ANDERSON RODRIGUES BRANDÃO DE PAIVA

**Leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas em adultos:
caracterização clínica, molecular e de neuroimagem**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Kok

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Paiva, Anderson Rodrigues Brandão de
Leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas
em adultos : caracterização clínica, molecular e de
neuroimagem / Anderson Rodrigues Brandão de Paiva. -
- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.
Orientador: Fernando Kok.

Descritores: 1.Leucoencefalopatias
2.Adrenoleucodistrofia 3.CADASIL 4.Genética
5.Neuroimagem 6.Doença de Pelizaeus-Merzbacher

USP/FM/DBD-179/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus filhos, Artur e Beatriz,
fontes inesgotáveis de inspiração e alegria.

À Carla, minha esposa,
por seu apoio incondicional, incentivo, suporte
e companheirismo.

À minha irmã, Mayara, por todo seu apoio,
exemplo e ensinamentos.

Aos meus pais, Marta e Joaquim, por serem os
alicerces de toda a minha formação como
indivíduo – devo tudo a vocês.

Agradecimentos

Ao longo desta longa e desafiadora jornada, muitas pessoas foram importantes para a execução deste trabalho e a todas serei eternamente grato.

Agradeço enormemente ao Professor Dr. Fernando Kok, por todo incentivo, orientação e paciência. Muito além dos ensinamentos sobre neurogenética, ficam a amizade e a admiração por sua perspicácia e singular capacidade de colocar temas áridos da genética em termos simples e ainda mais fascinantes.

Ao Professor Dr. Leandro Lucato, neurorradiologista professor livre-docente do Instituto de Radiologia do HCFMUSP, por toda a sua disponibilidade e presteza em discutir os casos comigo e ajudar na elaboração dos artigos. Sua contribuição foi muito enriquecedora e determinante para este trabalho.

Aos colegas do ambulatório de Neurogenética do HCFMUSP, pela agradável convivência e que muito me ensinaram e contribuíram para este trabalho em diversos momentos e contextos: Dr. David Schlesinger, Dr. Paulo Ribeiro da Nóbrega, Dr. Fernando Freua, Dr. Bruno Della Ripa, Dra. Fernanda Monti, Dra. Simone Amorim, Dra. Denise Dória, Dra. Katiane Sayão, Dra. Isabella Barcelos e Mara Dell Ospedale Ribeiro.

À Dra. Lúcia Inês Macedo-Souza e ao Dr. Uirá Souto Melo, biólogos do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) da USP, que foram imprescindíveis para que as análises moleculares deste trabalho fossem feitas. Sempre muito prestativos e dispostos a compartilhar o intrincado conhecimento de ciência básica.

Ao Professor Dr. Henry Houlden e ao Dr. David S. Lynch, da *Queen Square University College London*, pela inestimável ajuda na solução de vários casos desafiadores. Suas colaborações permitiram que este trabalho atingisse patamares não previamente imaginados. Esperamos continuar trabalhando juntos.

À Professora Dra. Juliana Gurgel-Giannetti, que contribuiu de forma decisiva para a investigação de uma família com um quadro totalmente novo, viabilizando biópsias musculares e colaborações internacionais.

Às Dras. Eliana Garzon e Joaquina Andrade, neurofisiologistas responsáveis pelo setor de Eletroencefalograma do HCFMUSP, que minuciosa e pacientemente revisaram os traçados de EEG dos pacientes desta tese.

Às Professoras Angela M. Vianna-Morgante e Carla Rosemberg, do CEGH-USP, por contribuírem com a realização de testes genéticos em casos selecionados desta tese.

Aos Professores do HCFMUSP que me formaram como médico neurologista e que tenho como grandes referências, em especial: Dr. Getúlio Daré Rabello, Dr. Paulo Eurípedes Marchiori, Dra. Mônica Santoro Haddad e Dr. Egberto Reis Barbosa.

À imensa equipe do HCFMUSP, em especial Sueli e Reiko, secretárias do Departamento de Neurologia, pelo apoio irrestrito nas questões administrativas.

Aos pacientes, motivo último do esforço aqui empreendido, por compartilharem comigo suas histórias, terem disponibilidade de participar do estudo e por tanto me ensinarem.

À toda minha família, por todo apoio e vibração a cada conquista, e em especial ao meu tio, José Rodrigues Brandão, amigo e conselheiro, por quem tenho grande admiração.

À minha irmã, Mayara, por seu apoio, incentivo e exemplo de determinação. Mesmo distante, faz-se sempre presente – e como nossas conversas “filosóficas” e “científicas” estão cada vez mais deliciosas...

Aos meus pais, Marta e Joaquim, meus maiores professores e exemplos na vida. Sempre foram meus maiores incentivadores e torcedores. Muito obrigado por sempre me estimularem a buscar realizar meus sonhos, mesmo quando não coincidiram com os seus. Devo todas as conquistas a vocês.

À minha esposa, Carla, que compreendeu que este projeto era muito importante para mim e me deu todo o suporte com muita paciência. Ao longo de uma empreitada como esta, não foram poucos os momentos difíceis – e eu não teria conseguido superá-los sem ter você a meu lado.

Na verdade só sabemos quão pouco sabemos
– com o saber cresce a dúvida.

Goethe (1826)

Normatização

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo principal	9
2.2 Objetivos secundários	9
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1 Leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas	13
3.1.1 Definições	13
3.1.1.1 Leucoencefalopatia versus leucodistrofia	13
3.1.1.2 Desmielinização <i>versus</i> dismielinização	17
3.1.1.3 Hipomielinização	17
3.1.1.4 Idade de início.....	17
3.1.2 Aspectos históricos	18
3.1.3 Epidemiologia.....	21
3.2 Leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas em adultos	21
3.2.1 Importância	21
3.2.2 Classificação	22
3.2.3 Caracterização clínica	23
3.2.4 Caracterização neurorradiológica	28
3.2.5 Caracterização genética	32
3.2.6 Abordagem diagnóstica	36
3.3 Principais leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas em adultos	36
3.3.1 Adrenoleucodistrofia/adrenomieloneuropatia ligada ao X (OMIM #300100)	37
3.3.2 Doença da substância branca evanescente (OMIM #603896)	40
3.3.3 Acidúria L2-Hidroxiglutarica (OMIM #236792)	42
3.3.4 Leucoencefalopatias genéticas de origem vascular	44
3.3.5 Leucoencefalopatias genéticas e origem mitocondrial	47

3.3.6 Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides (OMIM #221820)	49
3.3.7 Doença de Alexander (OMIM #203450)	51
3.3.8 Leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto (OMIM #169500)	54
3.3.9 Síndrome de Sjögren-Larsson (OMIM #270200)	55
3.3.10 Doenças Hipomielinizantes	57
3.3.11 Miscelânea	59
4 MÉTODOS	61
4.1 Desenho do estudo	63
4.2 Local	63
4.3 Amostra	63
4.3.1 Critérios de inclusão	63
4.3.2 Critérios de exclusão	64
4.4 Procedimentos	65
4.4.1 Avaliação clínica	65
4.4.2 Avaliação laboratorial	65
4.4.3 Avaliação neurofisiológica	67
4.4.4 Avaliação por ressonância magnética	69
4.4.5 Avaliação anatomopatológica de biópsia muscular	70
4.4.7 Testes funcionais	71
4.5 Aspectos éticos	71
4.6 Análise dos dados	71
5 RESULTADOS	73
5.1 Espectro de doenças	80
5.1.1 Adrenoleucodistrofia/adrenomieloneuropatia ligada ao X	80
5.1.1.2 Adrenomieloneuropatia ligada ao X	81
5.1.1.2.1 Adrenomieloneuropatia ligada ao X – aspectos clínicos	81
5.1.1.2.2 Adrenomieloneuropatia ligada ao X – aspectos neurorradiológicos	82
5.1.1.3 Adrenoleucodistrofia ligada ao X	83
5.1.1.3.1 Adrenoleucodistrofia ligada ao X – casos típicos – aspectos clínicos	83
5.1.1.3.2 Adrenoleucodistrofia ligada ao X – casos típicos – aspectos neurorradiológicos	84
5.1.1.3.4 Adrenoleucodistrofia ligada ao X – um caso atípico	85
5.1.2 Doença da substância branca evanescente	87
5.1.2.1 Doença da substância branca evanescente – aspectos clínicos	87
5.1.2.2 Doença da substância branca evanescente – aspectos neurorradiológicos	88
5.1.2.3 Doença da substância branca evanescente – aspectos genéticos	89

5.1.3 Acidúria L2-hidroxiglutárica	90
5.1.3.1 Acidúria L2-hidroxiglutárica – aspectos clínicos	90
5.1.3.2 Acidúria L2-hidroxiglutárica – aspectos neurorradiológicos	92
5.1.3.3 Acidúria L2-hidroxiglutárica – aspectos genéticos	94
5.1.4 Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides	94
5.1.4.1 Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides – aspectos clínicos	95
5.1.4.2 Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides – aspectos neurorradiológicos	96
5.1.4.3 Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides – aspectos genéticos	98
5.1.5 CADASIL	98
5.1.5.1 CADASIL – aspectos clínicos	98
5.1.5.2 CADASIL – aspectos neurorradiológicos	99
5.1.5.3 CADASIL – aspectos genéticos	99
5.1.6 Leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto	100
5.1.6.1 Leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto – aspectos clínicos	100
5.1.6.2 Leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto – aspectos neurorradiológicos	101
5.1.6.3 Leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto – aspectos genéticos	102
5.1.7 Doença de Alexander	103
5.1.7.1 Doença de Alexander – aspectos clínicos	103
5.1.7.2 Doença de Alexander – aspectos neurorradiológicos	104
5.1.7.3 Doença de Alexander – aspectos genéticos	104
5.1.8 Síndrome de Gordon-Holmes	105
5.1.8.1 Síndrome de Gordon-Holmes – aspectos clínicos	105
5.1.8.2 Síndrome de Gordon-Holmes – aspectos neurorradiológicos	106
5.1.8.3 Síndrome de Gordon-Holmes – aspectos genéticos	107
5.1.9 Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula e elevação de lactato	107
5.1.9.1 Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula e elevação de lactato – aspectos clínicos	108
5.1.9.2 Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula e elevação de lactato – aspectos neurorradiológicos	108
5.1.9.3 Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula e elevação de lactato – aspectos genéticos	109
5.1.10 Doença relacionada a <i>PLP1</i>	110
5.1.10.1 Doença relacionada a <i>PLP1</i> – aspectos clínicos	110
5.1.10.2 Doença relacionada a <i>PLP1</i> – aspectos neurorradiológicos	111

5.1.10.3 Doença relacionada a <i>PLP1</i> – aspectos genéticos	112
5.1.11 Síndrome de Sjögren-Larsson.....	112
5.1.11.1 Síndrome de Sjögren-Larsson – aspectos clínicos.....	112
5.1.11.2 Síndrome de Sjögren-Larsson – aspectos neurorradiológicos	113
5.1.11.3 Síndrome de Sjögren-Larsson – aspectos genéticos	114
5.1.12 Deficiência intelectual autossômica recessiva 55 (relacionada a <i>PUS3</i>).....	114
5.1.12.1 Deficiência intelectual autossômica recessiva 55 (relacionada a <i>PUS3</i>) – aspectos clínicos	114
5.1.12.2 Deficiência intelectual autossômica recessiva 55 (relacionada a <i>PUS3</i>) – aspectos neurorradiológicos	117
5.1.12.3 Deficiência intelectual autossômica recessiva 55 (relacionada a <i>PUS3</i>) – aspectos genéticos	119
5.1.13 Encefalomioneuropatia relacionada a <i>FDX2</i>	119
5.1.13.1 Encefalomioneuropatia relacionada a <i>FDX2</i> – aspectos clínicos ...	120
5.1.13.2 Encefalomioneuropatia relacionada a <i>FDX2</i> – aspectos neurorradiológicos	123
5.1.13.3 Encefalomioneuropatia relacionada a <i>FDX2</i> – aspectos neurofisiológicos.....	125
5.1.13.4 Encefalomioneuropatia relacionada a <i>FDX2</i> – aspectos laboratoriais	125
5.1.13.5 Encefalomioneuropatia relacionada a <i>FDX2</i> – aspectos da biópsia muscular	126
5.1.13.6 Encefalomioneuropatia relacionada a <i>FDX2</i> – aspectos genéticos	127
5.1.13.7 Encefalomioneuropatia relacionada a <i>FDX2</i> – um novo fenótipo	128
5.2 Pacientes sem diagnóstico	129
6 DISCUSSÃO.....	131
6.1 – Doenças mais comuns em nossa casuística	136
6.1.1 – Adrenomieloneuropatia e adrenoleucodistrofia ligada ao X	136
6.1.2 – Doença da substância branca evanescente.....	137
6.1.3 – Acidúria L2-hidroxiglutárica	139
6.1.4 – Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides	140
6.1.5 – CADASIL	141
6.2 – Doenças com apenas um paciente diagnosticado	142
6.2.1 – Doença de Alexander.....	142
6.2.2 – Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula e elevação de lactato – LBSL.....	143
6.2.3 – Síndrome de Sjögren-Larsson.....	143
6.2.4 – Leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto – ADLD	145

6.2.5 – Síndrome de Gordon-Holmes	146
6.2.6 – Doença relacionada a <i>PLP1</i>	147
6.3 – Novas contribuições.....	148
6.3.1 – Deficiência intelectual autossômica recessiva 55 (relacionada a <i>PUS3</i>).....	148
6.3.2 – Encefalomioneuropatia relacionada a <i>FDX2</i>	150
6.4 – Painel de genes, exoma clínico e exoma completo.....	152
6.5 – Proposta de algoritmo diagnóstico.....	156
6.5.1 – Quando suspeitar de uma LD/LG genética:.....	158
6.5.2 – Excluir doenças adquiridas:	158
6.5.3 – Rever história familiar:	160
6.5.4 – Rever sintomas e sinais neurológicos:	160
6.5.5 – Rever achados extra-neurológicos:	161
6.5.6 – Rever achados neurorradiológicos:.....	161
6.6.7 – Investigação metabólica ou genética:	162
7 CONCLUSÕES	163
8 ANEXOS.....	167
9 REFERÊNCIAS.....	179
10 APÊNDICES	211
10.1 Apêndice A – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	
10.2 Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
10.3 Apêndice C – Endereços eletrônicos dos artigos científicos relacionados a esta tese publicados em revistas indexadas	
10.4 Apêndice D - Imaging of adult leukodystrophies. <i>Arq Neuropsiquiatr</i> 2014	
10.5 Apêndice E - Leukodystrophy with premature ovarian failure: think on white matter disease. <i>Arq Neuropsiquiatr</i> 2015	
10.6 Apêndice F - A novel <i>GFAP</i> mutation in a type II (late-onset) Alexander disease patient. <i>J Neurol</i> 2016	
10.7 Apêndice G - Clinical and genetic characterization of leukoencephalopathies in adults. <i>Brain</i> 2017	
10.8 Apêndice H - When multiple sclerosis and X-linked adrenoleukodystrophy are tangled. <i>Neurol Clin Pract</i> 2018	
10.9 Apêndice I- Typical clinical and neuroimaging features in Sjögren-Larsson syndrome. <i>Arq Neuropsiquiatr</i> 2018	
10.10 Apêndice J - A novel complex neurological phenotype due to a homozygous mutation in <i>FDX2</i> . <i>Brain</i> 2018	
10.11 Apêndice K - Practical approach to the diagnosis of adult-onset leukodystrophies: an updated guide in the genomic era. <i>J Neurol Neurosurg Psychiatry</i> 2019	

10.12 Apêndice L - Adult Leukodystrophies: A Step-by-Step Diagnostic Approach. *Radiographics* 2019

10.13 Apêndice M - *PUS3* mutations are associated with intellectual disability, leukoencephalopathy, and nephropathy. *Neurol Genet* 2019

Listas

ABREVIATURAS E SIGLAS

4H	“Hypomyelination with hypogonadotrophic hypogonadism and hypodontia” – Hipomielinização com hipogonadismo hipogonadotrófico e hipodontia
ADC	“Apparent diffusion coeficiente” – coeficiente de difusão aparente
ADLD	“Autosomal Dominant adult-onset Demyelinating Leukodystrophy” – Leucodistrofia autossômica dominante desmielinizante do adulto
ALD-X	Adrenoleucodistrofia ligada ao X
ALD/AMN-X	Adrenoleucodistrofia/adrenomieloneuropatia ligada ao X
AGCML	Ácidos graxos de cadeia muito longa
AMN-X	Adrenomieloneuropatia ligada ao X
Array-CGH	“Array comparative genomic hibridization” – hibridização comparativa com genomas em arranjos
cADL-X	Adrenoleucodistrofia ligada ao X – forma cerebral
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CARASAL	“Cathepsin-A Related Arteriopathy with Strokes And Leukoencephalopathy” – Arteriopatia com acidentes vasculares e leucoencefalopatia relacionada à catepsina A
CARASIL	“Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy” – Arteriopatia cerebral autossômica recessiva com infartos subcorticais e leucoencefalopatia
CADASIL	“Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy” – Arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia
CNV	“Copy number variation” – variação no número de cópias
COX	“Cytochromo c oxidase”
CPK	Creatinofosfoquinase
DFT	Degeneração Fronto-Temporal
DI	Deficiência intelectual

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DWI	“Diffusion-weighted imaging” – imagem pesada em difusão
EDSS	“Expanded Disability Status Scale” – Escala do status de incapacidade expandida
EEG	Eletroencefalograma
EM	Esclerose Múltipla
ENMG	Eletroneuromiografia
ExAC	“Exome Aggregation Consortium”
FAD	Flavina Adenina Dinucleotideo
FLAIR	“Fluid attenuated inversion recovery”
FOV	“Field of view”
FSPGR	“Fast spoiled gradient echo”
FXTAS	“Fragile X Tremor/Ataxia Syndrome” – Síndrome tremor-ataxia ligada ao X
GTP	Guanosine-trifosfato
H-ABC	“Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum” – Hipomielinização com atrofia de gânglios da base e cerebelo
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDLS	“Hereditary Diffuse Leukoencephalopathy with Spheroids” – Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferoides
HGMD	“Human Gene Mutation Database”
HH	Hipogonadismo hipogonadotrófico
HLD	“Hypomyelinating leukodystrophy” – leucodistrofia hipomielinizante
HSP	“Hereditary spastic paraplegia” – paraplegia espástica hereditária
L2HGA	“L-2-Hydroxyglutaric Aciduria” – Acidúria L2-hidroxiglutárica
LBSL	“Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal cord involvement and Lactate elevation” - Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula espinhal e elevação de lactato
LCR	Líquido cefalorraquiano
LD	Leucodistrofias
LEMP	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
LG	Leucoencefalopatias genéticas

LTBL	“Leukoencephalopathy with thalamus and brainstem involvement and high lactate” – Leucoencefalopatia com acometimento de tálamo e tronco encefálico e elevação de lactato
MEEM	Miniexame do estado mental
MNGIE	“Mitochondrial Neuro Gastrointestinal Encephalopathy” - Encefalopatia mitocondrial neurogastrointestinal
mtDNA	DNA mitocondrial
NAA	N-acetilaspártato
NGS	“Next-generation sequencing” – sequenciamento de nova geração
OMIM	“Online mendelian inheritance in man”
PCR	“Polymerase chain reaction” – reação da polimerase em cadeia
PMD	“Pelizaeus-Merzbacher Disease” – Doença de Pelizaeus-Merzbacher
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _r	RNA ribossomal
RNA _t	RNA transportador
SDH	Succinato desidrogenase
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SPG	“Spastic paraplegia” – paraplegia espástica
TE	Tempo de eco
TI	Tempo de inversão
TR	Tempo de repetição
TSE	“Turbo spin-echo”
UCL	“University College London”
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VWM	“Vanishing White Matter Disease” – doença da substância branca evanescente
WES	“Whole-exome sequencing” – sequenciamento completo do exoma
WGS	“Whole-genome sequencing” – sequenciamento completo do genoma
XCT	Xantomatose Cerebrotendínea

FIGURAS

Figura 1 -	Manifestações extra-neurológicas	27
Figura 2 -	Achados adicionais de neuroimagem	32
Figura 3 -	Pacientes avaliados	76
Figura 4 -	Frequência dos diagnósticos entre os 31 probandos	78
Figura 5 -	Padrões de herança genética das doenças diagnosticadas	79
Figura 6 -	RM de crânio do paciente 4.1.....	83
Figura 7 -	Imagem axial FLAIR do paciente 7.1	85
Figura 8 -	Paciente 1.2 com ALD-X de apresentação assimétrica relacionada a trauma em região parietal direita	86
Figura 9 -	Paciente 10.2 com VWM	89
Figura 10 -	Paciente 14.1 com diagnóstico de L2HGA	93
Figura 11 -	Paciente 15.1 com diagnóstico de L2HGA	94
Figura 12 -	Paciente 17.1 com diagnóstico de HDLS	96
Figura 13 -	Paciente 18.1 com diagnóstico de HDLS	97
Figura 14 -	Axial FLAIR do paciente 20.1 diagnosticado com CADASIL.....	99
Figura 15 -	Imagens do paciente com diagnóstico de ADLD	102
Figura 16 -	Paciente com diagnóstico de doença de Alexander do adulto	104
Figura 17 -	Paciente com diagnóstico de síndrome de Gordon-Holmes.....	107
Figura 18 -	Paciente com diagnóstico de LBSL	109
Figura 19 -	Paciente com diagnóstico de doença relacionada ao <i>PLP1</i>	111
Figura 20 -	Paciente com síndrome de Sjögren-Larsson em fase avançada	113
Figura 21 -	Pacientes com deficiência intelectual relacionada a <i>PUS3</i>	117
Figura 22 -	RM de crânio da paciente 22.2 com diagnóstico de deficiência intelectual relacionada a <i>PUS3</i>	118
Figura 23 -	Eletroferogramas do sequenciamento Sanger de <i>PUS3</i>	119

Figura 24 –	Heredograma dos pacientes com diagnóstico de doença relacionada ao <i>FDX2</i>	120
Figura 25 –	RM de crânio de pacientes com diagnóstico de doença relacionada a <i>FDX2</i>	124
Figura 26 –	Biópsia de músculo dos pacientes 12.1 e 12.4	127
Figura 27 –	Possível história natural da doença relacionada a <i>FDX2</i>	129
Figura 28 –	Fluxograma de abordagem diagnóstica de pacientes com suspeita de leucodistrofia ou leucoencefalopatia genética	157

TABELAS

Tabela 1 –	Caracterização clínica	170
Tabela 2 –	Caracterização genética.....	174
Tabela 3 –	Caracterização neuorradiológica.....	176

QUADROS

Quadro 1 –	Doenças classificadas como leucodistrofias	16
Quadro 2 –	Achados neurológicos de maior valor diagnóstico	24
Quadro 3 –	Padrão de herança das principais leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas	25
Quadro 4 –	Achados extra-neurológicos de maior valor diagnóstico em pacientes com leucodistrofia ou leucoencefalopatia genética	26
Quadro 5 –	Padrão de lesões vistas na neuroimagem das principais leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas	29
Quadro 6 –	Achados adicionais de neuroimagem com maior valor diagnóstico	31
Quadro 7 –	Avaliação laboratorial em três etapas.....	67
Quadro 8 –	Resultados da 1ª etapa de avaliação	79
Quadro 9 –	Resultados das 2ª e 3ª etapas de avaliação	80

Resumo

Paiva ARB. *Leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas em adultos: caracterização clínica, molecular e de neuroimagem* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

As leucodistrofias e as leucoencefalopatias genéticas constituem um grupo heterogêneo de doenças raras que afetam preferencialmente a substância branca encefálica, sendo mais comuns na infância. Possuem amplo espectro fenotípico, com manifestações clínicas muitas vezes inespecíficas, mais comumente sintomas neuropsiquiátricos e acometimento de tratos longos. Os achados de neuroimagem são igualmente muito heterogêneos, mas tendem a ser consistentes para cada doença individualmente, por vezes permitindo precisa correlação fenotípica-genotípica. O uso crescente das técnicas de sequenciamento de nova geração têm possibilitado a identificação das bases genéticas de muitas destas doenças e a descrição de novas entidades, principalmente na faixa etária pediátrica. Já são mais de 60 genes associados a este grupo de doenças, adicionando complexidade à abordagem destes pacientes. No entanto, ainda se conhece pouco a respeito dos fenótipos e genótipos de pacientes adultos com leucodistrofia ou leucoencefalopatia genética. O objetivo do presente estudo foi descrever aspectos clínicos, neurorradiológicos e genéticos de pacientes adultos com leucodistrofia ou leucoencefalopatia genética. Foi realizado um estudo clínico retrospectivo e parcialmente prospectivo dos pacientes em acompanhamento no nosso serviço de neurogenética. Todas as 31 famílias (38 pacientes) incluídas foram submetidas a avaliação clínica e neurorradiológica. Exames neurofisiológicos foram realizados de acordo com a apresentação clínica. Exames diagnósticos bioquímicos ou genéticos foram solicitados em três etapas sequenciais. Na primeira etapa, após avaliação clínica e de neuroimagem, os pacientes foram submetidos a avaliação bioquímica ou teste genético específico conforme a hipótese diagnóstica. Nesta etapa 13 probandos obtiveram diagnóstico definitivo – sete com adrenoleucodistrofia/adrenomieloneuropatia ligada ao X, três com acidúria L2-hidroxi-glutárica, um com leucodistrofia autossômica dominante do adulto, um com doença de Alexander e um com síndrome de Sjögren-Larsson. Na segunda etapa, os pacientes foram submetidos a avaliação por sequenciamento do exoma clínico. Nesta etapa, mais 13 probandos obtiveram diagnóstico: quatro com doença de substância branca evanescente, três com CADASIL, três com leucoencefalopatia difusa hereditária com esferoides, um com leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula espinhal e elevação de lactato, um com a síndrome de Gordon-Holmes e um com a doença relacionada a *PLP1*. Na terceira etapa, os probandos sem diagnóstico foram submetidos a avaliação por sequenciamento completo do exoma e mais dois probandos obtiveram diagnóstico. Uma família foi diagnóstica com deficiência intelectual relacionada a *PUS3*, uma condição extremamente rara que cursa com deficiência intelectual sindrômica, leucoencefalopatia e, em nossas pacientes, nefropatia, que não havia sido previamente descrita. A outra família apresentou um fenótipo totalmente novo associado a *FDX2*. Os pacientes apresentavam atrofia óptica congênita, miopatia mitocondrial, polineuropatia periférica axonal e leucoencefalopatia reversível. Após as três etapas, 28 dentre 31 probandos (90%) obtiveram diagnóstico definitivo e três probandos continuaram sem diagnóstico definitivo. Concluímos que o quadro clínico e neurorradiológico das leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas em adultos é muito heterogêneo e depende da etiologia subjacente. A avaliação clínica e neurorradiológica minuciosas associadas a avaliação genética não enviesada, seja por sequenciamento do exoma clínico, seja por sequenciamento completo do exoma, foi determinante para o diagnóstico correto na maioria dos pacientes.

Descritores: Leucoencefalopatias; Adrenoleucodistrofia; CADASIL; Genética; Neuroimagem; Doença de Pelizaeus-Merzbacher.

Abstract

Paiva ARB. *Leukodystrophies and genetic leukoencephalopathies in adults: clinical, genetic and neuroimaging characterization* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Leukodystrophies and genetic leukoencephalopathies are a heterogeneous group of rare disorders that affect predominantly the cerebral white matter. They are more common in children and have a wide phenotypic spectrum with non-specific clinical features dominated by neuropsychiatric manifestations and long-tract symptoms. The neuroimaging findings are highly heterogeneous, but commonly have the same features for the same disorders, allowing precise phenotypic-genotypic correlation. As next-generation sequencing techniques become widely used, the genetic basis of a great number of these disorders has been established, as new disorders have been identified, especially in the pediatric population. At least 60 genes have been associated to these disorders, adding complexity to the diagnostic approach of such patients. However, little is known about the phenotypes and the genotypes of adult patients with leukodystrophies and genetic leukoencephalopathies. The aim of the present study was to describe clinical, neuroradiological and genetic aspects of adult patients with leukodystrophy or genetic leukoencephalopathy. A retrospective and partially prospective clinical study was conducted in our neurogenetics service. All 31 families included (38 patients) were clinically and neuroradiologically evaluated. Neurophysiological studies were performed as needed. Biochemical or genetic diagnostic tests were ordered in three sequential steps. On the first step, based on the clinical and neuroradiological presentations, biochemical or single-gene test were ordered according to the diagnostic hypothesis. On this step, 13 probands had a definitive diagnosis – seven with X-linked adrenoleukodystrophy/adrenomyeloneuropathy, three with L2-hydroxyglutaric aciduria, one with autosomal dominant adult-onset demyelinating leukodystrophy, one with Alexander disease and one with Sjögren-Larsson syndrome. On the second step, patients were evaluated by focused exome sequencing and 13 patients were diagnosed: four with vanishing white matter disease, three with CADASIL, three with hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids, one with leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation, one with Gordon-Holmes syndrome and one with *PLP1*-related disorder. On the third step, the probands without diagnosis were evaluated by whole-exome sequencing and two had a definitive diagnosis. One family was diagnosed with *PUS3*-related intellectual deficiency, an extremely rare condition that causes syndromic intellectual deficiency, leukoencephalopathy and, in our patients, nephropathy, something that was not previously described in this condition. The other family presented a totally new phenotype associated with *FDX2*. The patients presented congenital optic atrophy, mitochondrial myopathy, axonal peripheral polyneuropathy and reversible leukoencephalopathy. After the three steps, 28 out of 31 probands (90%) had a definitive diagnosis and three probands, remained undiagnosed. We concluded that the clinical and neuroradiological picture of adult patients with leukodystrophies and genetic leukoencephalopathies are highly heterogeneous and depends on the specific etiology. Careful clinical and neuroradiological evaluations associated with a non-biased genetic test – focused exome sequencing or whole-exome sequencing –, can define the correct diagnosis in a great proportion of patients.

Descriptors: Leukoencephalopathies; Adrenoleukodystrophy; CADASIL; Genetics; Neuroimaging; Pelizaeus-Merzbacher Disease.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

As leucoencefalopatias constituem um grupo heterogêneo de doenças que afetam preferencialmente a substância branca encefálica. É comum que o neurologista encontre pacientes com hipersinal da substância branca nas sequências ponderadas em T2 e FLAIR nos exames de ressonância magnética (RM) do encéfalo, sendo este na maioria das vezes secundário a doenças adquiridas de etiologia inflamatória, infecciosa, vascular, tóxica, metabólica ou neoplásica (Renaud, 2016; Ahmed et al., 2014). O termo leucodistrofia é historicamente usado para indicar as doenças da substância branca de origem genética, indicando um grupo extremamente variado de doenças frouxamente agrupados por apresentarem em comum marcado acometimento da substância branca.

Em 2015, Vanderver et al. definiram pela primeira vez de forma mais precisa o termo leucodistrofia e cunharam a expressão leucoencefalopatia genética. Assim, leucodistrofias (LD) seriam doenças hereditárias com acometimento primário da substância branca do sistema nervoso central, com ou sem comprometimento do sistema nervoso periférico, que têm em comum alterações de células da glia ou da bainha de mielina. Já as leucoencefalopatias genéticas (LG) seriam as doenças hereditárias da substância branca que não preenchem critérios para serem classificadas como LD e são decorrentes de comprometimento primário neuronal, vascular ou sistêmico.

As LD/LG são mais comuns na infância e, em menor proporção, na adolescência, sendo o acometimento em adultos considerado raro. No entanto, o uso disseminado da ressonância magnética e, mais recentemente, o crescente emprego das técnicas de sequenciamento de nova geração (“next-generation sequencing” – NGS) possibilitaram a identificação em adultos das mesmas doenças descritas na infância, embora com fenótipo muitas vezes diferente (Leite et al., 2014). Também têm sido identificadas novas LD/LG de surgimento exclusivo na idade adulta (Di Donato et al., 2014).

As manifestações neurológicas, tanto em adultos como em crianças, são muitas vezes inespecíficas, por acometimento de tratos longos, sendo as LD/LG

raramente consideradas no diagnóstico diferencial antes da realização da RM de encéfalo. Os pacientes adultos apresentam mais comumente alterações cognitivas e/ou comportamentais, associadas ou não a acometimento motor do tipo paraparesia espástica e/ou ataxia progressivas (Labauge et al., 2014). Em crianças, por sua vez, costumam predominar as manifestações motoras.

Os padrões de herança genética podem ajudar a orientar as hipóteses diagnósticas, sendo todos os padrões passíveis de serem encontrados (formas autossômicas recessivas, autossômicas dominantes com graus variados de expressividade e penetrância, ligadas ao X, e mitocondriais) (Parikh et al., 2015). Salienta-se que em adultos há um número relevante de casos esporádicos e formas autossômicas dominantes, ao contrário de crianças, nas quais predominam as formas autossômicas recessivas (Di Donato et al., 2014). Ainda assim, pode não haver história familiar, pois existem formas de penetrância incompleta e apresentações decorrentes de evento mutacional *de novo*.

As manifestações extra-neurológicas também podem ajudar a limitar as hipóteses diagnósticas. Em adultos, são particularmente úteis as informações sobre insuficiência adrenal (presente na adrenoleucodistrofia/adrenomieloneuropatia ligada ao X (ALD/AMN-X)), menopausa precoce (presente na doença da substância branca evanescente – “vanishing white matter disease (VWM)” – e na leucoencefalopatia progressiva com falência ovariana relacionada a AARS2 – Lynch et al., 2016), hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) (como ocorre na síndrome de Gordon-Holmes – Margolin et al., 2013), xantomas tendinosos (na xantomatose cerebrotendínea – XCT) e sintomas gastrointestinais (diarreia em pacientes com XCT e encefalopatia mitocondrial neurogastrointestinal (MNGIE) – Parikh et al., 2015).

Como regra geral, suspeita-se de uma LD/LG quando se está frente a um paciente com doença de curso crônico e acometimento de substância branca de distribuição bilateral, simétrico ou confluyente em imagens de RM de encéfalo seriadas (Renaud, 2016). No entanto, esta sugestão neurorradiológica tem dois problemas: as exceções são comuns e este padrão também pode ocorrer em quadros tóxicos, metabólicos ou estágios avançados de qualquer outra etiologia. Lesões assimétricas, com captação de gadolínio e evolução rápida falam a favor de doenças

adquiridas (Labauge et al., 2014), mas também existem etiologias genéticas que podem apresentar estas mesmas características.

Ressalta-se que embora os achados de RM possam ser muito heterogêneos nas diversas LD/LG, estes achados tendem a ser consistentes para cada doença, muitas vezes permitindo a identificação das mesmas a partir da imagem. Assim, ficou clara a necessidade de uma abordagem sistemática dos exames de RM para orientar a investigação destes casos. O trabalho de Schiffmann e van der Knaap de 2009 pode ser apontado como o mais abrangente e prático para uma abordagem inicial, incluindo dentre os diagnósticos diferenciais as doenças adquiridas e separando as doenças de substância branca inicialmente em 2 grandes grupos, hipomielinizantes *versus* as demais (desmielinizantes). No entanto, tal abordagem precisou ser refinada, principalmente para abordagem de casos suspeitos de LD/LG em adultos, o que foi feito por Labauge et al. (2014) e Ayrignac et al. (2015). Estes autores separaram as LD/LG em 3 grandes grupos: LG vasculares, LD/LG cavitantes e LD/LG não-vasculares, não-cavitantes. A identificação de achados específicos, como acometimento de tronco encefálico em alguns tratos específicos ou de medula espinhal e a presença de calcificações e/ou cistos podem ajudar ainda mais a direcionar o diagnóstico (Vanderver et al., 2015).

O diagnóstico definitivo pode ser obtido por meio de testes bioquímicos, como a dosagem dos ácidos graxos de cadeia muito longa (AGCML) no sangue de pacientes com suspeita de ALD/AMN-X, ou por meio de testes genéticos, como a pesquisa de variante patogênica em *ABCD1* em casos de ALD/AMN-X. Nos casos em que a clínica ou a imagem são muito sugestivos, como por exemplo na doença do Alexander do adulto ou leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula espinhal e elevação de lactato (“leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation” – LBSL), a pesquisa de um único gene pode ser custo-efetiva. No entanto, existem cerca de 60 genes implicados em LD/LG e muitas vezes não é possível apontar um único gene candidato a partir dos achados clínicos (Parikh et al., 2015).

Neste contexto, técnicas de NGS vêm mostrando melhor relação custo-benefício e têm ampliado rapidamente o nosso conhecimento sobre as LD/LG particularmente nas formas de início precoce (Vanderver et al., 2016 e Lynch et al.,

2017) e também apresentações atípicas. No entanto, conhece-se menos a respeito das apresentações clínicas e bases genéticas das formas do adulto. Estes são frequentemente diagnosticados como esclerose múltipla atípica ou doença neurodegenerativa de início precoce (Sundal et al., 2012).

Nesta tese revisamos a abordagem diagnóstica e caracterização clínica, de imagem e genética de pacientes adultos com LD/LG, bem como apresentamos uma breve revisão sobre as principais LD/LG diagnosticadas em adultos. Nossa casuística consistiu de pacientes atendidos no Ambulatório de Neurogenética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) com hipótese diagnóstica de LD/LG entre os anos de 2012 e 2016. Descrevemos o espectro de manifestações clínicas, neurorradiológicas e, sempre que possível, genéticas.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Descrever os seguintes aspectos de pacientes adultos portadores de LD/LG:

- clínicos
- neurorradiológicos
- genéticos

2.2 Objetivos secundários

Identificar as características de:

- exame físico geral
- exame neurológico
- exames laboratoriais
- exames neurofisiológicos
- exames neurorradiológicos

que possam contribuir para a identificação da etiologia das LD/LG;

Avaliar o impacto da investigação genética na definição diagnóstica;

Estabelecer correlações genótipo-fenótipo.

3 Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas

3.1.1 Definições

Muitas são as doenças que afetam exclusiva ou predominantemente a substância branca, e múltiplas são suas origens – vascular, inflamatória, tóxica, metabólica, infecciosa, neoplásica ou genética. Também muitos termos já foram usados para descrever estas doenças, por vezes pobremente definidos ou com sobreposição de significados, adicionando complexidade ao estudo do tema (van der Knaap et al., 2005a).

Dentre estes termos, destacamos os seguintes: leucoencefalopatias, leucodistrofias, desmielinização, dismielinização e hipomielinização.

3.1.1.1 Leucoencefalopatia versus leucodistrofia

O termo *leucoencefalopatia* refere-se etimologicamente a doenças da substância branca de uma forma genérica, sem inferências sobre a etiologia subjacente, como sinônimo de “doenças da substância branca” e assim será usado neste texto.

Já o termo *leucodistrofia* carece de uma definição perfeita e universalmente aceita, sendo as definições propostas até hoje influenciadas pelo conhecimento disponível à época em que foram formuladas. Há grande debate na literatura sobre qual seria a melhor definição, sendo as duas mais atuais as propostas por “*GLIA Consortium*” (Vanderver et al. (2015)) e por Kevelam et al. (2016).

O grupo chamado “*GLIA Consortium*” definiu pela primeira vez de forma consensual o termo leucodistrofia, adotando o critério neuropatológico. Para este grupo, leucodistrofias são doenças hereditárias que afetam a substância branca do sistema nervoso central, com ou sem acometimento do sistema nervoso periférico e que possuem em comum alterações das células da glia ou da bainha de mielina.

No mesmo artigo definiram também *leucoencefalopatia genética* como: “distúrbio hereditário que resulta em anormalidades da substância branca, mas que não preenche necessariamente critérios estritos para leucodistrofias”. São doenças com envolvimento neuronal primário ou manifestações sistêmicas proeminentes. Assim, toda leucodistrofia é também uma leucoencefalopatia genética, mas nem toda leucoencefalopatia genética é uma leucodistrofia.

Uma tentativa de classificar as doenças da substância branca hereditárias já conhecidas foi feita, e duas listas foram apresentadas por Vanderver et al. (2015) – uma de leucodistrofias e uma de leucoencefalopatias genéticas.

As definições apresentadas pelo “*GLIA Consortium*” permitem que doenças novas sejam classificadas prospectivamente e as já conhecidas eventualmente reclassificadas conforme o entendimento das mesmas aumente.

Em editorial que acompanha o referido artigo, Salsano (2015) começa citando Aristóteles – *natura non facit saltus* (“a natureza não dá saltos”) – para nos lembrar de como é difícil a elaboração de classificações e faz algumas observações críticas.

Por exemplo, a hipomielinização com atrofia de gânglios da base e cerebelo (“hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum” – H-ABC, relacionada a *TUBB4A*) é apresentada como leucodistrofia, embora não existam até o momento estudos neuropatológicos desta doença e seu gene se expresse predominantemente em neurônios. Também a XCT é apresentada como leucodistrofia, embora saibamos tratar-se de uma doença sistêmica.

