants as Cause of Hereditary Spastic Paraplegia Type 76 . In *Case Reports in Neurological Medicine* (Vol. 2019, pp. 1–5).  
<https://doi.org/10.1155/2019/7615605>
- Giordani, G. M., Diniz, F., Fussiger, H., Gonzalez-Salazar, C., Donis, K. C., Freua, F., Ortega, R. P. M., de Freitas, J. L., Barsottini, O. G. P., Rosemberg, S., Kok, F., Pedroso, J. L., França, M. C. J., & Saute, J. A. M. (2021). Clinical and molecular characterization of a large cohort of childhood onset hereditary spastic paraplegias. *Scientific Reports*, *11*(1), 22248.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-01635-2>
- Gorcenco, S., Kafantari, E., Wallenius, J., Karremo, C., Alinder, E., Dobloug, S., Landqvist Waldö, M., Englund, E., Ehrencrona, H., Wictorin, K., Karrman, K., & Puschmann, A. (2024). Clinical and genetic analyses of a Swedish patient series diagnosed with ataxia. *Journal of Neurology*, *271*(1), 526–542. <https://doi.org/10.1007/s00415-023-11990-x>
- Hage, M. C. F. N. S., & Iwasaki, M. (2009). Imagem por ressonância magnética: princípios básicos. In *Ciência Rural* (Vol. 39). scielo .
- Haj Salem, I., Beaudin, M., Stumpf, M., Estiar, M. A., Côté, P.-O., Brunet, F., Gamache, P.-L., Rouleau, G. A., Mourabit-Amari, K., Gan-Or, Z., & Dupré, N. (2021). Genetic and Epidemiological Study of Adult Ataxia and Spastic Paraplegia in Eastern Quebec. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, *48*(5), 655–665.  
<https://doi.org/10.1017/cjn.2020.277>
- Harding, A. E. (1983). Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet (London, England)*, *1*(8334), 1151–1155. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)92879-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(83)92879-9)
- Hayakawa, M., Matsubara, T., Mochizuki, Y., Takeuchi, C., Minamitani, M., Imai, M., Kosaki, K., Arai, T., & Murayama, S. (2022). An autopsied case report of spastic paraplegia with thin corpus callosum carrying a novel mutation in the SPG11 gene: widespread degeneration with eosinophilic inclusions. *BMC Neurology*, *22*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12883-021-02514-z>
- Huttenlocher, A., Palecek, S. P., Lu, Q., Zhang, W., Mellgren, R. L., Lauffenburger, D. A., Ginsberg, M. H., & Horwitz, A. F. (1997). Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease

- calpain. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(52), 32719–32722.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.52.32719>
- Islam, M., Hoggard, N., & Hadjivassiliou, M. (2021). Cerebrotendinous Xanthomatosis: diversity of presentation and refining treatment with chenodeoxycholic acid. *Cerebellum & Ataxias*, 8(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40673-021-00128-2>
- Jang, S. H., & Seo, J. P. (2015). The anatomical location of the corticoreticular pathway at the subcortical white matter in the human brain: A diffusion tensor imaging study. *Somatosensory & Motor Research*, 32(2), 106–109. <https://doi.org/10.3109/08990220.2014.986326>
- Jeurissen, B., Leemans, A., Tournier, J.-D., Jones, D. K., & Sijbers, J. (2013). Investigating the prevalence of complex fiber configurations in white matter tissue with diffusion magnetic resonance imaging. *Human Brain Mapping*, 34(11), 2747–2766.  
<https://doi.org/10.1002/hbm.22099>
- Jinnah, H. A. (1993). *HPRT1 Disorders*. (M. P. Adam, J. Feldman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (eds.)).
- Kim, A., Kumar, K. R., Davis, R. L., Mallawaarachchi, A. C., Gayevskiy, V., Minoche, A. E., Walls, Z., Kim, H. J., Jang, M., Cowley, M. J., Choi, J. H., Shin, C., Sue, C. M., & Jeon, B. (2019). Increased Diagnostic Yield of Spastic Paraplegia with or Without Cerebellar Ataxia Through Whole-Genome Sequencing. *Cerebellum*, 18(4), 781–790. <https://doi.org/10.1007/s12311-019-01038-0>
- Kocoglu, C., Gundogdu, A., Kocaman, G., Kahraman-Koytak, P., Uluc, K., Kiziltan, G., Caglayan, A. O., Bilguvar, K., Vural, A., & Basak, A. N. (2018). Homozygous CAPN1 mutations causing a spastic-ataxia phenotype in 2 families. *Neurology: Genetics*, 4(1), e218.  
<https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000218>
- Koh, K., Ishiura, H., Tsuji, S., & Takiyama, Y. (2018). JASPAC: Japan Spastic Paraplegia Research Consortium. *Brain Sciences*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/brainsci8080153>
- Koyama, S., Sekijima, Y., Ogura, M., Hori, M., Matsuki, K., Miida, T., & Harada-Shiba, M. (2021). Cerebrotendinous Xanthomatosis: Molecular Pathogenesis, Clinical Spectrum, Diagnosis, and Disease-Modifying Treatments. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 28(9), 905–925.  
<https://doi.org/10.5551/jat.RV17055>
- Kumari, R., Uppilli, B. R., Shakya, S., Garg, A., Joshi, A., Khan, A., Suroliya, V., Sonakar, A. K., Sharma, P., & Singh, I. (2021). *Integrated whole exome sequencing and functional approach delineate genetic heterogeneity in cerebellar ataxias*.
- Lai, L. L., Chen, Y. J., Li, Y. L., Lin, X. H., Wang, M. W., Dong, E. L., Wang, N., Chen, W. J., & Lin, X. (2020). Novel CAPN1 mutations extend the phenotypic heterogeneity in combined spastic

- paraplegia and ataxia. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 7(10), 1862–1869.  
<https://doi.org/10.1002/acn3.51169>
- Lambe, J., Monaghan, B., Munteanu, T., & Redmond, J. (2018). CAPN1 mutations broadening the hereditary spastic paraplegia/spinocerebellar ataxia phenotype. *Practical Neurology*, 18(5), 369–372. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2017-001842>
- Lan, M. Y., Lu, C. S., Wu, S. L., Chen, Y. F., Sung, Y. F., Tu, M. C., & Chang, Y. Y. (2022). Clinical and genetic characterization of a Taiwanese cohort with spastic paraparesis combined with cerebellar involvement. *Frontiers in Neurology*, 13, 1005670.  
<https://doi.org/10.3389/fneur.2022.1005670>
- Lee, J., & Muzio, M. R. (2024). *Neuroanatomy, Extrapyramidal System*.
- Li, S., Chang, S. H., Francisco, G., & Verduzco-Gutierrez, M. (2014). Acoustic startle reflex in patients with chronic stroke at different stages of motor recovery: A pilot study. *Topics in Stroke Rehabilitation*, 21(4), 358–370. <https://doi.org/10.1310/tsr2104-358>
- Li, S., Chen, Y. T., Francisco, G. E., Zhou, P., & Rymer, W. Z. (2019). A unifying pathophysiological account for post-stroke spasticity and disordered motor control. *Frontiers in Neurology*, 10(MAY), 468. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00468>
- Lindig, T., Bender, B., Hauser, T. K., Mang, S., Schweikardt, D., Klose, U., Karle, K. N., Schüle, R., Schöls, L., & Rattay, T. W. (2015). Gray and white matter alterations in hereditary spastic paraplegia type SPG4 and clinical correlations. *Journal of Neurology*, 262(8), 1961–1971.  
<https://doi.org/10.1007/s00415-015-7791-7>
- Lo Giudice, T., Lombardi, F., Santorelli, F. M., Kawarai, T., & Orlicchio, A. (2014). Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Experimental Neurology*, 261, 518–539. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.011>
- Lynch, D. S., Koutsis, G., Tucci, A., Panas, M., Baklou, M., Breza, M., Karadima, G., & Houlden, H. (2016). Hereditary spastic paraplegia in Greece: characterisation of a previously unexplored population using next-generation sequencing. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 24(6), 857–863. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.200>
- Martinuzzi, A., Vavla, M., Paparella, G., Montanaro, D., Bonanni, P., Musumeci, O., Brighina, E., Hlavata, H., Rossi, G., Aghakhanyan, G., Martino, N., Baratto, A., D'Angelo, M. G., Peruch, F., Fantin, M., Arnoldi, A., Citterio, A., Vantaggiato, C., Rizzo, V., ... Bassi, M. T. (2016). The contribution of clinical and paraclinical indicators to the characterization of the phenotype in a large group of molecularly defined hereditary spastic paraplegias. *Acta Myologica*, 35(1), 58.  
<https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L640842868&from=export>