Cerca de um ano após a publicação destas definições, Kevelam et al. (2016), questionam o foco sobre a mielina como critério central da definição de leucodistrofia. À luz dos novos conhecimentos, tal foco não se justificaria e argumenta com alguns exemplos: novamente a leucodistrofia H-ABC, que se deve a um defeito na produção de microtúbulos e leva a uma axonopatia com perda secundária de mielina; o gene *CSF1R* codifica fator de crescimento específico para micróglia, macrófago e monócito, mas quando mutado leva ao fenótipo de leucoencefalopatia com esferoides axonais e glia pigmentada (“hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids” – HDLS), com achados anátomo-patológicos de axonopatia.

Assim, para Kevelam et al. (2016), leucodistrofias são “doenças geneticamente determinadas que afetam primariamente a substância branca do sistema nervoso central, independentemente do componente estrutural envolvido, do processo molecular afetado ou do curso da doença.” Tal definição foi ratificada por van der Knaap e Bugiani em 2017, em artigo de revisão.

Chamamos a atenção ainda para a questão do curso da doença. Historicamente, as leucodistrofias foram entendidas como doenças de curso crônico e progressivo, mas na verdade existem casos de evolução estática (como a acidúria L2-hidroxiglutarica – L2HGA) e até de melhora da doença após uma manifestação inicial (em geral na infância). Como exemplos destas citamos a leucoencefalopatia megalencefálica com cistos subcorticais, a leucoencefalopatia com acometimento de tálamo e tronco encefálico e elevação de lactato (“leukoencephalopathy with thalamus and brainstem involvement and high lactate” – LTBL) e a doença relacionada ao *FDX2*, que descreveremos em detalhes nesta tese. Este aspecto temporal foi observado pelo “*GLIA Consortium*”, que não considera mais o curso da doença na sua definição de leucodistrofia.

Todos os autores citados aqui são unânimes em reconhecer que as definições de leucodistrofia são necessariamente imperfeitas e deverão ser continuamente aprimoradas. Nesta tese usaremos sempre que possível as definições propostas pelo “*GLIA Consortium*”, pois vem sendo a preferida nas publicações que a sucederam e nos parece a mais apropriada do ponto de vista etimológico.

No entanto, como bem notou Salsano (2015), estamos mudando as classificações baseadas em termos clínicos (como distonias (DYTs), ataxias espinocerebelares (SCAs), paraplegias espásticas (SPGs)), ou bioquímicos (acidúria L2-hidroxiglutarica), ou patológicos (HDLS), por termos baseados em genética. Assim, como exemplo, coexistem na literatura atual os termos doença de Pelizaeus-Merzbacher (PMD) ou SPG2 ou leucodistrofia hipomielinizante 1 (HDL1) ou doenças relacionadas a *PLP1* para se referir a um genótipo com vários fenótipos. Algumas áreas do conhecimento já começaram a reorganizar a sua nomenclatura para melhor incorporar a linguagem genética, como a nova classificação de neuropatias periféricas hereditárias (Mathis et al., 2015) e de distúrbios de movimento (Marras et al., 2016).

Acreditamos que este possa vir a ser o caminho adotado para o estudo das LD/LG nos próximos anos (Fussiger et al, 2017).

No Quadro 1 listamos as doenças que consensualmente foram classificadas como leucodistrofias, segundo Vanderver et al. (2015). As doenças que não constam no quadro se encaixam melhor na definição de leucoencefalopatia genética.

Quadro 1 – Doenças classificadas como leucodistrofias

Adrenoleucodistrofia/adrenomieloneuropatia ligada ao X
Displasia oculodentodigital
Doença da substância branca evanescente
Doença de Alexander
Doença de Canavan
Doença de Krabbe
Doença de Pelizaeus-Merzbacher
Doença de Pelizaeus-Merzbacher-like
Doença por corpos de poliglicosanos
Doença relacionada a <i>SOX10</i>
Doenças da biogênese peroxissomal
Doenças do armazenamento de ácido siálico
Fucosidose
Hipomielinização com acometimento de tronco encefálico e medula espinhal e espasticidade em pernas
Hipomielinização com atrofia de gânglios da base e cerebelo (H-ABC)
Hipomielinização com catarata congênita
Leucodistrofia autossômica dominante desmielinizante do adulto
Leucodistrofia metacromática
Leucoencefalopatia com acometimento de tálamo e tronco encefálico e elevação de lactato
Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula espinhal e elevação de lactato
Leucoencefalopatia com edema intramielínico relacionada a CIC-2
Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferoides (HDLS)
Leucoencefalopatia megalencefálica com cistos subcorticais
Leucoencefalopatia por deficiência de RNase T2
Síndrome 18q-
Síndrome 4H (hipomielinização, hipodontia, hipogonadismo hipogonadotrófico) – doença relacionada a Pol-III
Síndrome de Aicardi-Goutières
Síndrome de Sjögren-Larsson
Xantomatose cerebrotendínea

Fonte: adaptado de Vanderver et al., 2015

3.1.1.2 Desmielinização *versus* dismielinização

Os termos desmielinização e dismielinização também podem ser confundidos e aqui adotaremos as definições propostas por van der Knaap et al. em 2005a.

A desmielinização é o processo de perda da mielina por acometimento primário e seletivo das células da glia ou da bainha de mielina propriamente dita. Assim, esclerose múltipla e leucodistrofia metacromática, por exemplo, são doenças que causam desmielinização.

Já dismielinização refere-se ao processo que leva a formação de uma bainha de mielina anormal, podendo ser acompanhada ou não de perda de mielina, tal como ocorre na fenilcetonúria.

3.1.1.3 Hipomielinização

Por fim, hipomielinização refere-se à redução da produção de mielina com consequente déficit permanente de sua constituição. É um sinal radiológico extremamente útil, pois permite reduzir sobremaneira a lista de genes a serem testados.

As doenças classicamente descritas como leucodistrofias hipomielinizantes da infância são a PMD, doença de Pelizaeus-Merzbacher símile, a síndrome 18q- e a doença de Cockayne, sendo que as duas primeiras já foram descritas em adultos (Cailloux et al., 2000; Orthman-Murphy et al., 2009). Os outros genes já relacionados a leucodistrofia hipomielinizante com casos em adultos são: *TUBB4A*, *POLR3A*, *POLR3B*, *CLCN2* e *NKX6-2* – todos serão comentados na seção 3.3.10 – Doenças Hipomielinizantes.

3.1.1.4 Idade de início

Um outro fator que adiciona complexidade ao estudo das LD/LG em adultos é a idade de início dos sintomas, pois temos os seguintes cenários possíveis:

- pacientes em que os primeiros sintomas surgiram na idade adulta;
- pacientes em que os primeiros sintomas surgiram na infância e persistiram na idade adulta;

- pacientes em que os primeiros sintomas surgiram na infância e melhoraram ao longo do desenvolvimento, podendo ter deixado sintomas residuais ou não.

Há que se considerar também a possível distinção entre início dos sintomas sistêmicos ou início dos sintomas neurológicos. Por exemplo, pacientes com XCT têm diarreia crônica de início na infância, mas os sintomas neurológicos podem surgir somente no fim da adolescência ou início da vida adulta.

Estas distinções não são feitas com frequência na literatura, sendo que a maioria dos trabalhos envolvendo pacientes adultos agrupam os cenários descritos acima.

Uma outra forma de abordar esta questão é a partir da genética, observando que já foram descritos genes que se expressam na infância, adolescência e vida adulta, genes que se expressam exclusivamente na vida adulta e genes que se expressam (até onde sabemos) somente na infância.

A maioria dos trabalhos define como adulto indivíduos maiores de 16 anos – e aqui seguiremos esta convenção.

3.1.2 Aspectos históricos

As pesquisas sobre as doenças da substância branca começaram há cerca de 180 anos, com os primeiros estudos anátomo-patológicos. Podemos dividir didaticamente em três grandes períodos: a era da patologia (1830-1980), a era da neuroimagem (1980-2000), e a era da genética (2000-dias atuais).

Em 1838, o talentoso patologista e ilustrador escocês Robert Carswell publicou em seu atlas a primeira ilustração da doença hoje conhecida como esclerose múltipla (Kevelam et al., 2016). Este talvez possa ser considerado o marco zero dos estudos sobre as doenças da substância branca.

Em 1897, Otto Heubner descreveu uma doença neurológica rara em crianças cuja os aspectos histopatológicos eram de acometimento difuso da substância branca e marcado endurecimento da mesma. Passou-se então a adotar o termo “esclerose difusa” em oposição à esclerose múltipla. Em 1899 Pelizaeus e em 1910 Merzbacher

descreveram o acometimento familiar da “esclerose difusa” (Heubner (1897)¹ apud Kevelam et al. 2016; Pelizaeus (1899)² apud Kevelam et al. 2016; Merzbacher (1910)³ apud Kevelam et al 2016).

O termo leucodistrofia foi proposto pela primeira vez por Bielschowsky e Henneberg em 1928 para descrição da leucodistrofia metacromática e sugerido para a descrição de doenças hereditárias progressivas que afetam a substância branca (Bielschowsky e Henneberg⁴ apud van der Knaap e Bugiani, 2017). O termo provem do grego, “*leuco*”= branco, “*dis*”= falta de, e “*trofia*”= crescimento.

Foi somente em 1984 que Seitelberg definiu leucodistrofia como “um processo desmielinizante progressivo e crônico do sistema nervoso central, com características de distúrbio metabólico da manutenção da bainha de mielina. No que concerne a etiologia, a maioria é causada por elementos endógenos”.

Também em 1984, Morell e Wiesmann definiram leucodistrofia como “distúrbios que afetam primariamente a oligodendroglia ou a mielina (...) de origem endógena, com padrão compatível com transferência genética de um defeito metabólico (...) com deterioração progressiva”.

Interessante notar a adoção do critério anátomo-patológico centrado na mielina por estas definições. Ressalta-se que à época de tais definições o número de condições conhecidas era pequeno, suas bases bioquímicas pouco compreendidas e suas bases genéticas totalmente desconhecidas (van der Knaap e Bugiani, 2017). O diagnóstico era feito até então por achados bioquímicos ou anátomo-patológicos.

A década de 1980 foi particularmente importante para a história dos estudos sobre LD/LG, pois nela surgiram a ressonância magnética (RM) e os primeiros estudos genéticos de leucodistrofias.

A RM revolucionou o estudo das LD/LG. Foi possível verificar que pacientes que tinham o mesmo diagnóstico confirmado por testes bioquímicos, tinham o mesmo padrão de acometimento visível nas imagens de RM (Kevelam et al., 2016).

¹ Heubner O. Ueber diffuse hirnsklerose. *Charité-Ann* 1897;22:298-310.

² Pelizaeus F. Ueber eine eigenartige familiäre Entwicklungshemmung vornehmlich auf motorischem Gebiet. *Arch Psychiatrie Nervenkr* 1899;31:100–104.

³ Merzbacher L. Eine eigenartige familiär-hereditäre Erkrankungsform (aplasia axialis extracorticalis congenita). *Z Gesamte Neurol Psychiatrie* 1910;3:1–138.

⁴ Bielschowsky M, Henneberg R. Ueber familiäre diffuse sklerose (Leukodystrophia cerebri progressive hereditária). *J Psychol Neurol (Lpz)* 1928;36:131-81.

Assim se deu o início do reconhecimento de padrão de imagem de RM para o diagnóstico das LD/LG.

Na década de 1990 e início dos anos 2000, várias doenças foram descritas a partir de critérios de imagem, como, por exemplo: leucoencefalopatia megalencefálica com cistos subcorticais, VWM, H-ABC, LBSL, síndrome de hipomielinização, hipodontia e hipogonadismo hipogonadotrófico (síndrome 4H) e LTBL (van der Knaap et al., 1995; van der Knaap et al., 1997; van der Knaap et al., 2002a; van der Knaap et al., 2002b; Atrouni et al., 2003; Steenweg et al., 2012).

Os primeiros genes relacionados a LD/LG foram identificados no final dos anos 1980 e início dos anos 1990, a saber: *PLP1*, *ARSA*, *ASPA*, *ABCD1*, *GALC* (Hudson et al., 1989; Polten et al., 1991; Kaul et al., 1993; Mosser et al., 1993; Sakai et al., 1994). Tais descobertas foram feitas a partir da abordagem de estudos de genes candidatos ou estudos de ligação.

Em 2001, as primeiras doenças definidas a partir da imagem por RM, tiveram suas bases genéticas estabelecidas: VWM foi relacionada a 5 genes (*EIF2B1 a 5*) e a leucoencefalopatia megalencefálica com cistos subcorticais foi relacionada a *MLC1*.

Até então, os estudos genéticos necessários para a definição de uma nova doença (estudos de ligação) eram bastante trabalhosos, caros e dependentes de grande número de indivíduos afetados para a comprovação dos mesmos. Foi somente a partir de 2005, com a introdução da tecnologia de NGS que uma nova mudança de paradigma ocorreu na abordagem das doenças mendelianas raras (Ng et al., 2009).

Em 2012, o uso do sequenciamento completo do exoma permitiu relacionar variantes patogênicas em *CSF1R* à HDLS (Rademakers et al., 2012). Esta foi a primeira leucodistrofia que teve sua base genética estabelecida por técnicas de NGS. Desde então, outros genes vêm sendo descobertos, dos quais podemos citar: *EARS2*, *TUBB4A*, *RNF216*, *AARS2*, etc. (Steenweg et al., 2012; Simons et al., 2013; Margolin et al., 2013; Dallabona et al., 2014).

A identificação e estudo de pacientes adultos com LD/LG foram bastante limitados até o início dos anos 2010, com apenas alguns relatos de casos e pequenas séries publicadas. Com o crescente uso das técnicas de NGS observamos a ampliação de fenótipos de genes previamente descritos em LD/LG da infância, muitas vezes com manifestações em adultos completamente diferentes das encontradas na

infância. Não por acaso, houve um significativo aumento da literatura referente a estes casos nos últimos oito anos, com várias revisões de literatura sobre LD/LG em adultos já publicadas (Renaud 2012, 2016; Leite et al., 2014; Ahmed et al., 2014; Vanderver 2016b; Lynch et al., 2018).

3.1.3 Epidemiologia

Os dados epidemiológicos sobre LD e/ou LG são limitados e referem-se principalmente à faixa etária pediátrica (Vanderver et al., 2014).

Embora individualmente cada condição seja bastante rara, segundo Costello et al. (2009), em conjunto (LD/LG em crianças e adultos), sua prevalência pode se aproximar da prevalência da esclerose múltipla – atualmente estima-se que esta afeta 2,3 milhões de pessoas em todo o mundo (Jones, 2016). Se por um lado esta projeção pareça exagerada, por outro vale lembrar que o uso com maior liberalidade de métodos diagnósticos de neuroimagem e o uso mais intensivo do NGS possibilitarão a identificação de um número crescente de indivíduos.

Estimava-se que até 50% dos casos de LD/LG em adultos permaneciam sem diagnóstico definitivo, mesmo após extensa avaliação, embora esta realidade pareça estar começando a mudar (Renaud, 2012).

3.2 Leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas em adultos

3.2.1 Importância

O grupo das LD/LG vem ganhando progressivo destaque na literatura neurológica na medida em que os testes genéticos têm possibilitado o maior reconhecimento destas doenças e a descrição de novas entidades.

No entanto, há ainda enormes lacunas na compreensão destes casos: qual é a prevalência e a incidência destas doenças? Por que as manifestações em adultos e crianças são muitas vezes tão diferentes? Quais as relações genotípicas-fenotípicas? Qual o espectro de fenótipos possíveis? Qual a melhor forma de abordagem diagnóstica? Qual a melhor forma de classificá-las? Estas são apenas algumas das

perguntas para as quais ainda não temos respostas adequadas – nem mesmo para a população pediátrica.

Assim, o neurologista de adultos quando frente a um caso suspeito de LD/LG tem o enorme desafio de lidar com doenças raras, pouco compreendidas e para as quais há ainda poucos dados de literatura. Daí a importância de novos trabalhos nesta área.

3.2.2 Classificação

Não há consenso sobre a melhor forma de classificação das LD/LG em adultos. Muitas das classificações propostas não fazem distinção entre adultos e crianças, tornando confusa a abordagem de pacientes adultos a partir destas.

Alturkustani et al. (2013) foi o primeiro a propor uma classificação exclusiva para LD/LG de início no adulto, adotando critérios clínicos e patológicos. O primeiro passo seria excluir LD/LG clássicas da infância, que porventura estivessem se manifestando tardiamente. Sugere especificamente a pesquisa de ALD/AMN-X, doença de Krabbe, leucodistrofia metacromática, doença de Alexander e VWM.

O segundo passo seria a identificação de disautonomia precoce, sugerindo o diagnóstico de leucodistrofia autossômica dominante do adulto (ADLD) ligada a *LMNBI*. Não havendo disautonomia, o próximo passo seria a análise patológica, útil para os diagnósticos de HDLS e doença de Nasu-Hakola (ligada a *TYROBP (DAPI2)* ou *TREM2*).

Sem dúvida, a classificação proposta por Alturkustani é bastante incompleta e de difícil aplicação em sua totalidade, por requerer o uso da patologia – com suas dificuldade inerentes de obtenção e interpretação de amostras. No entanto, deve ser reconhecida como a primeira proposta de abordagem de pacientes adultos com LD/LG presente na literatura.

No entanto, sendo a imagem por RM o principal exame complementar individual para o estudo das LD/LG, uma abordagem a partir da mesma tem maior lógica. Assim, o maior estudo realizado até o momento usou como critério o padrão de acometimento visto na ressonância magnética, dividindo os pacientes em três grupos: doenças vasculares, doenças cavitantes e doenças sem aspecto vascular ou

cavitante. Foram avaliados 154 pacientes franceses distribuídos por todo o país (Aygnac et al., 2015) adotando-se esta classificação.

O padrão vascular foi definido pela presença de hipersinal da substância branca profunda, ponte e/ou cápsula externa nas sequências ponderadas em T2/FLAIR com sinais de micro-hemorragias na sequência T2*/SWI. Este foi o grupo com maior número de casos com diagnóstico definitivo, sendo que os diagnósticos encontrados foram CADASIL, doenças relacionadas a variantes patogênicas de *COL4A1* e a síndrome de Labrune (leucoencefalopatia com calcificações e cistos).

O padrão cavitante foi o menor grupo e foi definido pela presença de marcado hipossinal em T1 dentro de áreas de hipersinal em T2/FLAIR. A VWM foi a única doença encontrada neste grupo.

Por fim, o grupo de pacientes sem aspectos vasculares ou cavitantes em suas ressonâncias constituiu o maior e mais heterogêneo grupo. A ALD-X foi o diagnóstico mais frequente, tendo sido também encontrados casos de doença de Krabbe, leucodistrofia metacromática, XCT, ADLD dentre outras. Foi também este grupo que teve o maior número de casos sem diagnóstico definitivo (45%).

Esta segunda classificação tem seu valor, pois pode orientar a investigação clínica de forma prática. Os autores ainda destacam que no terceiro grupo, uma avaliação detalhada da clínica e dos exames de imagem por profissionais com experiência no atendimento de pacientes com LD/LG permitiram o diagnóstico presuntivo correto em 21/82 pacientes.

3.2.3 Caracterização clínica

As manifestações neurológicas mais comuns das LD/LG em adultos são: alterações cognitivas e/ou comportamentais, alterações da marcha, disartria, síndrome piramidal, ataxia cerebelar e por vezes movimentos anormais ou até mesmo epilepsia (Leite et al., 2014). O curso clínico tende a ser crônico e lentamente progressivo, mas por vezes pode ser rápido, como em alguns casos de HDLS ou acelerado por fatores externos, principalmente trauma, como ocorre em VWM.

Alguns achados neurológicos podem ajudar a reduzir a lista de diagnósticos diferenciais. O Quadro 2 traz estes achados.

Quadro 2 – Achados neurológicos de maior valor diagnóstico

Neuropatia óptica	Doenças mitocondriais Leucodistrofia metacromática Doença de Krabbe Doença de Pelizaeus-Merzbacher
Nistagmo / alterações da motricidade ocular extrínseca	Doença de Pelizaeus-Merzbacher Doença de Pelizaeus-Merzbacher símile
Neuropatia periférica	Doenças mitocondriais ADLDLeucodistrofia metacromática Doença de Krabbe Doenças peroxissomais (ADL/AMN-X) Síndrome de Cockayne Doença de Pelizaeus-Merzbacher Doença de Pelizaeus-Merzbacher símile
Disautonomia	ADLD (precoce) Doença por corpos de poliglicosanos do adulto
Enxaqueca	CADASIL
Tremor palatal	Doença de Alexander
Acidente vascular encefálico	CADASIL CARASIL CARASAL Doença de Fabry

Fonte: adaptado de Ahmed et al., 2014 e Renaud, 2016

A história familiar quando sugere algum padrão de herança também é extremamente útil. Em adultos, ao contrário das crianças, há uma representação significativa de casos esporádicos e doenças autossômicas dominantes – embora isto nem sempre fique evidente pela história. Variantes patogênicas *de novo* podem ocorrer principalmente em doença de Alexander e ALD/AMN-X. Há também doenças autossômicas dominantes que apresentam penetrância incompleta, como a HDLS. O Quadro 3 traz as doenças separadas por forma de herança.

Quadro 3 – Padrão de herança das principais leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas

Autossômicas dominantes	CADASIL ADLD HDLS Doença de Alexander Doenças associadas ao <i>COL4A1</i> Leucodistrofia cerebral com vasculopatia retiniana (<i>TREX1</i>)
Ligadas ao X	ADL/AMN-X Doença de Pelizaeus-Merzbacher Síndrome tremor-ataxia ligada ao X Doença de Fabry
Autossômicas recessivas	Todas as demais

No entanto, são os achados extra-neurológicos aqueles com maior potencial discriminatório (Parikh et al., 2015). O Quadro 4 mostra os principais achados.

Quadro 4 – Achados extra-neurológicos de maior valor diagnóstico em pacientes com leucodistrofia ou leucoencefalopatia genética

Insuficiência adrenal	.ADL/AMN-X .Síndrome 4H
Falência ovariana precoce	.Doença da substância branca evanescente .Leucoencefalopatia relacionada a <i>AARS2</i> .Síndrome tremor-ataxia ligada ao X
Hipogonadismo hipogonadotrófico	.Síndrome 4H .Distúrbios relacionados ao <i>PNPLA6</i>
Ictiose	.Síndrome de Sjögren-Larsson .Deficiência de múltiplas sulfatases .Doença de Refsum .Síndrome de Cockayne .Tricotiodistrofia
Xantomas cutâneos	.Xantomatose cerebrotendínea
Alterações gastrointestinais	.Xantomatose cerebrotendínea .Encefalopatia mitocondrial neurogastrointestinal .Leucodistrofia metacromática (colelitíase)
Catarata	.Xantomatose cerebrotendínea .Síndrome 4H .Doença de Fabry .Doenças mitocondriais .Doenças peroxissomais
Retinopatia	.Doença de Krabbe .Doença de Refsum .Síndrome de Cockayne .Gangliosidoses GM1 e GM2 .Síndrome de Sjögren-Larsson .Doenças mitocondriais .Doenças peroxissomais .Microangiopatia cerebrotiniana com calcificações e cistos (síndrome de Labrune) .Doenças associadas ao <i>COL4A1</i> .Leucodistrofia cerebral com vasculopatia retiniana (<i>TREX1</i>)
Perda auditiva	.Doenças mitocondriais .Doença de Refsum
Hipo/oligodontia	.Síndrome 4H .Síndrome de Cockayne
Alterações esqueléticas	.Síndrome de Nasu-Hakola .Deficiência de múltiplas sulfatases .Sialidose
Macrocrania	.Doença de Alexander .Acidúrias orgânicas .Leucoencefalopatia megalencefálica com cistos subcorticais

Fonte: (adaptado de Ahmed et al. (2014) e Renaud 2016)

Dismorfismos e hepatoesplenomegalia (como ocorre em doenças de depósito lisossomal) são extremamente incomuns em pacientes com LD/LG de início na idade adulta. No entanto, para aqueles em que a doença teve início precoce e chegaram à idade adulta, tais achados podem perdurar.

Frente a um paciente com LD/LG a busca sistemática pelos achados supracitados podem ser decisivos para um diagnóstico correto e/ou a orientação das investigações adicionais a serem realizadas. Na Figura 1 apresentamos alguns exemplos.

Figura 1 - Manifestações extra-neurológicas: **A**- hiperpigmentação de cicatriz, comum na síndrome de Addison, sugerindo ALD/AMN-X ou síndrome 4H; **B**- alopecia precoce, sugerindo ALD/AMN-X; **C**- ictiose, comum na síndrome de Sjögren-Larsson e na doença de Refsum; **D**- xantomas em calcanhar de Aquiles, sugerindo XCT

3.2.4 Caracterização neurorradiológica

Embora os estudos sobre doenças da substância branca tenham se iniciado nos anos 1830 com estudos patológicos, foi somente na década de 1980 que estes começaram a ganhar força, e com a ressonância magnética mudou-se por completo a abordagem destas doenças (Kevelam et al., 2016). A RM é indispensável na investigação das LD/LG. Eventualmente, a TC de crânio pode complementar a investigação – principalmente na busca de calcificações. Embora as LD/LG constituam um grupo bastante heterogêneo, pacientes com a mesma doença tendem a apresentar os mesmos achados de RM, possibilitando a identificação de padrões característicos de cada doença (Schiffmann e van der Kaap, 2009).

Encontramos na literatura três abordagens diagnósticas diferentes e ao mesmo tempo complementares dos achados de RM. O primeiro e mais influente trabalho foi o de Schiffmann e van der Knaap (2009), que propõe um algoritmo no qual a primeira distinção é entre doenças hipomielinizantes e as demais. O grupo das hipomielinizantes é subsequentemente dividido entre as doenças com ou sem acometimento de sistema nervoso periférico. Já o grupo das não-hipomielinizantes é dividido conforme o padrão das lesões em multifocais ou confluentes. Este último grupo é ainda subdividido conforme a localização predominante das lesões – frontal, parieto-occipital, periventricular, subcortical, difuso e fossa posterior.

As LD/LG com hipomielinização são muito raras em adultos. Assim, seguindo esta abordagem, destacamos no Quadro 5 as principais LD/LG sem-hipomielinização do adulto.

Quadro 5 – Padrão de lesões vistas na neuroimagem das principais leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas (adaptado de Ahmed et al. (2014) e Renaud 2016)

Multifocais		.Vasculopatias .Doenças mitocondriais .HDLS .Acidúria L2-hidroxi-glutárica .Doença de Fabry	
Confluentes	Frontal	.Leucodistrofia metacromática .Variante frontal da ALD-X .HDLS .Doença de Alexander	
	Parieto-occipital	.ALD-X .Doença de Krabbe	
	Periventricular	.Leucodistrofia metacromática .Doença de Krabbe .Síndrome de Sjögren-Larsson .LBSL .Doença por corpos de poliglicosanos do adulto	
	Subcortical	.Síndrome de Kearns-Sayre .Acidúria L2-hidroxi-glutárica .Doenças do ciclo da uréia	
	Difusa	.Doença da substância branca evanescente .Doenças mitocondriais .Distrofia muscular congênita por deficiência de merosina .Fase final de várias doenças	
	Fossa posterior	Cerebelo e pedúnculos cerebelares médios	.Xantomatose cerebrotendínea .Doenças peroxissomais .Doença de Alexander .LBSL .ADLD .FXTAS
		Tronco encefálico	.LBSL .Doenças peroxissomais .Doença de Alexander .ADLD .Doença por corpos de poliglicosanos do adulto

A segunda proposta de abordagem diagnóstica a partir da imagem foi feita por Labauge et al. em 2014 e aplicada numa população de 154 pacientes pelo mesmo grupo (Ayrignac et al., 2015). Esta proposta tem a vantagem de ter sido elaborada exclusivamente para LD/LG de início na idade adulta, enquanto que a primeira era mais abrangente (podendo por vezes confundir o neurologista clínico). De forma bastante pragmática, divide em vasculares, cavitantes e outras.

A terceira proposta, feita por Vanderver (2016b), também foca exclusivamente em pacientes adultos e divide os pacientes em dois grandes grupos: um com doenças de início multifocal, que pode muitas vezes lembrar uma doença desmielinizante ou vascular; e outro com as formas em adultos das LD/LG que tipicamente se apresentam em crianças, sendo a maioria confluyente.

Vanderver et al. (2014) também propôs a busca sistemática de alguns achados que podem estreitar as possibilidades diagnósticas, os quais destacamos no quadro 6 e na figura 2.

Por último, o acometimento de fossa posterior em LD/LG em adultos foi recentemente revisado por Ayrignac et al. (2016). Segundo o mesmo, o hipersinal em T2/FLAIR em tronco pode estar presente na maioria das LD/LG, sendo em algumas o acometimento trato-específico. A atrofia leve de tronco encefálico é também relativamente frequente, mas a atrofia moderada ou grave têm maior valor diagnóstico, ocorrendo em LBSL, ADLD, doença por corpos de poliglicosanos do adulto e em doença de Alexander (a acentuada atrofia de bulbo leva a um aspecto de “girino”).

O hipersinal de pedúnculos cerebelares, particularmente os médios, também não é muito específico, mas é mais frequentemente encontrado em: LBSL, ADLD, síndrome tremor-ataxia ligada ao X (FXTAS) e doença por corpos de poliglicosanos do adulto. Já o acometimento de pedúnculos cerebelares superior e inferior têm maior valor diagnóstico, sugerindo LBSL.

Outra avaliação que pode ser útil é a dos núcleos denteados do cerebelo. Estes são mais acometidos em XCT, L2HGA, doença de Alexander e doença por corpos de poliglicosanos do adulto. Nesta última pode haver também significativa atrofia cerebelar.

Independente da abordagem inicial adotada, ressalta-se que muitas vezes é possível o reconhecimento de um padrão bem específico de imagem, como em LBSL ou VWM, por exemplo. Comentaremos um pouco mais sobre o padrão específico (quando houver) de cada doença quando abordarmos individualmente as principais LD/LG em adultos.

Quadro 6 – Achados adicionais de neuroimagem com maior valor diagnóstico

Cistos na substância branca	.Doença da substância branca evanescente .Leucoencefalopatia megalencefálica com cistos subcorticais .Microangiopatia cerebrorretiniana com calcificações e cistos (síndrome de Labrune) .Acidúria L2-hidroxiglutarica
Calcificações	.Microangiopatia cerebrorretiniana com calcificações e cistos (síndrome de Labrune) .Doenças associadas ao <i>COL4A1</i> e <i>COL4A2</i> .Doença de Fabry .Doenças mitocondriais
Impregnação pelo contraste	.ALD-X .Doença de Alexander .HDLS .Microangiopatia cerebrorretiniana com calcificações e cistos (síndrome de Labrune) .Doenças mitocondriais
Corpo caloso fino	.HDLS .Síndrome 4H
Lesões de núcleos da base não-calcificantes	.HDLS .Doença de Alexander .Microangiopatia cerebrorretiniana com calcificações e cistos (síndrome de Labrune) .Xantomatose cerebrotendínea .Doença da substância branca evanescente .Acidúria L2-hidroxiglutarica .Doenças mitocondriais
Acometimento de medula espinhal	.LBSL .ADLD .Doença de Alexander .Xantomatose cerebrotendínea .Doença por corpos de poliglicosanos do adulto .Doenças mitocondriais .Homocistinúrias

Fonte: adaptado de Ahmed et al. (2014) e Vanderver et al 2014

Figura 2 - Achados adicionais de neuroimagem: A – cistos periventriculares (setas) visualizados em imagem ponderada em FLAIR em paciente com VWM; B – imagem de TC de crânio mostrando calcificações em substância branca parietal (setas brancas) e calcificações puntiformes em substância branca frontal (setas azuis), bilateralmente, em paciente com o diagnóstico de HDLS; C – lesões parieto-occipitais bilaterais com impregnação pelo gadolínio (setas) em paciente com ALD-X; D – acometimento de medula espinhal (seta) em paciente com diagnóstico de LBSL

3.2.5 Caracterização genética

Se a ressonância magnética promoveu a primeira grande revolução no estudo das doenças da substância branca, pode-se dizer que as técnicas de NGS estão produzindo a segunda.

Os primeiros genes associados a LD/LG foram identificados no final dos anos 1980, após estudos de ligação. A maioria das LD/LG que conhecemos tiveram suas bases genéticas estabelecidas por esta técnica entre os anos 1990 e 2010 (Kevelam et al., 2016).

No entanto, sabemos que os estudos de ligação são muito trabalhosos, demorados e requerem um número grande de acometidos ou famílias consanguíneas para se identificar o gene responsável. Assim, num mundo com famílias cada vez menores e diante de doenças muito raras, esta abordagem mostra-se de baixa custo-efetividade.

Quando tratava-se de doença autossômica dominante porém, que na maior parte das vezes fosse decorrente de evento mutacional *de novo*, as técnicas

tradicionais de investigação genética eram de pouca utilidade, pois não havia recorrência de casos na família.

Neste contexto, surgem as técnicas de NGS (“next-generation sequencing” – NGS), com o sequenciamento completo do exoma (“whole exome sequencing” – WES) e mais recentemente o sequenciamento completo do genoma (“whole genome sequencing” – WGS), trazendo uma mudança de paradigma para a pesquisa e prática clínicas. As técnicas de NGS são frequentemente chamadas de técnicas de sequenciamento paralelo massivo, pois sequenciam simultaneamente milhões ou até bilhões de pequenos fragmentos de DNA (Shendure; Ji, 2008).

De forma bastante simplificada, podemos dizer que as técnicas de NGS consistem em extrair o DNA, fragmentá-lo em pequenos pedaços, organizar uma “biblioteca” com estes fragmentos que serão por sua vez sequenciados gerando milhões de leituras, alinhar estas leituras a um genoma de referência e submetê-las a filtros em busca de selecionar variantes raras e de possível relevância clínica. (Biesecker; Green, 2014).

O WES é o sequenciamento paralelo massivo das regiões codificadoras de proteínas do genoma, o que corresponde a cerca de 1% (30Mb) do genoma humano total (Shendure; Ji, 2008).

Trata-se de uma ferramenta poderosa, capaz de sequenciar os cerca de 21.000 genes humanos de forma maciça, sendo muito eficaz na pesquisa de mutações de ponto (trocas simples de aminoácidos, ou “missense”, e do tipo perda de sentido, ou “nonsense”), pequenas inserções ou deleções de até 10 nucleotídeos e mutações de sítios de reformatação (“splice site junctions”). No entanto, não é capaz de detectar variantes patogênicas por expansões de repetições de nucleotídeos e grandes inserções/deleções (Biesecker e Green, 2014), e sua eficiência para detecção de variações do número de cópias (“copy number variations” – CNVs) necessita ser aprimorada.

A avaliação por WES pode ainda ser feita em trio, ou seja, no probando e seus genitores. Tal estratégia permite a identificação de novos genes em doenças dominantes ou mesmo em doenças ligadas ao X decorrentes de mutação *de novo*.

Existem ainda formas limitadas de sequenciamento paralelo massivo que utilizam técnicas de NGS. Os painéis de genes baseados em fenótipos têm se tornado

bastante populares, por seu custo mais baixo. Embora permitam a avaliação de múltiplos genes em um só exame, oferecendo vantagem sobre o pedido em série de vários testes genéticos isolados, têm uma limitação inerente ao conhecimento disponível à época da montagem do painel. Assim, diferentes laboratórios podem oferecer painéis que incluam genes diferentes para o mesmo fenótipo.

Ainda, nem sempre a caracterização do fenótipo é fácil. Como exemplo podemos citar os casos de ataxias espásticas, que podem gerar dúvida na solicitação do exame – painel de ataxias ou de paraplegias espásticas? Ou casos de demência de início precoce com acometimento de substância branca – painel para demências ou para LD/LG?

Outra forma de avaliação limitada do exoma é a conhecida como exoma clínico (na literatura de origem inglesa – “*focused exome sequencing*”). É uma técnica NGS que sequencia os exons dos genes previamente relacionados a doenças humanas – cerca de 6000 genes (12Mb de sequências exônicas). Permite uma avaliação ampla, não-enviesada, a um custo mais baixo quando comparado ao WES. No entanto, não permite a identificação de alterações genéticas em genes que estão fora desta lista, que está em expansão permanente.

O uso de NGS para a realização do WES em doenças neurológicas vem crescendo rapidamente, por permitir uma avaliação não enviesada de todos os genes codificantes de proteínas em pacientes com fenótipos complexos, com suspeita de etiologia genética, principalmente quando há múltiplos genes suspeitos ou não há genes suspeitos (Fogel et al., 2016).

Estas duas situações são bastante frequentes em casos de LD/LG e o WES tem sido usado para:

- 1- a caracterização genotípica de fenótipos que já haviam sido descritos antes da disponibilidade destas técnicas – como é o caso da HDLS, descrita por Lanska et al. (1994), com gene identificado por Rademakers et al. (2012); e
- 2- a definição de novas entidades clínicas, já com sua base molecular, como os casos de LTBL (Steenweg et al., 2012) e H-ABC (Simons et al., 2013), dentre outras.

O WES tem permitido diminuir o número de pacientes sem diagnóstico. Em 2010, Bonkowsky et al. mostrou que em uma amostra de 122 crianças, 51% permaneceram sem diagnóstico mesmo após extensa investigação.

Já Vanderver et al. (2016a) mostra uma realidade um pouco mais favorável. Numa amostra inicial de 191 pacientes sem diagnóstico, avaliação inicial em um centro de referência permitiu o diagnóstico em 101 pacientes utilizando o reconhecimento de padrões clínicos/neurorradiológicos e testes diagnósticos direcionados. Dos pacientes restantes, 71 foram submetidos ao WES e 25 obtiveram um diagnóstico definitivo enquanto outros 5 tiveram genes potencialmente patogênicos identificados.

Assim, numa população sem diagnóstico, o WES foi capaz de diagnosticar 42% dos casos e, se considerarmos a amostra inicial, houve uma aumento de 20% no poder diagnóstico. A avaliação sistemática associada a WES foi capaz de diagnosticar 73% dos casos.

No entanto, este estudo foi conduzido em uma população entre 3 e 26 anos, com idade de início dos sintomas entre o nascimento e 19 anos. Somente em 2017, Lynch et al. publicaram o primeiro estudo utilizando NGS em uma série composta exclusivamente por indivíduos adultos com LD/LG não resolvidos (contribuímos com este trabalho e parte dos pacientes aqui apresentados também integraram esta série). Em uma amostra de 100 indivíduos, um diagnóstico definitivo foi feito em 26.

No estudo francês que avaliou pacientes com início dos sintomas após os 16 anos de idade, 57/154 (37%) pacientes permaneceram sem diagnóstico após avaliação minuciosa por um grupo de pesquisadores da área. Notadamente no grupo de pacientes com leucoencefalopatia não-vascular/não-cavitante 45% dos pacientes permaneceram sem diagnóstico (Ayrignac et al., 2015).

Ainda não há na literatura uma recomendação consensual sobre a melhor forma de buscar o diagnóstico genético de um dado paciente. Obviamente pode-se proceder a avaliação de um gene por vez conforme a hipótese diagnóstica, se o quadro clínico e neurorradiológico forem muito sugestivos, ou utilizar painéis com múltiplos genes, ou WES (Vanderver et al., 2014, 2016a). No entanto, esta última estratégia tem sido cada vez mais empregada.

3.2.6 Abordagem diagnóstica

Pelo o que foi exposto até aqui, fica claro que precisamos de uma estratégia para abordagem racional destes pacientes. A avaliação clínica deve buscar sistematicamente os achados extra-neurológicos e, sempre que possível, tentar caracterizar o padrão de herança.

A avaliação da ressonância magnética deve buscar algum dos padrões típicos (discutidos com cada doença individualmente a seguir) ou pelo menos a categorização em uma das grandes categorias (vascular ou cavitante ou não-vascular/não-cavitante) propostas por Labauge et al., 2014.

Uma avaliação laboratorial como a proposta por Ahmed et al. (2014) que exclua doenças infecciosas, inflamatórias e metabólicas deve anteceder a solicitação de testes genéticos. O exame do líquido tem seu maior valor para excluir doenças adquiridas, raramente estando alterado em LD/LG.

Excluídas as causas adquiridas e identificado um padrão típico, pode-se proceder testes bioquímicos ou genéticos confirmatórios.

Caso até este ponto não exista uma hipótese diagnóstica, Ahmed et al. (2014) sugere uma “segunda rodada” de testes bioquímicos, e sua sugestão é seguida por Aygnac et al. (2015). Estes exames visam investigar as LD/LG mais comuns ou tratáveis, como por exemplo ADL/AMN-X (dosagem dos ácidos graxos de cadeia muito longa), XCT (dosagem de colestanol), L2HGA (ácidos orgânicos urinários), leucodistrofia metacromática (atividade da arilsulfatase A em leucócitos) e doença de Krabbe (atividade da galactocerebrosidase em leucócitos ou fibroblastos), entre outras.