- Melo, U. S., Freua, F., Lynch, D. S., Ripa, B. D., Tenorio, R. B., Saute, J. A. M., de Souza Leite, F., Kitajima, J., Houlden, H., Zatz, M., & Kok, F. (2018). Clinical aspects of hereditary spastic paraplegia 76 and novel CAPN1 mutations. In *Clinical Genetics* (Vol. 94, Issue 5, pp. 482–483). <https://doi.org/10.1111/cge.13428>
- Meng, Y., & Zhang, X. (2014). In vivo diffusion spectrum imaging of non-human primate brain: initial experience in transcallosal fiber examination. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 4(2), 129–135. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2014.04.05>
- Méreaux, J. L., Firanescu, C., Coarelli, G., Kvarnung, M., Rodrigues, R., Pegoraro, E., Tazir, M., Taithe, F., Valter, R., Huin, V., Lidström, K., Banneau, G., Morais, S., Parodi, L., Coutelier, M., Papin, M., Svenningsson, P., Azulay, J. P., Alonso, I., ... Stevanin, G. (2021). Increasing involvement of CAPN1 variants in spastic ataxias and phenotype-genotype correlations. *Neurogenetics*, 22(1), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s10048-020-00633-2>
- Mukherjee, P., Chung, S. W., Berman, J. I., Hess, C. P., & Henry, R. G. (2008). Diffusion tensor MR imaging and fiber tractography: technical considerations. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 29(5), 843–852. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A1052>
- Müller, H. P., Unrath, A., Huppertz, H. J., Ludolph, A. C., & Kassubek, J. (2012). Neuroanatomical patterns of cerebral white matter involvement in different motor neuron diseases as studied by diffusion tensor imaging analysis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 13(3), 254–264. <https://doi.org/10.3109/17482968.2011.653571>
- Munkonda, M. N., Kauffenstein, G., Kukulski, F., Lévesque, S. A., Legendre, C., Pelletier, J., Lavoie, E. G., Lecka, J., & Sévigny, J. (2007). Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists. *Biochemical Pharmacology*, 74(10), 1524–1534. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.07.033>
- Narendiran, S., Debnath, M., Shivaram, S., Kannan, R., Sharma, S., Christopher, R., Seshagiri, D. V., Jain, S., Purushottam, M., Mangalore, S., Bharath, R. D., Bindu, P. S., Sinha, S., Taly, A. B., & Nagappa, M. (2022). Novel insights into the genetic profile of hereditary spastic paraplegia in India. *Journal of Neurogenetics*, 36(1), 21–31. <https://doi.org/10.1080/01677063.2022.2064463>
- Navas-Sánchez, F. J., Martín De Blas, D., Fernández-Pena, A., Alemán-Gómez, Y., Lage-Castellanos, A., Marcos-Vidal, L., Guzmán-De-Villoria, J. A., Catalina, I., Lillo, L., Muñoz-Blanco, J. L., Ugalde, A. O., Quintáns, B., Sobrido, M. J., Carmona, S., Grandas, F., & Desco, M. (2022). Corticospinal tract and motor cortex degeneration in pure hereditary spastic paraparesis type 4 (SPG4). *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 23(1–2), 25–34. <https://doi.org/10.1080/21678421.2021.1962353>

- Nóbrega, P. R., Bernardes, A. M., Ribeiro, R. M., Vasconcelos, S. C., Araújo, D. A. B. S., Gama, V. C. de V., Fussiger, H., Santos, C. de F., Dias, D. A., Pessoa, A. L. S., Pinto, W. B. V. de R., Saute, J. A. M., de Souza, P. V. S., & Braga-Neto, P. (2022). Cerebrotendinous Xanthomatosis: A practice review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Frontiers in Neurology*, *13*, 1049850. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.1049850>
- Nonnekes, J., De Niet, M., Nijhuis, L. B. O., De Bot, S. T., Van De Warrenburg, B. P. C., Bloem, B. R., Geurts, A. C., & Weerdesteyn, V. (2013). Mechanisms of postural instability in hereditary spastic paraplegia. *Journal of Neurology*, *260*(9), 2387–2395. <https://doi.org/10.1007/s00415-013-7002-3>
- Nonnekes, J., Oude Nijhuis, L. B., de Niet, M., de Bot, S. T., Pasman, J. W., van de Warrenburg, B. P. C., Bloem, B. R., Weerdesteyn, V., & Geurts, A. C. (2014). Startreact restores reaction time in HSP: Evidence for subcortical release of a motor program. *Journal of Neuroscience*, *34*(1), 275–281. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2948-13.2014>
- Novarino G, Fenstermaker AG, Zaki MS, et al. (2014). Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science*, *343*, 506–511. <https://doi.org/10.1126/science.1247363>
- Orsucci, D., Petrucci, L., Ienco, E. C., Chico, L., Simi, P., Fogli, A., Baldinotti, F., Simoncini, C., LoGerfo, A., Carlesi, C., Arnoldi, A., Bassi, M. T., Siciliano, G., Bonuccelli, U., & Mancuso, M. (2014). Hereditary spastic paraparesis in adults. A clinical and genetic perspective from Tuscany. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *120*, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2014.02.002>
- Ortega Suero, G., Abenza Abildúa, M. J., Serrano Munuera, C., Rouco Axpe, I., Arpa Gutiérrez, F. J., Adarmes Gómez, A. D., Rodríguez de Rivera, F. J., Quintans Castro, B., Posada Rodríguez, I., Vadillo Bermejo, A., Domingo Santos, Á., Blanco Vicente, E., Infante Ceberio, I., Pardo Fernández, J., Costa Arpín, E., Painous Martí, C., Muñoz García, J. E., Mir Rivera, P., Montón Álvarez, F., ... Sobrido Gómez, M. J. (2023). Epidemiology of ataxia and hereditary spastic paraplegia in Spain: A cross-sectional study. *Neurologia*, *38*(6), 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2023.04.003>
- Pan, M. K., Huang, S. C., Lo, Y. C., Yang, C. C., Cheng, T. W., Yang, C. C., Hua, M. S., Lee, M. J., & Tseng, W. Y. I. (2013). Microstructural integrity of cerebral fiber tracts in hereditary spastic paraparesis with SPG11 mutation. *American Journal of Neuroradiology*, *34*(5), 990–996. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A3330>
- Paparella, G., Vavla, M., Bernardi, L., Girardi, G., Stefan, C., & Martinuzzi, A. (2020). Efficacy of a Combined Treatment of Botulinum Toxin and Intensive Physiotherapy in Hereditary Spastic

- Paraplegia. *Frontiers in Neuroscience*, *14*, 111. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00111>
- Pedroso, J. L., Vale, T. C., França Junior, M. C., Kauffman, M. A., Teive, H., Barsottini, O. G. P., & Munhoz, R. P. (2022). A Diagnostic Approach to Spastic ataxia Syndromes. *Cerebellum*, *21*(6), 1073–1084. <https://doi.org/10.1007/s12311-021-01345-5>
- Peng, F., Sun, Y. M., Quan, C., Wang, J., & Wu, J. J. (2019). Two novel homozygous mutations of CAPN1 in Chinese patients with hereditary spastic paraplegia and literatures review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *14*(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1053-1>
- Perić, S., Marković, V., Candayan, A., De Vriendt, E., Momčilović, N., Savić, A., Dragašević-Mišković, N., Svetel, M., Stević, Z., Božović, I., Mesaroš, Š., Drušević, J., Basta, I., Petrović, I., Tamaš, O., Mijajlović, M., Novaković, I., Sokić, D., & Jordanova, A. (2022). Phenotypic and Genetic Heterogeneity of Adult Patients with Hereditary Spastic Paraplegia from Serbia. *Cells*, *11*(18). <https://doi.org/10.3390/cells11182804>
- Piccinelli, S. C., Bassi, M. T., Citterio, A., Manganeli, F., Tozza, S., Santorelli, F. M., Cassarino, S. G., Caria, F., Baldelli, E., Galvagni, A., Santoro, L., Padovani, A., & Filosto, M. (2019). A novel CAPN1 mutation causes a pure hereditary spastic paraplegia in an Italian family. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 10, p. 580). <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00580>
- Pramparo, T., Steiner, R. D., Rodems, S., & Jenkinson, C. (2023). Allelic prevalence and geographic distribution of cerebrotendinous xanthomatosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *18*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02578-1>
- Raffelt, D. A., Tournier, J.-D., Smith, R. E., Vaughan, D. N., Jackson, G., Ridgway, G. R., & Connelly, A. (2017). Investigating white matter fibre density and morphology using fixel-based analysis. *NeuroImage*, *144*(Pt A), 58–73. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.09.029>
- Rahimi Bidgoli, M. M., Javanparast, L., Rohani, M., Najmabadi, H., Zamani, B., & Alavi, A. (2021). CAPN1 and hereditary spastic paraplegia: a novel variant in an Iranian family and overview of the genotype-phenotype correlation. *International Journal of Neuroscience*, *131*(10), 962–974. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1763344>
- Rezende, T. J. R., De Albuquerque, M., Lamas, G. M., Martinez, A. R. M., Campos, B. M., Casseb, R. F., Silva, C. B., Branco, L. M. T., D'Abreu, A., Lopes-Cendes, I., Cendes, F., & França, M. C. (2015). Multimodal mri-based study in patients with SPG4 mutations. *PLoS ONE*, *10*(2), e0117666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117666>
- Rothwell, J. C., Vidailhet, M., Thompson, P. D., Lees, A. J., & Marsden, C. D. (1994). The auditory startle response in progressive supranuclear palsy. *Journal of Neural Transmission, Supplement*, *42*(42), 43–50. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6641-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6641-3_4)
- Ruano, L., Melo, C., Silva, M. C., & Coutinho, P. (2014). The global epidemiology of hereditary ataxia