Caso ainda persista sem diagnóstico, deve-se considerar a realização de um painel de genes associados a LD/LG ou o sequenciamento do exoma (Vanderver, 2016b).

3.3 Principais leucodistrofias e leucoencefalopatias genéticas em adultos

A seguir discutimos algumas doenças selecionadas dentre as LD/LG descritas na vida adulta.

3.3.1 Adrenoleucodistrofia/adrenomieloneuropatia ligada ao X (OMIM #300100)

A adrenoleucodistrofia ligada ao X (ADL-X) é uma doença metabólica causada por um defeito em *ABCD1* localizado no cromossomo Xq28, que leva a uma falha na beta-oxidação peroxissomal dos AGCML, ou seja, os que possuam cadeia com 22 ou mais carbonos. Há consequente acúmulo de AGCML, particularmente em substância branca cerebral, medula espinhal, córtex adrenal, células de Leydig e folículos capilares (Moser, 1997; Engelen et al., 2012). Sua incidência, considerando ambos os sexos, pode variar de 0,8:100.000 habitantes (Horn et al., 2013) a 6:100.000 (Bezman et al., 2001). No Brasil, Jardim et al. (2010), encontraram uma incidência de 2,9:100.000 habitantes.

Clinicamente, há considerável variabilidade fenotípica, sendo três os fenótipos principais, além dos portadores assintomáticos: a forma cerebral da ADL-X (cADL-X), a adrenomieloneuropatia ligada ao X (AMN-X) e a doença de Addison isolada (Steinberg et al., 2015).

A doença de Addison pode se manifestar em qualquer idade a partir dos 2 anos e pode permanecer durante muitos anos como a única manifestação. Em fases avançadas, além da deficiência de glicocorticoides, pode apresentar deficiência de mineralocorticoides. Esta forma de apresentação é rara em mulheres, afetando menos de 2% das heterozigotas (Steinberg et al. (2015), Engelen et al., 2012).

A AMN-X é a forma mais comum em adultos, em geral se iniciando na 3ª ou 4ª década de vida com paraparesia espástica, ataxia sensitiva, perda da sensibilidade vibratória, distúrbios esfinterianos (principalmente urinário), disfunção erétil e dores em membros inferiores (Moser, 1997 e Engelen et al., 2012). Corresponde a cerca de 40 a 45% do total de afetados (Steinber et al., 2015).

O acometimento medular tende a ser predominante sobre as manifestações de neuropatia periférica. Entra, portanto, no diagnóstico diferencial das paraplegias espásticas hereditárias (“hereditary spastic paraplegia” – HSP) com concomitante neuropatia periférica. Esta é na maioria das vezes uma polineuropatia sensitivo-motora axonal, podendo raramente ser desmielinizante.

Alguns sinais adicionais extra-neurológicos podem ajudar no diagnóstico: hiperchromia (melhor observada em cicatrizes e por vezes gengiva) e/ou hipotensão ortostática secundária a doença de Addison (presente em cerca de 70% dos pacientes com AMN-X no momento do diagnóstico); alopecia precoce (com cabelo fino e esparso) e raramente insuficiência testicular (Engelen et al., 2012).

A RM pode mostrar hipersinal em T2/FLAIR nos tratos corticoespinhais, mas esta alteração não caracteriza a cADL-X. No entanto, cerca de 20% dos pacientes podem evoluir com desmielinização levando a déficit cognitivo. Pode então ocorrer estabilização ou evolução para neuroinflamação mais disseminada, com impregnação pelo gadolínio vista na RM, e evolução semelhante a cADL-X da infância (van Geel et al., 2001). Destacamos que traumatismos cranioencefálicos podem desencadear desmielinização focal (Leite et al., 2014) ou até precipitar a evolução catastrófica para cADL-X (Bouquet et al., 2015).

A forma cerebral da ADL-X em adultos pode ser isolada ou, mais comumente precedida por AMN-X (de Beer et al., 2014). A apresentação clínica é relativamente semelhante em adultos e crianças, com declínio cognitivo e motor de rápida evolução, embora no adulto tenda a ser um pouco mais lenta. O diagnóstico pode ser particularmente desafiador naqueles pacientes sem história familiar e sem disfunção adrenal no momento da instalação do quadro neurológico. Manifestações neuropsiquiátricas, por vezes simulando psicose ou demência, são frequentes. Pode ainda apresentar epilepsia, em geral de fácil controle, e, em fases mais avançadas, atrofia óptica.

A RM de crânio em adultos com cADL-X mostra hipersinal em T2/FLAIR parieto-occipital, em geral simétrico, com acometimento de corpo caloso. Pode haver impregnação pelo gadolínio sugerindo quadro inflamatório ativo. Alguns pacientes têm acometimento inicial da substância branca dos lobos frontais, podendo envolver o joelho do corpo caloso (Inoue et al., 2012). Há ainda uma forma mais rara de apresentação, chamada olivopontocerebelar, com acometimento predominante de cerebelo, pedúnculos cerebelares e trato corticoespinhal ao longo de todo o tronco encefálico (Ogaki et al., 2016). As alterações da RM podem anteceder a piora clínica, e o acompanhamento por RM periódicas pode ter implicações terapêutica.

Sobre as manifestações clínicas no sexo feminino, Engelen et al. (2014) publicaram um estudo prospectivo de 46 mulheres heterozigotas mostrando que até 63% delas desenvolvem um quadro semelhante a adrenomieloneuropatia observada em homens. Há um significativo aumento da frequência de sintomas com o avançar da idade (88% das mulheres acima de 60 anos eram sintomáticas). Um achado particularmente surpreendente foi o de incontinência fecal precoce, presente em 28% da amostra.

O diagnóstico da ADL/AMN-X pode ser bioquímico por meio da dosagem de ácidos graxos de cadeia muito longa (C24 a C30, particularmente C26) no sangue (plasma); porém, cerca de 20% das mulheres heterozigotas não apresentam este achado (Steinberg et al., 2015). A pesquisa da variante patogênica em *ABCD1* é o método de escolha nestes casos. Não há correlação entre os níveis de AGCML, o tipo de variante patogênica e o fenótipo clínico. São descritas cerca de 631 variantes patogênicas no “The Human Gene Mutation Database” - HGMD público (Stenson et al., 2003), a maioria levando à substituição simples de aminoácidos (“missense”), mas não há correlação entre o genótipo e o fenótipo.

O tratamento consiste na reposição de corticoides naqueles portadores de insuficiência adrenal – o que não altera as manifestações neurológicas – e em tratamento de suporte para as manifestações neurológicas. O transplante de células hematopoiéticas pluripotentes é uma opção para meninos e adolescentes com manifestações precoces de cADL-X. Como as alterações neurorradiológicas antecedem as manifestações clínicas, pacientes em risco devem ser monitorados com RM de crânio a cada seis meses (Steinber et al., 2015). O transplante células hematopoiéticas pluripotentes para cADL-X em adultos foi recentemente avaliado em 14 pacientes por Kühl et al. (2017), sendo que 6 não sobreviveram e aqueles com “Expanded Disability Status Scale score” (EDSS) < 6 antes do transplante obtiveram melhor resultado de sobrevida e preservação da marcha.

Os resultados de um estudo aberto e sem grupo-controle sugerem que o uso do óleo de Lorenzo na fase pré-sintomática pode reduzir os níveis de C26:0 e, consequentemente, reduzir o risco de progressão para cADL-X (Moser et al., 2005). No entanto, alguns pacientes desenvolveram a doença mesmo com a redução dos

níveis de AGCML. Assim, tais dados devem ser interpretados com cautela e acreditamos que o óleo de Lorenzo é ainda uma terapia sob investigação.

Em 2017, foram publicados os resultados preliminares de uma terapia gênica *ex vivo* usando infusão de células autólogas CD34+ modificadas com vetor lentiviral, com resultados promissores em meninos com a fase inicial de cADL-X (Eichler et al., 2017).

Para os portadores de AMN-X o tratamento é apenas de suporte.

3.3.2 Doença da substância branca evanescente (OMIM #603896)

A doença da substância branca evanescente (*Vanishing White Matter Disease* – VWM) é uma leucodistrofia autossômica recessiva causada por alteração no fator de iniciação de tradução eucariótico 2B (“eukaryotic translation initiation factor 2B” – eIF2B), uma proteína de 5 subunidades, reguladora essencial da tradução do RNAm. Sua função é converter a forma inativa do fator de iniciação de tradução (eIF2) na sua forma ativa, ligada a GTP, precursora da iniciação da tradução proteica (Wortham e Proud, 2015). Embora expressa de forma ubíqua, a mutação em homozigose ou heterozigose composta em qualquer das 5 subunidades causa doença preferencialmente da substância branca do sistema nervoso central por acometimento de astrócitos e oligodendrócitos (Dooves et al. 2016, e Raini et al., 2017).

A prevalência de VWM é desconhecida, mas em estudos de pacientes com leucodistrofia sem diagnóstico prévio, foi uma das mais comuns tanto em uma abordagem a partir da RM (van der Knaap et al., 1999) quanto em uma abordagem utilizando WES (Vanderver et al., 2016a).

Clinicamente distinguem-se 5 apresentações conforme a idade de início, sendo a gravidade inversamente proporcional à idade. Assim existem as formas pré-natal/congênita, forma infantil subaguda (< 1 ano), infantil precoce (1-5 anos), infantil tardia/juvenil (5-15 anos) e de início no adulto (Fogli e Boespflug-Tanguy, 2006). As formas de início precoce se caracterizam por grave quadro encefalopático, com hipomielinização, crises epiléticas e rápida progressão letal. Já para as crianças com apresentação após 1 ano, os sintomas predominantes são ataxia, síndrome

piramidal e deficiência intelectual. Traumatismos cranianos ou febre podem piorar agudamente o quadro (Schiffmann et al., 2012).

Em adultos, as mulheres parecem ser mais frequentemente acometidas e as manifestações neurológicas iniciais costumam ser cognitivo-comportamentais. O quadro tende a ser de evolução lenta e podem surgir sinais piramidais, ataxia cerebelar e epilepsia – esta em geral de fácil controle (Labauge et al., 2009). Há relatos de pacientes com apresentação inicial de enxaqueca e sinais focais transitórios (Robinson et al., 2014). Não é comum o envolvimento dos nervos periféricos, embora este já tenha sido descrito. Em alguns pacientes as alterações na RM antecedem as manifestações neurológicas. A relação de piora dos sintomas neurológicos secundária a situações de estresse, tais como trauma ou infecção, também ocorre em adultos, porém é menos frequente (Labauge et al., 2009). Menopausa precoce por falência ovariana secundária é um achado que pode ser uma grande pista diagnóstica. Vale ressaltar que crianças também podem apresentar falência ovariana primária, por disgenesia ovariana, fato que deu origem ao termo “ovarioleucodistrofia”.

A RM de crânio pode ser muitas vezes diagnóstica. Há envolvimento difuso e simétrico da substância branca e a progressiva substituição desta por líquido. Surgem inicialmente áreas de aspecto tigróide e posterior surgimento de cistos - áreas em que o sinal da substância branca fica semelhante ao sinal do líquido nas sequências ponderadas em T1, T2 e FLAIR.

Tais lesões cavitantes podem ser confundidas com esclerose múltipla (EM) cavitante, mas a localização e a morfologia das lesões ajudam na distinção – pacientes com EM tendem a apresentar lesões ovóides perpendiculares aos ventrículos laterais e lesões isoladas puntiformes justacorticais, já pacientes com VWM tendem a apresentar hiperintensidades simétricas infratentoriais, principalmente em pedúnculos cerebelares médios e substância branca cerebelar. Os cistos em pacientes com VWM tendem a se localizar mais anteriormente (Aygnac et al., 2016b).

Curiosamente, não é comum o aumento dos ventrículos, ficando estes com as suas dimensões e posições originais, bem como o córtex. Há envolvimento de cerebelo e tronco encefálico, mas sem degeneração cística nestes. A espectroscopia

mostra redução global de todos os metabólitos (van der Knaap, 2005b). Em adultos, atrofia cortical e acometimento de corpo caloso são muito comuns e a degeneração cística pode estar ausente (Carra-Dallière et al, 2011).

O diagnóstico pode ser feito pelos achados típicos da RM de crânio, mas deve idealmente ser confirmado pela análise molecular dos cinco genes que codificam o fator de iniciação de tradução eucariótico 2B (*EIF2B1* a *EIF2B5*). A maioria dos pacientes são heterozigotos compostos e o gene que com mais frequência mostra-se alterado é o *EIF2B5* (Fogli et al., 2004).

Algumas correlações genotípicas-fenotípicas são possíveis: a variante patogênica p.Arg113His é a mais comum e, em homozigose em *EIF2B5*, nunca causa doença em crianças. Esta variante gera um fenótipo mais brando quando comparada aos heterozigotos compostos (van der Lei et al., 2010). Já a variante p.Val309Leu neste mesmo gene causa formas graves da doença (Fogli et al. (2004) e Carra-Dalliere et al. (2011)). Em geral as mulheres tendem a ter um curso mais brando da doença.

O tratamento é sintomático.

3.3.3 Acidúria L2-Hidroxiglutarica (OMIM #236792)

A acidúria L2-hidroxiglutarica (L2HGA) é um erro inato do metabolismo de herança autossômica recessiva causado por uma diminuição da atividade de enzima relacionada ao FAD, localizada na membrana mitocondrial, a L2-hidroxiglutarato desidrogenase. Esta enzima catalisa a oxidação do L2-hidroxiglutarato a alfa-cetoglutarato. O consequente acúmulo de L2-hidroxiglutarato é tóxico para o sistema nervoso central (Rzem et al., 2004).

A incidência e prevalência exatas não são conhecidas e há pouco mais de 300 casos descritos na literatura desde que a doença foi descrita em 1980 (Duran et al. (1980) e Patay et al. (2015)). Em um estudo sobre acidemias orgânicas com 15 anos de duração, Wajner et al. (2009) analisaram a urina de 6866 crianças e apenas em 9 pacientes o diagnóstico final foi L2HGA.

Clinicamente, a doença se inicia na infância, em geral insidiosa ao longo do primeiro ano de vida, com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor ou apenas

difficuldade de aprendizagem. Muitos pacientes com quadro mais brando podem chegar à vida adulta sem um diagnóstico específico, apenas considerados portadores de deficiência intelectual leve, até que ocorra progressão dos sintomas (Faiyaz-Ul-Haque et al., 2014).

As manifestações motoras mais comuns se devem a ataxia cerebelar, mas distonia/coreodistonia também podem ocorrer, especialmente em membros superiores. Com a progressão do doença podem aparecer sinais piramidais e até mesmo tetraparesia espástica. Epilepsia é comum, e em geral de fácil controle. Podem ocorrer mioclonias negativas, nistagmo horizontal, atrofia óptica, perda auditiva e disfagia (Steenweg et al., 2010). Há uma tendência de progressão dos sintomas com o avançar da idade. Pacientes com L2HGA têm um risco aumentado de apresentar neoplasias de sistema nervoso central (SNC), especialmente gliomas de alto grau (Patay et al., 2012).

A RM de crânio é muito sugestiva deste diagnóstico. As lesões são inicialmente multifocais e subcorticais, com acometimento das fibras em U, e tendem a confluir, inicialmente nas regiões frontoparietais. Mesmo em casos de doença grave e avançada, a substância branca periventricular tende a ser poupada, assim como estruturas mais centrais como corpo caloso, tronco encefálico e por vezes cápsula interna. Pode haver alteração de sinal em núcleo caudado, putamen e especialmente globo pálido. Há atrofia cerebelar com predomínio de vermis e alteração de sinal de núcleos denteados, sem no entanto alterar a substância branca cerebelar (van der Knaap, 2005c).

Diante de um quadro clínico sugestivo e uma RM de crânio característica, o passo seguinte é realizar a pesquisa de ácidos orgânicos na urina, que mostra um expressivo aumento de 2-hidroxiglutarato. É então necessária a distinção entre o isômero prevalente para a confirmação bioquímica do diagnóstico.

Pode ser também realizada a análise molecular de *L2HGDH*, sendo que a maioria dos casos descritos até hoje são homozigotos para mutações de ponto. Em um estudo de 18 famílias de origem portuguesa, Vilarinho et al. (2005) encontraram 3 variantes patogênicas mais frequentes: c.529delC, levando a mudança de matriz de leitura (“frameshift”), uma de perda de sentido c.208C>T (p.Arg70*) e uma substituição simples de aminoácido c.293A>G (p.His98Arg).

O tratamento é sintomático.

3.3.4 Leucoencefalopatias genéticas de origem vascular

O acometimento de substância branca por doença de pequenos vasos cerebrais (microangiopatia) é um achado comum na prática neurológica, sendo na grande maioria dos casos secundário a causas adquiridas. No entanto, estima-se que cerca de 5% destes pacientes apresentam doença de pequenos vasos de origem monogênica (Yamamoto et al., 2011). Em geral são pacientes jovens ou eventualmente idosos sem fatores de risco cardiovascular.

Dentre estas causas genéticas, destacamos as seguintes, que frequentemente entram no diagnóstico diferencial de LD/LG: CADASIL, CARASIL, doenças relacionadas a mutação do colágeno tipo IV, vasculopatia retiniana com leucodistrofia cerebral e doença de Fabry.

Clinicamente a maioria destas doenças se manifesta como acidente vascular encefálico em jovem, mas também é comum a ocorrência de demência vascular e/ou alteração da marcha (Sondergaard et al., 2017). As imagens de RM de crânio demonstram um padrão que é bastante familiar ao neurologista que atende idosos com doença cerebrovascular e apresenta infartos lacunares cumulativos com micro-hemorragias, supra e infratentoriais.

CADASIL (*Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy* – OMIM #125310) é sem dúvida a mais importante e mais prevalente dentre as doenças citadas acima e se caracteriza por 4 achados clínicos principais: acidentes vasculares encefálicos isquêmicos subcorticais recorrentes de início no adulto jovem; declínio cognitivo; migrânea com aura e manifestações psiquiátricas (transtorno de humor e apatia). Os infartos cerebrais são tipicamente lacunares e o quadro demencial tem uma progressão em degraus, como ocorre em demência vascular relacionada aos fatores de risco cardiovasculares. A migrânea, as alterações de humor e apatia não estão presentes em todos os casos e o curso clínico é variável, com alguns pacientes totalmente incapacitados por volta dos 50 anos e outros ainda independentes aos 80 anos (Rutten e Lesnik, 2016).

A RM de crânio em pacientes com CADASIL mostra lesões lacunares cumulativas, microhemorragias predominantemente em tálamo e as lesões mais sugestivas são o acometimento de polos temporais e cápsula externa (Rutten e Lesnik, 2016), embora estas lesões não estejam sempre presentes.

É uma doença de herança autossômica dominante, com raros casos descritos de mutação *de novo*, e se deve a variantes patogênicas em *NOTCH3* – mais de 230 descritas. Este gene codifica o receptor Notch3, presente nas células musculares lisas vasculares e acredita-se que por um ganho tóxico de função o domínio extracelular da Notch3 se acumula nas paredes arteriais, levando à fibrose e estenose de arteríolas, especialmente cerebrais (Tikka et al., 2014).

O diagnóstico era classicamente feito pela análise por microscopia eletrônica de espécimes de biópsia de pele (em busca de Notch3 nas paredes dos vasos), mas atualmente pode ser feito pela pesquisa de variantes patogênicas em *NOTCH3* (Joutel et al., 2001). O tratamento é sintomático e deve-se dar especial atenção ao controle dos fatores de risco cardiovasculares.

CARASIL (*Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy* – OMIM #600142) é também uma doença hereditária de pequenos vasos, considerada bastante semelhante a CADASIL, diferindo principalmente pelo seu modo de herança (autossômica recessiva em contrapartida à herança autossômica dominante de CADASIL).

No entanto, algumas outras diferenças podem ser apontadas: CADASIL é panétnica, enquanto CARASIL predomina no Japão, embora já tenha sido descrita em outras populações, inclusive no Brasil (Tikka et al., 2014; Souza et al., 2016); clinicamente, alopecia precoce e dor lombar por hérnia discal e alterações espondilóticas são frequentes, pois CARASIL afeta também o tecido conectivo; os achados de RM de crânio são bastante semelhantes aos encontrados em CADASIL, mas tendem a ser mais homogêneos e poupar as fibras em “U”.

O diagnóstico pode ser confirmado pelo encontro de variantes patogênicas bialélicas em *HTRA1*, porém, mais recentemente tem sido descrito que a variante em heterozigose também pode causar doença de pequenos vasos cerebrais com um padrão de herança autossômico dominante (Bougea et al., 2017).

As doenças relacionadas ao colágeno tipo IV (*COL4A1* e *COL4A2*) foram inicialmente descritas em crianças com porencefalia, mas há também descrições de pacientes adultos acometidos. Sendo o colágeno tipo IV um dos principais componentes da membrana basal em diversos tecidos, é de se esperar que as manifestações das variantes patogênicas em *COL4A1* e *COL4A2* sejam sistêmicas. Assim, estes pacientes se apresentam com combinações variadas de acidentes vasculares encefálicos recorrentes isquêmicos e/ou hemorrágicos, aneurismas, nefropatia, miopatia, cardiopatia e anormalidades oftalmológicas (Meuwissen et al., 2015).

A vasculopatia retiniana com leucodistrofia cerebral (OMIM #192315) é uma doença autossômica dominante de início no adulto causado por variante patogênica em *TREX1*, que é o mesmo implicado na síndrome de Aicardi-Goutieres, encefalopatia grave da infância, autossômica recessiva, com calcificações em núcleos da base e leucodistrofia. Em adultos manifesta-se com perda visual, acidente vascular encefálico recorrente e consequente declínio cognitivo e sinais focais. Alguns apresentam manifestações sistêmicas como fenômeno de Raynaud, cirrose hepática e glomerulopatia (Richards et al., 2007).

A doença de Fabry (OMIM #301500) é uma doença lisossomal ligada ao X causada pela diminuição da atividade da alfa-galactosidase A. Tipicamente apresenta-se na infância ou adolescência com acroparestesias (polineuropatia periférica), angioqueratomas, opacidades de córnea e cristalino e proteinúria, podendo evoluir mais tarde com cardiopatia e doença cerebrovascular. No entanto, caso haja uma atividade residual (>1%) da alfa-galactosidase A, apresentações mais brandas podem surgir, por vezes apenas com acidente vascular encefálico isquêmico criptogênico. Ressalta-se também que mulheres portadoras da mutação podem apresentar manifestações apenas cardíacas e/ou cerebrovasculares na idade adulta. É fundamental que esta doença seja reconhecida, pois é passível de tratamento específico, com terapia de reposição enzimática (Mehta e Hughes, 2017).

3.3.5 Leucoencefalopatias genéticas de origem mitocondrial

As disfunções mitocondriais resultam em distúrbios do metabolismo energético celular e, conseqüentemente, afetam preferencialmente os órgãos de maior demanda energética, como encéfalo e músculos, mas podem ser multissistêmicas. Tipicamente, as lesões encefálicas mais comuns afetam simetricamente os núcleos da base e o tronco encefálico, mas algumas síndromes levam a extenso acometimento de substância branca (Wong, 2012).

Antes de prosseguirmos com a descrição destas síndromes, destacamos que a mitocôndria é uma organela celular constituída a partir de dois genomas, o mitocondrial e o nuclear. O DNA mitocondrial (mtDNA) codifica 13 subunidades proteicas das cadeias respiratórias, 2 RNA ribossomais (RNAr) e 22 RNA transportadores (RNAt). Cerca de 99% das proteínas mitocondriais são codificadas por DNA nuclear (nDNA) (Koopman et al., 2012).

Assim, as doenças mitocondriais monogênicas podem ter herança autossômica recessiva, autossômica dominante, ligada ao X ou de transmissão materna pelo DNA mitocondrial.

Quando o DNA mitocondrial está envolvido na gênese da doença, há significativa variabilidade fenotípica, mesmo dentro de uma mesma família. Isto se deve a duas particularidades da mitocôndria, a saber: heteroplasmia e limiar de efeito.

Cada célula humana, exceto as hemácias, contém milhares de mitocôndrias, todas com o mesmo mtDNA (homoplasmia). No entanto, aqueles com variantes patogênicas no mtDNA carregam uma mistura de mtDNA “mutante” e mtDNA “selvagem”, a que chamamos heteroplasmia. Para que ocorram manifestações clínicas, deve haver uma certa quantidade de mtDNA “mutante”, a que chamamos de limiar de efeito (Schon et al., 2012). Como a quantidade de mtDNA “mutante” pode variar entre indivíduos da mesma família e até mesmo entre tecidos do mesmo indivíduo, as manifestações clínicas podem também ser bastante variadas.

As manifestações clínicas que tipicamente podem ocorrer em doenças mitocondriais, independente de sua base genética, em diversas combinações, em qualquer idade, são: ptose palpebral, oftalmoparesia externa, miopatia, intolerância a

exercícios, cardiomiopatia, atrofia óptica, hipoacusia/surdez neurosensorial, baixa estatura, retinopatia pigmentar, diabetes melito, encefalopatia, crises epiléticas, demência, espasticidade, ataxia, episódios “*stroke-like*” e migrânea (Chinnery, 2014).

Embora várias síndromes de origem mitocondrial possam cursar com lesões de substância branca, destacaremos apenas duas, por apresentarem leucoencefalopatia de forma mais consistente: leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula e elevação de lactato (“Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation” – LBSL – OMIM #611105) e encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial (“Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy” – MNGIE – OMIM # 603041).

LBSL é uma síndrome mitocondrial de gravidade variável, com casos neonatais em geral bastante graves e aqueles de início na infância ou na idade adulta de evolução mais lenta (van Berge et al., 2014). Tipicamente os pacientes apresentam ataxia, espasticidade e disfunção de coluna dorsal, podendo também apresentar disartria, dificuldade de aprendizagem, epilepsia e neuropatia periférica (van der Knaap et al., 2003). Alguns pacientes apresentam piora do quadro clínico após febre ou pequenos traumas (van der Knaap e Salomons, 2015).

As alterações de RM de crânio são muito características e o diagnóstico pode ser feito baseado nos seguintes achados: lesões de substância branca multifocais ou homogêneas e confluentes poupando região subcortical associada a acometimento de colunas dorsais e tratos corticoespinhais laterais na medula e acometimento da decussação das pirâmides bulbares e/ou do leminisco medial no bulbo e concomitante lesão de pelo menos uma das seguintes estruturas: esplênio do corpo caloso, perna posterior da cápsula interna, pedúnculos cerebelares superiores ou inferiores, parte intraparenquimatosa do nervo trigêmeo, trato trigeminal mesencefálico, tratos espino cerebelares anteriores ou substância branca cerebelar (van der Knaap et al., 2003).

Para confirmação diagnóstica, pesquisa-se variante patogênica em *DARS2*, que codifica a aspartil-tRNA sintetase, enzima que liga o aspartato ao RNAt mitocondrial, o que é necessário para a correta tradução do RNAm mitocondrial. A doença é autossômica recessiva e curiosamente a maioria dos pacientes são

heterozigotos compostos para *DARS2*, sendo que uma variante patogênica é quase sempre no sítio de processamento do intron 2, o leva a formação de RNAm anômalo que é incapaz de produzir proteína funcional (van Berge et al, 2014).

Já a encefalopatia mitocondrial neurogastrointestinal (MNGIE), também autossômica recessiva, caracteriza-se por neuropatia periférica, ptose, oftalmoparesia, perda auditiva, caquexia, leucoencefalopatia e dismotilidade gastrointestinal grave (Hirano, 2016). A leucoencefalopatia em geral é difusa, assintomática e pode por vezes poupar o corpo caloso. São raros os casos de MNGIE sem leucoencefalopatia. O diagnóstico é confirmado pela demonstração de variantes deletérias em *TYMP*.

3.3.6 Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides (OMIM #221820)

A leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides (“hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids” – HDLS) é uma doença autossômica dominante, inicialmente definida a partir dos seus achados neuropatológicos como duas entidades distintas: leucodistrofia ortocromática pigmentada familiar (“Familial Pigmented Orthochromatic Leukodystrophy” – POLD) e leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides axonais (“Hereditary Diffuse Leukoencephalopathy with axonal spheroids” – HDLS). Antes mesmo da definição de sua base genética em 2012 por Rademakers et al., em 2009 Wider et al. já tinham assinalado as semelhanças entre as duas condições. Na ocasião, propuseram o nome atual da doença. Tais semelhanças foram ratificadas por Nicholson et al. em 2013 quando demonstraram a base genética comum de pacientes inicialmente descritos como portadores de POLD e HDLS.

Os aspectos neuropatológicos únicos desta doença são: perda axonal na substância branca cerebral, com esferóides axonais (edema) e presença variável de micróglia pigmentada. Tais alterações decorrem da mutação em heterozigose em *CSF1R*, que codifica o receptor do fator-1 estimulador de colônia (*colony stimulating factor-1 receptor*), que é muito expresso em células da linhagem mielóide, incluindo a micróglia. Este receptor regula a proliferação, diferenciação e sobrevivência da micróglia (Lynch et al., 2015).

Não há dados robustos sobre incidência e prevalência de HDLS, mas estima-se que seja mais frequente do que se imagina (Sundal e Wszolek, 2014). Em uma população de 114 pacientes com leucodistrofia de início na idade adulta, Guerreiro et al. (2013) encontraram 12 pacientes (11%) com variante patogênica em *CSF1R*. Em uma coorte de 48 pacientes, Lynch et al. (2015) encontraram 5 pacientes (10%). Já Karle et al. (2013), em uma população semelhante de 25 pacientes, confirmou este diagnóstico em 6 (24%).

Clinicamente predominam os sintomas cognitivo-comportamentais, com predomínio de disfunção executiva e alterações de personalidade (desinibição, perda de autocritica, perseveração), que costumam ser precoces (Sundal e Wszolek, 2014). Assim, HDLS é um importante diagnóstico diferencial da variante comportamental da degeneração lobar fronto-temporal (DFT). Inicia-se em geral na 5ª década, mas pode variar de 20 a 60 anos (Guerreiro et al., 2013).

Sintomas adicionais incluem: espasticidade (especialmente em membros inferiores), crises epiléticas, distonia, parkinsonismo, ataxia, cefaleia, síndrome pseudobulbar e defeitos de campos visuais. O curso é progressivo, podendo variar de 2 a 30 anos, com sobrevida média de 8 anos (Sundal e Wszolek, 2014).

Do ponto de vista neurorradiológico, os achados mais comuns são alterações de sinal da substância branca em lobos frontais ou frontoparietais, corpo caloso e tratos corticoespinhais. Tais lesões são inicialmente focais, assimétricas, podendo ser puntiformes, e tendem a se tornar confluentes (Sundal et al., 2012). Pode haver atrofia cortical e de corpo caloso. Notadamente não há lesão de substância cinzenta. Não há atrofia de tronco encefálico e o acometimento cerebelar é mínimo.

As alterações da RM de crânio podem anteceder os primeiros sinais clínicos em pelo menos 5 anos (Konno et al., 2014). Outro achado significativo é a presença de pequenas calcificações, predominantemente em lobos frontais, próximas aos cornos anteriores dos ventrículos laterais (Konno et al., 2014).

O diagnóstico historicamente era feito por biópsia de SNC, mas isto não mais se justifica desde a identificação do *CSF1R* como responsável pela doença. A maioria das variantes patogênicas descritas até o momento (mutações de ponto com trocas simples de aminoácidos, perda de sentido, mudança da matriz de leitura, em sítios de reformatação e também deleções) se localizam no domínio tirosina-quinase

da proteína, codificado pelos exons 12-22. Esta é a porção intracelular que ativa uma série de vias que atuam na regulação da micróglia. No entanto, outras variantes patogênicas já foram identificadas em outros domínios (Miura et al., 2018). Todas as variantes patogênicas levam a formação de proteínas truncadas e à haploinsuficiência de *CSF1R*, ocasionando a doença (Stabile et al., 2016).

É interessante notar que a HDLS e a doença de Nasu-Hakola são leucoencefalopatias relacionadas à micróglia e que o papel desta na manutenção do SNC e em doenças mais comuns vem sendo desvendado (Lynch et al., 2015). O *TREM2*, outro receptor de superfície da micróglia, quando mutado em homozigose leva à doença de Nasu-Hakola, mas em heterozigose, é um fator de risco para doença de Alzheimer.

3.3.7 Doença de Alexander (OMIM #203450)

A doença de Alexander é uma leucodistrofia autossômica dominante caracterizada pelo achado anatomopatológico de fibras de Rosenthal, que são corpos de inclusão intracelulares encontrados em astrócitos compostos de agregados da proteína filamentar intermediária GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), entre outras proteínas (Srivastava e Naidu, 2015).

Sua prevalência é desconhecida e, desde a sua descrição original em 1949 por Alexander, mais de 550 casos já foram registrados (Srivastava e Naidu, 2015).

Clinicamente, existem duas classificações mais usadas para a descrição da doença de Alexander. A primeira, proposta por Russo et al. em 1976, que antecede a descoberta da relação de *GFAP* com a doença (Brenner et al., 2001), classifica por idade de início dos sintomas em 3 subtipos: infantil (até 2 anos), juvenil (2 a 14 anos) e adulta (acima de 14 anos).

A segunda classificação, elaborada a partir da análise de 215 casos confirmados geneticamente, ratifica a relação da idade de início com as manifestações clínicas, mas divide a doença em dois subtipos clínicos que não dependem exclusivamente da idade de início: tipo I e tipo II (Prust et al., 2011). Esta é a classificação mais utilizada atualmente e por isso vamos detalhá-la um pouco mais.

A doença de Alexander tipo I se caracteriza por encefalopatia, macrocefalia, crises epiléticas, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, início precoce (em geral antes dos 4 anos), pioras paroxísticas e alterações típicas na RM de crânio. Já o tipo II pode se manifestar em qualquer idade, mas tende a ser de início mais tardio e se caracteriza por manifestações bulbares, espasticidade, ataxia, anormalidades da movimentação ocular, disfunção autonômica e tremor palatal (este nem sempre presente). Os achados de RM de crânio foram chamados por Prust de atípicos, quando comparados com a forma mais frequente da infância, pois há atrofia e alteração de sinal em bulbo e medula espinhal, e a alteração de sinal da substância branca supratentorial é inconstante.

Vale ressaltar que há considerável variabilidade fenotípica, especialmente no tipo II, com os casos de início na adolescência apresentando características intermediárias entre as observadas no tipo I e o padrão mais consistentemente visto em adultos. Assim, estes pacientes podem apresentar déficit cognitivo, crises epiléticas e macrocefalia em combinações diversas com ataxia, espasticidade, disfagia e disartria (Balbi et al., 2010).

As manifestações mais características em adultos são as relacionadas ao acometimento de tronco encefálico baixo: disartria, disfonia, paralisia de corda vocal, rinolalia e disfagia. Estima-se a ocorrência de tremor palatal (também chamado de mioclonia palatal) em cerca de 41% dos pacientes (Pareyson et al., 2008). A busca ativa por este sinal clínico raro é de grande valor diagnóstico, pois sua lista de diagnósticos diferenciais é muito restrita – lesões focais do triângulo de Mollaret, doença de Alexander do adulto, síndrome PAPT (“progressive ataxia and palatal tremor”) e idiopático. Curiosamente, apenas os pacientes com tremor palatal idiopático costumam se queixar de cliques audíveis.

Ainda relacionado ao tronco encefálico, distúrbios do sono como apnéia e transtorno comportamental do sono REM já foram descritos. Síndrome piramidal, por vezes assimétrica, causando paraparesia ou tetraparesia é muito frequente e por vezes a única manifestação, ocorrendo sem os sinais bulbares. A ataxia cerebelar é também bastante frequente, axial e apendicular. Crises epiléticas e declínio cognitivo são incomuns em adultos (Pareyson et al., 2008).

Existem relatos de casos de adultos assintomáticos, apesar de a doença ser considerada autossômica dominante com penetrância completa. Discute-se na literatura se estes indivíduos permaneceriam realmente assintomáticos ou apenas pré-sintomáticos (Shiihara et al., 2004).

Do ponto de vista neurorradiológico, as diferenças entre os achados de RM de crânio de crianças e adultos é marcante, com os pacientes de início na adolescência novamente apresentando achados intermediários. Farina et al. (2008) descreveu o padrão neurorradiológico típico observado em adultos, sendo a atrofia de bulbo e medula espinhal cervical, com hipersinal em T2, os achados mais sugestivos. É comum o envolvimento de hilo dos núcleos denteados e, em pacientes abaixo dos 40 anos, o acometimento da substância branca periventricular, com algumas áreas de impregnação pelo contraste. Um sinal bastante peculiar é o “sinal do girino”, descrito por Namekawa et al. (2002), em que a marcada atrofia de bulbo e medula com a base da ponte preservada, formam uma imagem que se assemelha, nas aquisições sagitais, a um girino. Quanto mais tarde o início da doença, mais os achados de imagem tendem a se concentrar na fossa posterior.

A forma juvenil da doença, além do acometimento de bulbo e medula espinhal, também tem um padrão de imagem diferente, com características marcantes: lesões nodulares em tronco encefálico (por vezes simulando tumores) e a presença do “sinal da guirlanda”, múltiplas pequenas protrusões na parede dos ventrículos laterais, por vezes com captação de contraste (van der Knaap et al., 2006). Tal achado se deve ao depósito de fibras de Rosenthal nos espaços perivasculares e subependimários.

O diagnóstico historicamente era feito por biópsia ou *post mortem* pela demonstração de fibras de Rosenthal, mas atualmente é feito pela presença de variante patogênica em heterozigose em *GFAP*. É doença com padrão de herança autossômico dominante, sendo em muitos casos decorrente de evento mutacional *de novo*. Há considerável variabilidade fenotípica, mesmo entre membros de uma mesma família, o que leva a considerar a presença de outros genes modificadores da expressão de *GFAP* (van der Knaap et al., 2005d). A quase totalidade das variantes patogênicas descritas até hoje são do tipo troca simples de aminoácido (“missense”).

O tratamento é de suporte.

3.3.8 Leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto (OMIM #169500)

A leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto (“adult-onset autosomal dominant demyelinating leukodystrophy” – ADLD) ou mais recentemente chamada de leucodistrofia autossômica dominante do adulto *LMNB1*-relacionada (Finnsson et al., 2015) é uma doença causada pelo acúmulo da proteína lamina B1, pertencente à família das proteínas filamentosas intermediárias (como a GFAP, implicada na doença de Alexander) e parte do envelope nuclear. Tal acúmulo protéico leva a desmielinização por disfunção de astrocitos com preservação da oligodendróglia (Padiath et al., 2006).

A prevalência da ADLD é desconhecida, mas há relatos de casos provenientes de diversos grupos étnicos (Nahhas et al., 2016).

Clinicamente, caracteriza-se por início entre a quarta e a sexta décadas de vida, com disautonomia precoce, antecedendo ou iniciando conjuntamente com alteração da marcha e incoordenação (Finnsson et al., 2015). Curiosamente, um dos poucos casos descritos na literatura em que os sintomas motores antecederam os autonômicos foi de um paciente brasileiro (Giorgio et al., 2013). Ainda assim, disautonomia (com disfunção vesical, constipação, hipotensão ortostática e disfunção erétil) é uma das manifestações mais constantes desta doença.

É lentamente progressiva, com sobrevida média de 18 anos, e geralmente segue uma ordem de surgimento dos sintomas: disautonomia seguida de paraparesia espástica que evolui para tetraparesia e finalmente paralisia pseudobulbar (Finnsson et al., 2015).

Sinais cerebelares tipicamente surgem ao mesmo tempo que os sinais piramidais. Assim, ADLD deve ser incluída no diagnóstico diferencial das síndromes atáxico-espásticas. Ataxia de marcha, dismetria, disdiadococinesia, tremor de intenção e seguimento sacádico são os achados mais comuns, sendo nistagmo encontrado em menor proporção de pacientes (Finnsson et al., 2015). Declínio cognitivo e manifestações psiquiátricas surgem mais tardiamente. Pode haver ainda perda de propriocepção e palestesia, principalmente em membros inferiores, por

lesão medular. Neuropatia periférica ainda não foi descrita nesta condição (Nahhas et al., 2016).

As alterações neurorradiológicas podem anteceder o início dos sintomas em até 16 anos e por vezes se observa significativa dissociação clínico-radiológica, com alterações extensas na RM de crânio e relativamente poucas manifestações clínicas (Melberg et al., 2006). As alterações mais precoces parecem ser hipersinal em T2/FLAIR da substância branca abaixo do córtex motor se estendendo para perna posterior da cápsula interna e, posteriormente, para todo o trato corticoespinal até o bulbo.

Subsequentemente há envolvimento de corpo caloso e pedúnculos cerebelares e finalmente da substância branca frontoparietal, com relativa preservação da substância branca periventricular (Melberg et al., 2006). Não há impregnação por contraste ou restrição à difusão das moléculas de água (Padiath et al., 2006). O acometimento de medula espinal é também marcante e precoce em pacientes com ADLD. Há atrofia de toda a extensão da medula espinal e leve alteração de sinal. Acredita-se que, pelo menos em parte, os sintomas disautônômicos se devem a este envolvimento medular (Sundblom et al., 2009).

O diagnóstico é confirmado pela demonstração de duplicação de *LMNB1* (Padiath et al., 2006) ou, mais raramente, sua deleção desde que envolva a região promotora (Giorgio et al., 2015). A duplicação deste gene leva a super-expressão da proteína lamina B1. Curiosamente, são descritos autoanticorpos contra a lamina B em pacientes com doenças autoimunes, inclusive esclerose múltipla (Padiath et al., 2006). Assim, não causa surpresa o fato de ADLD e esclerose múltipla terem várias características em comum e a ADLD ser frequentemente diagnosticada como esclerose múltipla primariamente progressiva.

O tratamento é de suporte.

3.3.9 Síndrome de Sjögren-Larsson (OMIM #270200)

A síndrome de Sjögren-Larsson é um erro inato do metabolismo lipídico decorrente do acúmulo de aldeídos e álcoois graxos por deficiência da enzima microsomal “fatty aldehyde dehydrogenase – FALDH” (Rizzo et al., 1988). Esta

enzima catalisa a oxidação de vários aldeídos graxos de cadeia longa e média em ácidos graxos (Fuijkschot et al., 2012). O acúmulo destes afeta a formação normal multilamelar de membranas na camada córnea da pele e da bainha de mielina (van Domburg et al., 1999).

Descrita originalmente na Suécia, onde se estima uma prevalência de 0,4 para 100.000 habitantes (Cho et al., 2018), não há dados epidemiológicos de outros locais. Ainda assim, tem sido descrita em diversas localidades, inclusive no Brasil (Dutra et al., 2009).

Clinicamente, a apresentação clássica de início na infância consiste na tríade deficiência intelectual, diplegia espástica e ictiose congênita (Sjögren e Larsson, 1957). No entanto, há considerável variabilidade fenotípica e a evolução para neurodegeneração tende a não ocorrer, com muitos pacientes chegando à idade adulta (por vezes sem diagnóstico).

Na série de 11 pacientes de van Domburg et al. (1999), todos os pacientes eram nascidos pré-termo, mas esta não é uma constante. As alterações cutâneas já eram notadas logo ao nascimento, com eritema. Gradualmente ao longo do primeiro ano de vida a pele foi se espessando e se tornando escamosa, por vezes atingindo as regiões palmar e plantar. Por fim, hiperkeratose amarelo-acastanhada se desenvolveu, com predomínio nas regiões de dobras, pescoço e periumbilical. A região central da face foi poupada. Os cabelos são normais ou finos (van Domburg et al., 1999). Uma característica marcante da ictiose em pacientes com SSL é a presença de prurido, que não é comum em outros distúrbios ictióticos. Alguns pacientes podem apresentar intolerância ao calor por hipo-hidrose e outros podem apresentar ictiose mais leve, por vezes somente com xerodermia (Fuijkschot et al., 2012).

As manifestações neurológicas em geral não estão presentes ao nascimento, mas surgem ao longo dos primeiros 30 meses de vida, tendem a ser não-progressivas e sem correlação de gravidade com a idade de início (Lossos et al., 2006). A característica mais marcante é a espasticidade, com para ou tetraparesia espástica (Fuijkschot et al., 2012). A maioria dos pacientes se tornam cadeirantes até a adolescência, mas não parece haver progressão além deste período (Verhoog et al., 2008). Observa-se ainda disartria (pseudobulbar) leve a moderada, distúrbios de linguagem e deficiência intelectual moderada (Fuijkschot et al., 2012).

Alterações oftalmológicas também são frequentes, com perda visual (em geral simétrica e moderada) e fotofobia. Tal perda visual se deve a maculopatia de início precoce por inclusões cristalinas ou “pontos cintilantes” perifoveais (Jack et al., 2015). Assim como os achados neurológicos, as alterações oftalmológicas tendem a se estabilizar no fim da infância/início da adolescência. A tomografia de coerência óptica (“optical coherence tomography” – OCT) pode mostrar cristais maculares e pseudocistos, além de atrofia de retina (Fuijkschot et al., 2012).

Do ponto de vista neurorradiológico, há certo atraso da mielinização e, a partir de 2 a 3 anos, observa-se alteração difusa da substância branca. Eventualmente pode haver mielinização incompleta permanente (Willemsen et al., 2004). Tal padrão tende a ser manter estável após os 3 anos de idade. A intensidade das alterações de sinal da substância branca é variável e não há correlação entre a gravidade das lesões na RM de crânio, idade de início e gravidade dos sintomas clínicos (Willemsen et al., 2004). A espectroscopia pode ser valiosa para o diagnóstico ao demonstrar pico lipídico a 1.3ppm em áreas de substância branca não afetada (Fuijkschot et al., 2012).

O diagnóstico é confirmado pela demonstração variantes patogênicas bialélicas em *ALDH3A2*, ou determinação da atividade de FALDH no sangue (Fuijkschot et al., 2012). As variantes patogênicas descritas são tanto do tipo troca simples de aminoácido (“missense”) como variantes que levam a interrupção prematura da tradução proteica.

O tratamento é sintomático.

3.3.10 Doenças Hipomielinizantes

O achado de hipomielinização em RM de crânio em adultos pode reduzir sobremaneira o número de hipóteses diagnósticas. Os principais genes relacionados a LD/LG hipomielinizantes são: *PLP1*, *GJC2*, *TUBB4A*, *POLR3A*, *POLR3B*, *CLCN2* e *NKX6-2*.

As doenças relacionadas a *PLP1* são as principais representantes deste grupo. De herança ligada ao cromossomo X, possuem um amplo espectro de fenótipos que engloba a doença de Pelizaeus-Merzbacher (PMD – OMIM #312080) e a paraplegia

espástica hereditária tipo 2 (SPG2 – OMIM #312920) (Hobson e Kamholz, 2013). *PLP1* codifica duas proteínas importantes da bainha de mielina do SNC: a proteína proteolipídica da mielina (PLP, que é o componente mais abundante da mielina do SNC) e sua isoforma DM20. Há acúmulo somente de PLP ou das duas isoformas da proteína no retículo endoplasmático dos oligodendrócitos, que pode levar à apoptose (Southwood et al., 2002).

Há poucos dados epidemiológicos disponíveis e somente para PMD. Nos EUA, por exemplo, é de 1:200.000 a 1:500.000 (Hobson e Kamholz, 2013). Já na Alemanha, fica em 0,13:100.000 nascidos-vivos (Heim et al., 1997) e na República Tcheca 1:90.000 (Seeman et al., 2003). São bastante raras as descrições de pacientes com PMD de início na vida adulta (Suzuki et al., 2011).

Clinicamente, há grande variabilidade fenotípica, com casos graves de início neonatal a formas do adulto como SPG não-complicada. Parece haver correlação direta entre a gravidade da doença e quantidade de proteínas PLP/DM20 expressas, bem como com a morte de oligodendrócitos (Cailloux et al., 2000). O quadro clássico de PMD se inicia antes dos 5 anos de idade, em geral por volta de 2,5 anos, com nistagmo, hipotonia, ataxia e tremor cefálico. A hipotonia dá lugar à espasticidade nos 4 membros e é pior em membros inferiores. Há evolução com declínio cognitivo em muitos casos e pode haver epilepsia ou movimentos anormais como distonia (Golomb et al., 2004). Mulheres heterozigotas podem também apresentar sintomas, em geral mais leves (Hurst et al., 2006).

Os pacientes classificados como SPG2 podem se apresentar com paraparesia espástica progressiva, sem outros sintomas e sinais associados ou como SPG2 complicada, com ataxia, nistagmo, disautonomia, declínio cognitivo, atrofia óptica, neuropatia periférica e leucoencefalopatia (Hobson e Komholz, 2013). Assim, muitas vezes pode ser difícil distinguir uma forma leve de PMD de uma forma complicada de SPG2. Adultos tendem a se apresentar com o fenótipo SPG2 “pura” ou complicada, sendo muito raros os casos de início após os 30 anos [Suzuki et al. (2011) e Rubegni et al. (2017)].

Do ponto de vista neurorradiológico, as formas de início na infância se caracterizam por hipomielinização difusa em diferentes graus, com afilamento de corpo caloso (Nezu et al., 1998). Em pacientes adultos, leucoencefalopatia

periventricular e difusa com afilamento de corpo caloso também é encontrada (Suzuki et al., 2011). Um padrão de lesões salpicadas e confluentes também é descrito (Rubegni et al., 2017).

O diagnóstico é confirmado pela demonstração de variante patogênica em *PLP1*. As mais comumente encontradas são duplicações (Mimault et al., 1999), mas inserções, deleções, rearranjos cromossômicos e mutações de ponto também são descritas (Cailloux et al., 2000). Não há correlação entre o tamanho da duplicação e o fenótipo (Regis et al., 2008), mas mutações do tipo troca simples de aminoácido (“missense”) em regiões altamente conservadas têm correlação com a gravidade do fenótipo (Cailloux et al., 2000).

O tratamento é sintomático.

Já a doença de Pelizaeus-Merzbacher-*like* é relacionada a variantes patogênicas em *GJC2*, com herança autossômica recessiva (Uhlenberg B et al, 2004). O fenótipo é muito semelhante ao dos distúrbios relacionados a *PLP1*, com a maioria dos pacientes com doença de início precoce. Há alguns relatos de casos de início tardio, com evolução lenta, manifestando-se principalmente por paraparesia espástica e ataxia cerebelar (Orthmann-Murphy JL et al, 2009).

Uma causa muito rara de leucoencefalopatia hipomielinizante de início no adulto são as variantes patogênicas em *CLCN2*. O padrão de herança é autossômico recessivo e os pacientes tipicamente se apresentam com ataxia cerebelar leve. A RM de crânio mostra acometimento de perna posterior de ambas as cápsulas internas, núcleos denteados, pedúnculos cerebrais e pedúnculos cerebelares médios. Pode haver restrição à difusão nestas áreas e acometimento mais amplo de substância branca cerebral e cerebelar com padrão de hipomielinização (Depienne et al, 2013).

Os demais genes relacionados à hipomielinização (*TUBB4A*, *POLR3A*, *POLR3B* e *NKX6-2*) até o momento não foram associados a casos de início no adulto.

3.3.11 Miscelânea

Há pelo menos 60 genes relacionados a LD/LG (Parikh et al., 2015) e é muito provável que esta lista continue a crescer dada a maior disponibilidade das técnicas

de NGS. Pela relevância para este trabalho, destacamos mais duas condições, ambas autossômicas recessivas: doença relacionada a *RNF216* (OMIM #212840) e deficiência intelectual relacionada a *PUS3* (OMIM #617051).

O *RNF216* foi vinculado à síndrome de Gordon-Holmes por Margolin et al., 2013. Clinicamente os pacientes se caracterizavam por ataxia cerebelar, demência e hipogonadismo hipogonadotrófico. A RM de crânio mostrava hipersinal multifocal de substância branca no T2/FLAIR que antecedia os sintomas e sinais clínicos. Posteriormente os pacientes evoluíram com atrofia cortical e cerebelar.

Em 2015, Santens et al. descreveram mais duas famílias belgas com variante patogênica bialélica em *RNF216*. Clinicamente, havia predomínio do quadro demencial e, além de ataxia e hipogonadismo, os pacientes apresentavam coreia generalizada. A RM de crânio mostrava hipersinal difuso da substância branca no T2/FLAIR, supra e infratentorial, com atrofia cortical, cerebelar e putaminal bilateral.

Em 2016, Shaheen et al. identificaram variante patogênica em homozigose em *PUS3* que segregava com um fenótipo de deficiência intelectual em uma família saudita. Clinicamente, os pacientes apresentavam deficiência intelectual grave, microcefalia, fácies sindrômica, estrabismo, esclera acinzentada, manchas mongólicas e crises convulsivas de fácil controle. Do ponto de vista neurorradiológico, havia ventriculomegalia, cistos aracnoides, disgenesia de corpo caloso, alteração de sinal de globos pálidos e núcleos denteados e alterações multifocais simétricas da substância branca subcortical, especialmente frontal.

4 Métodos

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo clínico retrospectivo e parcialmente prospectivo.

Os dados retrospectivos foram originários de pacientes já diagnosticados e que se encontravam em seguimento na Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas. O caráter prospectivo do estudo permitiu avaliar os pacientes com diagnóstico recente além daqueles já em seguimento que não tiveram completado a investigação, com padrão neurorradiológico de leucoencefalopatia, segundo a metodologia proposta pelo estudo.

Os pacientes foram identificados a partir de uma base de dados do Ambulatório de Neurogenética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) na qual constam todos os pacientes que já foram atendidos no ambulatório desde a sua criação em 2008.

4.2 Local

Ambulatório de Neurogenética da Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.3 Amostra

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes que preenchiam os seguintes critérios *a* ou *b* associados aos critérios *c* e *d*, ou ao critério *e*.

- a- Pacientes com idade igual ou superior a 16 anos no momento da avaliação, independente da idade de início dos sintomas;
- b- Familiares sintomáticos com idade inferior a 16 anos e suspeita de terem a mesma doença do probando;

- c- Pacientes com alterações na substância branca do sistema nervoso central na ressonância magnética;
- d- Pacientes com suspeita de etiologia genética feita a partir das manifestações clínicas ou história familiar ou padrão de neuroimagem.
- e- Pacientes com idade igual ou superior a 16 anos, com adrenomieloneuropatia ligada ao X, independentemente de haver alteração ou não na RM de crânio.

Consideramos manifestações clínicas suspeitas de etiologia genética o acometimento de tratos longos associado ou não alterações cognitivo-comportamentais.

As histórias familiares consideradas sugestivas de etiologia genética foram: presença de consanguinidade explícita; suspeita de consanguinidade oculta (pais e avós provenientes de cidades pequenas, com populações inferiores a 50.000 habitantes); presença de mais de um familiar acometido na mesma geração ou em geração distinta.

Já os padrões de neuroimagem considerados suspeitos de etiologia genética foram: acometimento difuso e simétrico da substância branca do SNC; acometimento trato-específico; acometimento heterogêneo, porém confluyente.

4.3.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com contra-indicação absoluta à realização de ressonância magnética de encéfalo;
- Pacientes ou responsáveis que se negaram à realização de ressonância magnética ou que não quiseram participar do estudo;
- Pacientes que receberam diagnóstico final alternativo, de origem não genética.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Avaliação clínica

A avaliação clínica consistiu de anamnese, exame físico geral e exame neurológico.

Na anamnese foram valorizados dados como: a idade de início da doença, os sintomas apresentados, a progressão, a presença ou ausência de história familiar e consanguinidade. Em relação ao exame físico geral foram avaliadas alterações nos sistemas cardiovascular, respiratório, digestivo, osteoarticular e dermatológico, além de distúrbios.

O exame neurológico incluiu avaliação de: funções cognitivas (miniexame do estado mental, expansão de dígitos, bateria breve, fluência verbal fonêmica e semântica e desenho do relógio), equilíbrio, marcha, coordenação, tônus, força, reflexos superficiais e profundos, sensibilidade superficial e profunda e exame de nervos cranianos.

As alterações foram caracterizadas pela presença de síndromes como: distúrbio, cognitiva, epilética, hipotônica, piramidal, cerebelar, medular, de unidade motora e/ou de nervos cranianos e presença ou ausência movimentos anormais.

4.4.2 Avaliação laboratorial

Os exames laboratoriais foram definidos a partir da avaliação clínica e de neuroimagem, levando em conta as necessidades de cada paciente.

Uma avaliação laboratorial mínima com os seguintes exames foi realizada para todos os pacientes: hemograma, uréia, creatinina, sódio, potássio, cálcio iônico, glicemia de jejum, perfil hepático, perfil tireoidiano, vitamina B12, ácido fólico, homocisteína, CPK, perfil lipídico, VDRL, FTA-ABs e *ELISA* anti-HIV.

A seguir, três etapas de avaliação laboratorial foram propostas. Na primeira etapa, foram realizados testes bioquímicos ou avaliação molecular de genes

específicos conforme a suspeita diagnóstica feita a partir da avaliação clínica e de neuroimagem.

Assim, nos pacientes com suspeita de ALD/AMN-X, foi realizada dosagem no plasma de ácidos graxos de cadeia muito longa no laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clinicas da UFRGS, em Porto Alegre.

Os pacientes com suspeita de acidúria L2-hidroxiglutarica foram submetidos à pesquisa de ácidos orgânicos na urina – realizada no laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clinicas da UFRGS, em Porto Alegre.

Foram realizados estudos genético-moleculares utilizando DNA genômico extraído de sangue periférico conforme os critérios abaixo (definidos a partir da disponibilidade dos exames à época da realização do estudo):

- Suspeita clínica de ADLD: pesquisa da duplicação de *LMNB1* por *array-CGH*, utilizando a *Human Genome CGH Microarray 60K*, produzida pela Agilent Technologies, contendo cerca de 60.000 oligonucleotídeos distribuídos pelo genoma humano. Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (CEGH – Profa. Carla Rosemberg).
- Suspeita clínica de doença de Alexander: pesquisa de variante patogênica em *GFAP* por sequenciamento Sanger (realizado no CEGH, aos cuidados do aluno de pós-doutorado Dr. Uirá Souto Melo).
- Suspeita clínica de síndrome de Sjögren-Larsson: pesquisa de variante patogênica em *ADLH3A2* por sequenciamento Sanger (realizado no CEGH, aos cuidados do aluno de pós-doutorado Dr. Uirá Souto Melo).

Na segunda etapa, os demais pacientes e aqueles que foram submetidos a uma das pesquisas anteriores e tiveram seu resultado negativo, foram submetidos a análise por sequenciamento de nova geração no *Department of Molecular Neuroscience*, pelo Dr. David S. Lynch, MD, sob coordenação do Prof. Henry Houlden, MD, PhD, da *University College London*. Inicialmente foram submetidos ao chamado exoma clínico (“focused exome sequencing”), utilizando o “Agilent Sure Select Focused Exome (Agilent)”, de acordo com o protocolo do fabricante. A lista de genes analisados por esta técnica totaliza 6110 genes previamente implicados em doenças

humanas ou potencialmente implicadas. As bases de dados HGMD, OMIM e ClinVar foram utilizadas para priorizar as variantes patogênicas.

Por fim, na terceira etapa, os pacientes submetidos ao sequenciamento do exoma clínico que não tiveram variantes patogênicas identificadas, foram submetidos ao sequenciamento completo do exoma, usando a plataforma HiSeq (Illumina).

Os pacientes com suspeita de acidúria L2-hidroxi glutárica, após a identificação da elevação de ácidos orgânicos na urina, foram submetidos a avaliação molecular por sequenciamento do exoma clínico para confirmação diagnóstica.

A avaliação de cariótipo, quando necessária, foi realizada pela Profa Angela Morgante, do CEGH.

Quadro 7 - Avaliação laboratorial em três etapas

Etapas	Pacientes...	Exames bioquímicos ou genéticos
1ª etapa	ALD/AMN-X?	AGCML (plasma)
	L2HGA?	Ácidos orgânicos (urina)
	ADLD?	Teste para <i>LMNB1</i>
	Doença de Alexander?	Teste para <i>GFAP</i>
	Síndrome de Sjögren-Larsson?	Teste para <i>ADLH3A2</i>
2ª etapa	Casos complexos ou sem hipótese diagnóstica ou não diagnosticados na 1ª etapa	Sequenciamento do exoma clínico
3ª etapa	Sem diagnóstico nas etapas 1 e 2	Sequenciamento completo do exoma

4.4.3 Avaliação neurofisiológica

Eletroencefalograma (EEG) e eletroneuromiografia (ENMG) foram realizados conforme julgamento clínico.

O EEG foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) em equipamento digital Nihon Kohden, modelo 1200, de 32 canais. Os eletrodos foram colocados de acordo com o sistema internacional 10-20 para a colocação dos eletrodos; com os seguintes parâmetros de aquisição: filtro de alta frequência de 70 Hz, constante de tempo de 0,3 segundos,

tempo de registro de 30 a 60 minutos incluindo registro de vigília e sono espontâneo (sempre que possível), provas de ativações como abertura e fechamento ocular, fotoestimulação intermitente e, naqueles que colaboraram, hiperpneia.

O registro foi acoplado ao vídeo digital para análise de eventuais alterações comportamentais.

Duas eletrencefalografistas experientes (Dra Eliana Garzon e Dra Joaquina Andrade) analisaram de forma independente e cega os traçados. Os registros foram classificados como normais ou anormais.

As anormalidades foram classificadas como decorrentes dos ritmos de base (carência de ritmos ou elementos fisiológicos, sincronia, excesso de ondas lentas), anormalidades não epileptiformes (presenças de ondas lentas contínuas ou em surtos) ou anormalidades epileptiformes (presença de paroxismos epileptiformes). Quanto à localização as anormalidades foram classificadas como regionais, hemisféricas, generalizadas ou multifocais.

Os exames de ENMG foram realizados pelo Dr Mário Wilson Brotto no HCFMUSP ou pela Dra Simone Amorim, colaboradora do grupo de Neurogenética do HCFMUSP. Foi utilizado equipamento da marca VIASYS – Nicolet, Madison, Winscosin, EUA, modelo Viking Quest, versão 7.5, com amplificador de 2 canais, portátil. Foram realizados estudos de conduções nervosas motoras (velocidades de condução, tempos de latência proximal e distal, amplitudes dos potenciais evocados motores e ondas F) e sensitivas (velocidades de condução, amplitudes dos potenciais evocados sensitivos e reflexo H no nervo tibial posterior), e eletromiografia (músculos paravertebrais e proximais e distais dos membros superiores e inferiores de pelo menos um dimídio, em repouso e na contração voluntária).

Os valores de normalidade para a neurocondução sensitiva e motora em adultos foram padronizados de acordo com os dados apresentados por Preston e Shapiro (2013). O protocolo mínimo incluiu a avaliação dos nervos mediano, ulnar, tibial e sural. Sempre possível, foram avaliados também os nervos axilar, radial, femoral e fibular. Os valores de normalidade para onda F e reflexo H são proporcionais à altura do paciente e para o seu cálculo foram utilizadas as fórmulas padronizadas por Oh (2003).

4.4.4 Avaliação por ressonância magnética

Foram realizados exames de ressonância magnética de crânio em aparelho de 1,5 Tesla (GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin, EUA) ou 3 Teslas (Philips Medical Systems, Best, Holanda)) no Instituto de Radiologia (InRad) do HCFMUSP com a realização das seguintes seqüências:

- Imagens volumétricas FLAIR VISTA no plano sagital com “field of view” (FOV)=25cm, espessura = 0,6mm / intervalo =0,0mm, com matriz de 208x208, e com TE/TR=mínimo/6000ms e TI=1975ms.
- Imagem volumétrica FSPGR ponderada em T1, com FOV=26cm, espessura = 1,6mm, e matriz de 320 x 192, com TE/TR=mínimo/450-650ms e TI=40ms.
- Imagem axial TSE ponderada em T1 com pulso de transferência de magnetização (TM), FOV=23cm, espessura=4,5mm / intervalo=0,5mm, matriz de 256x122, e com TE/TR=10/800ms.
- Imagem coronal TSE ponderada em T2 com saturação de gordura SPAIR, FOV=20cm / espessura=4,5mm, intervalo=0,5mm, com matriz de 400x321, e com TE/TR=80/321ms.
- Tensor de difusão: imagens axiais ponderadas em difusão com fator $b=800 \text{ s/mm}^2$, com 15 direções de gradiente, com FOV=22,4cm, espessura=2,0mm, com intervalo=0,0mm, matriz de 112x112, e com TE/TR=65/6106ms.
- Espectroscopia de prótons de voxel único (“single voxel”) com a técnica PRESS, TE= 30 e TE= 135 ms, espessura=10mm.

Foram avaliados também estudos de ressonância magnética realizados em outros serviços em aparelhos de pelo menos 1,5 Tesla e que constassem de pelo menos as seguintes sequencias: axial T1 pré e pós infusão de gadolínio, axial T2, axial FLAIR, difusão e T2* / SWI.

Para fins de descrição de resultados, nos pacientes que possuíam mais de um estudo de ressonância magnética, consideramos apenas aquele que mais contribuiu para o diagnóstico (escolhido arbitrariamente pelos pesquisadores).

Todas as imagens foram avaliadas em conjunto por um neurorradiologista com experiência na avaliação de casos de LD/LG (Prof. Dr. Leandro Tavares Lucato), pelo Prof. Dr. Fernando Kok e pelo autor desta tese.

4.4.5 Avaliação anatomopatológica de biópsia muscular

Pacientes com suspeita de acometimento muscular foram submetidos a biópsia, quando se julgou necessário. Tais biópsias foram realizadas pela Prof. Dra. Juliana Gurgel-Giannetti, que obteve material do músculo bíceps braquial, posteriormente seccionado com criostato em preparados de 8 mm de espessura.

As seguintes avaliações histoquímicas convencionais foram realizadas: hematoxilina e eosina, tricromo de Gomori modificado, técnica “periodic acid-Schiff”, “oil red O”, nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase-tetrazolium redutase (NADH-TR), succinato desidrogenase (SDH), citocromo *c* oxidase (COX) e adenosina trifosfatase (ATPase) pré-incubadas em pH 9,4, 4,63 e 4,35. Coloração pelo azul da Prússia de Perls foi feita pela equipe do Prof. Dr. Anders Oldfors, da Universidade de Gothenburg (Suécia), como descrito por Stevens (1990), com enriquecimento por DAB (Mochel et al., 2008) para identificação de depósitos de ferro. Também o Prof. Oldfors realizou a avaliação imuno-histoquímica e por microscopia eletrônica.

Para a imuno-histoquímica, as secções de 8mm foram fixadas com formaldeído a 4%, a 4°C por 10 min, lavados em salina “Tris-buffered-Tween” 20 (TBS-T) por 10 minutos e, permeabilizados em série de metanol, lavado em TBS-T por 5 minutos e processados em “Dako Autostainer”, usando “Dako EnVision TM Flex High pH”. Os seguintes anticorpos foram aplicados por uma hora: anti-SDHB ab14714 Abcam (1:500), anti-MTCO1 ab14705 Abcam (1:2000) e anti-VDAC1 ab14734 Abcam (1:2000).

Avaliação por microscopia eletrônica foi feita em espécimes de tecidos que foram fixados em glutaraldeído, pós-fixados em OsO₄ e embebidos em resina. Secções ultrafinas foram contrastadas com uranilacetato e citrato de chumbo.

4.4.7 Testes funcionais

Foram realizados testes funcionais pela equipe do Prof. Dr. Roland Lill, da Universidade de Marburg (Alemanha), com material extraído do músculo de pacientes identificados como portadores de variante patogênica em *FDX2*. RNA extraído de músculo de dois dos nossos pacientes e de dois controles saudáveis foram usados para “quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)”. O RNA foi reversamente transcrito usando “primers” de *FDX2* cobrindo a junção dos exons 4 e 5. Foi realizada a amplificação de cDNA e a expressão relativa do gene calculada.

Estudos com “Western Blot” foram realizados em tecido muscular para determinar a concentração protéica – detalhes técnicos em Gurgel-Giannetti et al., 2018.

4.5 Aspectos éticos

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HCFMUSP (número do parecer: 214/262) em 12/03/2013 – Apêndice A.

Todos os pacientes incluídos no estudo receberam informações sobre o que consiste o estudo, incluindo objetivos, metodologia, riscos e benefícios. Após informações, todos os pacientes ou responsáveis leram e assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE – Apêndice B).

4.6 Análise dos dados

Trata-se de estudo descritivo que não comporta análise estatística.

O banco de dados foi construído em planilha do programa Excel 2011 da Microsoft e a organização dos dados foi realizada por meio de tabelas.

5 Resultados

5 RESULTADOS

Foram identificados 42 pacientes dentre 357 pacientes listados na base de dados do Ambulatório de Neurogenética do HCFMUSP como portadores de alterações na substância branca do SNC de presumível ou definida etiologia genética, no período de fevereiro de 2013 a março de 2017. Dentre os 42 pacientes, dois pacientes tinham menos de 16 anos no momento da avaliação e foram incluídos por serem familiares de um dos probandos e terem manifestações clínicas semelhantes. Os demais pacientes eram maiores de 16 anos. Assim, 11,7% dos pacientes seguidos em nosso serviço à época foram categorizados como portadores de LD/LG. Destes, 38 (31 famílias) foram incluídos no estudo.

Os motivos de exclusão foram: uma paciente com síndrome de Tay-Sachs cuja alteração de substância branca não foi posteriormente confirmada, um paciente com esclerose múltipla e dois pacientes com doença inflamatória indeterminada (Figura 3).

Figura 3 – Pacientes avaliados

Para facilitar a análise dos dados obtidos, os casos incluídos foram dispostos em três tabelas (Tabela 1 – caracterização clínica, Tabela 2 – caracterização genética, Tabela 3 – caracterização neurorradiológica, anexos A, B e C, respectivamente), agrupados por diagnóstico definitivo ou ausência do mesmo.

Três pacientes permaneceram sem diagnóstico mesmo após a realização de sequenciamento completo do exoma.

A avaliação clínica e de neuroimagem realizada pelo autor desta tese, seu orientador e um neurorradiologista experiente (Dr. Leandro Tavares Lucato) foi capaz de sugerir uma hipótese diagnóstica em 27 dentre os 31 probandos (87%).

Dez dentre estes 27 probandos obtiveram confirmação diagnóstica por meio de exames bioquímicos – 32% de toda a série. Foram sete pacientes com ALD/AMN-X e três com L2HGA. Estes últimos ainda obtiveram confirmação diagnóstica por meio de avaliação molecular por exoma clínico.

Dos 21 probandos sem diagnóstico restantes, quatro foram submetidos a testes de genes candidatos específicos (conforme a disponibilidade em nosso serviço). Em dois foi feita a pesquisa da duplicação de *LMNB1* por *array-CGH*, confirmando o diagnóstico de ADLD em um deles. Uma paciente com suspeita de doença de Alexander do adulto e um paciente com suspeita de síndrome de Sjögren-Larsson tiveram seus diagnósticos confirmados pelo sequenciamento de *GFAP* e *ALDH3A2*, respectivamente.

Restando ainda 18 probandos sem diagnóstico, procedemos então com o sequenciamento do exoma clínico. Destes, 14 tinham pelo menos uma hipótese diagnóstica prévia e o exoma clínico confirmou 10 destas, a saber: quatro probandos com VWM, dois com HDLS, três com CADASIL e um com LBSL.

Em quatro destes 14 casos a hipótese clínica estava equivocada: uma suspeita de síndrome de Labrune que na verdade correspondia a um caso de HDLS; uma suspeita de VWM que correspondia a síndrome de Gordon-Holmes por variante patogênica em *RNF216*; e uma suspeita de VWM e uma de ADLD que não se confirmaram mesmo após o sequenciamento completo do exoma e os pacientes permaneceram sem um diagnóstico definitivo.

O sequenciamento do exoma clínico revelou ainda um diagnóstico previamente não-suspeitado de doença relacionada a *PLP1*.

Assim, após as avaliações clínica, neurorradiológica, bioquímica e genética por sequenciamento do exoma clínico tínhamos 26/31 (83%) probandos com diagnóstico definitivo. Fomos capazes de predizer o diagnóstico correto pela clínica e imagem em 23/31 probandos – 74% de nossa série.

Restando ainda cinco famílias sem diagnóstico, procedemos para a última etapa de avaliação. O sequenciamento completo do exoma permitiu identificar variantes patogênicas em dois genes adicionais (*PUS3* e *FDX2*), aumentando o percentual de casos com diagnóstico definitivo para 90% (28/31). Assim, apenas três probandos permaneceram sem diagnóstico definitivo após o sequenciamento completo do exoma. A figura 4 mostra a frequência dos diagnósticos entre os probandos.

Figura 4 – Frequência dos diagnósticos entre os 31 probandos

Dentre os 38 pacientes incluídos, 23 tiveram idade de início dos sintomas após 16 anos de idade. Quatro tiveram idade de início após os 50 anos, sendo que dois deles não obtiveram diagnóstico definitivo. Dos 3 pacientes sem diagnóstico final, apenas uma teve idade de início dos sintomas antes dos 16 anos (aos três anos).

Dentre os 28 probandos com diagnóstico definitivo, oito (28%) eram portadores de doenças autossômicas dominantes, 12 (42%) eram portadores de doenças autossômicas recessivas e oito (28%) eram portadores de doenças ligadas ao X (Figura 5).

Padrões de herança genética **Figura 5** – Padrões de herança genética das doenças diagnosticadas

Em 14 probandos havia história familiar de outros indivíduos acometidos e em quatro havia história de consanguinidade explícita entre os pais, facilitando a hipótese de doença de origem genética.

Quadro 8 - Resultados da 1ª etapa, na qual 13 pacientes obtiveram diagnóstico final (números referentes a probandos)

Pacientes com suspeita de:		Confirmados
ALD/AMN-X	07	07
L2HGA	03	03
ADLD	02	01
Doença de Alexander	01	01
Síndrome de Sjögren-Larsson	01	01
Total	14	13

Quadro 9 – Resultados das 2^a e 3^a etapas (números referentes a probandos)

Pacientes com suspeita de...		Confirmados na 2 ^a etapa	Diagnóstico final alternativo na 2 ^a etapa	Diagnóstico final na 3 ^a etapa
VWM	06	04	<i>RNF216</i>	
CADASIL	03	03		
HDLS	02	02		
LBSL	01	01		
Labrune	01	-	HDLS	
ADLD	01	-		
Total	14	10	02	
Pacientes sem suspeita diagnóstica prévia				
	04		<i>PLP1</i>	<i>PUS3</i>
				<i>FDX2</i>
Total	18	10	03	02

5.1 Espectro de doenças

5.1.1 Adrenoleucodistrofia/adrenomieloneuropatia ligada ao X

Identificamos cinco pacientes com adrenomieloneuropatia (1.1, 2.1, 3.1, 4.1 e 5.1) e três pacientes com adrenoleucodistrofia ligada ao X (1.2, 6.1 e 7.1), oriundos de 7 famílias. Todos os pacientes deste grupo tiveram confirmação diagnóstica pela presença de elevação do AGCML. Infelizmente não foi possível realizar a análise molecular dos pacientes deste grupo.

5.1.1.2 Adrenomieloneuropatia ligada ao X

5.1.1.2.1 Adrenomieloneuropatia ligada ao X – aspectos clínicos

A idade média de início dos sintomas foi de 16,4 anos (extremos: 2 a 30 anos), sendo que dois pacientes tiveram início dos sintomas antes dos 16 anos.

A manifestação neurológica inicial em todos estes pacientes foi alteração de marcha. No entanto, três deles relataram manifestações não-neurológicas que antecederam o transtorno de marcha – dois apresentavam alopecia e um (5.1) apresentava dores articulares em membros inferiores quatro anos antes do início da alteração de marcha.

Apenas um paciente (3.1) apresentava queixas cognitivas, com dificuldade de organização e execução de tarefas mais complexas, como cuidar das próprias finanças, mas sem maiores repercussões funcionais. Na avaliação formal apresentava disfunção executiva e comportamento impulsivo e um pouco infantilizado, mas tinha memória, linguagem, praxias e habilidades visuoespaciais preservadas. Interessante notar que este paciente era o que apresentava maior tempo de evolução da doença (25 anos) no momento da avaliação. Este mesmo paciente tinha antecedente de transtorno depressivo maior e sofria de transtorno de ansiedade – também observado nos pacientes 1.1 e 4.1.

Dentre os cinco pacientes com AMN-X, três apresentavam marcha em tesoura com componente talonante sobreposto, um apresentava marcha em tesoura sem ataxia sensitiva associada (5.1) e um, o paciente 3.1, tornara-se cadeirante após 23 anos de evolução da doença.

Os cinco pacientes apresentavam síndrome piramidal com espasticidade e reflexos tendinosos profundos exaltados em MMII, bem como sinal de Babinski bilateralmente. Apenas um paciente (4.1) tinha reflexos aquileus abolidos. Todos tinham reflexos vivos em MMSS, exceto o paciente 5.1, que os tinha hipoativos.

Três pacientes (1.1, 2.1 e 4.1) apresentavam ataxia sensitiva de predomínio axial e em MMII, caracterizada pelas presenças do sinal de Romberg e do componente talonante da marcha.

Os cinco pacientes apresentavam sinais de polineuropatia sensitiva crônica em MMII, sendo que os pacientes 3.1 e 5.1 apresentavam apenas comprometimento

da sensibilidade vibratória. Já os demais apresentavam perda das sensibilidades superficiais e profundas.

Nenhum paciente apresentava alterações em nervos cranianos. Apenas o paciente 2.1 não tinha queixas esfinterianas, enquanto dois se queixavam de urge-incontinência urinária (1.1 e 3.1) e dois de retenção urinária (4.1 e 5.1).

Três pacientes relataram crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas, com pouquíssimos eventos ao longo da vida, com fácil controle medicamentoso.

Os cinco pacientes apresentavam insuficiência adrenal cortical e estavam em tratamento, exceto um (4.1), que apresentava insuficiência adrenal subclínica. Um deles (5.1) já havia apresentado sintomas clínicos (fadiga, hipotensão e hipoglicemia) e três apresentavam hiperpigmentação (1.1, 2.1 e 5.1). Um paciente (4.1) apresentava oligospermia e azospermia, sugerindo insuficiência testicular. Os demais não foram investigados para este fim.

Todos apresentavam quadro lentamente progressivo, sendo que o paciente 1.1 passou a usar muletas após 10 anos de evolução e o paciente 3.1 tornou-se cadeirante após 23 anos de evolução. O paciente 4.1 teve uma evolução atípica, com quadro relativamente estável por muitos anos. Entre dois e 28 anos apresentava marcha em tesoura e quedas frequentes, mas não notava piora progressiva. A partir daí houve piora progressiva, necessitando de apoio para deambular após os 31 anos. Os pacientes 2.1 e 5.1 ainda eram capazes de deambular sem qualquer auxílio no momento da avaliação.

Nenhum paciente deste grupo realizou EEG e apenas o paciente 4.1 foi submetido a ENMG, que mostrou polineuropatia axonal motora crônica.

5.1.1.2.2 Adrenomieloneuropatia ligada ao X – aspectos neurorradiológicos

A RM de crânio foi normal em dois pacientes (1.1 e 2.1). Os outros três pacientes apresentavam apenas hipersinal em T2 e FLAIR em substância branca junto aos átrios e cornos occipitais de ambos os ventrículos laterais, sem restrição à difusão e sem impregnação pelo gadolínio. O paciente 4.1 apresentava predomínio frontal das lesões e ainda apresentava uma lesão expansiva nas porções inferiores do IV ventrículo, sugestiva de ependimoma (Figura 6).

Figura 6 - RM de crânio do paciente 4.1. Acometimento de substância branca de predomínio frontal (setas), visto no axial FLAIR

Quatro pacientes realizaram RM de colunas cervical e torácica, sendo que em dois os exames foram normais (4.1 e 5.1) e dois apresentaram afilamento de medula torácica (1.1 e 2.1). Nestes observou-se tênue hipsinal em T2 nos tratos corticoespinhais bilateralmente, também no segmento torácico.

5.1.1.3 Adrenoleucodistrofia ligada ao X

Identificamos três pacientes com ALD-X, sendo que dois (6.1 e 7.1) tiveram os primeiros sintomas antes dos 16 anos. Ambos tinham um quadro bastante típico da chamada forma cerebral de ADL-X da infância.

5.1.1.3.1 Adrenoleucodistrofia ligada ao X – casos típicos – aspectos clínicos

Estes dois pacientes tiveram como manifestações iniciais alterações de aprendizagem, inicialmente atribuídas a transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. Posteriormente evoluíram com síndrome piramidal de liberação e deficitária, declínio cognitivo progressivo, sinais de polineuropatia periférica

sensitivo-motora e perda visual progressiva. Ambos apresentavam epilepsia com crises focais e generalizadas, facilmente controladas com fármacos antiepilépticos.

Também apresentavam síndrome de Addison e um deles apresentava alopecia. O paciente 7.1 apresentou aos 12 anos de idade aumento indolor do volume testicular, seguido de redução volumétrica até ficar praticamente indectável – sugerindo insuficiência testicular.

O paciente 6.1 tornou-se cadeirante mais precocemente, após 3 anos de doença, mas ainda era capaz de ir para as consultas em cadeira de rodas e interagir minimamente com o examinador após 19 anos de doença. Já o paciente 7.1 tornou-se cadeirante após 7 anos, mas em 9 anos já estava restrito ao leito, em mutismo acinético.

Avaliação por EEG mostrou desorganização difusa da atividade elétrica cerebral, sem atividade epileptiforme. Não foram submetidos à ENMG.