- and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*, 42(3), 174–183. <https://doi.org/10.1159/000358801>
- Rudenskaya, G. E., Kadnikova, V. A., Ryzhkova, O. P., Dyomina, N. A., Sharkova, I. V., & Polyakov, A. V. (2021). Autosomal recessive spastic paraplegia types 7 and 76. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*, 15(2), 13–20. <https://doi.org/10.25692/ACEN.2021.2.2>
- Ryzhkova, O., Mironovich, O., Gundorova, P., Orlova, A., Cherevatova, T., Chukhrova, A., Zabnenkova, V., Schagina, O., Kadnikova, V., Galeeva, N., & Poliakov, A. (2022). Abstracts from the 54th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference: e-Posters. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 30(SUPPL 1), 88–608. <https://doi.org/10.1038/s41431-021-01026-1>
- Salinas, S., Proukakis, C., Crosby, A., & Warner, T. T. (2008). Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *The Lancet Neurology*, 7(12), 1127–1138. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70258-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70258-8)
- Santos, D. M., Xavier, J. M., Morgado, A. L., Solá, S., & Rodrigues, C. M. P. (2012). Distinct regulatory functions of calpain 1 and 2 during neural stem cell self-renewal and differentiation. *PLoS One*, 7(3), e33468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033468>
- Sarret, C., Lemaire, J.-J., Tonduti, D., Sontheimer, A., Coste, J., Pereira, B., Feschet, F., Roche, B., & Boespflug-Tanguy, O. (2016). Time-course of myelination and atrophy on cerebral imaging in 35 patients with PLP1-related disorders. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 58(7), 706–713. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13025>
- Saute, J. A., Giugliani, R., Merckens, L. S., Chiang, J. P.-W., DeBarber, A. E., & de Souza, C. F. M. (2015). Look carefully to the heels! A potentially treatable cause of spastic paraplegia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(2), 363–364. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9745-0>
- Schiavoni, S., Spagnoli, C., Rizzi, S., Salerno, G. G., Frattini, D., Pisani, F., & Fusco, C. (2020). Paediatric-onset hereditary spastic paraplegias: a retrospective cohort study. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 62(9), 1068–1074. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14547>
- Schilling, K., Gao, Y., Janve, V., Stepniewska, I., Landman, B. A., & Anderson, A. W. (2017). Can increased spatial resolution solve the crossing fiber problem for diffusion MRI? *NMR in Biomedicine*, 30(12). <https://doi.org/10.1002/nbm.3787>
- Schöls, L., Rattay, T. W., Martus, P., Meisner, C., Baets, J., Fischer, I., Jäggle, C., Fraidakis, M. J., Martinuzzi, A., Saute, J. A., Scarlato, M., Antenora, A., Stendel, C., Höflinger, P., Lourenco, C. M., Abreu, L., Smets, K., Paucar, M., Deconinck, T., ... Schüle, R. (2017). Hereditary spastic paraplegia type 5: natural history, biomarkers and a randomized controlled trial. *Brain : A Journal of Neurology*, 140(12), 3112–3127. <https://doi.org/10.1093/brain/awx273>
- Schreiber, J., Riffert, T., Anwander, A., & Knösche, T. R. (2014). Plausibility Tracking: a method to

- evaluate anatomical connectivity and microstructural properties along fiber pathways. *NeuroImage*, 90, 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.01.002>
- Schüle, R., Wiethoff, S., Martus, P., Karle, K. N., Otto, S., Klebe, S., Klimpe, S., Gallenmüller, C., Kurzwelly, D., Henkel, D., Rimmele, F., Stolze, H., Kohl, Z., Kassubek, J., Klockgether, T., Vielhaber, S., Kamm, C., Klopstock, T., Bauer, P., ... Schöls, L. (2016). Hereditary spastic paraplegia: Clinicogenetic lessons from 608 patients. *Annals of Neurology*, 79(4), 646–658. <https://doi.org/10.1002/ana.24611>
- Sharma, Y., Saini, A. G., Kaur, R., Bhatia, V., Didwal, G., Kumar, P., & Uppala, R. (2022). Neurodegeneration and Early Infantile Epilepsy Associated with ITPA Variants: A Case Series and Review of Literature. *Neuropediatrics*, 53(3), 167–175. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1742322>
- Shetty, A., Gan-Or, Z., Ashtiani, S., Ruskey, J. A., van de Warrenburg, B., Wassenberg, T., Kamsteeg, E. J., Rouleau, G. A., & Suchowersky, O. (2019). CAPN1 mutations: Expanding the CAPN1-related phenotype: From hereditary spastic paraparesis to spastic ataxia. *European Journal of Medical Genetics*, 62(12), 103605. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.12.010>
- Siow, S. F., Yeow, D., Rudaks, L. I., Jia, F., Wali, G., Sue, C. M., & Kumar, K. R. (2023). Outcome Measures and Biomarkers for Clinical Trials in Hereditary Spastic Paraplegia: A Scoping Review. *Genes*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/genes14091756>
- Souza, P. V. S., Silva, L. H. L., Badia, B. M. L., Farias, I. B., Pinto, W. B. V. R., & Oliveira, A. S. B. (2019). SPG76: An extremely rare hereditary spastic paraplegia with a new expanding complicated phenotype. In *Revue Neurologique* (Vol. 175, Issue 9, pp. 572–574). <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.01.397>
- Stelten, B. M. L., Dotti, M. T., Verrips, A., Elibol, B., Falik-Zaccari, T. C., Hanman, K., Mignarri, A., Sithole, B., Steiner, R. D., Verma, S., Yahalom, G., Zubarioglu, T., Mochel, F., & Federico, A. (2021). Expert opinion on diagnosing, treating and managing patients with cerebrotendinous xanthomatosis (CTX): a modified Delphi study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 353. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01980-5>
- Stelten, B. M. L., Huidekoper, H. H., van de Warrenburg, B. P. C., Brilstra, E. H., Hollak, C. E. M., Haak, H. R., Kluijtmans, L. A. J., Wevers, R. A., & Verrips, A. (2019). Long-term treatment effect in cerebrotendinous xanthomatosis depends on age at treatment start. *Neurology*, 92(2), e83–e95. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006731>
- Tadic, V., Klein, C., Hinrichs, F., Münchau, A., Lohmann, K., & Brüggemann, N. (2017). CAPN1 mutations are associated with a syndrome of combined spasticity and ataxia. In *Journal of neurology* (Vol. 264, Issue 5, pp. 1008–1010). <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8464-5>

- Thauerer, B., Zur Nedden, S., & Baier-Bitterlich, G. (2012). Purine nucleosides: endogenous neuroprotectants in hypoxic brain. *Journal of Neurochemistry*, *121*(3), 329–342.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07692.x>
- Travaglini, L., Bellacchio, E., Aiello, C., Pro, S., Bertini, E., & Nicita, F. (2017). Expanding the clinical phenotype of CAPN1-associated mutations: A new case with congenital-onset pure spastic paraplegia. In *Journal of the Neurological Sciences* (Vol. 378, pp. 210–212).  
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.05.014>
- Unrath, A., Müller, H. P., Riecker, A., Ludolph, A. C., Sperfeld, A. D., & Kassubek, J. (2010). Whole brain-based analysis of regional white matter tract alterations in rare motor neuron diseases by diffusion tensor imaging. *Human Brain Mapping*, *31*(11), 1727–1740.  
<https://doi.org/10.1002/hbm.20971>
- Van de Vondel, L., De Winter, J., Beijer, D., Coarelli, G., Wayand, M., Palvadeau, R., Pauly, M. G., Klein, K., Rautenberg, M., Guillot-Noël, L., Deconinck, T., Vural, A., Ertan, S., Dogu, O., Uysal, H., Brankovic, V., Herzog, R., Brice, A., Durr, A., ... Baets, J. (2022). De Novo and Dominantly Inherited SPTAN1 Mutations Cause Spastic Paraplegia and Cerebellar Ataxia. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, *37*(6), 1175–1186.  
<https://doi.org/10.1002/mds.28959>
- van Heijst, A. F., Verrips, A., Wevers, R. A., Cruysberg, J. R., Renier, W. O., & Tolboom, J. J. (1998). Treatment and follow-up of children with cerebrotendinous xanthomatosis. *European Journal of Pediatrics*, *157*(4), 313–316. <https://doi.org/10.1007/s004310050818>
- van Lith, B. J. H., Coppens, M. J. M., Nonnekens, J., van de Warrenburg, B. P. C., Geurts, A. C., & Weerdesteyn, V. (2018). StartReact during gait initiation reveals differential control of muscle activation and inhibition in patients with corticospinal degeneration. *Journal of Neurology*, *265*(11), 2531–2539. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-9027-0>
- Voordecker, P., Mavroudakis, N., Blečić, S., Hildebrand, J., & Zegers de Beyl, D. (1997). Audiogenic startle reflex in acute hemiplegia. *Neurology*, *49*(2), 470–473.  
<https://doi.org/10.1212/wnl.49.2.470>
- Wali, G., Sue, C. M., & Mackay-Sim, A. (2018). Patient-derived stem cell models in SPAST HSP: Disease modelling and drug discovery. *Brain Sciences*, *8*(8).  
<https://doi.org/10.3390/brainsci8080142>
- Wang, D. (2009). Reticular formation and spinal cord injury. *Spinal Cord*, *47*(3), 204–212.  
<https://doi.org/10.1038/sc.2008.105>
- Wang, Y., Hersheson, J., Lopez, D., Hammer, M., Liu, Y., Lee, K.-H., Pinto, V., Seinfeld, J., Wiethoff, S., Sun, J., Amouri, R., Hentati, F., Baudry, N., Tran, J., Singleton, A. B., Coutelier, M., Brice, A.,

- Stevanin, G., Durr, A., ... Baudry, M. (2016). Defects in the CAPN1 Gene Result in Alterations in Cerebellar Development and Cerebellar Ataxia in Mice and Humans. *Cell Reports*, *16*(1), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.044>
- Wei, Q., Dong, H. L., Pan, L. Y., Chen, C. X., Yan, Y. T., Wang, R. M., Li, H. F., Liu, Z. J., Tao, Q. Q., & Wu, Z. Y. (2019). Clinical features and genetic spectrum in Chinese patients with recessive hereditary spastic paraplegia. *Translational Neurodegeneration*, *8*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40035-019-0157-9>
- Xia, Z. cai, Liu, Z. hua, Zhou, X. xia, Liu, Z., Wang, J. ling, Hu, Z. mao, Tan, J. qiong, Shen, L., Jiang, H., Tang, B. sha, & Lei, L. fang. (2020). Mutation analysis of CAPN1 in Chinese populations with spastic paraplegia and related neurodegenerative diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, *411*, 116691. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116691>
- Yang, J. O., Yoon, J. Y., Sung, D. H., Yun, S., Lee, J. J., Jun, S. Y., Halder, D., Jeon, S. J., Woo, E. J., Seok, J. M., Cho, J. W., Jang, J. H., Choi, J. K., Kim, B. J., & Kim, N. S. (2021). The emerging genetic diversity of hereditary spastic paraplegia in Korean patients. *Genomics*, *113*(6), 4136–4148. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.10.014>
- Yeo, S. S., Chang, M. C., Kwon, Y. H., Jung, Y. J., & Jang, S. H. (2012). Corticoreticular pathway in the human brain: diffusion tensor tractography study. *Neuroscience Letters*, *508*(1), 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.11.030>
- Zhu, Z., Hou, W., Cao, Y., Zheng, H., Tian, W., & Cao, L. (2023). Spastic paraplegia type 76 due to novel CAPN1 mutations: three case reports with literature review. *Neurogenetics*, *24*(4), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s10048-023-00726-8>

## 7. ARTIGOS

**7.1 – Publicado na revista *Clinical Genetics*; 2023 May;103(5):580-584.**  
*doi: 10.1111/cge.14280.*(Fussiger et al., 2023)

### **Copy number variations in SPAST and ATL1 are rare among Brazilians**

Helena Fussiger <sup>1#</sup> , Bruna Letícia da Silva Pereira <sup>2#</sup> , Janice Pacheco Dias Padilha <sup>1#</sup> , Karina Carvalho Donis <sup>3</sup> , Rare Genomes Project Consortium <sup>4</sup> , Marina Siebert <sup>5</sup> , Ana Carolina Brusius Facchin <sup>3</sup> , Guilherme Baldo <sup>2</sup> , Jonas Alex Morales Saute <sup>1,3,6\*</sup>

1 Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2 Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

3 Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

4 Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil. Full list of authors of the consortium can be found in the Appendix.

5 Laboratory Research Unit, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

6 Department of Internal Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

# These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author:

Jonas Alex Morales Saute

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Medical Genetics Service. Av. Ramiro Barcelos, 2350, Santa Cecília 90035903 - Porto Alegre, RS – Brazil. Phone +55 51 33598011. E- mail: [jsaute@hcpa.edu.br](mailto:jsaute@hcpa.edu.br)

Conflict of interest: We have no conflicts of interest to disclose.

Funding: The study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant Number:460941/2014-3) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos- Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) (Grant Number:14-0695). Pereira BLS, Saute JA and Baldo G are supported by CNPq. Padilha JPD is supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This research was also made possible through access to the data and findings generated by the Rare Genomes Project. The Rare Genomes Project is an initiative of Hospital Israelita Albert Einstein in partnership with the

Programa de Apoio ao Desenvolvimento Institucional do Sistema Único de Saúde (PROADI-SUS, Law 12.101/2009, protocol number 25000.083098/2019-71) from the Brazilian Ministry of Health.

#### ABSTRACT

Copy number variations (CNV) may represent a significant proportion of SPG4 and SPG3A diagnosis, the most frequent autosomal dominant subtypes of hereditary spastic paraplegias (HSP). We aimed to assess the frequency of CNVs in SPAST and ATL1 and to update the molecular epidemiology of HSP families in southern Brazil. A cohort study that included 95 Brazilian index cases with clinical suspicion of HSP was conducted between April 2011 and September 2022. Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) was performed in 41 cases without defined diagnosis by different massive parallel sequencing techniques (MPS). Diagnosis was obtained in 57/95 (60%) index cases, 15/57 (26.3%) being SPG4. Most frequent autosomal recessive HSP subtypes were SPG7 followed by SPG11, SPG76 and cerebrotendinous xanthomatosis. No CNVs in SPAST and ATL1 were found. Copy number variations are rare among SPG4 and SPG3A families in Brazil. Considering the possibility of CNVs detection by specific algorithms with MPS data, we consider that this is likely the most cost-effective approach to investigate CNVs in these genes in low-risk populations, with MLPA being reserved as an orthogonal confirmatory test.

Keywords: Copy number variation; Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification; MLPA; SPG4; SPG3A; SPAST; ATL1; rearrangements

#### INTRODUCTION

Hereditary spastic paraplegias (HSP) are a group of rare monogenic neurodegenerative diseases characterized by muscle weakness associated with spasticity predominantly affecting the lower limbs. HSPs are classified into pure or complex forms, in which signs related to corticospinal tract dysfunction are accompanied by other neurological or systemic alterations (Harding, 1983; Shribman et al, 2019). Pathogenic variants in genes related to axonal transport, membrane and organelle trafficking, mitochondrial dysfunction and lipid metabolism are the main mechanisms associated with these diseases' development (Shribman et al, 2019). More than 87 genes or gene loci (SPG) were described as causing HSP subtypes (Tábara et al, 2022), presenting with autosomal dominant (AD), autosomal recessive (AR), mitochondrial or X-linked inheritance patterns. SPG4, caused by pathogenic variants in SPAST (2p22.3), is the most frequent HSP subtype, representing up to 60% of families with clear AD inheritance (Schule et al., 2016; Burguez et al., 2017). SPG3A,

caused by variants in ATL1 (14q22.1), is the second most prevalent subtype among AD-HSP, with most cases being pure forms with onset before 10 years of age. Although small-scale variants in SPAST and ATL1 are the most frequent genetic alterations in SPG4 and SPG3A, copy number variations (CNVs), such as large deletions or duplications of exons, may represent more than 20% of disease-causing variants in some cohorts (Depienne et al., 2007; Elert-Dobkowska et al, 2015; Kadnikova et al, 2019). Previously, our group described the performance of a massively parallel sequencing (MPS) panel containing 12 HSP-related genes in twenty-nine index cases from southern Brazil (Burguez et al., 2017). The diagnostic yield of the panel was close to 50%; however, copy number (CNV) or structural variations were not evaluated by this technology. In order to identify possible CNVs not detected in the previous cohort and in its follow-up, in this study we evaluated SPAST and ATL1 genes by Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) technique.

## MATERIALS AND METHODS

### Study design and subjects

This cohort study included 95 Brazilian index cases with clinical suspicion of HSP. CNVs in SPAST and ATL1 were assessed in 41 of them, whose molecular diagnosis was not defined by a panel of 12 genes related to the most frequent forms of HSP (see Burguez et al, 2017 for details and for the complete list of genes) or exome sequencing (WES). Subjects were recruited from the neuromuscular genetics' outpatient clinic of a Reference Service for Rare Diseases in southern Brazil between April 2011 and September 2022. The samples were analyzed regardless of age at onset of symptoms, HSP form or pattern of inheritance. This project was approved by the institutional research ethics committee (GPPG-HCPA 2014-0695, 2017-0341) informed consent or data use term were obtained according to the ethical precepts recommended by the Declaration of Helsinki.

### Molecular Analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by a commercial kit (QIAamp® DSP DNA Mini Kit, Qiagen) using the manufacturer's protocol. The panel of 12 genes per SMP was performed as previously described (Burguez et al., 2017). In six index cases, five with defined diagnosis, commercial WES results were available. Genome sequencing (WGS) was performed in 5 index cases that took part in the Rare Genomes Project. WGS libraries were prepared with Illumina TruSeq® DNA PCR-Free Library Prep protocol HS (Illumina Inc., San Diego, CA, United

States) for Whole Genome Sequencing reagent kit and sequencing was performed with NovaSeq® 6,000 platform (detailed description of WGS procedures are available elsewhere, Coelho et al. 2022). CNV analysis of ATL1 and SPAST were performed by MLPA using the commercial kit (SALSA-MLPA P-165 SPG3A/SPG4, MRC-Holland) according to the manufacturer's recommendations. Multiplex-PCR products from the fragment analysis were analyzed by capillary electrophoresis using the ABI-3500xL Genetic Analyzer platform (Applied- Biosystems) with data analysis being performed with Coffalyser.Net Software (MRC-Holland).

## RESULTS

We evaluated 95 index cases with HSP suspicion with MPS (12 genes panel/WES/WGS), with 57 (60%) cases reaching a diagnosis. Of these, 15/57 (26.3%) were diagnosed with SPG4 (9 with a pedigree suggestive of AD inheritance and the remaining being isolated cases), all with pure forms. If we consider only the cases with AD inheritance, 9/19 (47.3%) had a diagnosis of SPG4 and 1 (5.2%) a diagnosis of SPG3A. The most frequent forms of AR-HSP were SPG7 (8 families) and SPG11, SPG76 and cerebrotendinous xanthomatosis (CTX, with 6 families each, see Figure 1). We performed MLPA of SPAST and ATL1 in 41 index cases, and no CNVs were found. Considering altogether the cases with confirmed diagnosis by SMP, we did not find CNVs in SPAST and ATL1 in: 19 cases with AD inheritance; 36 cases with AR inheritance; 47 isolated cases; 44 cases with pure forms; and 51 cases with complex forms. After negative MLPA analysis, 3 index cases were diagnosed with SPG76 by WGS and a more comprehensive HSP-related gene panel. The clinical and demographic profile of the cohort is summarized in Table 1 and detailed in Supp. Table 1.

## DISCUSSION

The frequency of copy number variations as the cause of SPG4 and SPG3A varies among populations. In a Brazilian cohort with 95 families with suspected HSP, 44 of which were pure forms, we did not find any case caused by this type of variant. Our data updated the regional series placing SPG7 as the most frequent form of AR-HSP, followed by SPG11, SPG76 and CTX. Large deletions/duplications in SPAST were found in most SPG4 series worldwide, with relative frequencies ranging from 3.8 to 37.5% in the largest cohorts. Table 1 shows the main results of a comprehensive review of studies that evaluated this type of variant in SPAST, considering studies that evaluated more than 100 cases with HSP. Altogether, these studies reported 131 CNVs (14.9%

of reported variants, being 123 exons deletions and 8 exons duplications) in SPAST in at least 879 index cases. The highest proportions of CNVs in SPAST (between 20.4% and 37.5%) were found in series from France (Depienne et al. 2007), Poland (Elert-Dobkowska et al. 2015), Russia (Kadnikova et al. 2019) and South Korea (Park et al. 2015), whereas the lowest proportion was seen in Spain, 3.8% (Alvarez et al. 2010). Regarding the CNV detection technique, all studies since 2006 used MLPA, except for two, one of which used a customized comparative genomic hybridization for HSP (Ishiura et al. 2014) and the other analyzed CNVs from WES (Varghaei et al. al, 2022). In the latter study, 48 samples were selected according to ExomeDepth algorithm results for MLPA analysis, and 6 large deletions in SPAST were identified (corresponding to 9.2% of cases with SPG4, with a true positive rate of 12.5%, Varghaei et al, 2022).