5.1.1.3.2 Adrenoleucodistrofia ligada ao X – casos típicos –aspectos neurorradiológicos

Ambos apresentavam alterações de RM de crânio muito semelhantes, com hipersinal em T2 e FLAIR acometendo simetricamente substância branca temporoparietooccipital bilateral. Havia acometimento de tratos corticoespinhais se estendendo para ramos posteriores de ambas as cápsulas internas e pedúnculos cerebrais. Notava-se acometimento de radiações ópticas e esplênio e corpo do corpo caloso (Figura 7). Curiosamente não apresentavam impregnação pelo gadolínio, nem tampouco restrição à difusão.

Ambos realizaram RM de colunas cervical e torácica que foram normais.

Figura 7 - Imagem axial FLAIR do paciente 7.1 mostrando acometimento de perna posterior de ambas as cápsulas internas (setas em A) e hipersinal em substância branca de predomínio parieto-occipital bilateral (setas em B). Há ainda aumento dos cornos posteriores dos ventrículos laterais

5.1.1.3.4 Adrenoleucodistrofia ligada ao X – um caso atípico

Já o paciente 1.2 teve uma apresentação clínica bastante peculiar, com predomínio das manifestações cognitivo-comportamentais, mas tendo como primeiro sintoma inequívoco da doença uma crise epiléptica tônico-clônica generalizada aos 28 anos. No entanto, já apresentava alterações comportamentais prévias, com impulsividade, etilismo, tabagismo, uso de drogas ilícitas, comportamento antissocial e humor deprimido desde a adolescência.

Pouco antes de apresentar a primeira crise epiléptica, apresentara delírios paranoides persecutórios, e desde então evoluiu com esquecimentos frequentes para fatos recentes e grande dificuldade de organização e manutenção da atenção. Dois anos antes da primeira crise epiléptica sofreu traumatismo cranioencefálico em acidente automobilístico. Seu exame neurológico era normal, exceto por disfunção executiva e certo embotamento afetivo com perda da prosódia durante o discurso.

Os achados da RM de crânio deste paciente também eram surpreendentes e pouco usuais em pacientes com ALD-X. Em seu primeiro exame já apresentava

extensa área de hipersinal em T2 e FLAIR em substância branca fronto-parieto-têmporo-occipital direita, com realce linear e periférico com restrição à difusão e impregnação pelo gadolínio. Havia ainda hipersinal no trajeto do trato corticoespinal direito, no ramo posterior da cápsula interna (Figura 8).

Figura 8 - Paciente 1.2 com ALD-X de apresentação assimétrica relacionada a trauma em região parietal direita. Imagens do primeiro estudo de RM de crânio, sequências axiais FLAIR mostrando acometimento difuso à direita (A, B, E, F), inclusive em trato corticoespinal se estendendo até pedúnculo cerebral direito (seta em A). Restrição periférica à movimentação das moléculas de água (hipersinal na difusão em C e correspondente hipossinal em ADC em D, setas) e impregnação periférica e descontínua pelo gadolínio (setas em G e H)

Uma nova RM de crânio obtida três anos depois mostrava aumento da área de hipersinal em T2 e FLAIR, se estendendo para joelho, corpo e esplênio do corpo caloso, bem como hipocampo e amígdala direita e centro semioval esquerdo. Foram realizadas RM de colunas cervical e torácica que estavam normais.

O EEG deste paciente mostrava desorganização difusa da atividade elétrica cerebral, mais evidente em hemisfério direito, e paroxismos de ondas agudas em região posterior direita. Apresentava ainda insuficiência adrenal subclínica. Não realizou ENMG e teve seu diagnóstico confirmado pela dosagem dos AGCML

5.1.2 Doença da substância branca evanescente

Identificamos cinco pacientes, pertencentes a quatro famílias, com VWM, todos com confirmação genética.

5.1.2.1 Doença da substância branca evanescente – aspectos clínicos

A idade média de início dos sintomas foi de 34,6 anos (extremos: 20 a 52 anos) e todos os pacientes apresentaram declínio cognitivo, síndrome piramidal e ataxia cerebelar.

O declínio cognitivo manifestou-se inicialmente por disfunção executiva, frequentemente acompanhada de manifestações psiquiátricas como ansiedade, irritabilidade ou apatia. Aqueles com comprometimento mais grave também apresentaram apraxia e amnésia anterógrada e parcialmente retrógrada. Foi uma manifestação precoce nos três homens de nossa casuística e ficou evidente nas duas mulheres apenas depois de cerca de 10 anos de evolução.

Todos apresentaram síndrome piramidal de liberação com reflexos tendinosos profundos exaltados, principalmente em membros inferiores, e sinal de Babinski em 4/5. Déficit de força foi observado em 3/5 pacientes e nos três foi assimétrico. Espasticidade estava presente em três pacientes e dois pacientes apresentavam paratonia. Uma paciente (10.1) apresentava reflexos aquileus abolidos e flacidez distal, sugerindo possível neuropatia periférica associada (não comprovada por ENMG).

Os achados de incoordenação também foram assimétricos e em geral leves – dismetria, decomposição de movimento, tremor de intenção e marcha atáxica (apenas dois pacientes). Um paciente (9.1) ainda apresentava distonia de membros superior esquerdo e um paciente apresentava discreta bradicinesia.

O exame das sensibilidade foi pouco fidedigno em dois pacientes (pelo déficit cognitivo) e normal nos outros três. Em dois pacientes observamos sacadas hipométricas e seguimento sacádico e em uma paciente observamos palidez de papila óptica. Disartria estava presente em 2/5 pacientes.

Três pacientes apresentavam epilepsia, em geral de fácil controle e três apresentavam alterações do sono (insônia inicial). Uma das duas mulheres

apresentou menopausa precoce aos 38 anos e a outra, que teve os primeiros sintomas da doença aos 52 anos, teve menopausa aos 45 anos.

Quatro pacientes (indivíduos 8.1, 9.1, 10.1 e 10.2) apresentaram os primeiros sintomas após traumatismo cranioencefálico. As manifestações iniciais foram diversas: coma após traumatismo cranioencefálico, quedas, déficit motor, crise epiléptica, amnésia anterógrada e neuralgia do trigêmeo. Apenas um paciente relatou piora episódica dos sintomas associada a dias quentes.

Todos apresentaram evolução lentamente progressiva, com aceleração da piora após traumatismo crânio encefálico em três. Apenas a paciente com maior tempo de duração da doença (26 anos) era cadeirante e os demais eram capazes de deambular sem apoio, embora com alterações da marcha (espástica e/ou atáxica).

A mediana de tempo decorrido entre os primeiros sintomas e o diagnóstico definitivo foi de 7 anos e o tempo mais longo foi de 26 anos. Uma paciente (indivíduo 11.1), cuja a manifestação inicial foi neuralgia do trigêmeo iniciado aos 52 anos, teve diagnóstico prévio de esclerose múltipla e recebeu tratamento com imunomodulador por cerca de 10 anos até a suspeita de um diagnóstico alternativo.

Apenas um paciente era filho de pais sabidamente consanguíneos. Em outras duas famílias, provenientes de cidades pequenas (número de habitantes inferior a 10.000), suspeitamos de consanguinidade não-explicita.

Os exames laboratoriais e a análise do líquido não mostraram alterações relevantes em nenhum dos nossos pacientes.

O EEG foi realizado em três pacientes (10.1, 10.2 e 11.1), sendo normal em um (10.2) e mostrando desorganização difusa em dois (10.1 e 11.1). Nenhum paciente deste grupo foi submetido a avaliação por ENMG.

5.1.2.2 Doença da substância branca evanescente – aspectos neurorradiológicos

A RM de crânio mostrou em todos os casos hipersinal confluyente em T2/FLAIR com correspondente hipossinal em T1, com predomínio periventricular e nos lobos frontais e parietais. Todos apresentaram rarefação da substância branca, com sinal em T2/FLAIR se aproximando do sinal do líquido. Também apresentaram cistos em geral periventriculares, mais comumente adjacentes aos cornos anteriores

dos ventrículos laterais. Havia ainda atrofia cortical e afilamento de corpo caloso. Apenas em dois pacientes (10.2 e 11.1) observamos hipersinal em ponte e bulbo e apenas em um paciente observamos alteração de sinal em substância branca cerebelar (10.2). A Figura 9 mostra o aspecto característico da doença observado no FLAIR.

Figura 9 - Paciente 10.2 com VWM. Axial FLAIR em A mostrando acometimento difuso de substância branca com cistos periventriculares (setas em A); rarefação da substância branca visualizada em axial FLAIR (B); corpo caloso fino (C); hipersinal em FLAIR em topografia de olivas bulbares (D); hipersinal em substância branca cerebelar (E); hipersinal em ponte e lobos temporais (F)

5.1.2.3 Doença da substância branca evanescente – aspectos genéticos

O DNA dos pacientes 8.1, 9.1, 10.1 e 11.1 foi avaliada por exoma clínico e foram encontradas variantes patogênicas em *EIF2B4* (paciente 10.1) e *EIF2B5* nos demais. Todos pacientes deste grupo tinham a suspeita clínica de VWM antes da análise molecular. Os pacientes 8.1 e 9.1 carregavam a mesma variante patogênica em

homozigose por troca simples de aminoácido, p.Arg113His, já previamente descrita (Leegwater et al., 2001). Estudos funcionais já demonstraram que esta variante patogênica em homozigose reduz a atividade da proteína eIF2 (Liu et al., 2011). Embora não sabidamente aparentados, ambos eram provenientes da mesma região (interior do estado da Bahia).

Esta mesma variante estava presente na paciente 11.1, em heterozigose composta. Já a segunda, por troca simples de aminoácido, é uma variante nova que os modelos de predição apontam como patogênica, promovendo a substituição de metionina por leucina em um resíduo conservado da proteína.

A paciente 10.1 era heterozigota composta para variantes patogênicas em *EIF2B4*. A primeira variante (c.[495+3delA], segundo os modelos de predição, afeta sítio de reformatação do RNAm. A variante p.Arg208Gln consiste em uma troca simples de aminoácido em um resíduo semiconservado, já tendo sido reportada em homozigose (Fogli et al., 2004) e em heterozigose composta (Ohlenbusch et al., 2005).

Os dados destes pacientes integram a série descrita no artigo que publicamos em parceria com o Departamento de Neurogenética da *University College London* (Lynch et al., 2017).

5.1.3 Acidúria L2-hidroxiglutárica

Identificamos quatro pacientes (03 famílias) com acidúria L2-hidroxiglutárica, todos com evidências bioquímicas e posterior confirmação genética.

5.1.3.1 Acidúria L2-hidroxiglutárica – aspectos clínicos

Os quatro pacientes apresentavam história e evolução bastante semelhantes. Todos apresentaram os primeiros sintomas no primeiro ano de vida, com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, mas foram capazes de atingir os marcos motores do desenvolvimento. O paciente 13.1 teve como primeira manifestação postural anormal do pescoço por volta de 10 meses de vida e somente depois o atraso do desenvolvimento ficou mais evidente.

Tornaram-se adultos com deficiência intelectual significativa, mas capazes de participar minimamente da vida familiar, comunicar-se com vocabulário restrito, ajudar em pequenos afazeres domésticos e realizarem atividades básicas da vida diária com o mínimo auxílio. Três dos quatro pacientes necessitaram pelo menos em algum momento de medicações antipsicóticas para controle comportamental de agressividade e irritabilidade excessivas.

Além do quadro cognitivo-comportamental, todos apresentavam ataxia cerebelar leve, axial e apendicular, e disartria. Os paciente 13.1 e 14.1 apresentavam marcha atáxica e base alargada ao assumir ortostase, sem sinal de Romberg. A paciente 14.2 apresentava marcha em tesoura e a paciente 15.1 já era acamada à época da avaliação.

Síndrome piramidal caracterizada por reflexos tendinosos profundos exaltados, espasticidade em MMII e sinal de Babinski estava presente em 3/4 pacientes. Epilepsia de início ainda na infância, com crises focais e generalizadas, em geral de fácil controle com apenas um fármaco antiepilético também esteve presente em três pacientes.

Movimentos anormais foram identificados em três pacientes. O paciente 13.1 apresentava hemidistonia à esquerda e retrocolo. Era o único que encontrava-se em uso de antipsicótico no momento da avaliação. A paciente 14.2 apresentava tremor cefálico intermitente em negação e distonia em mãos associada a careteamento facial. Já sua irmã (paciente 14.1) apresentava apenas careteamento facial. A paciente 15.1 também apresentava distonia em mãos e careteamento facial, mas sem tremor cefálico.

Todos apresentaram evolução estável, sem nítida piora do quadro na vida adulta, exceto pela paciente 15.1. Esta, aos 45 anos, evoluiu com afasia de expressão e hemiparesia direita completa secundária a glioblastoma multiforme. A família optou por tratamento paliativo e perdemos o seguimento desta paciente.

Os exames laboratoriais e o líquor não mostravam alterações relevantes, exceto pela espectrometria de massa de ácidos orgânicos na urina, que em todos os pacientes trazia o aumento significativo do ácido 2-hidroxi-glutárico – sem, entretanto, discriminar seu enantiômero.

O EEG foi realizado apenas nas pacientes 14.1 e 14.2. Ambas apresentaram desorganização difusa da atividade elétrica cerebral com predomínio de ondas teta, sendo que a paciente 14.2 apresentava ainda surtos de ondas delta de até 1,3Hz de projeção generalizada.

5.1.3.2 Acidúria L2-hidroxiglutarica – aspectos neurorradiológicos

A RM de crânio foi bastante característica em todos os casos, com hipersinal multifocal subcortical em todos os lobos, poupando substância branca periventricular e com hipersinal em núcleos denteados e por vezes em globos pálidos e cápsula interna (Figura 10). Todos apresentaram certo grau de redução volumétrica. Espectroscopia foi obtida de apenas uma paciente e mostrou discreto aumento de mioinositol e redução de Naa (denotando redução da população neuronal) um achado pouco específico, mas que pode estar relacionado à gliose. A paciente 15.1 apresentou glioblastoma multiforme na evolução (Figura 11).

Figura 10 - Paciente 14.1 com diagnóstico de L2HGA. Imagens axiais ponderadas em T2 mostrando acometimento difuso da substância branca com predomínio subcortical e relativa preservação da substância branca periventricular (A-C). Notar hipersinal em cápsulas internas (setas em A), acometimento de fibras em “U” (setas em B e C) e hipersinal nos núcleos denteados (setas em D)

Figura 11 - Paciente 15.1 com diagnóstico de L2HGA. Em A axial T2 mostrando hipersinal difuso com predomínio subcortical (setas brancas) e processo expansivo núcleo-capsular esquerdo (seta azul), heterogêneo, com impregnação pelo gadolínio (mostrado em B, seta)

5.1.3.3 Acidúria L2-hidroxiglutarica – aspectos genéticos

A análise molecular mostrou que os pacientes 13.1 e 15.1 tinham a mesma variante em homozigose, c.530delC/p.Pro177fs, já descrita em população de descendência portuguesa (Vilarinho et al., 2005). A paciente 14.1 era homozigota para a variante patogênica por troca simples de aminoácido p.Gly211Val, já descrita por Steenweg et al. em 2010.

5.1.4 Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides

Identificamos três pacientes com HDLS, todas do sexo feminino, sendo a idade de início as seguintes: 38, 47 e 50 anos. Apenas uma paciente tinha outro familiar acometido (irmão) e as demais eram casos esporádicos.

5.1.4.1 Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides – aspectos clínicos

As manifestações iniciais foram diferentes em cada uma: amnésia anterógrada; alteração comportamental e dor e diminuição de força em membro inferior direito. No entanto, as três apresentaram síndrome cognitivo-comportamental caracterizada por disfunção executiva, certa desinibição social, perda da crítica e apatia. As três também apresentaram insônia inicial.

Um sintoma que chamou a atenção na paciente 16.1 foi a significativa hiporexia e emagrecimento desde os primeiros sintomas. Familiares observaram que o irmão também apresentou quadro semelhante de início na sexta década de vida, com disfunção executiva e emagrecimento. Cerca de 3 anos após as primeiras manifestações, o irmão já se encontrava em mutismo acinético. Não tivemos oportunidade de examiná-lo e o mesmo faleceu após 3 anos de evolução da doença.

Em contrapartida, a paciente 17.1 apresentou ganho ponderal após o início da doença e a paciente 18.1 não teve alterações apreciáveis de peso no primeiro ano de doença.

A paciente 16.1 apresentava também enxaqueca com aura, o que não foi observado nas demais pacientes.

O exame neurológico das pacientes 16.1 e 17.1, além das alterações cognitivo-comportamentais, mostrava apenas uma leve redução do balanço passivo de uma dos membros superiores. A paciente 16.1 também apresentava leve assimetria de reflexos.

Já a paciente 18.1 teve uma evolução completamente diferente, mais rápida e com grave comprometimento motor. Houve perda progressiva de força inicialmente assimétrica que evoluiu para tetraparesia espástica, “*dropped-head*”, disartria e síndrome cognitivo-comportamental. Após um ano dos primeiros sintomas já era cadeirante. Três anos após, foi submetida à confecção de gastrostomia e quatro anos após estava em mutismo acinético. Nesta fase apresentava tremor palatal síncrono com movimentos oculares nistagmóides e palidez de papila óptica bilateral. Foi a óbito após cinco anos de doença.

Os exames laboratoriais e a análise do líquido não mostraram alterações relevantes em nenhuma das três pacientes.

O EEG da paciente 18.1 mostrava desorganização difusa assimétrica da atividade elétrica cerebral com predomínio de ondas teta. As demais pacientes não realizaram EEG. Nenhuma paciente deste grupo foi submetida a ENMG.

5.1.4.2 Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides – aspectos neurorradiológicos

As RM de crânio das três pacientes mostraram hipersinal multifocal em T2/FLAIR assimétrico em lobos frontal e parietal, com frequente acometimento de corpo caloso e de trato corticoespinhal. Em 2/3 pacientes havia restrição à difusão das moléculas de água e pequenas calcificações esparsas. Apenas uma paciente, a mais grave, apresentava cavitações e nenhuma teve impregnação pelo gadolínio (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Paciente 17.1 com diagnóstico de HDLS. Em A, axial T1 mostrando dilatação dos cornos anteriores dos ventrículos laterais (setas brancas) e atrofia cortical frontal assimétrica (seta azul), com hipossinal de substância branca; em B axial T2 e em C axial FLAIR, ambos mostrando hipersinal de substância branca frontal bilateral (setas)

Figura 13 - Paciente 18.1 com diagnóstico de HDLS. Axial FLAIR (A-C) após 01 ano do início dos sintomas, mostrando hipersinal da substância branca com exuberante envolvimento dos trato corticoespinhais, principalmente o esquerdo, até o nível da decussação das pirâmides (setas brancas), além de acometimento de esplênio do corpo caloso (seta amarela). Em D observa-se restrição à difusão das moléculas de água no trato corticoespinhal esquerdo (seta verde). Nova RM do encéfalo (E-I) no quarto ano de evolução da doença mostra significativa progressão das lesões. Axial FLAIR (E-G) mostram proeminência dos ventrículos supratentoriais e hipersinal difuso da substância branca, predominantemente no hemisfério cerebral direito. Há áreas de sinal semelhante ao do líquido, com conteúdo discretamente hiperprotéico, dispersas, com certa distribuição venular, sugerindo áreas císticas/cavidades (setas azuis). Apresentava ainda porções com restrição à difusão de moléculas de água (setas vermelhas em H-I) e calcificações esparsas, melhor visualizadas em TC de crânio (setas laranjas em J)

5.1.4.3 Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides – aspectos genéticos

As pacientes 16.1 e 18.1 foram diagnosticadas por exoma clínico e a paciente 17.1 já havia realizado WES no CEGH antes da inclusão no estudo. Foram identificadas três variantes patogênicas nunca previamente descritas: 1. c.2427_2428delCA/p.Ile810fs*19; 2. c.2654+1G>T/? e 3. c.2570C>T/p.Pro857Leu).

5.1.5 CADASIL

Identificamos três pacientes portadores de CADASIL.

5.1.5.1 CADASIL – aspectos clínicos

A idade de início dos sintomas variou de 30 a 37 anos (média 34,3 anos). Em 2/3 pacientes a história familiar sugeria herança autossômica dominante e a 3^a paciente era a única acometida de sua família.

Todos pacientes apresentaram acidentes vasculares encefálicos isquêmicos e apresentavam sinais focais correspondentes aos mesmos no exame clínico. Dois pacientes apresentavam enxaqueca com aura. Um deles (paciente 19.1) era pouco responsivo aos tratamentos habituais apresentava muitas vezes aura motora prolongada. A outra paciente (21.1) apresentava aura visual e sensitiva.

Os três apresentavam síndrome cognitiva com predomínio de disfunção executiva, mas também prejuízo de memória episódica. Interessante notar que dois pacientes mantinham-se independentes para atividades instrumentais da vida diária após 12 anos de evolução e um (paciente 19.1) estava totalmente dependente de terceiros após 10 anos de evolução.

O paciente 20.1 recebeu o diagnóstico de forame oval patente e foi submetido ao tratamento cirúrgico do mesmo como forma de prevenir novos eventos isquêmicos. No entanto, tais eventos continuaram ocorrendo.

Os exames laboratoriais e do líquido não mostraram alterações relevantes em nenhum dos casos.

O EEG foi normal em dois indivíduos e no caso 21.1 apresentava surtos de ondas lentas de projeção temporal esquerda.

Nenhum paciente deste grupo foi submetido a ENMG.

5.1.5.2 CADASIL – aspectos neurorradiológicos

A RM de crânio mostrou hipersinal multifocal em T2/FLAIR compatível com lacunas isquêmicas e microangiopatia (Figura 14). Quando realizada na fase aguda de um novo déficit, mostrou restrição à difusão das moléculas de água.

Observamos também lesões em núcleos da base e dois pacientes apresentavam sinais de micro-hemorragias. Os três apresentavam hipersinal de cápsula externa e um paciente (19.1) não apresentava hipersinal em polos temporais.

Figura 14 - Axial FLAIR do paciente 20.1 diagnosticado com CADASIL mostrando o acometimento típicos de polos temporais (A) e cápsula externa (B)

5.1.5.3 CADASIL – aspectos genéticos

A presença de variante patogênica em *NOTCH3* foi confirmada por exoma clínico nos três casos. Coincidentemente, as três variantes patogênicas encontradas foram por troca simples de aminoácido e provocavam a substituição de arginina por cisteína, porém em posições diferentes da proteína – p.Arg169Cys, p.Arg332Cys e p.Arg133Cys. As três variantes já foram previamente descritas (Joutel et al., 1997; Oliveri et al., 2001).

5.1.6 Leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto

Identificamos um paciente com leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto (ADLD).

5.1.6.1 Leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto – aspectos clínicos

Tratava-se de um homem saudável até os 38 anos de idade, quando passou a apresentar disfunção erétil isolada. Nos anos subsequentes passou a apresentar episódios frequentes de pré-síncope por hipotensão postural e fadiga aos médios esforços. Aos 52 anos passou a apresentar urge-incontinência urinária e constipação intestinal.

Os primeiros sintomas motores surgiram aos 54 anos, com alteração da marcha e diminuição de força assimétrica inicialmente em MMII. Aos 56 anos tornou-se cadeirante e passou a apresentar também dificuldade para atividade motora fina de MMSS. Também neste período passou a queixar-se de esquecimentos frequentes, irritabilidade e humor deprimido.

O pai e um irmão do paciente apresentaram quadro semelhante e faleceram mais jovens – o pai aos 54 anos e o irmão aos 48 anos. Tinha uma irmã sexagenária e um filho de 30 anos assintomáticos.

Ao exame físico geral não mostrava alterações relevantes, exceto por hipotensão postural assintomática, sem resposta cronotrópica compensatória. Já ao exame neurológico apresentava desatenção, disfunção executiva, certa perseveração, mas mantinha memória, praxias, habilidades visuoespaciais e linguagem preservadas. Era cadeirante e apresentava tetraparesia espástica assimétrica e pior em MMII. Os reflexos tendinosos profundos eram exaltados em MMSS, presentes em MMII, exceto aquileus, que eram abolidos. Apresentava sinais de Hoffman, Tromner e Babinski bilateralmente e não apresentava reflexos axiais da face. Havia dismetria e disdiadococinesia em MMSS, assimétrica, e diminuição das sensibilidades dolorosa, vibratória e proprioceptiva em botas. Notava-se nistagmo evocado pelo olhar para esquerda, seguimento microscacádico e reflexo nauseoso abolido.

Os exames laboratoriais e o exame do líquido não mostraram alterações relevantes.

A ENMG mostrou polineuropatia periférica desmielinizante sensitiva crônica. O EEG mostrou surtos de ondas lentas de projeção na região temporal esquerda.

5.1.6.2 Leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto – aspectos neurorradiológicos

A RM de crânio (Figura 15) mostrava extenso acometimento de substância branca, difuso, simétrico, com acometimento das fibras em “U” e relativa preservação da região periventricular. Havia afilamento de corpo caloso e alteração de sinal dos ramos posteriores da cápsula interna, pedúnculos cerebelares superiores e médios e das fibras transversas da ponte. Havia ainda afilamento do bulbo e transição bulbo-medular. Não havia impregnação pelo gadolínio ou restrição à difusão.

Foram realizadas também RM de coluna cervical e torácica que mostraram alteração difusa do sinal em funículos posteriores e na topografia dos tratos corticoespinhais, particularmente na medula cervical.

Figura 15 - Imagens do paciente com diagnóstico de ADLD. Hipersinal difuso em T2 em substância branca cerebral com correspondente hipossinal em T1 (A-B). Hipersinal em ambos os tratos corticoespinhais em cápsulas internas, pedúnculos cerebrais, ponte e decussação das pirâmides em bulbo, em T2 (C) e FLAIR (D-F) – setas brancas. Acometimento bilateral de braços da ponte (setas amarelas em E)

5.1.6.3 Leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto – aspectos genéticos

Frente a quadro de leucodistrofia do adulto, provavelmente autossômica dominante e com disautonomia precoce, foi feita a hipótese de ADLD e solicitada a pesquisa da duplicação de *LMNB1* por *array-CGH*. Este estudo mostrou uma duplicação intersticial de 212 kb no braço longo do cromossomo 5, afetando a banda

q23.2 entre as posições genômicas 126.074.816-126.287.368 (*Build* 36/Hg18 do genoma humano), que englobava *LMNB1*.

5.1.7 Doença de Alexander

Identificamos uma paciente com doença de Alexander do adulto (Paiva et al., 2016).

5.1.7.1 Doença de Alexander – aspectos clínicos

Tratava-se de uma mulher que, aos 25 anos, após a segunda gravidez, passou a apresentar quedas frequentes, incontinência urinária e alteração da voz (“como se estivesse bêbada”). Por volta dos 32 anos apresentava perda de força em MIE, com progressiva dificuldade para deambular.

Aos 34 anos, iniciou perda de força em MSE e tornou-se cadeirante aos 35 anos. Apresentava ainda engasgos frequentes, obstipação intestinal, insônia, humor deprimido e apatia. Exceto por ser etilista e tabagista, não tinha outros antecedentes médicos relevantes.

Havia história familiar de câncer de mama (mãe faleceu em decorrência do câncer aos 46 anos), acidente vascular encefálico isquêmico (pai falecido aos 68 anos) e deficiência intelectual (em uma irmã que faleceu aos 8 anos). Contava ainda com seis irmãos saudáveis.

Ao exame neurológico apresentava: declínio cognitivo com predomínio de síndrome disexecutiva; tetraparesia espástica assimétrica, pior à esquerda e em MMII, com reflexos tendinosos profundos globalmente exaltados e sinal de Babinski bilateralmente; ataxia cerebelar de predomínio axial; sacadas hipométricas, com nistagmo evocado pelo olhar para esquerda, ausência de reflexo nauseoso e disartria e disfagia graves. Notadamente, não apresentava tremor palatal.

Os exames laboratoriais e do líquido não apresentavam alterações relevantes.

Foi submetida a avaliação por ENMG que foi normal. Não realizou EEG.

5.1.7.2 Doença de Alexander – aspectos neurorradiológicos

A RM de crânio (Figura 16) apresentava hipersinal difuso de substância branca, com predomínio periventricular e poupando as fibras em “U”. Havia hipersinal em pedúnculos cerebelares médios, bulbo e núcleos denteados.

Notava-se ainda significativa atrofia de bulbo e medula espinhal cervical, com relativa preservação da ponte. Estes achados, nas aquisições sagitais, formavam o “sinal do girino”. Não havia impregnação pelo gadolínio ou restrição à difusão. A espectroscopia mostrava aumento de colina, redução de Naa e aumento das relações de mio-inositol.

Figura 16 - Paciente com diagnóstico de doença de Alexander do adulto. Imagens ponderadas em T1 axiais (A-B) e sagital (C), mostrando atrofia de bulbo com preservação do volume da ponte e o característico sinal do girino (setas)

5.1.7.3 Doença de Alexander – aspectos genéticos

Pelo acometimento bulbar, espasticidade e ataxia associados ao achado do sinal do girino, fizemos a hipótese de doença de Alexander e foi solicitado o sequenciamento do gene *GFAP*. Identificou-se a variante c.809G>C (p.Arg270Pro), nunca previamente descrita na literatura médica e ausente entre cerca de 141 mil indivíduos da população mundial, conforme consultado na “Genome Aggregation Database” – GnomAD (Karczewski et al., 2019), sendo que os modelos computacionais preditores de patogenicidade (SIFT, PolyPhen e Mutation Taster)

indicaram que ela fosse deletéria ou provavelmente deletéria. Não foram realizados estudos funcionais.

A paciente faleceu após insuficiência respiratória aguda aos 39 anos e não foi realizada necropsia.

5.1.8 Síndrome de Gordon-Holmes

Identificamos um paciente com a síndrome de Gordon-Holmes, no qual encontramos variante nunca previamente descrita em *RNF216*.

5.1.8.1 Síndrome de Gordon-Holmes – aspectos clínicos

Quadro iniciado aos 31 anos de idade com indisposição, adinamia, perda de memória para fatos recentes, perda de objetos com frequência e dificuldade de organização. Passou a ter dificuldade com movimentos finos dos dedos e leve alteração da marcha, mas sem repercussão funcional.

Havia ainda irritabilidade e certa agressividade. Paralelamente, apresentava perda de libido e disfunção erétil. Investigação da queixa sexual em outro serviço mostrou hipogonadismo hipogonadotrófico, sem alterações em outros hormônios hipofisários. Recebeu por este motivo a prescrição de testosterona.

Não havia outros antecedentes mórbidos. Era filho de pais não consanguíneos, embora pertencessem à mesma localidade (zona rural do interior de Minas Gerais). Os pais, uma irmã e quatro irmãos eram saudáveis, mas um dos irmãos mais velhos apresentou quadro semelhante, também de início aos 31 anos, com declínio cognitivo, alteração da marcha e movimentos involuntários. Este irmão ficou acamado a partir dos 35 anos e faleceu aos 38 anos.

O exame físico geral não tinha particularidades. Já ao exame neurológico apresentava síndrome cognitiva com prejuízo significativo de memória episódica e disfunção executiva; equilíbrio preservado, mas dificuldade na marcha em tandem e presença de paracinesias; força e sensibilidades preservadas; reflexos tendinosos profundos presentes e simétricos em MMSS, vivos em MMII, com cutâneo-plantar em flexão bilateralmente; leve ataxia cerebelar caracterizada por discreta dismetria e

decomposição dos movimentos; coréia generalizada leve, com predomínio dos movimentos em face e MMSS; sem alterações de nervos cranianos.

Os exames laboratoriais, exceto pelos hormônios sexuais, não mostravam alterações significativas. O exame do líquido e o EEG foram normais. Não foi realizada ENMG.

Em sua última avaliação, aos 44 anos, demonstrava piora cognitiva, passando a requerer ajuda para atividades básicas da vida diária. Também nesta última avaliação demonstrava sintomas psicóticos, iniciados poucos meses antes, com delírio persecutório, ilusões ópticas, percepção delirante da realidade e agitação psicomotora, sem no entanto apresentar alucinações. O quadro motor permanecia inalterado, com coréia e ataxia cerebelar leves.

5.1.8.2 Síndrome de Gordon-Holmes – aspectos neurorradiológicos

A RM de crânio (Figura 17) mostrava hipersinal confluyente e simétrico de substância branca supra e infratentorial em T2/FLAIR, com acometimento periventricular e subcortical, sem captação de gadolínio ou restrição à difusão. Apresentava ainda alteração de sinal em tálamos, cápsulas externas, pedúnculos cerebrais (com envolvimento de substância negra), ponte, pedúnculos cerebelares médios e núcleos denteados. A espectroscopia mostrava discreta redução na relação colina/Naa.

Figura 17 - Paciente com diagnóstico de síndrome de Gordon-Holmes por variante patogênica em *RNF216*. Imagens axiais ponderadas em T2 (**A** e **B**) e FLAIR (**C**) mostrando hipersinal bilateral e simétrico em substância branca, lesões em tálamos (setas brancas em **B**), cápsulas externas (setas amarelas em **C**), pedúnculos cerebelares médios (setas azuis em **A**), ponte (seta verde em **A**) e núcleos denteados (setas laranjas em **A**)

5.1.8.3 Síndrome de Gordon-Holmes – aspectos genéticos

Antes da análise molecular tínhamos a hipótese diagnóstica de doença da substância branca evanescente, mas o exoma clínico encontrou uma nova variante patogênica do tipo perda de sentido em homozigose em *RNF216*, c.1482C>A (p.Tyr494*), que é relacionado à síndrome de Gordon-Holmes.

5.1.9 Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula e elevação de lactato

Identificamos uma paciente portadora de leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e elevação de lactato (LBSL).

5.1.9.1 Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula e elevação de lactato – aspectos clínicos

Trata-se de uma paciente que era assintomática até os 5 anos de idade, quando passou a apresentar tremor de intenção e alteração da marcha, com desequilíbrio e pés arrastando.

O quadro foi lentamente progressivo e, aos 23 anos, ainda era capaz de deambular com apoio unilateral, mas apresentando quedas frequentes. Queixava-se ainda de constipação intestinal, e mantinha o controle do ritmo urinário.

Era a primogênita de uma prole de quatro e os pais eram consanguíneos, primos de primeiro grau. Desconhecia outros familiares com quadro semelhante.

O exame físico geral era normal, exceto por alterações tróficas de pele e fâneros dos pés, sugestivos de disautonomia. Não apresentava hipotensão ortostática. Ao exame neurológico apresentava comprometimento cognitivo leve por disfunção executiva, com as demais funções cognitivas preservadas. Assumia ortostase com ajuda, apresentava base alargada e sinal de Romberg. A marcha era em tesoura, com componente de ataxia sensitiva. Havia paraparesia espástica, com sinal de Babinski bilateralmente e reflexos globalmente exaltados, exceto por aquileus que estavam abolidos. Apresentava tremor de intenção, dismetria e disdiadococinesia bilaterais e simétricas, com piora significativa ao fechar os olhos, sugerindo ataxia cerebelar e sensitiva. As sensibilidades vibratória e proprioceptiva estavam diminuídas em MMII, e as sensibilidades tátil e dolorosa, preservadas. Apresentava seguimento microssacádico e sacadas hipermétricas, com discreto nistagmo evocado pelo olhar e disartria cerebelar.

Os exames laboratoriais, o EEG e o exame do líquido foram normais (inclusive a dosagem do lactato no líquido). Não foi submetida a ENMG.

5.1.9.2 Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula e elevação de lactato – aspectos neurorradiológicos

A RM de crânio (Figura 18) realizada aos 23 anos mostrava hipersinal em T2/FLAIR na substância branca cerebral e cerebelar, confluyente, de predomínio periventricular, poupando as fibras em “U”. As lesões observadas em tronco encefálico eram bastante peculiares: alteração de sinal em pedúnculos cerebelares

superiores e inferiores, tratos piramidais, espinocerebelares, mesencefálicos e trajetórias intraparenquimatosas de do nervo trigêmeo. Todas as alterações eram bilaterais e simétricas.

Havia restrição à difusão das moléculas de água nas fibras de projeção. Não houve impregnação pelo gadolínio. A espectroscopia mostrava redução na relação NAA/creatina e não houve aumento de lactato.

Figura 18 - Paciente com diagnóstico de LBSL. Axial T2 mostrando envolvimento confluyente da substância branca cerebral (A), pedúnculos cerebelares médios (setas brancas) e porções intraparenquimatosas dos tratos do nervo trigêmeo (setas amarelas em B) e pirâmides bulbares (seta azul em C) – todas lesões bilaterais

5.1.9.3 Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula e elevação de lactato – aspectos genéticos

A análise molecular por exoma clínico encontrou que a paciente era heterozigota composta para variantes patogênicas em *DARS2*. A primeira variante patogênica c.228-20_-21delTTinsC (p.Arg76Serfs*5) é uma *indel*, já previamente descrita (Scheper et al., 2007). A segunda variante identificada, c.1456C>T (p.Leu486Phe) é uma mutação nova de troca simples de aminoácido que leva à substituição de uma leucina por fenilalanina e é considerada patogênica.

5.1.10 Doença relacionada a *PLP1*

Identificamos um paciente com uma variante patogênica nunca previamente reportada em *PLP1*.

5.1.10.1 Doença relacionada a *PLP1* – aspectos clínicos

Tratava-se de um homem, filho único de pais não-consanguíneos, que era hígido até os 30 anos de idade, quando passou a apresentar tremor cefálico em negação. Os sintomas começaram após o falecimento de sua mãe (por cardiopatia isquêmica).

Evoluiu poucos meses depois com distúrbio de marcha insidioso (“não conseguia dobrar os joelhos”), quedas da própria altura, urge-incontinência urinária e constipação intestinal. A partir dos 33 anos, apresentou declínio cognitivo lentamente progressivo caracterizado por perda de memória, disfunção executiva, confabulação e alterações de personalidade.

Aos 40 anos se tornou cadeirante e totalmente dependente de terceiros para atividades básicas da vida diária. Apresentava comportamento infantilizado, com risos frequentes e imotivados e repetição quase constante de algumas frases. Curiosamente, repetia há alguns anos que sentia dores de cabeça, mas não apresentava comportamento condizente ou resposta a qualquer analgésico.

Não apresentava morbididades associadas e desconhecia casos semelhantes ou pessoas com doenças neurológicas na família.

Ao exame apresentava significativo declínio cognitivo (MEEM 12/30), era cadeirante, mas conseguia assumir ortostase com apoio unilateral, demonstrando significativa instabilidade e base alargada. A marcha era em tesoura com ataxia cerebelar associada. A força estava preservada em MMSS, mas apresentava paraparesia espástica com força grau IV, reflexos exaltados em MMII e sinal de Babinski bilateralmente. Apresentava tremor cefálico tipo “não-não”, sem direção preferencial. Os reflexos axiais da face estavam exaltados. Havia ataxia cerebelar de predomínio axial, com nistagmo evocado pelo olhar, sacadas hipermétricas e seguimento sacádico, além de disartria cerebelar com certo tremor de voz associado. O exame das sensibilidades não era fidedigno.

Os exames laboratoriais, a ENMG e o exame do líquido foram normais. Não realizou EEG.

5.1.10.2 Doença relacionada a *PLP1* – aspectos neurorradiológicos

A RM de crânio (Figura 19) realizada após 10 anos de evolução da doença mostrava leve hipersinal em T2/FLAIR da substância branca, difuso, com isossinal em T1, sugerindo hipomielinização. Havia alteração de sinal dos pedúnculos cerebelares médios e não houve captação de contraste ou restrição à difusão das moléculas de água.

Figura 19 - Paciente com diagnóstico de doença relacionada ao *PLP1*. Axial FLAIR (A-C) mostrando tênue hipersinal difuso da substância branca, sem a respectiva correspondência de hipossinal em T1 (D)

5.1.10.3 Doença relacionada a *PLP1* – aspectos genéticos

A análise molecular por exoma clínico identificou uma variante nunca previamente reportada, c.355dupG (p.Gly121Profs*83) que levava a mudança da matriz de leitura e consequente perda de função de *PLP1*.

5.1.11 Síndrome de Sjögren-Larsson

Identificamos um paciente com a síndrome de Sjögren-Larsson (Paiva et al., 2018).

5.1.11.1 Síndrome de Sjögren-Larsson – aspectos clínicos

Tratava-se de um homem de 28 anos que apresentava ictiose congênita e criptorquidia que apresentou atraso do desenvolvimento neuropsicomotor notado a partir dos 6 meses de vida.

Chegou a sentar sozinho e falar poucas palavras simples, mas nunca deambulou e evoluiu posteriormente com involução da linguagem. Aos 18 meses teve crise convulsiva febril (episódio único). Evoluiu com grave deficiência intelectual e grave comprometimento motor associado a múltiplas deformidades articulares. Foi submetido a vários procedimentos ortopédicos na tentativa de corrigir o posicionamento dos membros (as maiores intervenções foram correção de luxação de quadril e tonotomia bilateralmente aos 15 anos). Foi submetido à plástica palpebral por xeroftalmia. Gastrostomia aos 21 anos por disfagia grave.