In addition to regional genetic factors, sample characteristics can influence the relative frequency of CNVs among SPG4 cases. Kadnikova et al. found CNVs in SPAST in 10/37 (27%) cases in the Russian population, with 69% of cases having AD inheritance (Kadnikova et al, 2019), whereas the frequency of CNVs in a study carried out in Poland was 15/40 (37.5%), being 39% in cases with AD-HSP and only 5.4% in isolated cases (Elert-Dobkowska et al., 2015). In a study carried out in Spain (Alvarez et al. 2010), which had a predominance of sporadic cases or cases with unknown inheritance (62%), the presence of CNVs in SPAST was the lowest among the studies presented in Table 1. In our study, only 20% of the investigated cases had defined AD inheritance, with 49.5% of the sample being composed of isolated cases, which may partially explain the difference in results in relation to the literature. In addition to the pattern of inheritance, differences related to the phenotype of cases may also have influenced the results, since 53.7% of our cohort had complex phenotype. A study carried out in China presented similar results to ours, having evaluated 52 families, 39 of them with a complex phenotype (Shi et al, 2022), reinforcing this possibility. Our results regarding ATL1 are consistent with those found in the literature, as only one study showed a large deletion in this gene (Suleck et al, 2013), indicating the rarity of CNVs as the cause of SPG3A.

The main limitation of our study was the number of individuals recruited for investigation by the MLPA technique and the phenotypic and pedigree profile (enriched in complex phenotypes and AR-HSP and isolated cases). It would be possible that by analyzing a greater number of patients with pure forms and AD inheritance we would have found CNVs in SPAST; however, it is unlikely that CNVs are frequent in the Brazilian population. Accordingly, there is only a single case report of SPG4 being caused by a large rearrangement in Brazil (Mitne-Neto. et al, 2007).

## CONCLUSION

The relative frequency of SPG4 in southern Brazil is similar to that found worldwide. However, unlike other studies, we did not find CNVs in SPAST by MLPA, suggesting that these variants are rare in our population. Considering the possibility of CNVs detection by MPS, corroborated by recent studies in HSPs, we consider that this is the most cost-effective approach to initiate CNVs analysis in these genes at least in low-risk populations, with MLPA being reserved as an orthogonal confirmatory test.

## REFERENCES

1. Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *The Lancet*. 1983;321:1151-5.
2. Shribman, S., Reid, E., Crosby, A. H. et al., (2019). Hereditary spastic paraplegia: from diagnosis to emerging therapeutic approaches. *The Lancet Neurology*, 18, 1136-1146.
3. Tábara LC, Al-Salmi F, Maroofian R, et al. TMEM63C mutations cause mitochondrial morphology defects and underlie hereditary spastic paraplegia. *Brain*. 2022;145:3095-3107.
4. Schüle R, Wiethoff S, Martus P, et al. Hereditary spastic paraplegia: Clinicogenetic lessons from 608 patients. *Ann Neurol*. 2016;79:646-58.
5. Burguez D, Polese-Bonatto M, Scudero LAJ, et al. Clinical and molecular characterization of hereditary spastic paraplegias: A next-generation sequencing panel approach. *Journal of the Neurological Sciences*. 2017;383:18-25
6. Depienne C, Fedirko E, Forlani S, et al. Exon deletions of SPG4 are a frequent cause of hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet*. 2007;44:281-4.
7. Elert-Dobkowska E, Stepniak I, Krysa W, et al. Molecular spectrum of the SPAST, ATL1 and REEP1 gene mutations associated with the most common hereditary spastic paraplegias in a group of Polish patients. *J Neurol Sci*. 2015;359:35-9.
8. Kadnikova VA, Rudenskaya GE, Stepanova AA, Sermyagina IG, Ryzhkova OP. Mutational spectrum of SPAST (SPG4) and ATL1 (SPG3A) genes in Russian patients with hereditary spastic paraplegia. *Sci Rep*. 2019;9:14412.
9. Coelho AVC, Mascaro-Cordeiro B, Lucon DR, et al. The Brazilian Rare Genomes Project: Validation of Whole Genome Sequencing for Rare Diseases Diagnosis. *Front Mol Biosci*. 2022;9:821582.

10. Alvarez V, Sánchez-Ferrero E, Beetz C, et al. Mutational spectrum of the SPG4 (SPAST) and SPG3A (ATL1) genes in Spanish patients with hereditary spastic paraplegia. *BMC Neurol.* 2010;10:89.
11. de Bot ST, van den Elzen RTM, Mensenkamp AR, et al. Hereditary spastic paraplegia due to SPAST mutations in 151 Dutch patients: new clinical aspects and 27 novel mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010;81:1073-8
12. Ishiura H, Takahashi Y, Hayashi T, et al. Molecular epidemiology and clinical spectrum of hereditary spastic paraplegia in the Japanese population based on comprehensive mutational analyses. *J Hum Genet.* 2014;59:163-72.
13. Park H, Kang SH, Park S, et al. Mutational spectrum of the SPAST and ATL1 genes in Korean patients with hereditary spastic paraplegia. *Journal of the Neurological Sciences.* 2015;357(1-2):167-72.
14. Mészárosová AU, Putzová M, Čermáková M, et al. SPAST mutation spectrum and familial occurrence among Czech patients with pure hereditary spastic paraplegia. *J Hum Genet.* 2016;61:845-50.
15. Chelban V, Tucci A, Lynch DS, et al. Truncating mutations in SPAST patients are associated with a high rate of psychiatric comorbidities in hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017;88:681-7.
16. Parodi L, Fenu S, Barbier M, et al. Spastic paraplegia due to SPAST mutations is modified by the underlying mutation and sex. *Brain.* 2018;141:3331-42.
17. Varghaei P, Estiar MA, Ashtiani S, et al. Genetic, structural and clinical analysis of spastic paraplegia 4. *Parkinsonism & Related Disorders.* 2022;98:62-9.
18. Sulek A, Elert E, Rajkiewicz M, et al. Screening for the hereditary spastic paraplaegias SPG4 and SPG3A with the multiplex ligation-dependent probe amplification technique in a large population of affected individuals. *Neurol Sci.* 2013;34:239-42.
19. Mitne-Neto M, Kok F, Beetz C, et al. A multi-exonic SPG4 duplication underlies sex-dependent penetrance of hereditary spastic paraplegia in a large Brazilian pedigree. *Eur J Hum Genet.* 2007;15:1276-9.
20. Shi Y, Wang A, Chen B, et al. Clinical features and genetic spectrum of patients with clinically suspected hereditary progressive spastic paraplegia. *Front Neurol.* 2022;13:872927.

Figure 1:

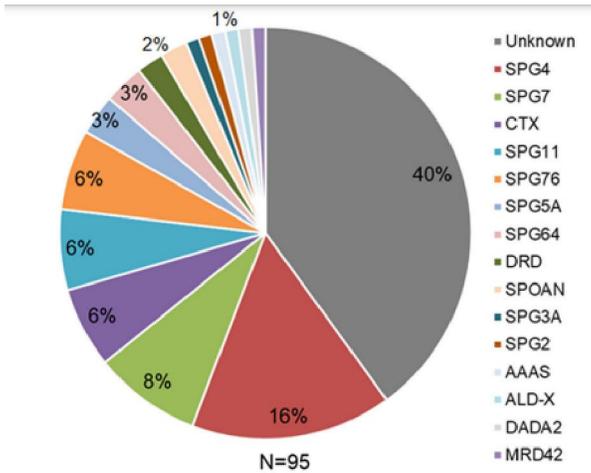


TABLE 1 Characteristics of the hereditary spastic paraplegia cohort

Group	N	Female	Age	Inheritance pattern				Clinical form	
				AD <sup>a</sup>	AR <sup>a,b</sup>	Isolated <sup>b</sup>	X-linked	Pure	Complex
Total sample	95	54 (56.8%)	43.3 (16.6)	19 (20%)	36 (37.9%)	47 (49.5%)	2 (2.1%)	44 (46.3%)	51 (53.7%)
Confirmed diagnosis	57 (60%)	33 (57.9%)	45 (14.7)	10 (52.6%)	25 (75%)	23 (48.9%)	2 (100%)	25 (56.8%)	32 (62.7%)
MLPA performed	41 (43.1%)	25 (60.9%)	42.8 (18)	9 (21.9%)	11 (26.8%)	25 (60.9%)	0	20 (48.8%)	21 (51.2%)

Note: Data are shown as frequencies and percentages, except for age that is shown as mean (standard deviation).

Abbreviations: AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; N, number.

<sup>a</sup>A single family was considered both as possible autosomal dominant and autosomal recessive inheritance.

<sup>b</sup>Isolated cases with parental consanguinity were considered both as autosomal recessive and isolated cases.

**Table 2:**  
**Table 2** – Copy number variation analysis of *SPAST* across studies

Author/year	Country	Population	CNV technique	CNV in <i>SPAST</i>	
				%HSP	%SPG4
Depienne et al. 2007	European France 86%	121 HSP index cases with normal <i>SPAST</i> dHPLC - 120 AD-HSP (99.1%)  102 SPG4 index cases (78 SPG4 subjects with point variants were added)	MLPA	24/121 (19.8%)  24 exons deletions	24/102 (20.6%)
Alvarez et al. 2010	Spain	370 HSP index cases - 141 - HSP-AD (38%) - 229 - Sporadic or unknown (62%)  52 SPG4 index cases	MLPA	2/370 (0.5%)  2 exons deletions	2/52 (3,8%)
de Bot et al. 2010	Netherlands	1380 HSP subjects  84 SPG4 index cases	MLPA	8/1380 (0.5%)  8 exons deletions	8/84 (9.5%)
Ishiura et al. 2014	Japan	129 HSP index cases - 49 AD-HSP (38%) - 11 AR-HSP (8.5%) - 6 indeterminate inheritance (4.6%) - 63 sporadic (48.8%)  - 82 pure HSP (63.5%)  32 SPG4 index cases	aCGH	5/129 (3.8%)  4 exons deletions 1 exon duplication	5/32 (15.6%)
Elert-Dobkowska et al. 2015	Poland	216 HSP index cases 40 SPG4 index cases	MLPA	15/216 (6.9%)  14 exons deletions 1 exons duplication	15/40 (37.5%)
Park et al. 2015	South Korea	206 HSP index cases  49 SPG4 index cases	MLPA	10/206 (4.8%)  9 exons deletions 1 exons duplication	10/49 (20.4%)
Mészárosová et al.	Czech Republic	263 HSP index cases with pure forms	MLPA	4/263 (1.5%)	4/48 (8.3%)

2016			- 106 sporadic patients (40.3%) - 91 AD-HSP (34.6%) - 66 indeterminate inheritance (25.1%)			4 exons deletions
			48 SPG4 index cases			
Chelban et al. 2017	United Kingdom	104 SPAST positive index cases		MLPA	NA	13/104 (11%) 13 exons deletions
Parodi et al. 2018	SPATAX network - France 89%	842 SPG4 patients - 481/636 had family history (75.6%) - 36/636 sporadic (5.7%) - 119/636 unavailable (18.7%)		MLPA	NA	34/266*(12.8%) 31 exons deletions 3 exons duplications
Kadnikova et al. 2019	Russia	122 HSP index cases - 69 familial (56.6%) - 53 sporadic (43.4%)		MLPA	10/122 (8.2%)	10/37 (27%) 8 exons deletions 2 exons duplications
Varghaei et al. 2022	Canada	431 HSP index cases 65 SPG4 index cases		WES MLPA	6/431 (1.4%)	6/65 (9,2%) 6 exons deletions

A search on PubMed was performed with the search strategy: “(Hereditary Spastic Paraplegia OR HSP OR AD-HSP OR SPAST OR ATL1 OR SPG4 OR SPG3A) AND (copy number variation OR deletion OR duplication OR “rearrangements)” on October 2022. We selected studies that evaluated copy number variants in *SPAST* and *ATL1* that included at least 100 subjects with hereditary spastic paraplegias. aCGH, customized comparative genomic hybridization; AD, autosomal dominant; AR autosomal recessive; CNV, copy number variation; HSP, hereditary spatic paraplegia; WES, exome sequencing analysis with ExomeDepth pipeline. \*only the number of different variants in *SPAST* was presented.

**Artigos 2,3,4 e 5 removidos por direitos autorias (artigo 2) e por ainda não estarem publicados.**

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS:**

O objetivo principal do estudo foi o de caracterizar/atualizar aos dados epidemiológicos, moleculares, clínicos e paraclínicos das PEH em nossa população. Através da primeira fase do trabalho, atingimos o primeiro objetivo específico quando mostramos as especificidades deste grupo de doenças na nossa coorte, observando achados particulares de prevalência, assim como moleculares. Comparando com o estudo anterior publicado pelo nosso grupo, de 2017 (Burguez et al., 2017), constatamos algumas mudanças nas frequências das formas mais comuns da doença. Naquele momento, foram incluídos nas análises, através de estudo molecular por painel de genes (*ATL1*, *BSCL2*, *CYP7B1*, *KIAA0196*, *KIF5A*, *NIPA1*, *REEP1*, *SPAST*, *SPG7*, *SPG11* e *ZFYVE26* mais *CYP27A1*) 29 pacientes com fenótipo de PEH que apresentavam pelo menos um dos três critérios de recorrência familiar, consanguinidade e afilamento de corpo caloso. O rendimento do painel foi de 51,7%, no total, mas mais expressivo nos casos com fenótipo puro, principalmente pela prevalência alta de SPG4 (50%) e com herança AD (60%). Os com herança AR, a maior parte era SPG11 (16%), seguida de SPG7 (11%), SPG5 e CTX (ambos com 5%). A atualização dos dados epidemiológicos levou em consideração os resultados de 95 casos índice (incluindo os do estudo anterior) com fenótipo de PEH que realizaram investigação molecular através de painéis de genes, WES e WGS, chegando a um rendimento diagnóstico de 60%. A SPG4 continuou sendo a forma mais frequente, principalmente considerando casos puros e de herança AD, mas a SPG7 passou a ser a forma AR mais frequente, seguida da SPG11, SPG76 e CTX. Com a ampliação da análise molecular, subtipos diferentes de PEH foram encontrados, como *ENTPD1*-NDD/SPG64, fenótipo recentemente caracterizado na literatura, ultrarraro, responsável por 3% dos casos. Ressalta-se que, dentre os casos com padrão de herança AD que chegaram a uma etiologia molecular, todos eram SPG4 menos um, que confirmou diagnóstico de SPG3A. Pela revisão de literatura que mostrou diferentes populações apresentando casos de SPG4 causados por CNVs (responsável por até 37,5% das variantes causadoras de doença no *SPAST* em algumas populações) e um relato isolado no *ATL1*, realizamos análise molecular pela técnica de MLPA nestes genes, mas sem encontrar nenhum rearranjo. Estes resultados sugerem que a investigação genética de pacientes com fenótipo de PEH possa ser individualizada

dependendo do fenótipo e do padrão de herança: casos com herança AD e fenótipo puro podem iniciar a análise com sequenciamento do gene *SPAST*, enquanto que casos com herança AR e com fenótipos complexos provavelmente se beneficiam mais com avaliações mais amplas, como painéis de genes abrangentes, WES ou até mesmo WGS. Principalmente com a evolução das técnicas de análise de dados obtidos através de MPS, e considerando-se a baixa frequência de CNVs no *SPAST* encontrada na nossa população, a inclusão deste método na investigação das PEH não parece acrescentar ao rendimento diagnóstico, além de aumentar seu custo.

Nosso segundo objetivo foi descrever os aspectos moleculares e clínicos da CTX por ser um dos subtipos mais frequentes de PEH na nossa população e por apresentar potencial tratamento. Dados clínicos, moleculares e de resposta a tratamento foram obtidos de 38 pacientes (26 casos índice) provenientes de quatro diferentes regiões do país, configurando a maior coorte da doença descrita no nosso país e uma das maiores séries mundiais. A prevalência encontrada mostra que provavelmente a doença é subdiagnosticada levando em consideração estudos prévios que sugeriram prevalência de 0,21 a 1,4 casos por 100.000 habitantes em países de etnia latina/americana miscigenada (Pramparo et al., 2023). Demonstramos também que, mesmo a maior parte dos casos caracterizarem-se pelo fenótipo clássico da doença, sujeitos com apresentação espinhal foram responsáveis por cerca de 11% dos casos, mostrando a importância da investigação de CTX em casos com fenótipo de PEH. Apesar de muito frequentes, os achados clínicos de xantomas e catarata não estavam presentes em todos os casos, indicando que sua ausência não exclui a possibilidade diagnóstica, assim como achados de neuroimagem, que ocorrem na maioria (principalmente hipersinal em T2 FLAIR do núcleo dentado cerebelar), mas também podendo estar normal. O maior conhecimento sobre esta variabilidade fenotípica pode aumentar a suspeição diagnóstica da doença e, conseqüentemente, seu diagnóstico. Outra importante consideração foi a alteração no nível plasmático de colestanol, presente em 100% dos casos, sendo então importante marcador funcional a ser realizado em casos duvidosos, como na presença de VUS no gene *CY27A1*, por exemplo. Clinicamente, os sintomas iniciais mais comuns da doença foram os extraneurológicos, incluindo icterícia neonatal prolongada, diarreia, catarata e xantomas. Ocorrendo cerca de 10 anos do início neurológico do quadro. A partir dos sintomas motores ocorre progressão mais rápida da doença para perda de independência de marcha. Os pacientes tratados com ácido quenodesoxicólico não mostraram mudança nas escalas clínicas, porém, se considerarmos que estudos prévios mostraram que a evolução da doença

pode ser modificada quanto mais cedo for iniciado o tratamento (Stelten et al., 2019)(van Heijst et al., 1998), é possível que a terapia tenha iniciado de forma muito tardia em nossos pacientes. Mais ainda se faz importante aumentar o índice de suspeição da doença, principalmente antes do início do quadro neurológico.