Não havia outros familiares acometidos e tinha 2 irmãos saudáveis. O pai e uma irmã apresentavam ictiose leve.

Avaliado aos 27 anos, apresentava deficiência intelectual grave, mas era capaz de manter comunicação por meio de gestual rudimentar com os pais. Anártrico, cadeirante, com múltiplas deformidades ósseas nos quatro membros, caixa torácica e coluna vertebral. Já em uso de gastrostomia, instalada aos 21 anos. Apresentava tetraparesia espástica grave, com reflexos exaltados.

O exame de coordenação, sensibilidades e a pesquisa do reflexo cutâneo-plantar estavam prejudicados pelos quadros motor, cognitivo e ortopédico. Sem

alterações de nervos cranianos. Fundoscopia direta sem alterações, mas de difícil execução técnica.

Os exames laboratoriais não mostravam alterações relevantes.

O EEG mostrava desorganização difusa da atividade elétrica cerebral, com surtos de ondas teta e paroxismos de ondas agudas de projeção temporal esquerda.

Não foi realizada ENMG.

5.1.11.2 Síndrome de Sjögren-Larsson – aspectos neurorradiológicos

A RM de crânio (Figura 20) realizada aos 27 anos mostrava extenso hipersinal em T2/FLAIR na substância branca supratentorial, com predomínio nos lobos frontais e parietais. Havia envolvimento de corpo caloso, mas a fossa posterior era normal. Apresentava alguns focos de restrição à difusão na região subcortical e não houve impregnação contraste paramagnético.

A espectroscopia mostrava picos de lipídios na substância branca e diminuição da relação NAA/creatina, sugerindo disfunção ou perda neuroaxonal. Havia ainda aumento das relações colina/creatina e mioinositol/creatina, sugerindo gliose.

Figura 20 - Paciente com síndrome de Sjögren-Larsson em fase avançada. Em **A** observa-se icte congênita e deformidades ósseas em pés. Axial FLAIR (**B**) mostra leucoencefalopatia difusa. A espectroscopia (**C**), com tempo de eco = 30ms e região de interesse colocada na substância branca parieto-occipital, mostrava pico de lipídios em 0,8-0,9ppm e em 1,3ppm (setas). O pico de N-acetil-aspartato (NAA) estava diminuído, denotando perda ou disfunção neuroaxonal, e o pico de mioinositol (mI) estava aumentado, provavelmente relacionado à gliose

5.1.11.3 Síndrome de Sjögren-Larsson – aspectos genéticos

A associação de deficiência intelectual, tetraplegia espástica, ictiose e leucoencefalopatia nos fez considerar a hipótese de síndrome de Sjögren-Larsson e pedir a pesquisa de mutação em *ADHL3A2*. Identificamos que o paciente era heterozigoto composto para duas mutações de sítios de reformatação já previamente descritas: c.798+5G>A de origem libanesa (materna) e c.1108-1G>C de origem brasileira (paterna). Ambas as variantes levam a perda de função do gene (Rizzo et al., 1999; Lossos et al., 2006).

5.1.12 Deficiência intelectual autossômica recessiva 55 (relacionada a *PUS3*)

Identificamos duas irmãs com deficiência intelectual heterozigotas compostas para *PUS3*.

5.1.12.1 Deficiência intelectual autossômica recessiva 55 (relacionada a *PUS3*) – aspectos clínicos

Filhas de pais não consanguíneos, pertenciam a uma prole de cinco: um irmão com quadro semelhante que faleceu aos 22 anos, uma irmã assintomática que faleceu aos 28 anos por hidrocefalia e uma irmã saudável.

A paciente 22.1, com 44 anos em sua última avaliação, apresentou atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e características dismórficas desde o nascimento. Apresentava baixa estatura e houve atraso de linguagem e motor para deambular. Sempre andou com dificuldades, mas sem apoio. Usou fraldas até sete anos de idade. Apresentava manchas azuladas em região lombar e na cabeça (manchas mongólicas), mas que desapareceram na idade adulta. Nunca aprendeu a ler ou escrever, tinha vocabulário bastante limitado e era independente para atividades básicas da vida diária, além de capaz de ajudar com pequenos afazeres domésticos.

Apresentou duas crises epiléticas na vida, a primeira aos 18 anos e a segunda aos 23 anos, com eventos sugestivos de crise focal discognitiva seguida de generalização secundária. Fez uso de carbamazepina por alguns anos, sendo posteriormente suspenso.

Aos 35 anos teve fratura de bacia por queda da própria altura. A partir dos 37 anos passou a apresentar proteinúria persistente e em níveis crescentes associada a leve declínio da função renal, sem repercussões clínicas.

Até os 44 anos, nunca havia apresentado alterações comportamentais graves que requeressem intervenção. Porém, apresentou quadro psicótico persistente com alucinações auditivas e declínio na sua funcionalidade, sem alterações clínicas que o justifiquem.

Ao exame apresentava altura de 158cm (percentil 10), peso 48kg (percentil 10) perímetro cefálico 53cm (percentil 10), deficiência intelectual moderada a grave, riso imotivado e disartria leve. Equilíbrio estático, marcha, força, tônus, reflexos tendinosos profundos, reflexo cutâneo-plantar, coordenação, sensibilidades e nervos cranianos sem alterações. Reflexos axiais da face presentes e de fácil obtenção. Apresentava ainda fácies sindrômica, escleras acinzentadas e genu valgo.

Os exames laboratoriais de rotina eram todos normais até os 37 anos de idade. A partir daí passou a apresentar proteinúria recorrente, até o máximo de 2,6g/L, mas com melhora espontânea. Houve concomitante perda de função renal (depuração de creatinina de 68 ml/min), porém assintomática. Apresentou também elevação persistente de LDL-colesterol. O exame do líquido foi normal.

Já a irmã (paciente 22.2), com 37 anos na última avaliação, também apresentou atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e aspectos dismórficos desde o nascimento (Figura 21). Aos 6 meses de vida, apresentou nefrite que foi tratada e teve recuperação completa.

Após o período de aleitamento materno exclusivo, feito até os 6 meses de vida, passou a apresentar diarreia crônica. Evoluiu com baixa estatura e baixo peso. Tal diarreia perdurou até os 5 anos de idade, quando recebeu diagnóstico de doença celíaca baseada em biópsia de duodeno. Após a adequação da dieta, houve resolução da diarreia.

Aos 5 anos de idade teve primeira crise convulsiva e desde então apresentou raras crises. Desde então, não apresentou involução ou novos eventos relevantes do ponto de vista neurológico.

No entanto, a partir dos 20 anos, passou a apresentar síndrome nefrótica. A biópsia renal mostrou glomerulosclerose segmentar e focal (GESF) com depósito

granular mesangial de IgM+ e C3+++ na imunofluorescência. O quadro renal foi pouco responsivo à corticoterapia e evoluiu com disfunção renal progressiva. Aos 36 anos ingressou em programa de hemodiálise por insuficiência renal terminal não-oligúrica.

Apresentava ainda otite média recorrente; colesteatoma bilateral que foi operado aos 13 anos; hipotireoidismo; hipercolesterolemia; e osteoporose de início aos 32 anos, com fratura de fêmur não relacionada a trauma.

Ao exame apresentava deficiência intelectual moderada a grave, perímetro cefálico de 52 cm (percentil 3), altura 142 cm (abaixo do percentil 3), cifose, escoliose, escleras acinzentadas, fácies sindrômica (Figura 21) e genu valgo bilateralmente. Não apresentava sinais focais ao exame neurológico, apenas disartria com voz anasalada.

Os exames laboratoriais também só se alteraram após o início do quadro renal, com proteinúria maciça, elevação de LDL-colesterol e posterior evolução com aumento das escórias nitrogenadas. Por fim, quando já em hemodiálise, apresentava anemia de doença crônica e hiperparatireoidismo.

Os traçados de EEG de ambas as pacientes mostraram desorganização difusa da atividade elétrica cerebral por aumento de ondas teta, sem atividade epileptiforme.

Não foi realizada ENMG.

Figura 21 - Pacientes com deficiência intelectual relacionada a *PUS3*. Em **A**, heredograma da família das pacientes 22.1 e 22.2, mostrando como a mutação segregava na mesma. Fotografia da paciente 22.2 mostrando fâcies síndrômica (**B**) e esclera acinzentada (**C**)

5.1.12.2 Deficiência intelectual autossômica recessiva 55 (relacionada a *PUS3*) – aspectos neurorradiológicos

A RM de crânio mostrou alterações da substância branca em ambas as pacientes. A paciente 22.1 em RM de crânio realizada aos 42 anos de idade, apresentava alguns pontos de hipersinal no T2/FLAIR da substância branca cerebral de predomínio periventricular e tênue hipossinal na sequência PRESTO T2 nos globos pálidos e núcleos denteados.

A RM de crânio da paciente 22.2 (Figura 22), realizada aos 39 anos, mostrou hipersinal difuso em T2/FLAIR em todos os lobos da substância branca cerebral, com acometimento se estendendo até as áreas subcorticais, bem como acometimento da substância branca cerebelar. Assim como a irmã, apresentava hipossinal na sequência de suscetibilidade magnética (Ax 3D SWAN) em globos pálidos e núcleos denteados. Não havia acometimento de tronco encefálico.

Não apresentavam impregnação pelo contraste ou áreas de restrição à difusão.

Figura 22 – RM de crânio da paciente 22.2 com diagnóstico de deficiência intelectual relacionada a *PUS3*. Axial T2 (**A-B**) da paciente 22.2 mostrando extensa alteração de sinal de substância branca. Sequência de suscetibilidade (**C-D**) mostrando hipossinal em globos pálidos (setas brancas) e núcleos denteados (setas azuis)

5.1.12.3 Deficiência intelectual autossômica recessiva 55 (relacionada a *PUS3*) – aspectos genéticos

A avaliação molecular por WES mostrou que elas não demonstravam homozigose significativa – como esperado, pois não há consanguinidade –, mas ao filtrar os dados para variantes deletérias, ambas eram heterozigotas compostas para *PUS3* (Arg166Gln, Leu366Pro). Sequenciamos a mãe das pacientes que era heterozigota para p.Arg166Gln e a irmã saudável, que era heterozigota para p.Leu366Pro (o pai faleceu antes do início do estudo, impossibilitando a análise). Ambas as variantes são muito raras e em resíduos conservados (Figura 23). Os modelos de predição apontaram que ambas são patogênicas.

Figura 23 – Eletroferogramas do sequenciamento Sanger mostrando as variantes patogênicas c.497G>A (p.Arg166Gln) e c.1097T>C (p.Leu366Pro) em *PUS3*

5.1.13 Encefalomioneuropatia relacionada a *FDX2*

Identificamos quatro pacientes pertencentes a mesma família portadores de variante patogênica em homozigose em *FDX2*, que tem como produto uma

ferredoxina mitocondrial. O único fenótipo que havia sido associada a este gene era o de miopatia metabólica isolada (Spiegel et al., 2014).

A mesmo tempo e de forma independente, a equipe da Prof. Dra Juliana Gurgel-Giannetti, do setor de Neurologia Infantil da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), identificou outros dois pacientes, procedentes da mesma região geográfica e que tinham o mesmo quadro clínico e a mesma variante patogênica em homozigose. A partir disto, se deu início a uma colaboração com o grupo da UFMG, o que permitiu, com apoio de outras instituições nacionais e internacionais, investigar de forma mais detalhada esta condição e viabilizar sua publicação (Gurgel-Giannetti et al., 2018).

A figura 24 mostra o heredograma desta família. A seguir detalhamos os achados dos quatro pacientes que avaliamos diretamente.

Figura 24 – Heredograma dos pacientes com diagnóstico de doença relacionada ao *FDX2*

5.1.13.1 Encefalomioneuropatia relacionada a *FDX2* – aspectos clínicos

A paciente 12.1, filha de pais consanguíneos, com 29 anos à época da avaliação, apresentava baixa acuidade visual e nistagmo desde o primeiro ano de vida. Ela nunca foi capaz de correr e apresentava quedas frequentes e marcha digitígrafa desde os 10 anos de idade. Não apresentou atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e não apresentava queixas cognitivas ou psiquiátricas, exceto por ansiedade.

Relatava episódios recorrentes de mialgia difusa e fraqueza generalizada associada principalmente ao frio – pelo menos desde os 17 anos de idade. Durante estes episódios ela frequentemente precisava de ajuda para deambular e recuperava-se progressivamente. Apresentava ainda dor lombar crônica, dor em queimação nos pés desde a adolescência, vômitos pós-prandiais recorrentes sem causa aparente, hipermenorréia e infecções recorrentes do trato urinário. Mais recentemente passou a apresentar disfagia orofaríngea.

Ao exame neurológico apresentava: cognição normal; equilíbrio estático com base alargada e presença do sinal de Romberg; marcha anserina com componentes talonante e ceifante sobrepostos; tetraparesia de predomínio proximal (força grau III proximal em MMSS e IV distal, bem como grau IV em MMII), com leve atrofia de deltoides; reflexos tendinosos profundos presentes e simétricos em MMSS e abolidos em MMII; leve espasticidade em MMII; sinal de Babinski bilateralmente; dismetria e disdiadococinesia leves; perda de sensibilidades superficial e profunda em MMII; baixa acuidade visual (contar dedos a 30cm); palidez de papila bilateral; ptose palpebral bilateral; nistagmo evocado pelo olhar; hipomimia facial com fraqueza do músculo orbicular da boca; fala anasalada e tosse fraca. Havia ainda pés cavos, escoliose e perda da pilificação normal em MMII.

O paciente 12.2, com 34 anos à época da evolução, também apresentou baixa acuidade visual e nistagmo no primeiro ano de vida. Atingiu os marcos do desenvolvimento com pequeno atraso e apresentava quedas frequentes e certo desequilíbrio ao deambular, mas sem maiores limitações. Por volta dos 17 anos apresentou um episódio de dor lombar seguido de paraparesia crural que o deixou restrito ao leito por alguns meses e teve recuperação completa após cerca de um ano. Apresentava ainda queixa de cefaleia recorrente com características migranasas, epistaxe recorrente, dor lombar crônica e foi recentemente diagnosticado como portador de diabetes melito.

Ao exame neurológico, não apresentava alterações cognitivas de equilíbrio, marcha ou força. Os reflexos tendinosos profundos eram hipoativos e havia sinal de Babinski bilateralmente. Apresentava ataxia sensitiva leve, de predomínio axial e em MMII, diminuição das sensibilidades superficial e profunda em MMII, baixa da

acuidade visual grave (contava dedos a 30cm), palidez de papila e nistagmo por incapacidade de fixação (“roving-eyes”). Havia ainda pés cavos.

O paciente 12.3, com 6 anos à época da avaliação, também apresentou nistagmo e baixa da acuidade visual notada por volta de 14 meses de idade. Andou com 17 meses e falou com 12 meses. Seu desenvolvimento neuropsicomotor foi adequado, apenas com algumas dificuldades atribuídas ao déficit visual. Nos últimos três anos apresenta infecções respiratórias recorrentes.

Ao exame físico apresentava perímetro cefálico superior ao percentil 90, peso e altura no percentil 50 e exame neurológico sem alterações, exceto por baixa acuidade visual, nistagmo pendular e reflexos tendinosos profundos globalmente hipoativos.

Por fim, a paciente 12.4, com 13 anos à época da última avaliação, apresentava o fenótipo mais complexo, com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor notado já nos primeiros dias de vida, inicialmente por dificuldade de sucção. Foi um bebê hipotônico que sentou com ajuda aos 18 meses, andou com 24 meses, falou com 3 anos, reconheceu cores com 5 anos e foi capaz de escrever o próprio nome aos 8 anos. Por volta dos 3 anos, percebeu-se baixa da acuidade visual e avaliação oftalmológica documentou atrofia óptica bilateral. Apresenta infecções respiratórias e urinárias recorrentes, com piora da frequência nos últimos 3 anos.

Ao exame físico, seu perímetro cefálico estava abaixo do percentil 3, sua altura no percentil 10 e seu peso no percentil 25. Apresentava as seguintes alterações dismórficas: pavilhão auricular anterovertido bilateralmente, diástases dentárias, retrognatia, micrognatia, palato ogival, olhos amendoados, ponte nasal alta, dolicocefalia, braquidactilia, “puffy fingers”, pés cavos e eritema pérmio em extremidades. Seu comportamento era bastante infantilizado, mas capaz de responder a perguntas simples do examinador.

Não apresentava problemas de equilíbrio estático ou marcha, exceto por deambular com os joelhos levemente flexionados. Não apresentava alterações de força, coordenação ou sensibilidades. Seus reflexos tendinosos profundos eram globalmente hipoativos e o cutâneo-plantar em flexão bilateralmente. Apresentava baixa acuidade visual (20/70 com correção em ambos os olhos) e palidez de papila

bilateralmente, sem alterações de motricidade ocular extrínseca ou outras de nervos cranianos.

5.1.13.2 Encefalomioneuropatia relacionada a *FDX2* – aspectos neurorradiológicos

A paciente 12.1 realizou somente uma RM de crânio que mostrou hipoplasia de ambos os nervos ópticos e do quiasma óptico e hipersinal em T2/FLAIR discreto, subcortical, multifocal na substância branca frontal, parietal e occipital.

O paciente 12.2 também realizou apenas uma RM de crânio que não mostrou alteração de sinal, apenas atrofia de nervos ópticos e quiasma óptico.

Já a RM de crânio do paciente 12.3 realizada 1 ano e 8 meses de idade mostrou lesões multifocais com hipersinal em T2/FLAIR e hipossinal correspondente em T1 na substância branca supratentorial generalizado, com predomínio em lobos frontais, atingindo as fibras em “U”, na região peritrigonal e em quase todo o corpo caloso. Um ano depois, novo exame mostrou o mesmo padrão com lesões adicionais em tálamos anterior e mesial, região periaquedutal e ponte. Em ambos exames havia hipoplasia de nervos ópticos e quiasma óptico. Não houve captação pelo gadolínio e a espectroscopia realizada no segundo exame foi normal. Havia restrição à difusão no primeiro exame que no segundo exame deu lugar à facilitação.

A primeira RM de crânio da paciente 12.4, aos 8 meses de idade, mostrava certo aumento dos ventrículos laterais e mielinização incompleta, compatível com a idade, sem alterações de sinal. Novo exame aos 5 anos mostrou acometimento de: substância branca subcortical, com predomínio posterior; tálamos (poupando os tratos mamilotalâmicos e com envolvimento dos núcleos anteriores e lâminas medulares internas); e tronco encefálico (poupando os tratos corticoespinhais na ponte). Havia hipersinal da difusão, mas o ADC não estava disponível para definirmos restrição. Apresentava ainda hipocampos mal-rodados e atrofia/hipoplasia de nervos ópticos e quiasma óptico. Novos exames aos 9 e 10 anos de idade mostraram que as lesões de substância branca praticamente desapareceram. Na espectroscopia do penúltimo exame apresentou elevação de lactato. A figura 25 mostra os principais achados.

continua

Figura 25 - RM de crânio de pacientes com diagnóstico de doença relacionada a *FDX2*. Imagens axiais ponderadas em T2 (A-C) da paciente 12.4 aos 8 meses de vida sem alterações significativas. Nas imagens do paciente 12.3 quando tinha 1 ano e 8 meses (D-F) observa-se hipersinal em T2 na substância branca subcortical e em joelho e esplênio do corpo caloso, com restrição à difusão - talvez relacionada a edema intramielínico. Já aos 3 anos de idade, imagens ponderadas em T2 do paciente 12.3 (G-I) mostram progressão das lesões e também acometimento de ponte, mas poupando os tratos corticoespinhais (setas em G). Havia também acometimento de núcleos anteriores de ambos os tálamos, mas poupando os tratos mamilotalâmicos, vistos como ponto de hipossinal no meio da alteração de sinal (setas em H). Havia também envolvimento de lâmina medular interna (setas em I)

Figura 25 (continuação) Imagens ponderadas em T2 (J-L) da paciente 12.4 aos 5 anos mostram basicamente os mesmos achados do paciente 6.1 aos 3 anos, exceto pelo predomínio posterior

5.1.13.3 Encefalomioneuropatia relacionada a *FDX2* – aspectos neurofisiológicos

A ENMG da paciente 12.1 mostrou uma polineuropatia periférica axonal motora crônica, com sinais de desnervação ativa, sem acometimento sensitivo ou miopático. Realizou também EEG que mostrou desorganização difusa da atividade elétrica cerebral por maior quantidade de ondas teta, carência de fusos do sono, e paroxismos de espícula-onda irregular nas regiões occipitais bilaterais, com difusão para áreas posteriores.

A ENMG do paciente 12.2 mostrou polineuropatia sensitivo-motora axonal. Este paciente não realizou EEG.

O paciente 12.3 foi submetido à ENMG que foi normal e não realizou EEG.

A ENMG da paciente 12.4 realizada aos 13 anos de idade mostrou polineuropatia sensitivo-motora crônica axonal. Realizou também potencial evocado visual estava no limite inferior da normalidade.

5.1.13.4 Encefalomioneuropatia relacionada a *FDX2* – aspectos laboratoriais

Os exames laboratoriais da paciente 12.1 mostravam anemia leve persistente, microcítica, com anisocitose, sem reticulocitose, sem evidências de ferropenia, associada a neutropenia grave. Uma biópsia de medula óssea mostrou série

granulocítica hipoplásica. Apresentava ainda TSH levemente elevado com T4 livre normal (hipotireoidismo subclínico). Espectroscopia para a pesquisa de ácidos orgânicos na urina mostrou grande aumento de ácido benzoico.

Os exames laboratoriais do paciente 12.2 mostravam anemia leve persistente, microcítica, associada a neutropenia moderada. Foi diagnosticado como portador de diabetes melito tipo 2 aos 33 anos de idade.

Os exames laboratoriais do paciente 12.3 mostraram anemia microcítica, neutropenia grave recorrente, TSH levemente aumentado com T4 livre normal, CPK, DHL, AST e lactato arterial levemente elevados. A anemia foi parcialmente responsiva à reposição de ferro.

Exames laboratoriais da paciente 12.4 mostraram anemia microcítica leve e persistente, associada a trombocitopenia, sem neutropenia, TSH levemente elevado com T4 livre normal, leve hiperamonemia e CPK, aldolase e lactato levemente aumentados. O exame do líquido cefalorraquidiano aos 9 anos de idade foi normal, exceto por lactato no limite superior da normalidade. Cromatografias de aminoácidos séricos e de ácidos orgânicos urinários foram normais.

5.1.13.5 Encefalomioneuropatia relacionada a *FDX2* – aspectos da biópsia muscular

Os pacientes 12.1 e 12.2 foram submetidos a biópsia de músculo, realizada e analisada pela Prof. Gurgel-Giannetti. Ambos apresentaram fibras vermelhas rasgadas, SDH e COX negativas. As alterações eram mais intensas na paciente 12.1, na qual as fibras SDH- e COX-negativas eram agrupadas em áreas “patch-like” (Figura 26). Coloração específica para ferro demonstrou acúmulos puntiformes de ferro nestas mesmas fibras.

A microscopia eletrônica revelou inclusões paracristalinas mitocondriais em numerosas fibras. Nestas fibras inclusões irregulares eletrondensas frequentes foram identificadas e representam presumivelmente depósitos de ferro na mitocôndria.

A análise imuno-histoquímica das subunidades dos complexos mitocondriais II e IV mostraram significativa redução da expressão nas fibras com baixa atividade enzimática SDH e COX, enquanto a massa mitocondrial estava aumentada, conforme revelado pelo marcador mitocondrial VDAC1

Os pacientes 12.3 e 12.4 não foram submetidos à biópsia muscular.

Figura 26 - Biópsia de músculo dos pacientes 12.1 e 12.4. Painéis A-B: amostras coradas com tricromo de Gomori demonstrando fibras vermelhas rasgadas; painéis C-D: coloração SDH-positivas; painéis E-F: fibras COX-negativas

5.1.13.6 Encefalomioneuropatia relacionada a *FDX2* – aspectos genéticos

Foi realizado o mapeamento de homozigose em todo o genoma de todos os pacientes desta família, o que revelou duas regiões de homozigose, uma região de 1Mb no cromossomo 19 (Chr19:9400194-10492040) e uma região de 500kb no cromossomo 2 (Chr2:89469319-89994709).

Foi então realizado o WES, limitando a análise a variantes raras, em homozigose, que não eram sinônimas ou intrônicas, e que mapeavam dentro das regiões de homozigose previamente identificadas. Assim a única variante encontrada foi em *FDX2* (NM_001031734 c.431C>T, p.Pro144Leu), previamente chamado de *FDX1L*. Esta variante não foi encontrada nas bases de dados ExAC ou 1000G, mas foi encontrada em heterozigose em um de 600 controles da base de dados brasileira ABraOM (Naslavsky et al., 2017).

Esta variante foi validada pelo sequenciamento Sanger, confirmando que todos os afetados eram homozigotos e os progenitores heterozigotos. A variante *FDX2* p.Pro144Leu afeta um resíduo altamente conservado que é idêntico em todos os mamíferos com um gene ortólogo e em invertebrados.

A validação funcional da variante encontrada foi feita por “real-time RT-PCR” em amostras de músculo dos pacientes, comparando com dois indivíduos normais. Não foram identificadas diferenças na expressão de RNAm entre pacientes e controles.

Para determinar se a variante patogênica afetaria a estabilidade da proteína, foram examinados os níveis da proteína *FDX2* no músculo da paciente 12.1 e de um controle. Esta avaliação revelou uma significativa redução dos níveis de *FDX2* na paciente, promovendo evidência adicional de que a variante *FDX2* p.Pro144Leu é patogênica.

A paciente 12.4, que tinha atraso dos desenvolvimento neuropsicomotor e características dismórficas que não foram observadas nos outros pacientes, foi avaliada também por cariótipo. Este revelou uma tetrassomia do braço curto do cromossomo 9, cariótipo:46,XX,+i(9)(p10). O cariótipo de seus pais também foi analisado e era normal.

5.1.13.7 Encefalomioneuropatia relacionada a *FDX2* – um novo fenótipo

Assim, podemos resumir o fenótipo como uma síndrome composta de: atrofia óptica congênita; episódios recorrentes de mialgia e fraqueza proximal desencadeados por frio, infecções ou exercícios físicos, sugerindo possível rabdomiólise; miopatia proximal tardia; polineuropatia sensitivo-motora axonal crônica de início por volta de 10 a 12 anos; sinais piramidais de surgimento tardio; leucoencefalopatia reversível ou parcialmente reversível; anemia microcítica com neutropenia ou trombocitopenia; e hipotireoidismo subclínico. Diabetes talvez seja parte do quadro clínico, de início na idade adulta e a biópsia muscular mostra fibras vermelhas rasgadas, SDH e COX negativas, com acúmulo de ferro (Figura 27).

Figura 27 - Possível história natural da doença relacionada a *FDX2*: características clínicas respectivas idades de início inferidas a partir da observação de 6 casos (os 4 descritas nesta tese e 2 avaliados pela equipe da UFMG). A leucoencefalopatia não foi incluída por considerarmos que a mesma é assintomática

5.2 Pacientes sem diagnóstico

Em nossa série três pacientes não relacionados permaneceram sem diagnóstico mesmo após minuciosa revisão da apresentação clínica, radiológica e dos dados do sequenciamento completo do exoma.

A paciente 29.1, filha de pais não consanguíneos, nasceu com fenda palatina e passou a apresentar tremor de MMSS a partir dos três anos de idade. Após a menarca aos 12 anos, houve piora do tremor, que passou a ser também cefálico, e iniciou distúrbio de marcha (ebriosa). Após significativo estresse psicológico aos 16 anos de idade, houve agravamento do quadro motor e mudança de comportamento, tornando-se mais apática e infantilizada. Houve lenta progressão do quadro motor e declínio cognitivo. Teve menopausa precoce aos 27 anos.

Ao exame neurológico apresentava disfunção executiva, sinal de Romberg, marcha parieto-atáxica, paraparesia espástica com força grau IV, reflexos exacerbados em MMII, sinais de Babinski Hoffman e Tromner bilateralmente,

tremor cefálico em negação, ataxia cerebelar global com componente de ataxia sensitiva sobreposto, sensibilidades profundas diminuídas em MMII, baixa acuidade visual bilateral, sacadas hipométricas e seguimento sacádico.

A RM de crânio mostrava um padrão de hipersinal da substância branca tênue em T2/FLAIR, difuso, com sinal preservado em T1 sugerindo hipomielinização.

Inicialmente pensávamos que poderia se tratar de doença da substância branca evanescente, mas nenhuma variante patogênica patogênica foi encontrada no exoma.

A paciente 30.1 era uma mulher hígida até 53 anos de idade quando iniciou quadro de alteração da marcha lentamente progressiva, com posterior acometimento de esfíncteres e declínio cognitivo. Tinha uma história muito sugestiva de herança autossômica dominante, com pelo menos três gerações de familiares acometidas.

Ao ser examinada aos 65 anos (13 anos de evolução) apresentava síndrome cognitiva caracterizada por disfunção executiva, amnésia anterógrada e apraxia ideomotora, marcha em tesoura com necessidade de apoio unilateral, paraparesia espástica e leve ataxia cerebelar global. Notavelmente, não havia hipotensão postural.

A RM de crânio mostrava hipersinal difuso em T2/FLAIR, periventricular e subcortical, sem captação de contraste ou restrição à difusão.

Por fim, o paciente 31.1 era um senhor de 73 anos que desde os 55 anos apresentava disfagia orofaríngea leve a moderada, sem progressão até os 67 anos, como sintoma isolado. Aos 67 anos, apresentou três episódios de síncope em curto espaço de tempo e, em um destes eventos, sofreu graves queimaduras em tórax, necessitando de traqueostomia e gastrostomia. Desde então não teve novos episódios de síncope, mas evoluiu com distúrbio de marcha lentamente progressivo, hipoacusia e perda visual. Desconhecia casos semelhantes na família.

Ao exame apresentava apenas ataxia cerebelar global leve, sacadas lentificadas e ausência do reflexo vestibulo-ocular. A RM de crânio mostrava hipersinal em T2/FLAIR difuso, supra e infratentorial, com infartos e micro-hemorragias. Os exames laboratoriais e o exame do líquido não apresentavam alterações significativas. O sequenciamento do exoma também não identificou variantes patogênicas.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi caracterizar uma população adulta de pacientes com doenças da substância branca de etiologia genética, acompanhados em um centro de referência para doenças neurogenéticas. Descrevemos os aspectos clínicos e neurorradiológicos enfatizando aqueles com maior valor diagnóstico e conseguimos definir o diagnóstico em 28 de 31 famílias.

Este é um grupo de doenças raras bastante heterogêneo e nossa amostra confirma este aspecto, com 13 doenças diferentes sendo identificadas em 31 famílias. A doença mais frequentemente encontrada foi a ALD/AMN-X, diagnosticada em setes famílias. Tal achado está em consonância com a literatura, dado que é a LD/LG mais comum em crianças e adultos (Ayrygnac et al., 2015; Waldman, 2018).

No entanto, é interessante notar que este grupo de pacientes com ALD/AMN-X continha três pacientes com início da doença antes dos 16 anos. Se considerarmos apenas pacientes com idade de início dos sintomas superior a 16 anos, o grupo de pacientes com VWM se torna o principal representante (com 5 pacientes provenientes de 4 famílias).

Destas 13 doenças diagnosticadas, seis afetaram apenas um paciente – doença de Alexander, ADLD, síndrome de Sjögren-Larsson, LBSL, doença relacionada a *PLP1* e síndrome de Gordon-Holmes. Duas doenças são marcadamente novas (relacionadas a *PUS3* e *FDX2*) e serão discutidas com maior profundidade nas sessões subsequentes.

Dentre as 28 famílias com diagnóstico definitivo, metade tinha história familiar de outros acometidos e metade eram de casos esporádicos, o que está relativamente em linha com a literatura (Lynch et al., 2017), que afirma serem os casos esporádicos mais frequentes.

Interessante notar que dentre os sete pacientes diagnosticados com doenças sabidamente autossômicas dominantes, quatro não apresentavam história de outros familiares acometidos (dois de três pacientes com HDLS, um de três com CADASIL e uma paciente com doença de Alexander). Isto pode se dever a três fatores: casos de mutação *de novo*, que é comum em casos de doença de Alexander; doença

autossômica dominante de penetrância incompleta, como acredita-se ser o caso da HDLS; ou não-paternidade.

Os estudos de caracterização clínica, neurorradiológica e genética de LD/LG são bastante escassos na literatura, principalmente quando buscamos por estudos em adultos (Ayrignac et al, 2015; Vanderver et al, 2016; Lynch et al, 2017). Todos têm como ponto de partida uma avaliação minuciosa da apresentação clínica e dos achados de imagem, mas diferem nas etapas de avaliação subsequentes.

Acreditamos que a escolha dos exames subsequentes nos referidos estudos foi largamente influenciada pela disponibilidade dos mesmos – como ocorreu com o nosso estudo. Assim, Ayrignac et al (2015), realizou testes bioquímicos e sequenciamento de genes específicos conforme a suspeita, mas não submeteu sua amostra à avaliação por NGS. Ainda assim, obteve diagnóstico definitivo em 98/154 (64%) pacientes.

Já Vanderver et al. (2016a), em sua amostra inicial de 191 pacientes, foi capaz de apontar um diagnóstico direto em 101 pacientes (52,8%). Para tal, além de testes bioquímicos, foi capaz de sequenciar diretamente vários genes candidatos, como *EIF2B1-5*, *PLP1* ou *GFAP*. Assim, a amostra restante que foi encaminhada para NGS (71 pacientes) já tinha sido submetida a uma investigação mais ampla do que a nossa casuística. Destes 71, 25 obtiveram um diagnóstico final (35%).

Estas diferenças no protocolo de investigação ajudam a explicar como obtivemos uma taxa de diagnósticos mais alta (28/31 ou 90% dos casos). Utilizamos o protocolo sugerido por Ahmed et al. (2014) e tínhamos um repertório limitado de genes a serem testados individualmente (apenas *GFAP*, *LMNB1* e *ALDH3A2*). Assim, na etapa de avaliação por exoma clínico, obtivemos uma alta taxa de diagnósticos, 13/18 pacientes ou 72%.

Destes 18 pacientes submetidos à avaliação por exoma clínico, 16 foram aninhados à coorte inglesa da *University College London* e estão publicados na revista *Brain* (Lynch et al., 2017). Onze dentre os 26 pacientes que obtiveram diagnóstico final presentes nesta publicação são nossos pacientes. São eles: três pacientes com CADASIL, quatro com VWM e um paciente com cada um dos seguintes diagnósticos: doença relacionada a *PLP1*, LBSL, HDLS e síndrome de Gordon-Holmes. Optamos por excluir desta publicação os pacientes com diagnóstico

bioquímico, em conformidade com os critérios adotados pela instituição inglesa. Dois pacientes (16.1 e 17.1) que foram submetidos à avaliação por exoma clínico e que tiveram diagnóstico final de HDLS não foram incluídos no referido artigo, pois foram avaliados após a publicação.

Cinco probandos foram avaliados por sequenciamento completo do exoma e três continuaram sem diagnóstico. Dois destes tinham características que nos faziam suspeitar fortemente de uma etiologia genética – uma paciente com início precoce dos sintomas e uma paciente com mais familiares acometidos – e ainda assim permaneceram sem diagnóstico.

Os motivos que podem explicar a incapacidade do exoma completo de diagnosticar estes pacientes são variados. Existem as limitações relacionadas ao próprio método – não avaliar regiões intrônicas ou variantes patogênicas por expansão de trinucleotídeos, e sua capacidade limitada de avaliação de variação no número de cópias. Podem se tratar de doenças adquiridas ou genéticas de origem poligênica ou mesmo de origem em variantes patogênicas de DNA mitocondrial (que não foi avaliado em nossos pacientes). Pode-se ainda especular que possuam variantes patogênicas ainda não relacionadas LD/LG. A avaliação de trios (DNA dos progenitores e do probando) poderia fornecer dados relevantes, mas infelizmente não foi possível para estes pacientes. Reavaliações futuras de seus dados ou a avaliação por sequenciamento completo do genoma poderão ajudar a elucidar estes casos.

As famílias que obtiveram diagnóstico por sequenciamento completo do exoma (as diagnosticadas com variante patogênica em *FDX2* ou *PUS3*), foram excluídas do primeiro artigo que participamos e foi publicado na revista *Brain* (Lynch et al. 2017) por motivos distintos. A família portadora da variante patogênica em homozigose em *FDX2* foi propositalmente excluída para maior investigação do papel da variante suspeita no quadro, tendo em vista que é um fenótipo completamente diferente do descrito anteriormente relacionado ao mesmo gene. Naquele momento não tínhamos elementos suficientes (estudos funcionais) para afirmar que era aquele o gene responsável pelo quadro.

Já a família posteriormente diagnosticada com a variantes patogênicas em *PUS3* encontra-se publicada no suplemento do artigo de Lynch et al. (2017), na tabela com os casos sem diagnóstico final (são as pacientes N48 e N49 da referida

tabela). O diagnóstico só foi feito após reanálise do exoma completo, ao filtrar os dados por variantes deletérias heterozigotas compostas. Cumpre salientar que o primeiro artigo associando *PUS3* a qualquer fenótipo em humanos data de 2016 (Shaheen et al., 2016).

O caso desta família com variantes patogênicas em *PUS3* ilustra bem uma grande vantagem do sequenciamento completo do exoma sobre a avaliação por painéis de genes: a possibilidade de reanálises futuras dos dados. Os painéis de genes não oferecem esta possibilidade. Possuem ainda uma outra desvantagem: dado o crescente número de genes identificados relacionados às LD/LG, os painéis podem se tornar rapidamente obsoletos ou incompletos.

Algumas doenças que frequentemente são citadas em artigos de revisão sobre LD/LG não foram identificadas na nossa casuística. Nos referimos especificamente sobre a ausência de pacientes com leucodistrofia metacromática ou doença de Krabbe – que também foram muito raras em populações de adultos com LD/LG (Ayrignac et al. 2015).

Obviamente, são doenças muito raras em adultos e este não é um estudo populacional capaz de alcançar uma amostra significativa. Mas suspeitamos que talvez estas doenças estejam demasiadamente destacadas na literatura neurológica de pacientes adultos com LD/LG em detrimento de outras que foram mais frequentes nesta e em outras casuísticas, como VWM, HDLS e CADASIL.

6.1 Doenças mais comuns em nossa casuística

6.1.1 Adrenomieloneuropatia e adrenoleucodistrofia ligada ao X

Identificamos cinco pacientes com AMN-X e três pacientes com ALD-X e seus aspectos clínicos e neurorradiológicos em larga medida corroboram o que já está bem descrito na literatura (Engelen et al., 2012 e Kemp et al., 2016). Assim, o predomínio de sinais piramidais sobre os sinais neuropáticos e a presença de RM de crânio normais ou com discretas alterações de sinal em substância branca posterior em pacientes AMN-X, já eram esperados. O mesmo pode-se dizer dos sintomas iniciais de ALD-X semelhantes a TDAH e sua evolução catastrófica.

No entanto, alguns aspectos clínicos merecem destaque. O primeiro deles foi a observação de sintomas cognitivos em um dos pacientes com AMN-X, o que ocorre em menos de 20% dos pacientes (Moser, 1997). Ressalta-se que era o paciente com maior tempo de evolução da doença.

A insuficiência adrenal estava presente em todos os pacientes, porém subclínica em dois. Isto mostra que esta valiosa síndrome clínica, capaz de direcionar o diagnóstico, deve ser ativamente investigada, por vezes com auxílio da Endocrinologia.

Um paciente com AMN-X tinha achados laboratoriais compatíveis com insuficiência testicular, que também é uma síndrome clínica de alto valor diagnóstico, mas menos lembrada na prática. Talvez seja interessante incluir um espermograma como triagem em casos suspeitos.

Não encontramos na literatura associação entre ependimoma e ALD/AMN-X e acreditamos que a associação observada em um dos nossos pacientes com AMN-X seja espúria.

O caso mais desafiador foi, sem dúvida, o do paciente 1.2. A presença de lesão assimétrica na RM de crânio, a pobreza de sinais motores e a exuberância do quadro psiquiátrico o tornam um caso bastante atípico. Foi a história familiar, com um irmão acometido, que facilitou o diagnóstico.

6.1.2 Doença da substância branca evanescente

Identificamos cinco pacientes (4 famílias) com VWM, todos com a forma adulta da doença (início após os 16 anos). As manifestações clínicas com predomínio dos sintomas cognitivos, alteração da marcha e curso lentamente progressivo estão em linha com recente estudo publicado sobre a história natural de VWM (Hamilton et al., 2018).