O terceiro objetivo específico foi atualizar dados clínicos neurológicos e extraneurológicos de pacientes com *ENTPD1*-NDD/SPG64 e comparar com casos descritos através de revisão sistemática da literatura e contato com autores. A partir da revisão de literatura, encontramos apenas três novos casos a partir da publicação de Calame et al de 2022 que descreveu a maior serie de NDD-*ENTPD1* até então. Dessa forma, os achados clínicos mais associados a doença foram atraso/regressão do neurodesenvolvimento, deficiência intelectual e fraqueza, como já caracterizado previamente. Ficou claro também que a alteração neuropsiquiátrica de auto/hetero agressividade é um aspecto frequente da doença, algo também observado em outras doenças marcadas por distúrbios de metabolismo das purinas, levantando a hipótese de esta possa ser uma característica deste grupo de doença. Até mesmo como um grupo, a NDD-*ENTPD1* apresenta fenótipo mais semelhante a este grupo de doenças, como LND, a encefalopatia epiléptica e do desenvolvimento 35 e ADSLD(Jinnah, 1993)(Sharma et al., 2022), do que com as PEH. Apesar da disfunção de neurônio motor superior, demarcada pela fraqueza associada a sinal de Babinski, cerca de 80% não apresentavam hiperreflexia. Este achado sugere que possivelmente haja envolvimento diferentes das vias parapiramidais, principalmente do trato TCRE, entre estes pacientes e outras formas de PEH, pois este trato parece estar associado ao desenvolvimento da exacerbação do reflexo de estiramento, tanto nas formas clássicas das paraparesias hereditárias quanto em outras condições, como AVE(Nonnekes et al., 2014)(Y. T. Chen et al., 2019). Conseguimos também estabelecer correlação clínica entre a idade de início da doença e a presença de variantes de perda de função, além da confecção de curvas de Kaplan-Meyer, com as quais pudemos observar que a evolução da doença é mais acelerada nos primeiros anos de vida, levando a maioria dos pacientes a depender de cadeira de rodas. Nosso estudo apresenta o primeiro caso da doença associado a manifestação extraneurológica, caracterizada por esplenomegalia com necessidade de esplenectomia. Apesar de não haver relatos prévios a suspeita de que esta condição curse com manifestações fora do sistema nervoso já era esperada(D. G. Calame et al., 2022). Estes dados mostram que a doença ainda é pouco conhecida e que, a partir da descrição de mais casos, poderemos compreender melhor o fenótipo da condição,

proporcionando acompanhamento mais adequado destes pacientes, além de entender melhor a fisiopatologia da doença.

Descrever aspectos moleculares, de neuroimagem e clínicos e comparar com dados da literatura, através de revisão sistemática, de SPG76, foi nosso subsequente objetivo específico, tendo em vista que a atualização da prevalência das PEH na nossa população mostrou este subtipo de PEH como umas das formas frequentes. Descrevemos os nove casos acompanhados em nosso serviço e correlacionamos seus dados clínicos, paraclínicos e moleculares com os casos publicados até então, encontrados a partir de revisão sistemática, totalizando 112 sujeitos provenientes de 72 famílias. A maioria dos casos apresenta-se como forma complicada, principalmente por ataxia, com início na vida adulta, ocorrendo em média aos 26 anos. O caso de início congênito descrito por Travaglini (Travaglini et al., 2017) não pode ser corroborado após classificação das três variantes encontradas no gene *CAPN1*, que são VUS. O principal fator associado a apresentações mais precoces foi a presença de variantes não relacionadas a perda de função, como já observado por exemplo na SPG4 (Giordani et al., 2021). Especulou-se que variantes *missense* poderiam levar a um ganho tóxico de função, resultando em uma apresentação mais precoce. No entanto, esse mecanismo seria improvável para uma condição autossômica recessiva. Achados cognitivos são infrequentes, assim como distúrbios de movimentação ocular e achados extrapiramidais. Já a progressão da doença apresenta-se de forma insidiosa, semelhante ao previamente descrito na literatura para as PEHs como grupo (Schüle et al., 2016) (Cubillos Arcila et al., 2023). Sendo assim, nossos dados mostraram que a SPG76 apresenta fenótipo espástico atáxico de início na idade adulta e com lenta progressão, fazendo parte do diagnóstico diferencial de um vasto grupo de doenças. Os achados de neuroimagem talvez possam trazer subsídios para a suspeita diagnóstica desta condição através dos hipersinais em T2 FLAIR observados principalmente junto aos cornos occipitais dos ventrículos laterais, mas apenas quando presentes, pois sua ausência não descarta seu diagnóstico. A variante p.Trp392\* mostrou-se a mais frequente nos pacientes do RS, sendo que foi a mesma já descrita em outros casos brasileiros e também em portugueses (Méreaux et al., 2021) (Melo et al., 2018), sugerindo possível efeito fundador.

Nossos últimos objetivos específicos foram avaliar dados multiparamétricos de tractografia do TCS em diferentes grupos de pacientes com PEH (SPG4, *ENTPD1*-NDD/SPG64 e SPG76), comparando estes dados entre os subtipos e com controles e também com achados clínicos e moleculares. A tractografia é um método de avaliação de tratos específicos de substância branca. Tendo em vista os poucos estudos que avaliaram este parâmetro em pacientes com

PEH mesmo sendo uma doença marcada clinicamente e anatomopatologicamente pela degeneração do TCS, o estudo se fez relevante, até mesmo pela necessidade de mais dados para corroborar in vivo o acometimento desta via em pacientes com PEH e ainda avaliar a possibilidade dos diferentes parâmetros encontrados por DTI serem utilizados como biomarcadores da doença. Apesar de encontrarmos algumas diferenças entre os subtipos, nosso principal achado foi a correlação inversa encontrada entre os valores de FA, tanto bilaterais quando médio, e a duração da doença, levantando a hipótese de que este parâmetro pode correlacionar-se com a progressão da doença. Apesar de não haver correlação com a gravidade da doença, aferida pelo uso de apoio para deambular ou de cadeira de rodas, escores com informações de evolução contínuas, como a escala SPRS, poderiam confirmar este dado.

#### **9. PERSPECTIVAS FUTURAS:**

Novas atualizações sobre dados dos pacientes com PEH investigados e acompanhados no HCPA continuarão sendo realizadas para obter cada vez melhor entendimento sobre a casuística do nosso estado. Com maior número de casos de subtipos específicos, estudos mais robustos poderão trazer dados para caracterizar este grupo de doenças com algumas formas ainda pouco conhecidas e compreendidas. Os achados clínicos da NDD-ENTPD1 sugeriram envolvimento diferenciado de vias parapiamidais nos diferentes tipos de PEH, de maneira que planejamos estudar o TCRE nestes pacientes e comparar principalmente com SPG4, forma mais frequente no mundo com fenótipo predominantemente puro. Além disso, planeja-se também realizar estudo longitudinal de achados de neuroimagem, tanto por tractografia do TCS quanto do TCR e comparar com escalas clínicas e testes funcionais. O grupo também realiza estudos com outros potenciais biomarcadores de PEH, incluindo análise de microRNAs.

## 10. ANEXOS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Casos

Nº do CAAE: 11689019.1.0000.5327

#### **Título do Projeto: Métodos avançados de neuroimagem nas Paraparesias Espásticas Hereditárias**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é investigar como as alterações em exames de ressonância magnética cerebral e da medula espinhal progridem em pacientes com Paraparesias Espásticas Hereditárias. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Ambulatório de Neurogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no qual você é acompanhando.

Se você aceitar participar da pesquisa, será realizado o exame de ressonância magnética com duração de cerca de 20 minutos.

No exame de Ressonância Magnética, você será colocada (o) em um campo magnético. Ao atravessarem o corpo de uma pessoa, as ondas magnéticas são registradas e transformadas em imagens das estruturas internas do corpo através de um computador. Esse processo é muito parecido com o que acontece em um exame de raio-X, com a vantagem de essas ondas magnéticas não trazerem nenhum risco, exceto nas condições especiais mencionadas a seguir.

O campo magnético produzido para se obter a imagem de Ressonância Magnética traz riscos para quem carregar consigo objetos ou próteses metálicas, pois os metais podem se deslocar quando expostos a ímãs. Para evitar lesões, objetos metálicos (chaves, moedas, correntes, grampos de cabelo, brincos, anéis, piercings, botões metálicos nas roupas, muletas, etc) devem ser previamente retirados, pois podem ser atraídos pelo equipamento. Além disso, se você tiver implantes de marca-passo cardíaco ou equivalentes, clips colocados em aneurisma intracraniano, corpo estranho metálico intra-ocular, e alguns outros tipos de implantes ou próteses metálicas, não poderá realizar esse exame. Mesmo que nada disso seja detectado agora, no momento da concordância em participar do estudo, um novo questionário será apresentado para você momentos antes da realização do estudo, para garantir a sua segurança. Se nada for detectado, você praticamente não correrá risco algum.

Cabe ressaltar que você não receberá contraste endovenoso durante o exame de Ressonância Magnética. Ou seja, não há riscos relacionados ao uso desta substância.

Finalmente, você poderá apresentar desconforto e/ou cansaço relacionados à realização dos exames físicos neurológicos, que são um pouco extensos.

O exame de Ressonância Magnética será realizado no Serviço de Radiologia do HCPA no início do estudo e repetidos após 1 e 2 anos da primeira avaliação.

A participação no estudo não trará benefício direto ao participante, mas poderá possibilitar a definição de como esses exames de imagem poderão ser utilizados em futuras pesquisas de tratamentos para as Paraparesias Espásticas Hereditárias.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Você terá acesso ao resultado desse exame, se desejar. Se encontrarmos alguma razão clínica, nós encaminharemos você a atendimento na rede de saúde.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Jonas Alex Morales Saute pelo telefone (51) 3359-8011, com a pesquisadora Helena Fussiger, pelo mesmo telefone, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Controle

Nº do CAAE: 11689019.1.0000.5327

### **Título do Projeto: Métodos avançados de neuroimagem nas Paraparesias Espásticas Hereditárias**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é investigar como as alterações em exames de ressonância magnética cerebral e da medula espinhal progridem em pacientes com Paraparesias Espásticas Hereditárias.

Para a realização do estudo é necessário comparar os resultados obtidos com o grupo de pacientes que apresentam Paraparesias Espásticas Hereditárias com um grupo de pessoas que não apresenta esta doença. Você está sendo convidado para participar do grupo controle do estudo, ou seja, que não possui a doença Paraparesias Espásticas Hereditárias. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Ambulatório de Neurogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, será realizado exame de ressonância magnética com duração de 20 minutos.

No exame de Ressonância Magnética, você será colocada (o) em um campo magnético. Ao atravessarem o corpo de uma pessoa, as ondas magnéticas são registradas e transformadas em imagens das estruturas internas do corpo através de um computador. Muito parecido com o que acontece em um exame de raio-X, com a vantagem de essas ondas magnéticas não trazerem nenhum risco, exceto nas condições especiais mencionadas a seguir.

O campo magnético produzido para se obter a imagem de Ressonância Magnética traz riscos para quem carregar consigo objetos ou próteses metálicas, pois os metais podem se deslocar quando expostos a ímãs. Para evitar lesões, objetos metálicos (chaves, moedas, correntes, grampos de cabelo, brincos, anéis, piercings, botões metálicos nas roupas, muletas, etc) devem ser previamente retirados, pois podem ser atraídos pelo equipamento. Além disso, se você tiver implantes de marca-passo cardíaco ou equivalentes, clips colocados em aneurisma intracraniano, corpo estranho metálico intra-ocular, e alguns outros tipos de implantes ou próteses metálicas, não poderá realizar esse exame. Mesmo que nada disso seja detectado agora, no momento da concordância em participar do estudo, um novo questionário será apresentado para você momentos antes da realização do estudo, para garantir a sua segurança. Se nada for detectado, você praticamente não correrá risco algum.

Cabe ressaltar que você não receberá contraste endovenoso durante o exame de Ressonância Magnética. Ou seja, não há riscos relacionados ao uso desta substância.

Finalmente, você poderá apresentar desconforto e/ou cansaço relacionados à realização dos exames físicos neurológicos, que são um pouco extensos.

O exame de Ressonância Magnética será realizado no Serviço de Radiologia do HCPA, no início do estudo, uma única vez.

A participação no estudo não trará benefício direto ao participante, mas poderá possibilitar a definição de quais instrumentos de neuroimagem poderão ser utilizados em futuras pesquisas de tratamentos para as Paraparesias Espásticas Hereditárias.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Você terá acesso ao resultado desse exame, se desejar. Se encontrarmos alguma razão clínica, nós encaminharemos você a atendimento na rede de saúde.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Jonas Alex Morales Saute pelo telefone (51) 3359-8011, com a pesquisadora Helena Fussiger, pelo mesmo telefone, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

Artigos e capítulos de livros publicados durante o período do doutorado como autora contribuinte:

**frontiers** | Frontiers in *Neurology* | TYPE Review  
PUBLISHED 23 December 2022  
DOI 10.3389/fneur.2022.1049850

**Check for updates**

**OPEN ACCESS**

**EDITED BY**  
Hamedo Do Carvalho,  
University of Lisbon, Portugal

**REVIEWED BY**  
Rayfika Dzhingir,  
Rayy Clinix, United States  
Yusef Madijo,  
Hilalawa (Universitäts-Hochschule)  
Süleymaniye, France  
Beyler Zubairuolu,  
Mardin University-Correspondence, Turkey

**\*CORRESPONDENCE**  
Paulo Victor Sgobbi de Souza  
✉ pvs@sgobbi@gmail.com

**†**These authors have contributed equally to this work

**SPECIALTY SECTION**  
This article was submitted to  
Neuromuscular Disorders and  
Peripheral Neuropathies,  
a section of the journal  
Frontiers in Neurology

**RECEIVED 21 September 2022**  
**ACCEPTED 08 December 2022**  
**PUBLISHED 23 December 2022**

**CITATION**  
Nóbrega PR, Bernardes AM,  
Ribeiro RM, Vasconcelos SC,  
Araújo DARG, Gama VCV, Fussiger H,  
Santos CF, Dias DA, Pessoa ALS, Pinto  
WBRV, Saute AM, Sozka PVS and  
Braga-Neto P (2022)  
Cerebrotendinous Xanthomatosis: A  
practice review of pathophysiology,  
diagnosis, and treatment.  
Front. Neurol. 13:1049850.  
doi: 10.3389/fneur.2022.1049850

**COPYRIGHT**  
© 2022 Nóbrega, Bernardes, Ribeiro,  
Vasconcelos, Araújo, Gama, Fussiger,  
Santos, Dias, Pessoa, Pinto, Saute,  
Sozka and Braga-Neto. This is an  
open-access article distributed under  
the terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](#). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice, no use, distribution  
or reproduction is permitted which  
does not comply with these terms.

## Cerebrotendinous Xanthomatosis: A practice review of pathophysiology, diagnosis, and treatment

Paulo Ribeiro Nóbrega<sup>1,2†</sup>, Anderson Moura Bernardes<sup>3†</sup>, Rodrigo Mariano Ribeiro<sup>4</sup>, Sophia Costa Vasconcelos<sup>5</sup>, David Augusto Batista Sá Araújo<sup>1</sup>, Vitor Carneiro de Vasconcelos Gama<sup>1</sup>, Helena Fussiger<sup>6,4</sup>, Carolina de Figueiredo Santos<sup>7,8</sup>, Daniel Aguiar Dias<sup>7</sup>, André Luiz Santos Pessoa<sup>8,9</sup>, Wladimir Bocca Vieira de Rezende Pinto<sup>9</sup>, Jonas Alex Morales Saute<sup>4,10,11</sup>, Paulo Victor Sgobbi de Souza<sup>12\*</sup> and Pedro Braga-Neto<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Division of Neurology, Department of Clinical Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, <sup>2</sup>Neurogenetics Unit, Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil, <sup>3</sup>School of Medicine, Universidade Federal de Estabelecimentos de Ensino Superior em Novo Hamburgo, Novo Hamburgo, Brazil, <sup>4</sup>Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, <sup>5</sup>Pediatric Neurology, Universidade de Fortaleza, Fortaleza, Brazil, <sup>6</sup>Hospital Infantil Albert Sabin, Fortaleza, Brazil, <sup>7</sup>Division of Radiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, <sup>8</sup>Center of Health Science, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil, <sup>9</sup>Neurometabolic Unit, Division of Neuroinfectious Diseases, Department of Neurology and Neurosurgery, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>10</sup>Prevalent Genetics Service and Neurology Service, Hospital de Câncer de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil, <sup>11</sup>Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Cerebrotendinous Xanthomatosis represents a rare and underdiagnosed inherited neurometabolic disorder due to homozygous or compound heterozygous variants involving the *CYP27A1* gene. This bile acid metabolism disorder represents a key potentially treatable neurogenetic condition due to the wide spectrum of neurological presentations in which it most commonly occurs. Cerebellar ataxia, peripheral neuropathy, spastic paraparesis, epilepsy, parkinsonism, cognitive decline, intellectual disability, and neuropsychiatric disturbances represent some of the most common neurological signs observed in this condition. Despite representing key features to increase diagnostic index suspicion, multisystemic involvement does not represent an obligatory feature and can also be under-evaluated during diagnostic work-up. Chenodeoxycholic acid represents a well-known successful therapy for this inherited metabolic disease, however its unavailability in several contexts, high costs and common use in patients at late stages of disease course limit more favorable neurological outcomes for most individuals. This review article aims to discuss and highlight the most recent and updated knowledge regarding clinical, pathophysiological, neuroimaging, genetic and therapeutic aspects related to Cerebrotendinous Xanthomatosis.

**KEYWORDS**  
Cerebrotendinous Xanthomatosis, lipid storage disease, *CYP27A1*, chenodeoxycholic acid, inherited metabolic disorders, inborn errors of metabolism

**Landscape of cerebrotendinous xanthomatosis clinical practice and research in Brazil**

**Paulo Ribeiro Nóbrega<sup>1,2</sup>; Helena Fussiger<sup>3</sup>; Jonas Alex Morales Saute<sup>4,5,6\*</sup>.**

<sup>1</sup>Division of Neurology, Department of Clinical Medicine, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil;

<sup>2</sup>Neurogenetics Unit, Department of Neurology, School of Medicine of Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;

<sup>3</sup>Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>4</sup>Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil;

<sup>5</sup>Neurology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil;

<sup>6</sup>Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

\*Corresponding author:

Jonas Alex Morales Saute

Medical Genetics Service, HCPA

Ramiro Barcelos, 2350, Zip-code 90035-903, Porto Alegre, Brazil

e-mail: [jsaute@hcpa.edu.br](mailto:jsaute@hcpa.edu.br)

**PRISMA: revisão sistemática ENTPD1-NDD**

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
<b>TITLE</b>			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	1
<b>ABSTRACT</b>			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	
<b>INTRODUCTION</b>			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	3
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	3
<b>METHODS</b>			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	3-4
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organisations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	3-4
Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	3-4
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	3-4
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	3-4
Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	7 (figure 2)
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	7 and supplementary material – attachment 1
Study risk of bias assessment	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each study and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	3-4
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	4
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe	

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
		the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	4
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	4
Reporting bias assessment	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	4
<b>RESULTS</b>			
Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	7 (figure 2)
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	7 (figure 2)
Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	Supplementary material – attachment 1)
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	Supplementary material – attachment 1)
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarise the characteristics and risk of bias among contributing studies.	
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	7-8
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	7-8
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	7-8
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	
<b>DISCUSSION</b>			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	8-11
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	
<b>OTHER INFORMATION</b>			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or in the protocol.	
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	11
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	11
Availability of data, code and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all analyses; analytic code; any other materials used in the review.	Supplementary material – attachment 1

### PRISMA Revisão sistemática SPG76

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
<b>TITLE</b>			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	1
<b>ABSTRACT</b>			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	
<b>INTRODUCTION</b>			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	3
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	3
<b>METHODS</b>			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	3
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organisations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	3
Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	3
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	3
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	3
Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	
Study risk of bias	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each	3

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
assessment		study and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	4
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	4
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	4
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	4
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	4
Reporting bias assessment	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	
<b>RESULTS</b>			
Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	5-7
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	
Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	5-7
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	5-7
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarise the characteristics and risk of bias among contributing studies.	
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	10
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
<b>DISCUSSION</b>			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	10
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	10
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	10
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	10
<b>OTHER INFORMATION</b>			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	
	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or in the protocol.	
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	10
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	11
Availability of data, code and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all analyses; analytic code; any other materials used in the review.	