Destacamos que uma das duas mulheres acometidas não teve falência ovariana precoce, e teve início bastante tardio, aos 52 anos. No estudo de Hamilton et al. (2018), a idade de início mais avançada foi de 54 anos. Sua apresentação inicial foi também bastante peculiar, com sintomas de neuralgia do trigêmeo. Não

encontramos associação semelhante na literatura, embora a presença de cefaleia seja descrita – mas com características migranasas.

Esta mesma paciente teve o diagnóstico inicial de esclerose múltipla e recebeu tratamento para tal por longo período. Tal equívoco diagnóstico não parece ser incomum, mas uma avaliação cuidadosa da RM de crânio pode fazer o diagnóstico correto. Segundo Ayrignac et al. (2016b), as principais diferenças são: somente pacientes com esclerose múltipla apresentam lesões ovoides perpendiculares ao ventrículo lateral e lesões puntiformes justacorticais (100% em esclerose múltipla e 0% em VWM); cerca de metade dos pacientes com VWM apresentam lesões infratentoriais simétricas, o que não foi observado em pacientes com esclerose múltipla. Na nossa paciente faltavam as características típicas de esclerose múltipla e existiam as cavitações e rarefação de substância branca supratentorial, assim como o acometimento simétrico de tronco, em tegmento da ponte.

Outro aspecto clínico que nos chamou a atenção neste grupo de pacientes foram as piores relacionadas a traumatismo cranioencefálico, relatado em quatro dos cinco pacientes, mas a ausência de relatos de agravamentos por febre. Segundo Hamilton et al. (2018), febre foi um fator agravante mais comum do que trauma.

Com relação aos aspectos genéticos, identificamos uma família com variante patogênica em *EIF2B4* e três famílias com variante patogênica em *EIF2B5*, o gene mais comumente implicado em VWM (Labauge et al., 2009 e Hamilton et al., 2018). Dois pacientes eram homozigotos para a variante mais comumente descrita (p.Arg113His), que tipicamente não causa doenças em crianças.

No entanto, não podemos afirmar que os fenótipos produzidos por esta variante patogênica sejam brandos, pois ambos os pacientes apresentavam limitações funcionais significativas principalmente por seus sintomas cognitivos. Lei H et al. (2010) considerou os pacientes homozigotos para esta variante patogênica como portadores de fenótipos mais brandos baseando-se na idade de início dos sintomas e no tempo para tornar-se cadeirante. Dentre os nossos três pacientes com variante patogênica em *EIF2B5*, foi a paciente heterozigota composta a que apresentou o fenótipo mais brando, com início mais tardio e sintomas mais leves (neuralgia do trigêmeo).

6.1.3 Acidúria L2-hidroxiglutárica

Identificamos três famílias (quatro pacientes) com L2HGA. Os quatro pacientes tiveram início precoce e curso protraído da doença, conforme esperado nesta condição. Interessante notar que, ao contrário das demais acidopatias orgânicas, a L2GHA não apresenta descompensações agudas e os pacientes podem chegar à idade adulta sem diagnóstico.

Dentre os aspectos clínicos, destacamos a presença de movimentos anormais em três pacientes. Duas irmãs apresentavam distonia em mãos e careteamento, achado raro, mas já descrito (Marcel et al, 2012). Uma delas apresentava tremor cefálico e o outro paciente apresentava hemidistonia e distonia cervical em retrocolo. Os movimentos anormais podem ser o sintoma a desencadear uma nova investigação na vida adulta e levar ao diagnóstico (Termsarasab e Frucht, 2014).

Uma dentre quatro pacientes desenvolveu glioblastoma multiforme. Algumas particularidades deste caso incluem o fato de que a paciente não tinha diagnóstico de L2HGA até apresentar os sintomas decorrentes do tumor – afasia e hemiparesia –, e a idade avançada em que o tumor foi diagnosticado (45 anos).

A maioria dos pacientes reportados com L2HGA que apresentaram tumor de SNC eram mais jovens quando do diagnóstico (Patay et al. 2012 e Patay et al, 2015). Este mesmo autor acredita que provavelmente a incidência de tumores em L2HGA seja alta – ao redor de 40%. A presença de um caso dentre quatro na nossa pequena série, reforça esta impressão.

O tipo histológico encontrado é variável, nem sempre sendo gliomas de alto grau, mas outros pacientes já foram reportados com glioblastoma multiforme (Patay et al., 2012).

O mecanismo pelo qual a L2HGA aumenta a incidência de tumores de SNC ainda não é conhecido, mas é interessante notar que a mesma doença é simultaneamente mielinotóxica e tumorigênica. Também não há associações formuladas na literatura entre o genótipo e o maior ou menor risco de tumores.

6.1.4 Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides

A HDLS faz parte do pequeno grupo das doenças relacionadas à micróglia (junto com a doença de Nasu-Hakola). Identificamos três pacientes com HDLS, cerca de 9% da nossa série, prevalência comparável às encontradas em por Guerreiro et al. (2013) e Lynch et al. (2015). Confirmamos, portanto, HDLS como uma das principais LD/LG do adulto.

Embora a número de casos seja muito pequeno para qualquer inferência, destacamos que a paciente que teve início dos sintomas antes dos 40 anos teve progressão mais rápida da doença, evoluindo para óbito após 5 anos. A sobrevida média da HDLS é de 6,8 anos (Konno et al., 2017).

Esta mesma paciente (18.1) foi a primeira paciente a receber o diagnóstico de HDLS em nosso serviço. Inicialmente pensávamos tratar-se de um caso de síndrome de Labrune, pela presença de cavitações e calcificações nos exames de imagem. No entanto, avaliando retrospectivamente, observamos que as cavitações e calcificações presentes em nossa paciente são pequenas e periventriculares, como tipicamente descrito em HDLS (Konno et al., 2017). Por outro lado, a síndrome de Labrune tipicamente apresenta calcificações grosseiras e cistos exuberantes (Labrune et al., 1996).

As outras duas pacientes apresentaram-se com quadro cognitivo-comportamental que, num primeiro momento, lembram degeneração lobar frontotemporal, variante comportamental. No entanto, a RM de crânio com alterações da substância branca frontoparietal, bilateral e o acometimento de corpo caloso nos direcionaram para a hipótese diagnóstica correta.

CSF1R codifica um receptor de superfície celular que é altamente expresso em células da linhagem mielóide, incluindo a micróglia do SNC (Stanley e Chitu, 2014). Tal receptor possui domínios extracelular, transmembrana e intracelular, sendo este um domínio tirosina-quinase. A ativação deste receptor leva à ativação de uma série de vias secundárias, essenciais para a sobrevivência, diferenciação e proliferação da micróglia. A maioria das variantes patogênicas descritas até hoje, são mutações por trocas simples de aminoácido no domínio tirosina-quinase do *CSF1R* (exons 12-21) (Konno et al., 2017).

Encontramos três novas variantes patogênicas, todas no domínio tirosina-quinase (entre os exons 12-22), mas curiosamente apenas uma por troca simples de aminoácido (paciente 18.1, c2570C>T; p.Pro857Leu). Esta paciente está reportada na nossa publicação com o grupo da Queen Square (Lynch et al., 2017). A paciente 16.1 apresentava mutação por mudança do sítio de formatação (“frameshift mutation”) no exon 18, levando a perda de função. Já a paciente 17.1 apresentava mutação em sítio de “splicing” no exon 20, com consequência desconhecida sobre a proteína, mas presumimos também perda de função. Todas as variantes identificadas presumivelmente levam à formação de proteínas truncadas e à haploinsuficiência de *CSF1R*, como ocorre nas variantes patogênicas já previamente associadas à doença (Stabile et al., 2016).

6.1.5 CADASIL

Identificamos três pacientes com CADASIL, sendo este um dos diagnósticos mais frequentes. Acreditamos que sua prevalência possa ser ainda maior, pois sendo um diagnóstico relativamente mais conhecido dos neurologistas gerais, podem existir casos que não nos foram referenciados e continuam em seguimento nos ambulatórios de cefaleia ou neurologia vascular ou cognitiva.

Com relação aos aspectos clínicos, uma paciente não tinha história familiar, o que possivelmente se deve ao fato de ser ela portadora de mutação *de novo* ou de imprecisões na história familiar. Um paciente recebeu diagnóstico prévio de acidente vascular encefálico isquêmico secundário a forame oval patente e foi submetido a fechamento do mesmo. Isto ocorreu mesmo com uma história familiar claramente sugestiva de doença autossômica dominante.

O paciente 19.1 apresentava uma enxaqueca particularmente grave, com dores muito intensas e frequentes. Apresentava também aura complexa, com manifestações motoras e sensitivas graves, por vezes prolongadas – muitas vezes difícil de distinguir de um novo evento isquêmico. Foi refratário a todos os tratamentos profiláticos medicamentosos para enxaqueca disponíveis à época.

Importante ainda ressaltar que este é o único grupo de pacientes em que há hipersinal em T2 e FLAIR em polos temporais. No entanto, este não é um achado

universal, pois o paciente 19.1, mesmo após dez anos de doença, não apresentava esta alteração (Lynch et al., 2017).

6.2 Doenças com apenas um paciente diagnosticado

6.2.1 Doença de Alexander

A paciente que diagnosticamos com doença de Alexander do adulto é um exemplo de correlação genótipo-fenótipo levando ao diagnóstico correto. Obviamente a raridade da condição a torna mais difícil de ser lembrada pelo neurologista geral. A apresentação assimétrica e a ausência de uma clara história familiar podem atrasar a hipótese de uma doença genética, mas a avaliação meticulosa particularmente da RM de crânio permitiu o diagnóstico correto (Graff-Radford et al., 2014; Leite et al., 2014).

A história de uso de tabaco e bebidas alcoólicas poderia também induzir ao diagnóstico equivocado de síndrome de Marchiafava-Bignami, embora esta tenha um padrão de acometimento de substância branca diferente, com predomínio parieto-occipital e lesão de corpo caloso (Lucato et al., 2015). Conforme comentamos na revisão de literatura da presente tese, a presença de tremor palatal poderia sugerir o diagnóstico, mas sua ausência não exclui a possibilidade de doença de Alexander, como comprova o caso da nossa paciente.

Ressaltamos ainda que encontramos uma variante patogênica nova que (p.Arg270Pro), como a maioria das mutações previamente descritas, é por troca simples de aminoácido. O mecanismo patogênico de todas as variantes patogênicas descritas até o momento parece ser por ganho tóxico de função da proteína filamentar glial ácida, a principal proteína filamentar intermediária de astrócitos maduros (Prust et al., 2011). No entanto, o mecanismo exato que leva à doença ainda não é completamente compreendido. Infelizmente não tivemos oportunidade de realizar estudos funcionais. Também não tivemos acesso a amostras do DNA dos pais, para averiguar se a paciente era portadora de fato de evento mutacional *de novo*, como a maioria dos pacientes com doença de Alexander, ou não.

Como dicas para prática clínica, podemos deduzir deste caso que a doença de Alexander do adulto deve figurar nas listas de diagnóstico diferencial das LD/LG, bem como nas de paraparesias espásticas e ataxias-espásticas (de Bot et al., 2012).

6.2.2 Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula e elevação de lactato – LBSL

A paciente que diagnosticamos como portadora de LBSL também figura entre aqueles pacientes em que a apresentação clínica e particularmente a imagem de RM de crânio permitem a formulação de hipótese diagnóstica antes da testagem genética.

O início precoce e a evolução lenta, chegando à vida adulta ainda deambulando, mesmo que com apoio, estão em consonância com a descrição original da doença (van der Knaap et al., 2003). Os achados de RM de crânio em fossa posterior são muito característicos, principalmente o acometimento bilateral e simétrico dos tratos intraparenquimatosos do nervo trigêmeo. Tal achado associado a leucoencefalopatia supratentorial difusa, acometimento de pirâmides bulbares, colunas posteriores da medula espinhal, núcleos denteados do cerebelo e pico de lactato na espectroscopia praticamente selam o diagnóstico (van der Knaap et al., 2003).

Curiosamente, não é comum o achado de elevação de lactato medido no líquido (Labauge et al., 2007), assim como não havia em nossa paciente. Esta também não apresentava elevação de lactato na espectroscopia – o que não afasta o diagnóstico. Outro aspecto interessante do presente caso é que, apesar de os pais referirem consanguinidade, a variante encontrada foi em heterozigose composta, como ocorre na maioria dos casos descritos até o momento. Acredita-se que as variantes patogênicas em homozigose possam ser letais ou gerarem fenótipos mais graves (Köhler et al., 2015).

6.2.3 Síndrome de Sjögren-Larsson

Identificamos um paciente adulto com síndrome de Sjögren-Larsson com o fenótipo típico desta doença, uma síndrome neurocutânea de início precoce. Apesar

de se apresentar com a tríade clássica da doença de deficiência intelectual, diplegia espástica e ictiose congênita, o diagnóstico só foi concluído tardiamente. Isto nos motivou a escrever um breve relato para lembrar a comunidade médica deste diagnóstico (Paiva et al., 2018).

Vale ressaltar que o diagnóstico na vida adulta é facilitado por estar a síndrome já completamente manifesta. Na criança, há uma sequência característica de surgimento dos sintomas: parto prematuro de criança com ictiose congênita, com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor antes de 30 meses e alterações retinianas após os 3 anos de idade (Willemsen et al., 2001 e Fuijkschot et al., 2012). Esta apresentação associada a leucoencefalopatia com presença de picos lipídicos na espectroscopia ajudam a orientar o diagnóstico.

A ictiose na síndrome de Sjögren-Larsson predomina em regiões flexoras e tende a ter aspecto liquenificado, com coloração amarelada, como vista em nosso paciente. Pode ser acompanhada por hipo-hidrose e intolerância ao calor, mas nosso paciente não apresentava estes dois últimos sintomas. Como diagnóstico diferencial de ictiose congênita podemos citar tricotiodistrofia, doença de depósito lipídico neutro, síndrome de Conradi-Hünemann-Happle, doença de Gaucher, síndrome ceratite-ictiose-surdez e síndrome de Netherton (Nagappa et al., 2017).

Nosso paciente chegou a atingir alguns marcos do desenvolvimento neuropsicomotor, com posterior regressão. Os pais não foram capazes de lembrar com exatidão sobre prematuridade e sintomas visuais na infância, o que nos leva a acreditar que talvez não fossem muito intensos. Infelizmente, o paciente não foi submetido a uma avaliação neuro-oftalmológica pormenorizada que permitisse definir a presença de maculopatia, presente na maioria dos pacientes.

As alterações retinianas típicas são depósitos cristalinos brilhantes perifoveolares associados a microcistos em fóvea e marcada redução do pigmento macular. Assim, além da baixa acuidade visual, há fotofobia (Fuijkschot et al. 2012).

Alguns achados clínicos de nosso paciente são pouco usuais, embora já tenham sido descritos: anartria, disfagia grave e crise febril na infância (Fuijkschot et al. 2012).

Os achados de RM de crânio também eram bastante característicos, com lesões em substância branca confluentes, hiperintensas em T2 e FLAIR, difusas,

afetando também o corpo caloso e poupando fibras subcorticais e região infratentorial (Willemsen et al., 2004). No entanto, a presença de alguns pontos de restrição à difusão foram um achado inesperado, para o qual não temos uma boa explicação. Já os achados de espectroscopia, deram a pista definitiva para o diagnóstico.

Salientamos que a presença de picos lipídicos anormais na espectroscopia podem ocorrer em esclerose múltipla, doença de Niemann-Pick tipo C, deficiência de dihidroxiacetona fosfato aciltransferase e algumas doenças peroxissomais. No entanto, nestas condições os picos lipídicos são menos intensos do que os observados na síndrome de Sjögren-Larsson (Nagappa et al., 2017).

Uma grande variedade de variantes patogênicas em *ALDH3A2* é descrita em homozigose e heterozigose composta, resultando em perda de atividade enzimática (Willemsen et al., 2001). A variante c.1108-1G>C, de origem paterna, foi a mais frequentemente identificada em uma coorte brasileira prévia com nove pacientes. Tal variante também foi encontrada em pelo menos um paciente espanhol e especula-se sobre possível origem comum (Auada et al., 2006). Já a variante c.798+5G>A foi descrita por Rizzo et al. (1999), em uma família de origem libanesa. Ambas variantes presumivelmente levam a proteínas anormais por deleção de aminoácidos, sendo incapazes de exercer função catalítica e consequentemente reduzindo a atividade de FALDH (De Laurenzi et al., 1996).

6.2.4 Leucodistrofia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto – ADLD

Identificamos um paciente com ADLD por meio da revisão da apresentação clínica e da imagem. A presença de disautonomia e história familiar sugestiva de herança autossômica dominante foram particularmente úteis para o diagnóstico correto neste caso.

A idade de início, a sequencia de surgimento dos sintomas, com a disautonomia precoce e o declínio cognitivo tardio, bem como a evolução lenta do nosso paciente podem ser consideradas típicas (Finnsson et al., 2015). No entanto, uma característica clínica que não havia sido previamente relatada é a polineuropatia

desmielinizante sensitiva crônica. Não encontramos outra etiologia capaz de explicar melhor este achado em nosso paciente, tornando-se tentador especular que tal neuropatia periférica seja secundária à ADLD.

Do ponto de vista neurorradiológico, podemos considerar os achados de RM de crânio, coluna cervical e torácica também sugestivos da doença. Destacamos que o acometimento de medula, particularmente cervical, é um valioso achado, capaz de restringir as hipóteses diagnósticas a três principais: ADLD, LBSL e doença de Alexander.

Com relação aos aspectos genéticos é importante salientar que a variação no número de cópias (CNV) pode não ser identificada por NGS. Assim, idealmente todos os casos suspeitos de ADLD devem primeiro ser submetido a pesquisa de duplicação ou deleção em *LMNB1* por *array-CGH* ou MLPA.

De qualquer modo, vale mencionar que Pedroso et al. (2017) diagnosticaram um caso atípico de uma paciente heterozigota para variante patogênica de *LMNB1* por troca simples de aminoácido por meio de sequenciamento completo do exoma.

6.2.5 – Síndrome de Gordon-Holmes

Identificamos um paciente com a combinação incomum de declínio cognitivo, ataxia cerebelar, coréia, hipogonadismo hipogonadotrófico e leucoencefalopatia difusa que teve diagnóstico de doença neurodegenerativa relacionada a *RNF216* por meio do exoma clínico.

A característica clínica de maior valor diagnóstico neste caso é sem dúvida a presença de hipogonadismo hipogonadotrófico. Até o momento, apenas quatro genes foram relacionados a associação de ataxia e hipogonadismo hipogonadotrófico: *RNF216*, *POLR3A*, *PLOR3B* e *PNPLA6* (Margolin et al., 2013; Wolf et al., 2014; Synofzik et al, 2014). No entanto, o hipogonadismo pode ser subclínico e merece ser ativamente pesquisado em pacientes com ataxia ou coréia ou demência ou leucoencefalopatia difusa de etiologia indeterminada (Santes et al., 2015).

A associação de hipogonadismo hipogonadotrófico e coréia é ainda mais rara, sendo relacionada a apenas dois genes: *RNF216* e *NKX2-1* (Balicza et al., 2018). Já a associação de demência e coréia, além da doença de Huntington, tem um diagnóstico

diferencial mais amplo, podendo ser causada por variantes patogênicas em *C9orf72*, *TBP* (SCA17 ou “Huntington-like disease” (HDL) 4), *PRNP* (HDL1), *JPH3* (HDL1), *ATNI* (atrofia dentatorubropalidolusiana - DRPLA), entre outros. A DRPLA seria um diagnóstico diferencial importante para o nosso caso, pois também causa leucoencefalopatia difusa.

Salientamos a ocorrência simultânea de ataxia cerebelar e coréia em nosso paciente, que já havia sido notada previamente em outros casos, embora nem sempre destacada (Santes et al., 2015).

Variantes patogênicas em *RNF216* já foram relacionadas à síndrome 4H (Ganos et al., 2015), mas com achados de RM de crânio distintos. No nosso paciente não encontramos alterações de denteição, nem alterações de imagem sugestivas de hipomielinização.

Os achados de RM de crânio de nosso paciente em muito se assemelham aos descritos na literatura (Santes et al., 2015; Ganos et al., 2015), com leucoencefalopatia difusa confluenta, acometimento de ponte, cerebelo e núcleos da base, bem como atrofia cortical e cerebelar.

6.2.6 Doença relacionada a *PLP1*

Identificamos um paciente com uma nova variante patogênica em *PLP1*. Tratava-se de um adulto jovem, sem história familiar e com apresentação bastante incomum, cujo o diagnóstico só foi possível pelo exoma clínico.

Cumpramos salientar que o isossinal da substância branca em T1 pode facilmente passar despercebido e a hipótese de uma LD/LG hipomielinizante não ser cogitada. Neste caso isto ocorreu e desviou nossa atenção para possíveis etiologias tóxicas (Filley, 2015). O acometimento difuso em T2 nos fez considerar intoxicação por tolueno, mas não havia história de exposição.

A identificação da hipomielinização é muito importante, pois pode orientar a pesquisa genética para os seguintes genes: *PLP1*, *GJC2*, *TUBB4A*, *POLR3A*, *PLOR3B*, *CLCN2*, *NKX6-2* (Lynch et al., 2018). O aspecto tigróide da substância branca por vezes observado em crianças com PMD não parece ser específico de PMD nem tampouco comum em adultos (Rubegni et al., 2017).

Pouco se sabe sobre outras características distintivas de RM de crânio capazes de reduzir ainda mais a lista de diagnósticos diferenciais de LD/LG hipomielinizante, principalmente em adultos. Exceção apenas para doença relacionada a *TUBB4A* que, além da hipomielinização, pode apresentar atrofia de cerebelo e gânglios da base (síndrome H-ABC). Entretanto, há relatos de adultos com hipomielinização sem alterações de cerebelo e gânglios da base (Lu et al., 2017).

Clinicamente, a associação de paraparesia espástica, ataxia cerebelar e demência em um homem adulto poderia ser melhor enquadrada no diagnóstico diferencial das paraplegias espásticas hereditárias (“hereditary spastic paraplegia” – HSP) complicadas. No entanto, nos chamou a atenção o nistagmo evocado pelo olhar e o tremor cefálico em negação, semelhante ao titubeio descrito na forma clássica da doença de Pelizaeus-Merzbacher.

Assim, concordamos com a observação feita por Hobson e Kamholz (2013) sobre a dificuldade de distinguir uma forma tardia de PMD de uma forma complicada de SPG2. Acreditamos que casos como este geram argumentos para uma revisão de nomenclatura, talvez tendo o genótipo como base, conforme discutimos na revisão de literatura desta tese.

6.3 Novas contribuições

6.3.1 Deficiência intelectual autossômica recessiva 55 (relacionada a *PUS3*)

Identificamos duas irmãs com uma forma sindrômica de deficiência intelectual (DI) relacionada a *PUS3*, que estavam em acompanhamento em nosso serviço desde a primeira infância, mas que obtiveram diagnóstico definitivo somente na idade adulta.

DI pode ser causada por variantes patogênicas em diversos genes, que afetam diversos grupos proteicos. Isto sugere que numerosos processos biológicos críticos e não-redundantes desempenham funções na cognição normal. Um dos processos envolvidos parece ser o da modificação do RNAt, pois há uma lista crescente de

genes humanos implicados em DI que atuam neste processo: *FTSJ1*, *TRMT1*, *NSUN2*, *WDR4*, *ADAT3* e *PUS3* (Torres et al., 2014).

PUS3 codifica uma enzima altamente conservada da família das pseudouridilases que catalisa a formação de pseudouridina em resíduos específicos de uridina no RNAt. Tal modificação ocorre após a transcrição e é considerada crítica para estrutura, função e estabilidade do RNAt (Hur e Stroud, 2007).

A primeira família descrita por Shaheen et al (2016) com DI relacionada a *PUS3* era composta por três indivíduos sauditas de 3 a 15 anos com DI grave e alterações difusas da substância branca. Um paciente apresentava epilepsia e nenhum apresentava nefropatia. O sequenciamento completo do exoma detectou variante “nonsense” em homozigose (p.Arg435*), que levava a perda de função da proteína.

Nossas pacientes apresentavam uma forma mais leve de DI, se comparada à família saudita, e proteinúria/síndrome nefrótica de início após os 20 anos. Já os aspectos dismórficos descritos são bem semelhantes nas duas famílias. Sem dúvida, será muito interessante acompanhar se os pacientes da família original irão desenvolver alterações renais. Entramos em contato com o Prof. Fowzan S. Alkuraya, coautor da descrição original, e o mesmo afirmou que até o momento nenhuma anormalidade renal havia sido detectada.

Assim, acreditamos que o acometimento renal tardio observado em nossas pacientes amplia o fenótipo da doença relacionada a *PUS3*. Interessante notar que há raros relatos de associação de glomerulopatia (GEFS) resistente a corticoesteróides e variantes patogênicas em RNAt mitocondrial (Hotta et al., 2001; Guéry et al., 2003; Scaglia et al., 2003; Dinour et al., 2004). Também tubulopatia já foi relacionada a enzima envolvida na modificação do RNAt pós-transcrição (Edvardson et al., 2017).

Nossas observações ampliam o espectro fenotípico e alélico da doença relacionada a *PUS3*, bem como geram evidência adicional do papel da modificação pós-transcricional do RNAt nas doenças neurológicas, especialmente DI e LG.

6.3.2 Encefalomioneuropatia relacionada a *FDX2*

Identificamos uma família com uma condição nova, de início na infância, com características clínicas, radiológicas e patológicas incomuns. O sequenciamento completo do exoma permitiu identificar como causa uma variante patogênica em *FDX2*. Este achado foi validado pela análise de segregação e pela demonstração de quase completa ausência da proteína *FDX2* no tecido muscular dos pacientes afetados.

Por meio da avaliação conjunta desta família e da família estudada pela equipe da UFMG com apresentação semelhante, dada a presença de crianças e adultos acometidos, podemos inferir a história natural da doença. Clinicamente caracteriza-se por atrofia óptica e nistagmo de início precoce, antes dos três anos de idade. Na primeira ou na segunda década de vida, iniciam-se episódios recorrentes de mialgia e fraqueza muscular proximal desencadeada por infecções ou frio, com miopatia proximal progressiva. Polineuropatia axonal sensitivo-motora surge na segunda década ou na vida adulta, levando a fraqueza distal.

Uma leucoencefalopatia assintomática reversível ou parcialmente reversível surge na primeira infância e desaparece ao fim da primeira década. Anemia microcítica pode estar presente desde a primeira década, acompanhada ou não de leucopenia por neutropenia ou plaquetopenia. Na idade adulta surgem complicações endocrinológicas – hipotireoidismo subclínico e diabetes melito.

Curiosamente, existem pelo menos mais dois relatos de pacientes com variante patogênica em *FDX2*, ambos com fenótipo mais brando de rabdomiólise recorrente e miopatia mitocondrial, com a mesma variante em códon de início (c.1A>T), mas sem os demais achados que encontramos em nossos pacientes (Spiegel et al., 2014 e Lebigot et al., 2017). Presume-se que tal variante levaria a perda de expressão de *FDX2*. Em nossos pacientes demonstramos uma significativa redução da expressão de proteína no tecido muscular, apesar da quantidade normal de RNAm. Tal redução sugere instabilidade ou excesso de degradação da proteína anormal decorrente da variante que encontramos.

A leucoencefalopatia é encontrada em outros distúrbios da biogênese [Fe-S], como em variantes patogênicas de *NFUI* e *NUBPL*. Alguns portadores de

variante patogênica em *NUBPL* apresentam melhora progressiva das alterações em corpo caloso e substância branca cerebral, mas com concomitante piora clínica (Kevelam et al., 2013). Em nossos pacientes observamos melhora progressiva das alterações em substância branca, tálamos e tronco encefálico, sugerindo uma leucoencefalopatia reversível ou ao menos parcialmente reversível.

Uma explicação possível para tal reversibilidade é a presença de edema intramielínico (hipersinal em T2 associada a restrição à difusão) presente em nossos pacientes e também encontrado em outras leucoencefalopatias reversíveis, como *MLC1*, *HEPACAM* e *CLCN2* (Depienne et al., 2013).

Interessante notar que tal leucoencefalopatia foi assintomática, pois nenhuma criança apresentou sinais de acometimento de SNC (além da atrofia óptica) enquanto apresentavam lesões na RM de crânio. Entretanto, dois pacientes adultos apresentavam sinais piramidais leves, sem alterações de imagem que os justificassem. Tais sinais permanecem inexplicados e esperamos que o seguimento destes pacientes nos ajude a elucidá-los.

Os achados anatomo-patológicos de biópsia muscular de nossos pacientes são também bastante incomuns. Tipicamente, pacientes portadores de miopatias mitocondriais apresentam fibras vermelhas rasgadas que na coloração por tricromo de Gomori são SDH-positivas e COX-negativas (Di Mauro e Gurgel-Giannetti, 2005). No entanto, nossos pacientes apresentavam alterações focais de fibras SDH- e COX-negativas. Tal achado é consistente com a função da proteína FDX2 na formação dos complexos respiratórios I-III e produção do heme A para o complexo respiratório IV (Sheftel et al., 2010).

Já a coloração para depósitos de ferro e a microscopia eletrônica mostraram inclusões mitocondriais que presumivelmente continham ferro. Esta combinação de acúmulo de ferro e fibras SDH- e COX-negativas também é encontrada em pacientes com miopatia por variante patogênica em *ISCU* (Olsson et al., 2008 e Kollberg et al., 2009). Tais semelhanças sugerem que *ISCU* e *FDX2* são importantes para a homeostase do ferro celular (Paul e Lill, 2015).

Cumprе destacar que a paciente 12.4 apresentava deficiência intelectual e características dismórficas que acreditamos ser devidas a síndrome de tetrassomia do

9p. Tais achados também foram encontrados em uma série de casos desta doença (El Khattabi et al., 2015).

Defeitos na biogênese do “cluster” [Fe-S] vêm sendo reconhecidos como causadores de doenças neurológicas. Seu papel crítico na função mitocondrial é exemplificado pela variedade de sinais e sintomas neurológicos, afetando SNC e SNP nestes pacientes. O estudo desta família permitiu comprovar o papel importante de *FDX2* para a mitocôndria e as características da síndrome relacionada a sua variante patogênica.

6.4 Painel de genes, exoma clínico e exoma completo

Na próxima sessão discutiremos uma proposta de algoritmo de investigação dos casos suspeitos de LD/LG, mas antes cumpre discutir as vantagens e desvantagens de cada método de investigação genética.

No presente estudo, utilizamos sequenciamento pelo método Sanger ou “array-CGH” quando havia um único gene candidato, sequenciamento do exoma clínico e sequenciamento completo do exoma. Existem ainda os painéis diagnósticos que utilizam NGS que, embora não tenham sido utilizados neste estudo e dada a sua crescente popularidade, merecem uma breve consideração.

O tradicional sequenciamento pelo método Sanger é amplamente disponível para uso clínico. Utiliza a técnica de reação da polimerase em cadeia (“polymerase chain reaction” - PCR) para amplificação da região gênica de interesse e seu posterior sequenciamento. Os íntrons distantes dos éxons e as regiões promotoras não são rotineiramente avaliadas. É uma técnica de alta acurácia e interpretação clara, porém só possibilita testar um gene por vez e não é nem custo nem tempo-eficiente se a probabilidade pré-teste de um resultado positivo for baixa. Caso sejam pedidos testes de forma sequencial, seu custo pode rapidamente ultrapassar os custos dos exames que utilizam a técnica de NGS.

No presente estudo realizamos o sequenciamento Sanger de gene suspeito ou “array-CGH” em quatro casos e, conforme esperado, naqueles em que a probabilidade pré-teste era alta, ou seja, com apresentação clínica muito sugestiva, confirmamos o diagnóstico. Foram três pacientes, com as seguintes suspeitas: doença

de Alexander e síndrome de Sjögren-Larsson confirmados por sequenciamento sanger e ADLD confirmado por “array-CGH”. Já na paciente em que não obtivemos diagnóstico, a suspeita de ADLD era baixa, mas mesmo assim realizamos o “array-CGH” em busca da duplicação ou deleção em *LMNB1*, que foi negativa.

Os painéis de genes, o sequenciamento do exoma clínico e o sequenciamento do exoma completo são exames baseados na técnica de NGS. Esta técnica consiste em fragmentar o DNA, ampliá-lo e selecionar os exons de múltiplos genes de interesse para sequenciamento.

Os painéis de genes estão se tornando rapidamente mais disponíveis e a custos acessíveis para uso clínico em todo o mundo, sendo em geral o exame por NGS mais barato. São uma boa opção quando estamos diante de fenótipos superponíveis, sendo bastante acurados e de fácil interpretação. No entanto, é importante observar quais genes serão examinados por determinado painel, pois podem diferir de um serviço para o outro. Ainda, tais painéis não permitem reanálise em busca de novos genes e têm outra limitação importante – saber se o painel solicitado foi o painel correto.

Assim, os painéis podem ser muito úteis em alguns casos. Por exemplo, casos suspeitos de VWM, doença na qual cinco genes podem estar implicados e o sequenciamento Sanger seria custoso e demorado. Também em casos suspeitos de CADASIL, mas sem história familiar, pois haveria o diagnóstico diferencial com CARASIL ou CARASIL. Neste caso, deve-se averiguar previamente se os genes *HTRA1* e *CTSA* constam no painel. No entanto, talvez com uma história familiar fortemente sugestiva de doença autossômica dominante, a pesquisa direta de mutação em *NOTCH3* possa ser mais custo-efetiva.

Alguns casos do presente estudo, se tivessem sido considerados para a realização de painel de genes, poderiam gerar dúvidas, principalmente por não terem uma boa hipótese clínica pré-teste. Por exemplo, que painel seria mais apropriado para os pacientes com HDLS – painel de leucodistrofias ou de demências? E para o paciente que teve como diagnóstico final doença relacionada a *PLP1* – painel de paraplegias espásticas ou de leucodistrofias? Obviamente pode-se argumentar que chegaríamos ao diagnóstico final independentemente do painel escolhido. Bastaria

que os genes identificados figurassem em ambos os painéis – fato que depende da montagem do painel.

Já o exoma clínico é uma técnica de NGS também limitada, que avalia os exons dos genes que já foram previamente implicados em doenças humanas ou considerados potencialmente patogênicos. Para tal, utiliza bases de dados como HGMD, OMIM e ClinVar. Os genes incluídos na análise dependem do fabricante do kit para o exame. No presente estudo, foi utilizado “The Agilent SureSelect Focused Exome Technique” que avalia um total de 6110 genes (12Mb de sequências exônicas).

Tal técnica é obviamente muito mais abrangente do que a utilização de painéis, eliminando o problema da escolha do painel. É uma excelente opção quando estamos diante de casos com fenótipos atípicos ou de difícil caracterização e é um exame que possui excelente relação custo-benefício. Em casos de LD/LG tem desempenho semelhante ao do sequenciamento completo do exoma, obtendo diagnóstico em quase 30% dos casos (Vanderver et al., 2016; Lynch et al., 2017).

No presente estudo, 18 pacientes foram avaliados por exoma clínico e 13 obtiveram diagnóstico definitivo nesta etapa (72%). Esta taxa mais alta de diagnósticos na nossa casuística em comparação com os estudos internacionais pode ser atribuída ao fato de muitos dos nossos pacientes não terem sido submetidos a nenhum teste genético antes do sequenciamento do exoma clínico. No estudo realizado por Vanderver et al (2016) e mesmo nos casos da coorte inglesa da UCL (comunicação pessoal), vários pacientes tinham sido previamente submetidos a várias pesquisas genéticas, com sequenciamento Sanger de *NOTCH3*, *EIF2B1-5*, *DARS2* entre outros.

No entanto, o exoma clínico apresenta a mesma limitação de reanálise em busca de novos genes, como ocorre com os painéis. Seu custo tende a ser superior ao dos painéis e inferior ao do sequenciamento completo do exoma.

Para aqueles casos em que não houve um diagnóstico após a realização de painel de genes ou sequenciamento do exoma clínico, a próxima etapa é o sequenciamento completo do exoma. Esta é uma técnica que permite a avaliação de todos os exons de todos os cerca de 20.000 genes humanos. É excelente para pacientes com fenótipos atípicos ou indeterminados, permite a identificação de novos

genes patogênicos, tem uma boa correlação custo-benefício e permite reanálises futuras à luz de novos conhecimentos.

Esta análise mais abrangente gera uma questão ética relevante, que é a ocorrência de achados incidentais não correlacionados com a clínica. Assim, um paciente que realiza o sequenciamento completo do exoma por LD/LG, por exemplo, e tem o achado incidental de uma variante patogênica de *APOE4*, que aumenta o risco de doença de Alzheimer, pode gerar um debate se é correto ou não revelar este achado. Em geral, tal discussão deve ocorrer no aconselhamento pré-teste e, habitualmente só são revelados ao paciente as variantes que têm potencial correlação com seu quadro clínico – este é o procedimento adotado na maioria dos laboratórios de genética e foi o procedimento adotado neste estudo. Assim, a comunicação entre o clínico, com uma minuciosa caracterização do fenótipo, e o geneticista é fundamental, para definir quais variantes são relevantes para cada caso.

A interpretação do exoma completo pode ser difícil e nosso estudo traz dois exemplos desta dificuldade. O primeiro exemplo é das irmãs diagnosticadas como portadoras de doença relacionada a *PUS3*, que não obtiveram diagnóstico em uma primeira análise. Ao filtrar as variantes por presumível herança autossômica recessiva, as pacientes não apresentavam homozigose significativa, o que era esperado, dado que não havia história de consanguinidade. No entanto, ao serem usados filtros para variantes heterozigotas compostas raras e patogênicas, foram identificadas as variantes patogênicas em *PUS3*.

Já na família diagnosticada com doença relacionada a *FDX2*, a dificuldade foi demonstrar que a variante identificada como patogênica era a real responsável pelo fenótipo encontrado, tendo em vista que era um fenótipo totalmente novo se comparado ao que se conhecia do fenótipo previamente relacionado ao *FDX2*. Assim, primeiramente demonstramos que a variante patogênica que encontramos segregava em duas famílias não aparentadas de acordo com um padrão de herança autossômico recessivo. Posteriormente conseguimos validação funcional ao demonstrar a redução dos níveis da proteína FDX2 no músculo dos pacientes afetados (Gurgel-Giannetti et al., 2018).

Por fim, casos que permanecem sem diagnóstico após sequenciamento completo do exoma continuam a ser um grande desafio. Para estes, os testes

genéticos adicionais a serem considerados são o sequenciamento do exoma ou genoma mitocondrial ou o sequenciamento completo do genoma. A avaliação de DNA mitocondrial é muito difícil por meio do sequenciamento completo do exoma e não é habitualmente oferecida na forma de painéis. Já o sequenciamento completo do genoma é uma opção interessante para avaliação de variantes patogênicas intrônicas, em regiões promotoras e não-codificantes, bem como por variação no número de cópias. No entanto, trata-se de um exame de maior custo do que o sequenciamento completo do exoma, e principalmente de interpretação mais difícil, em geral restrito aos centros de pesquisa.

6.5 Proposta de algoritmo diagnóstico

Apresentamos agora uma sugestão de algoritmo diagnóstico para casos suspeitos de LD/LG, baseado no que realizamos e aprendemos com o presente estudo. Acreditamos que ele possa ser adaptado à realidade de cada serviço, a depender dos recursos disponíveis (Figura 28).

Figura 28 - Fluxograma de abordagem diagnóstica de pacientes com suspeita de leucodistrofia ou leucoencefalopatia genética. ADLD: leucodistrofia autossômica dominante desmielinizante do adulto; AGCML: ácidos graxos de cadeia muito longa; ALD/AMN-X: adrenoleucodistrofia/adrenomieloneuropatia ligada ao X; AxD: doença de Alexander; CADASIL: “Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy” – Arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia; FXTAS: “Fragile X Tremor/Ataxia Syndrome” – Síndrome tremor-ataxia ligada ao X; HDLS: “Hereditary Diffuse Leukoencephalopathy with Spheroids” – Leucoencefalopatia difusa hereditária com esferoides; L2HGA: “L-2-Hydroxyglutaric Aciduria” – Acidúria L2-hidroxiglutarica; LBSL: “Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal cord involvement and Lactate elevation” – Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula espinhal e elevação de lactato; LEMP: leucoencefalopatia multifocal progressiva; VWM: “Vanishing White Matter Disease” – doença da substância branca evanescente; XCT: xantomatose cerebrotendínea.

6.5.1 Quando suspeitar de uma LD/LG genética

Pacientes com algum dos seguintes sintomas:

- síndrome cognitivo-comportamental
- síndrome piramidal (principalmente se bilateral e simétrica)
- ataxia cerebelar ou sensitiva
- movimentos anormais

Associados a alterações bilaterais, simétricas e confluentes ou difusas da substância branca cerebral ou cerebelar, com acometimento ou não de tronco encefálico.

6.5.2 Excluir doenças adquiridas

Verificar exposição a possíveis agentes tóxicos

- metotrexate (principalmente intratecal)
- 5-fluoracil
- heroína (“chasing the dragon”)
- metanfetamina
- metanol
- álcool e tabaco (doença de Marchiafava-Bignami)

Considerar esclerose múltipla se:

- história de surto-remissão
- múltiplas lesões de substância branca
- impregnação pelo contraste
- dedos de Dawson
- acometimento de fibras em “U”
- acometimento medula espinhal
- presença de bandas oligoclonais

Considerar doença de pequenos vasos cerebrais se:

- maiores de 60 anos
- fatores de risco cardiovascular
- lacunas
- microhemorragias
- alteração de sinal significativa da ponte ou núcleos da base

Solicitar para todos os pacientes:

- hemograma
- função renal e eletrólitos
- perfil hepático
- perfil tireoidiano
- perfil lipídico
- vitamina B12, homocisteína, ácido metilmalônico
- cobre, ceruloplasmina
- ácido fólico
- amônia
- lactato
- vitamina E
- sorologias para HIV, hepatites B e C, sífilis
- VHS, PCR, complemento
- FAN, fator reumatoide, anti-DNA, anti-SSA, anti-SSB, ANCA, anticorpo antifosfolípide, anticardiolipina, anticoagulante lúpico
- Enzima conversora da angiotensina sérica
- Imunoeletroforese de proteínas plasmáticas e urinárias

Considerar:

- pesquisa de anticorpos antineuronais e investigação de neoplasia oculta (na suspeita de síndrome paraneoplástica)
- possibilidade de imunossupressão e eventual pesquisa de vírus JC no líquido
- possibilidade de linfoma primário do SNC ou gliomatose cerebrii

- possibilidade de leucoencefalopatia posterior reversível

6.5.3 Rever história familiar:

Padrão sugestivo de herança autossômica dominante:

- CADASIL
- HDLS
- ADLD
- Doença de Alexander
- Doença relacionada ao colágeno tipo IV (*COL4A1*)
- Vasculopatia retiniana com leucodistrofia cerebral (*TREX1*)

Padrão sugestivo de herança ligada ao X:

- ALD/AMN-X
- PMD/SPG2
- FXTAS
- Doença de Fabry

Padrão sugestivo de herança recessiva ou consanguinidade explícita ou implícita:

- todas as demais condições

Caso esporádico: manter todas as possibilidades em aberto

6.5.4 Rever sintomas e sinais neurológicos

Aqueles de maior valor diagnóstico:

- tremor palatal (Alexander)
- disautonomia (ADLD)
- enxaqueca (CADASIL, doenças mitocondriais)

6.5.5 Rever achados extra-neurológicos

Aqueles de maior valor diagnóstico em adultos:

- insuficiência adrenal (*ABCD1*, *POLR3A*, *POLR3B*)
- menopausa precoce (*EIF2B1-5*, *FMRI*, *AARS2*)
- hipogonadismo hipogonadotrófico (*RNF216*, *PNPLA6*, *POLR3A*, *POLR3B*)
- diarreia crônica (*CYP27A1*)
- dismotilidade gastrointestinal grave (*TYMP*)
- alterações esqueléticas (doença de Nasu-Hakola)

6.5.6 Rever achados neurorradiológicos

Em busca de um padrão de imagem capaz de direcionar a um teste gênico específico ou grupo de genes.

Padrão de acometimento da substância branca:

- parieto-occipital (ALD/AMN-X; Krabbe)
- frontal (ALD-X; Alexander; HDLS)
- periventricular (inespecífico)
- subcortical (L2HGA)
- tronco encefálico (Alexander, LBSL, ADLD)
- cerebelo (XCT, Alexander, LBSL, ADLD, FXTAS)

Reconhecer características distintivas:

- cistos ou cavitações (VWM, HDLS, Labrune)
- lacunas (CADASIL, CARASIL, CARASAL)
- calcificações (HDLS, Labrune)
- impregnação pelo gadolínio (ADL-X, Alexander, Labrune)
- acometimento de medula (ADLD, LBSL, Alexander)
- alterações na espectroscopia (síndrome de Sjögren-Larsson, XCT, LBSL)

6.6.7 Investigação metabólica ou genética:

Cumpridas as etapas anteriores, deve-se tentar formular uma hipótese diagnóstica ou pelo menos tentar definir um subgrupo de LD/LG para então definir que exame pedir – tendo em mente a realidade local e as considerações feitas na discussão sobre painel de genes, exoma clínico e exoma completo.

Assim, uma forte suspeita de ALD-X deve ser seguida da dosagem sérica dos AGCML ou do sequenciamento de *ABCD1* ou até mesmo da realização de um painel para LD/LG. Já uma suspeita de uma LD hipomielinizante pode ser seguida do pedido de um painel de genes ou do sequenciamento completo do exoma.

O uso indiscriminado de uma “segunda rodada” de exames laboratoriais, incluindo pesquisa bioquímica de LD/LG que são mais comuns na infância, mas bem raras em adultos, como o sugerido por Ahmed et al (2014), não nos parece adequado à nossa realidade. Deve-se considerar a dificuldade enfrentada em vários locais do Brasil para se ter acesso a exames como pesquisa de ácidos orgânicos na urina ou pesquisa da atividade enzimática da arilsulfatase, bem como o tempo que tais pesquisas podem adicionar na odisseia diagnóstica enfrentada por estes pacientes.

Assim, com a progressiva e rápida queda nos custos dos exames baseados nas técnicas de NGS, acreditamos que o melhor caminho em termos de relação custo-benefício após avaliação clínica e neurorradiológica minuciosa depende da suspeita clínica e da disponibilidade de exames em cada serviço.

Sugerimos que somente uma suspeita muito forte deve desencadear um pedido de sequenciamento Sanger ou de exame bioquímico. Caso contrário, a realização de painéis ou do sequenciamento completo do exoma deve ser discutida. Dada a raridade destas doenças, acreditamos que o encaminhamento precoce destes pacientes para centros de referência pode beneficiá-los sobremaneira, com aconselhamento, investigação e eventual tratamento adequados.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho de caracterização clínica, molecular e de neuroimagem de 38 pacientes (31 famílias) com leucodistrofias ou leucoencefalopatias genéticas permitiu concluir que:

1. O quadro clínico e neurorradiológico das LD/LG é muito heterogêneo e depende da etiologia subjacente.
2. O quadro clínico e neurorradiológico para cada etiologia encontrada tende a ser relativamente homogêneo.
3. As doenças mais comumente diagnosticadas foram ALD/AMN-X, VWM, CADASIL e HDLS.
4. A avaliação clínica e neurorradiológica minuciosas permitiram formular uma hipótese diagnosticada correta antes de teste confirmatório (bioquímico ou genético) em 23 das 31 famílias (74%).
5. A avaliação genética não eviesada, seja por sequenciamento do exoma clínico ou sequenciamento completo do exoma, foi determinante para o diagnóstico correto em grande parte da nossa amostra.
6. A avaliação por sequenciamento completo do exoma permitiu a identificação de uma condição muito rara (doença relacionada ao *PUS3*), ampliando seu fenótipo, e um novo fenótipo associado a *FDX2*.

8 Anexos

8 ANEXOS

Anexo A – Tabela 1 – Caracterização clínica

Paciente	Sexo	Idade atual	Idade de início	Consanguinidade	História familiar	1º sinal ou sintoma	Síndrome cognitiva	Manifestações psiquiátricas	Síndrome piramidal	Movimentos anormais	Neuropatia periférica	Ataxia	Crises epilépticas	Nervos cranianos	Aspectos dismórficos	Outras manifestações
Adrenomieloneuropatia / Adrenoleucodistrofia ligada ao X																
1.1	M	29	19a		+	alopécia		+	+		+	+	+			síndrome de Addison, alopecia
1.2	M	30	28a		+	crise epiléptica	+	+					+			síndrome de Addison subclínica
2.1	M	26	23a			alopécia			+		+	+				síndrome de Addison, alopecia
3.1	M	55	30a		+	alteração da marcha	+	+	+		+					síndrome de Addison
4.1	M	37	2a			alteração da marcha		+	+		+	+	+			síndrome de Addison subclínica, azospermia, oligospermia
5.1	M	23	8a			dores articulares em MMII			+		+		+			síndrome de Addison
6.1	M	29	10a		+	alteração da marcha	+	+	+	+	+		+	+		síndrome de Addison, alopecia
7.1	M	19	8a			déficit de atenção	+	+	+		+	+	+	+	+	síndrome de Addison
Doença da substância branca evanescente																
8.1	M	33	26a			coma	+	+	+			c				
9.1	M	30	29a	+		hemiparesia	+	+	+	D		c		SH		
10.1	F	43	20a		+	crise epiléptica	+	+	+			c	+	PP/N		menopausa precoce
10.2	M	51	46a		+	quedas	+	+	+			c	+			
11.1	F	64	52a			neuralgia do trigêmeo	+	+	+			c	+	BAV/PP		

continua

Anexo A – Tabela 1 – Caracterização clínica (continuação)

Paciente	Sexo	Idade atual	Idade de início	Consanguinidade	História familiar	1o sinal ou sintoma	Síndrome cognitiva	Manifestações psiquiátricas	Síndrome piramidal	Movimentos anormais	Neuropatia periférica	Ataxia	Crises epiléticas	Nervos cranianos	Aspectos dismórficos	Outras manifestações
Encefalomioneuropatia relacionada a <i>FDX2</i>																
12.1	F	29	1a	+	+	BAV		+	+		+	m		BAV/PP		bicitopenia, hipotireoidismo
12.2	M	34	1a	+	+	BAV		+	+		+	s		BAV/PP		bicitopenia, hipotireoidismo, diabetes
12.3	M	6	14m		+	BAV		+						BAV/PP		bicitopenia, hipotireoidismo
12.4	F	14	<1a		+	dificuldade de sucção	+				+			BAV/PP	+	bicitopenia, hipotireoidismo
Acidúria L2-hidroxiglutárica																
13.1	M	34	1a	+		postura anormal do pescoço	+	+		D		c	+	N	+	
14.1	F	34	<1a		+	ADNPM	+	+	+			c	+			
14.2	F	35	<1a		+	ADNPM	+	+	+	TC/D		c	+		+	
15.1	F	45	<1a		+	ADNPM	+	+	+	D		c				
Leucoencefalopatia com esferóides axonais e glia pigmentada																
16.1	F	48	47a		+	amnésia anterógrada	+	+	+							perda ponderal
17.1	F	53	50a			alteração comportamental	+	+								
18.1	F	43	38a			dor em MID	+	+	+	TP/D		*		PP/N		baqueteamento digital e distrofia ungeal

continua

Anexo A – Tabela 1 – Caracterização clínica (continuação)

Paciente	Sexo	Idade atual	Idade de início	Consanguinidade	História familiar	1o sinal ou sintoma	Síndrome cognitiva	Manifestações psiquiátricas	Síndrome piramidal	Movimentos anormais	Neuropatia periférica	Ataxia	Crises epiléticas	Nervos cranianos	Aspectos dismórficos	Outras manifestações
CADASIL																
19.1	M	40	30a		+	cefaléia	+	+	+			s				
20.1	M	49	37a		+	hemiataxia súbita	+	+	+	D						
21.1	F	48	36a			cefaléia	+	+	+			s		VIII		
Deficiência intelectual autossômica recessiva 55 (PUS3)																
22.1	F	41	<1a		+	ADNPM	+	+				+		+		proteinúria
22.2	F	37	<1a		+	ADNPM	+	+				+		+		síndrome nefrótica, doença celíaca
Leucoencefalopatia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto (ADLD)																
23.1	M	59	38a		+	disfunção erétil	+		+		+	c		RN/N		
Doença de Alexander																
24.1	F	39	27a			quedas			+			*		RN/N		
Síndrome de Gordon-Holmes (RNF216)																
25.1	M	41	31a		+	hipogonadismo	+	+		C		c				hipogonadismo hipogonadotrófico

continua

Anexo A – Tabela 1 – Caracterização clínica (conclusão)

Paciente	Sexo	Idade atual	Idade de início	Consanguinidade	História familiar	1o sinal ou sintoma	Síndrome cognitiva	Manifestações psiquiátricas	Síndrome piramidal	Movimentos anormais	Neuropatia periférica	Ataxia	Crises epiléticas	Nervos cranianos	Aspectos dismórficos	Outras manifestações
Leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula espinal e elevação de lactato																
26.1	F	23	5a	+		alteração da marcha	+	+	+	T/D	+	m				
Doença relacionada a <i>PLP1</i>																
27.1	M	40	30a			tremor cefálico	+	+	+	TC		c		n		
Síndrome de Sjögren-Larsson																
28.1	M	27	<1a			ADNPM	+	+	+			*	+		+	ictiose
Pacientes sem diagnóstico																
29.1	F	44	3a			tremor em MMSS	+	+	+	T/D	+	c		BAV/RN	+	menopausa precoce, osteoporose
30.1	F	65	53a		+	dor em MMII	+	+	+			c		BAV		
31.1	M	73	55a			disfagia orofaríngea		+			+	c		VIII/RN		sincope

Pacientes 1.1-7.1: adrenoleucodistrofia/adrenomieloneuropatia ligada ao X; 8.1-11.1: doença da substância branca evanescente; 12.1-12.4: doença relacionada a *FDX2*; 13.1-15.1: acidúria L2-hidroxi-glutárica; 16.1-18.1: leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides; 19.1-21.1: CADASIL; 22.1-22.2: deficiência intelectual autossômica recessiva relacionada a *PUS3*; 23.1: leucoencefalopatia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto; 24.1: doença de Alexander; 25.1: síndrome de Gordon-Holmes; 26.1: leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula espinal e elevação de lactato; 27.1: doença relacionada a *PLP1*; 28.1: síndrome de Sjögren-Larsson; 29.1-31.1: sem diagnóstico

Legenda: sexo M= masculino, F= feminino. + = presente. * = avaliação prejudicada pela gravidade da síndrome piramidal; c = ataxia cerebelar, s = ataxia sensitiva, m = ataxia mista. D = distonia. TC = tremor cervical. TP = tremor palatal. T = tremor. C = coreia. SH = sacadas hipométricas. PP = palidez de papila. N = nistagmo. BAV = baixa acuidade visual. VIII = nervo vestibulo-coclear. RN = reflexo nauseoso.

Anexo B – Tabela 2 – Caracterização genética

Paciente	Gene	Status (Hom; Het; Het C)	Variante cDNA	Efeito predito sobre a proteína	Previamente reportado	Técnica de análise molecular	Diagnóstico clínico?
8.1	<i>EIF2B5</i>	Hom	c.[388G>A];[388G>A]	p.[Arg113His];[Arg113His]	sim	EC	+
9.1	<i>EIF2B5</i>	Hom	c.[388G>A];[388G>A]	p.[Arg113His];[Arg113His]	sim	EC	+
10.1	<i>EIF2B4</i>	Het C	c.[495 + 3delA (;)623G>A]	p.[? (;) Arg208Gln]	não (mutação 1 nova variante; mutação 2 muito rara)	EC	+
10.2	<i>EIF2B4</i>	*	*	*	*	*	+
11.1	<i>EIF2B5</i>	Het C	c.[388G>A];[913A>T]	p.[Arg113His];[Met305Leu]	mutação 1 sim; mutação 2 não	EC	+
12.1	<i>FDX2</i>	Hom	c.[431C>T];[431C>T]	p.[Pro144Leu];[Pro144Leu]	não	SCE	
12.2	<i>FDX2</i>	Hom	c.[431C>T];[431C>T]	p.[Pro144Leu];[Pro144Leu]	não	SCE	
12.3	<i>FDX2</i>	Hom	c.[431C>T];[431C>T]	p.[Pro144Leu];[Pro144Leu]	não	SCE	
12.4	<i>FDX2</i>	Hom	c.[431C>T];[431C>T]	p.[Pro144Leu];[Pro144Leu]	não	SCE	
13.1	<i>L2HGDH</i>	Hom	c.[530delC];[530delC]	p.Pro177fs	sim	EC	+
14.1	<i>L2HGDH</i>	Hom	c.[G632T];[G632T]	p.Gly211Val	sim	EC	+
14.2	<i>L2HGDH</i>	*	*	*	*	*	+
15.1	<i>L2HGDH</i>	Hom	c.[530delC];[530delC]	p.Pro177fs	sim	EC	+
16.1	<i>CSF1R</i>	Het	c.2427_2428delCA	p.Ile810fs*19	não	EC	+
17.1	<i>CSF1R</i>	Het	c.2654+1G>T	?	não	SCE	+
18.1	<i>CSF1R</i>	Het	c.2570C>T	p.Pro857Leu	não	EC	#

continua

Anexo B – Tabela 2 – Caracterização genética (conclusão)

Paciente	Gene	Status (Hom; Het; Het C)	Variante cDNA	Efeito predito sobre a proteína	Previamente reportado	Técnica de análise molecular	Diagnóstico clínico?
19.1	<i>NOTCH3</i>	Het	c.505C>T	p.Arg169Cys	sim	EC	+
20.1	<i>NOTCH3</i>	Het	c.994C>T	p.Arg332Cys	sim	EC	+
21.1	<i>NOTCH3</i>	Het	c.397C>T	p.Arg133Cys	sim	EC	+
22.1	<i>PUS3</i>	Het C	c.[G497A];[T1097C]	p.[Arg166Gln];[Leu366Pro]	não	SCE	
22.2	<i>PUS3</i>	Het C	c.[G497A];[T1097C]	p.[Arg166Gln];[Leu366Pro]	não	SCE	
23.1	<i>LMNB1</i>	Het	Dup 212Kb em Chr5q23.2	?	sim	array-CGH	+
24.1	<i>GFAP</i>	Het	c.809G>C	p.Arg270Pro	não	Sanger	+
25.1	<i>RNF216</i>	Hom	c.[1482C>A];[1482C>A]	p.[Tyr494*];[Tyr494*]	não	EC	#
26.1	<i>DARS2</i>	Het C	c.[228-20_-21delTTinsC];[1456C>T]	p.[Arg76Serfs*5];[Leu486Phe]	mutação 1 sim; mutação 2 não	EC	+
27.1	<i>PLP1</i>	Het	c.355dupG	p.Gly121Profs*83	não	EC	
28.1	<i>ALDH3A2</i>	Het C	c.[798+5G>A];[1108-1G>C]	?	sim	Sanger	+
29.1						SCE	#
30.1						SCE	#
31.1						SCE	

Pacientes 8.1-11.1: doença da substância branca evanescente; 12.1-12.4: doença relacionada a *FDX2*; 13.1-15.1: acidúria L2-hidroxi-glutárica; 16.1-18.1: leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides; 19.1-21.1: CADASIL; 22.1-22.2: deficiência intelectual autossômica recessiva relacionada a *PUS3*; 23.1: leucoencefalopatia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto; 24.1: doença de Alexander; 25.1: síndrome de Gordon-Holmes; 26.1: leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula espinhal e elevação de lactato; 27.1: doença relacionada a *PLP1*; 28.1: síndrome de Sjögren-Larsson; 29.1-31.1: sem diagnóstico

Legenda: Hom = homozigoto. Het = heterozigoto. Het C = heterozigoto composto. EC = exoma clínico. SCE = sequenciamento completo do exoma. CGH = comparative genomic hybridisation. * = não testado. # = hipótese clínica incorreta. Dup = duplicação.

Anexo C – Tabela 3 – Caracterização neurorradiológica

Paciente	T1	Hipersinal de SSBB em T2							Acometimento infratentorial		Características adicionais									
		Confluente (C) ou Multifocal (M)	Periventricular	Fibras em U subcorticais	Frontal	Parietal	Temporal	Occipital	Tronco encefálico	Cerebelo	Alterações na DWI	Corpo caloso fino	Rarefação de SSBB	Calcificações	Cistos	Infartos	Micro-hemorragias	Captção de contraste	Outros achados	Espectroscopia
1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o	ND
1.2	↓	M	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	ndn
2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o	ND
3.1	↓	C	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
4.1	↓	C	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	x	ND
5.1	↓	C	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
6.1	↓	C	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	b, f, r	ND
7.1	↓	C	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	b, f	ND
8.1	↓	C	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	ND
9.1	↓	C	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	ND
10.1	↓	C	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	ND
10.2	↓	C	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	↓ NAA continua

Anexo C – Tabela 3 – Caracterização neurorradiológica (continuação)

Paciente	T1	Hipersinal de SSBB em T2							Acometimento infratentorial		Características adicionais									
		Confluente (C) ou Multifocal (M)	Periventricular	Fibras em U subcorticais	Frontal	Parietal	Temporal	Occipital	Tronco encefálico	Cerebelo	Alterações na DWI	Corpo caloso fino	Rarefação de SSBB	Calcificações	Cistos	Infartos	Micro-hemorragias	Captção de contraste	Outros achados	Espectroscopia
11.1	↙	C	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	ndn
12.1	↙	M	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	a	ndn
12.2	↙	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	ND
12.3	↙	M	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	a, b, c	ndn
12.4	↙	M	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	d	ndn
13.1	↙	M	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	e	ND
14.1	↙	M	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	e, f, g	ND
14.2	↙	M	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	e, g	↑ mI; ↓ NAA; *
15.1	↙	M	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	GBM	ND
16.1	↙	M	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	b	ND
17.1	↙	M	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	b, h, i	ND
18.1	↙	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	f, j	ND
19.1	↙	M	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	f	ND
20.1	↙	M	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	b, g, k, l	ND
21.1	↙	M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	b, g, k, l	ND

continua

Anexo C – Tabela 3 – Caracterização neurorradiológica (conclusão)

Paciente	T1	Hipersinal de SSBB em T2							Acometimento infratentorial		Características adicionais									
		Confluente (C) ou Multifocal (M)	Periventricular	Fibras em U subcorticais	Frontal	Parietal	Temporal	Occipital	Tronco encefálico	Cerebelo	Alterações na DWI	Corpo caloso fino	Rarefação de SSBB	Calcificações	Cistos	Infartos	Micro-hemorragias	Captção de contraste	Outros achados	Espectroscopia
22.1	↓	M	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ndn
22.2	↓	C	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ndn
23.1	↓	C	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	f, m, n, o	ND
24.1	↓	C	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	e, m, n, o, p, q	↑colina; ↓NAA; ↑mI
25.1	↓	C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	c, e, l, n, r, s	↓colina/NAA
26.1	↓	C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	f, m, t, u, v	↓NAA/creatina
27.1	↔	C	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n	ND
28.1	↓	C	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	b	picos de lipídios
29.1	↔	C	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓NAA
30.1	↔	C	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
31.1	↓	C	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	ND

Pacientes 1.1-7.1: adrenoleucodistrofia/adrenomieloneuropatia ligada ao X; 8.1-11.1: doença da substância branca evanescente; 12.1-12.4: doença relacionada a *FDX2*; 13.1-15.1: acidúria L2-hidroxi-glutárica; 16.1-18.1: leucoencefalopatia difusa hereditária com esferóides; 19.1-21.1: CADASIL; 22.1-22.2: deficiência intelectual autossômica recessiva relacionada a *PUS3*; 23.1: leucoencefalopatia desmielinizante autossômica dominante de início no adulto; 24.1: doença de Alexander; 25.1: síndrome de Gordon-Holmes; 26.1: leucoencefalopatia com acometimento de tronco encefálico e medula espinhal e elevação de lactato; 27.1: doença relacionada a *PLP1*; 28.1: síndrome de Sjögren-Larsson; 29.1-31.1: sem diagnóstico

Legenda: (+) = presente; (-) = ausente. ND = não disponível. ndn = nada digno de nota. GBM = glioblastoma multiforme. SSBB = substância branca.

a = afilamento de nervo óptico e de quiasma óptico; b - hipersinal em corpo caloso; c = hipersinal em tálamos; d = rotação incompleta de hipocampo; e = hipersinal em núcleos denteados; f = hipersinal em trato corticoespinhal; g = hipersinal em núcleos da base; h = atrofia de lobos frontais; i = atrofia de corpos estriados; j = ventrículos assimétricos; k = hipersinal em polos temporais; l = hipersinal em cápsulas externas; m = acometimento de pedúnculos cerebelares superiores; n = acometimento de pedúnculos cerebelares médios; o = atrofia de medula; p = atrofia de bulbo; q = malformação cortical frontal; r = pedúnculos cerebrais; s = substância negra; t = pedúnculos cerebelares inferiores; u = tratos espinocerebelares; v = tratos dos nervos trigêmeos; x =ependimoma em IV ventrículo; * = pico em 2,5ppm, correspondente ao ácido hidroxiglutárico

9 Referências

9 REFERÊNCIAS

Ahmed RM, Murphy E, Parton M, Schott JM, Mummery CJ, Rohrer JD, Lachmann RH, Houlden H, Fox NC, Chataway J. A practical approach to diagnosing adult onset leukodystrophies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85:770-81.

Alexander WS. Progressive fibrinoid degeneration of fibrillary astrocytes associated with mental retardation in a hydrocephalic infant. *Brain*. 1949;72:373-81.

Atrouni S, Daraze A, Tamraz J, Cassia A, Caillaud C, Megarbane A. Leukodystrophy associated with oligodontia in a large inbred family: fortuitous association or new entity? *Am J Med Genet*. 2003;118A:76-81.

Auada MP, Puzzi MB, Cintra ML, Steiner CE, Alexandrino F, Sartorato EL, Aguiar TS, Azulay RD, Carney G, Rizzo WB. Sjögren–Larsson syndrome in Brazil is caused by a common c.11081G→C splice site mutation in the ALDH3A2 gene. *Br J Dermatol*. 2006;154(4):770-73.

Ayrignac X, Carra-Dalliere C, Champfleur NM, Denier C, Aubourg P, Bellesme C, Castelnovo G, Pelletier J, Audoin B, Kaphan E, Seze J, Collongues N, Blanc F, Chanson JB, Magnin E, Berger E, Vukusic S, Durand-Dubief F, Camdessanche JP, Cohen M, Lebrun-Frenay C, Brassat D, Clanet M, Vermersch P, Zephir H, Outteryck O, Wiertlewski S, Laplaud DA, Ouallet JC, Brochet B, Goizet C, Debouverie M, Pittion S, Edan G, Deburghgraeve V, Le Page E, Verny C, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Hannequin D, Guyant-Maréchal L, Derache N, Defer GL, Moreau T, Giroud M, Guennoc AM, Clavelou P, Taithe F, Mathis S, Neau JP, Magy L, Devoize JL, Bataillard M, Masliah-Planchou J, Dorboz I, Tournier-Lasserre E, Levade T, Tanguy OB, Labauge P. Adult-onset genetic leukoencephalopathies: A MRI pattern-based approach in a comprehensive study of 154 patients. *Brain*. 2015;138:284-92.

Ayrignac X, Boutiere C, Carra-Dalliere C, Labauge P. Posterior fossa involvement in diagnosis of adult-onset inherited leukoencephalopathies. *J Neurol*. 2016a;263:2361-8.

Ayrignac X, Menjot de Champfleur N, Menjot de Champfleur S, Carra-Dellière C, Deverdun J, Corlobe A, Labauge P. Brain magnetic resonance imaging helps differentiate atypical multiple sclerosis with cavitory lesions and vanishing white matter disease. *Eur J Neurol*. 2016b;23(6):995-1000.

Balbi P, Salvini S, Fundarò C, Frazzitta G, Maestri R, Mosah D, Uggetti C, Sechi G. The clinical spectrum of late-onset Alexander disease: a systematic literature review. *J Neurol*. 2010;257(12):1955-62.

Balicza P, Grosz Z, Molnár V, Illés A, Csabán D, Gézsi A, Dézsi L, Zádori D, Vécsei L, Molnár M. NKX2-1 new mutation associated with myoclonus, dystonia, and pituitary involvement. *Frontiers Genetics*. 2018;9:335.

Bielschowsky M, Henneberg R. Ueber familiäre diffuse sklerose (Leukodystrophia cerebri progressive hereditária). *J Psychol Neurol (Lpz)*. 1928;36:131-81.

Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med*. 2014;370:2418-25.

Bonkowsky JL, Nelson C, Kingston JL, Filloux FM, Mundorff MB, Srivastava R. The burden of inherited leukodystrophies in children. *Neurology*. 2010;75(8):718-25.

Bougea A, Velonakis G, Spantideas N, Anagnostou E, Paraskevas G, Kapaki E, Kararizou E. The first Greek case of heterozygous cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: An atypical clinico-radiological presentation. *Neuroradiol J*. 2017;30(6):583-5.

Bouquet F, Dehais C, Sanson M, Lubetzki C, Louapre C. Dramatic worsening of adult-onset X-linked adrenoleukodystrophy after head trauma. *Neurology*. 2015;85:1991-3.

Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Goldman JE, Messing A. Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet*. 2001;27:117-20.

Cailloux F, Gauthier-Barichard F, Mimault C, Isabelle V, Courtois V, Giraud G, Dastugue B, Boespflug-Tanguy O. Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease. *Eur J Hum Genet*. 2000;8:837-45.

Carra-Dallière C, Horzinski L, Ayrygnac X, Vukusic S, Rodriguez D, Manguiere F, Peter L, Goizet C, Bouhour F, Denier C, Confavreux C, Obadia M, Blanc F, de Seze J, Sedel F, Guennoc AM, Sartori E, Laplaud D, Antonie JC, Fogli A, Boespflug-Tanguy O, Labauge P. Natural history of adult-onset eIF2B-related disorders: a multicentric survey of 24 cases. *Rev Neurol (Paris)*. 2011;167(11):802-11.

Carswell R. *Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease*. London: Longmans, Green; 1838.

Chinnery PF. Mitochondrial Disorders Overview. 2000 Jun 8 [Updated 2014 Aug 14]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

Cho KH, Shim SH, Kim M. Clinical, biochemical, and genetic aspects of Sjögren-Larsson syndrome. *Clin Genet*. 2018;93(4):721-30.

Costello DJ, Eichler AF, Eichler FS. Leukodystrophies: classification, diagnosis, and treatment. *Neurologist*. 2009;15(6):319-28.

Dallabona C, Diodato D, Kevelam SH, Haack TB, Wong LJ, Salomons GS, Baruffini E, Melchionda L, Mariotti C, Strom TM, Meitinger T, Prokisch H, Chapman K, Colley A, Rocha H, Ounap K, Schiffmann R, Salsano E, Savoird M, Hamilton EM, Abbink TE, Wolf NI, Ferrero I, Lamperti C, Zeviani M, Vanderver A, Ghezzi D, van der Knaap MS. Novel (ovario) leukodystrophy related to AARS2 mutations. *Neurology*. 2014;82:2063-71.

de Bot ST, Willemsen MAAP, Vermeer S, Kremer HPH, van de Warrenburg BPC. Reviewing the genetic causes of spastic-ataxias. *Neurology*. 2012;79:1507-14.

de Laurenzi V, Rogers GR, Hamrock DJ, Marekov LN, Steinert PM, Compton JG, Markova N, Rizzo WB. Sjögren-Larsson syndrome is caused by mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Nat Genet*. 1996;12:52-7.

Depienne C, Bugiani M, Dupuits C, Galanaud D, Touitou V, Postma N, van Berkel C, Polder E, Tollard E, Darios F, Brice A, de Die-Smulders CE, Vles JS, Vanderver A, Uziel G, Yalcinkaya C, Frints SG, Kalscheuer VM, Klooster J, Kamermans M, Abbink TE, Wolf NI, Sedel F, van der Knaap MS. Brain white matter oedema due to CIC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study. *Lancet Neurol*. 2013;12(7):659-68.

Di Donato I, Banchi S, Federico A, Dotti MT. Adult-onset genetic leukoencephalopathies. A focus on the more recently defined forms. *Curr Mol Med*. 2014;14(8):944-58.

DiMauro S, Gurgel-Giannetti J. The expanding phenotype of mitochondrial myopathy. *Curr Opin Neurol*. 2005;18:538-42.

Dinour D, Mini S, Polak-Charcon S, Lotan D, Holtzman EJ. Progressive nephropathy associated with mitochondrial tRNA gene mutation. *Clin Nephron*. 2004;62:149-54.

Dooves S, Bugiani M, Postma N, Polder E, Land N, Horan S, et al. Astrocytes are central in the pathomechanisms of vanishing white matter. *J Clin Invest*. 2016;126(4):1512-24.

Duran M, Kamerling JP, Bakker HD, van Gennip AH, Wadman SK. L-2-hydroxyglutaric aciduria: an inborn error of metabolism? *J Inherit Metab Dis*. 1980;3:109-12.

Dutra LA, de Aquino CC, Barsottini OG. Sjögren-Larsson syndrome: case report and review of neurologic abnormalities and ichthyosis. *Neurologist*. 2009;15(6):332-4.

Edvardson S, Prunetti L, Arraf A, Haas D, Bacusmo JM, Hu JF, Ta-Shma A, Dedon PC, de Crécy-Lagard V, Elpeleg O. tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyl-transferase defect due to KAE1/TCS3 (OSGEP) mutation manifest by neurodegeneration and renal tubulopathy. *Eur J Hum Genet*. 2017;25(5):545-51.

Eichler F, Duncan C, Musolino PL, Orchard PJ, De Oliveira S, Thrasher AJ, Armant M, Dansereau C, Lund TC, Miller WP, Raymond GV, Sankar R, Shah AJ, Sevin C, Gaspar HB, Gissen P, Amartino H, Bratkovic D, Smith NJC, Paker AM, Shamir E, O'Meara T, Davidson D, Aubourg P, Williams DA. Hematopoietic stem-cell gene therapy for cerebral adrenoleukodystrophy. *N Engl J Med*. 2017;377:1630-8.

El Khattabi L, Jaillard S, Andrieux J, Pasquier L, Perrin L, Capri Y, Benmansour A, Toutain A, Marcorelles P, Vincent-Delorme C, Journel H, Henry C, De Barace C, Devisme L, Dubourg C, Demurger F, Lucas J, Belaud-Rotureau M-AA, Amiel J, Malan V, De Blois M-CC, De Pontual L, Lebbar A, Le Dû N, Germain DP, Pinard J-MM, Pipiras E, Tabet A-CC, Aboura A, Verloes A. Clinical and molecular delineation of Tetrasomy 9p syndrome: report of 12 new cases and literature review. *Am J Med Genet A*. 2015;167(6):1252-61.

Engelen M, Kemp S, Visser M, Geel B, Wanders R, Aubourg P, Poll-The BT. X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7(1):1-14.

Faiyaz-Ul-Haque M, Al-Sayed MD, Fageih E, Jamil M, Saeed A, Amoudi MS, Kaya N, Abalkhail H, Al-Abdullatif A, Rashed M, Al-Owain M, Peltekova I, Zaidi SH. Clinical, neuroimaging, and genetic features of L-2-hydroxyglutaric aciduria in Arab kindreds. *Ann Saudi Med.* 2014;34(2):107-14.

Farina L, Pareyson D, Minati L, Ceccherini I, Chiapparini L, Romano S, Gambaro P, Fancellu R, Savoiaro M. Can MR imaging diagnose adult-onset Alexander disease? *Am J Neuroradiol.* 2008;29:1190-6.

Filley C. Occupation and the risk of chronic toxic leukoencephalopathy. In: M. Lotti and M.L. Bleecker, Editors. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 131 (3rd series) Occupational Neurology. Amsterdam: Elsevier BV; 2015. v.131, p.73-91.

Finnsso J, Sundblom J, Dahl N, Melberg A, Raininko R. *LMNB1*-related autosomal-dominant leukodystrophy: Clinical and radiological course. *Ann Neurol.* 2015;78:412-25.

Fogel BL, Satya-Murti S, Cohen BH. Clinical exome sequencing in neurologic disease. *Neurol Clin Pract.* 2016;6:164-76.

Fogli A, Schiffmann R, Bertini E, Ughetto S, Combes P, Eymard-Pierre E, Kaneski CR, Pineda M, Troncoso M, Uziel G, Surtees R, Pugin D, Chaunu MP, Rodriguez D, Boespflug-Tanguy O. The effect of genotype on the natural history of eIF2B-related leukodystrophies. *Neurology.* 2004;62(9):1509-17.

Fogli A, Schiffmann R, Hugendubler L, Combes P, Bertini E, Rodriguez D, Kimball SR, Boespflug-Tanguy O. Decreased guanine nucleotide exchange factor activity in eIF2B-mutated patients. *Europ J Hum Genet.* 2004b;12:561-6.

Fogli A, Boespflug-Tanguy O. The large spectrum of eIF2B-related diseases. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(1):22-9.

Fuijkschot J, Theelen T, Seyger M, Graaf M, Groot I, Wevers R, Wanders R, Waterham H, Willemsen M. Sjögren–Larsson syndrome in clinical practice. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35(6):955-62.

Fussiger H, Jardim LB, Saute JA. Letter Re: Cathepsin A-related arteriopathy with strokes and leukoencephalopathy (CARASAL). *Neurology*. 2017;88:1776.

Ganos C, Hersheson J, Adams M, Bhatia K, Houlden H. The 4H syndrome due to RNF216 mutation. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2015;21(9):1122-3.

Giorgio E, Rolyan H, Kropp L, Chakka AB, Yatsenko S, Di Gregorio E, Lacerenza D, Vaula G, Talarico F, Mandich P, Toro C, Pierre EE, Labauge P, Capellari S, Cortelli P, Vairo FP, Miguel D, Stubbolo D, Marques LC, Gahl W, Boespflug-Tanguy O, Melberg A, Hassin-Baer S, Cohen OS, Pjontek R, Grau A, Klopstock T, Fogel B, Meijer I, Rouleau G, Bouchard JP, Ganapathiraju M, Vanderver A, Dahl N, Hobson G, Brusco A, Brussino A, Padiath QS. Analysis of *LMNB1* duplications in autosomal dominant leukodystrophy provides insights into duplication mechanisms and allele-specific expression. *Hum Mutat*. 2013;34:1160-71.

Golomb MR, Walsh LE, Carvalho KS, Christensen CK, DeMyer WE. Clinical findings in Pelizaeus-Merzbacher Disease. *J Child Neurol*. 2004;19:328-31.

Graff-Radford J, Schwartz K, Gavrilova RH, Lachance DH, Kumar N. Neuroimaging and clinical features in type II (late-onset) Alexander disease. *Neurology*. 2014;82:49-56.

Guerreiro R, Kara E, Le Ber I, Bras J, Rohrer JD, Taipa R, Lashley T, Dupuits C, Gurunlian N, Mochel F, Warren JD, Hannequin D, Sedel F, Depienne C, Camuzat A, Golfier V, Du Boisguéheneuc F, Schottlaender L, Fox NC, Beck J, Mead S, Rossor MN, Hardy J, Revesz T, Brice A, Houlden H. Genetic analysis of inherited leukodystrophies: genotype-phenotype correlations in the *CSF1R* gene. *JAMA Neurol*. 2013;70:875-82.

Guery B, Choukroun G, Noël LH, Clavel P, Rötig A, Lebon S, Rustin P, Bellané-Chantelot C, Mougnot B, Grünfeld JP, Chauveau D. The spectrum of systemic involvement in adults presenting with renal lesion and mitochondrial tRNA(Leu) gene mutation. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(8):2099-108.

Gurgel-Giannetti J, Lynch DS, Paiva ARB, Lucato LT, Yamamoto G, Thomsen C, Basu S, Freua F, Giannetti AV, de Assis BDR, Ribeiro MDO, Barcelos I, Sayão Souza K, Monti F, Melo US, Amorim S, Silva LGL, Macedo-Souza LI, Vianna-Morgante AM, Hirano M, Van der Knaap MS, Lill R, Vainzof M, Oldfors A, Houlden H, Kok F. A novel complex neurological phenotype due to a homozygous mutation in FDX2. *Brain*. 2018;141(8):2289-98.

Hamilton E, van der Lei H, Vermeulen G, Gerver J, Lourenço C, Naidu S, Mierzevska H, Gemke R, de Vet H, Uitdehaag B, Lissenberg-Witte B, Group V, van der Knaap M. Natural history of vanishing white matter. *Ann Neurol*. 2018;84(2):274-88.

Heim P, Claussen M, Hoffmann B, Conzelmann E, Gartner J, Harzer K, Hunneman DH, Kohler W, Kurlmann G, Kohlschütter A. Leukodystrophy incidence in Germany. *Am J Med Genet*. 1997;71:475-8.

Heubner O. Ueber diffuse hirnsklerose. *Charité-Ann*. 1897;22:298-310.

Hirano M. Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy Disease. 2005 Apr 22 [Updated 2016 Jan 14]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

Hobson GM, Kamholz J. PLP1-Related Disorders. 1999 Jun 15 [Updated 2013 Feb 28]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

- Hotta O, Inoue CN, Miyabayashi S, Furuta T, Takeuchi A, Taguma Y. Clinical and pathologic features of focal segmental glomerulosclerosis with mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene mutation. *Kidney Int.* 2001;59:1236-43.
- Hudson LD, Puckett C, Berndt J, Chan J, Gencic S. Mutation of the proteolipid protein gene PLP in a human X chromosome-linked myelin disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(20):8128-31.
- Hur S, Stroud RM. How U38, 39, and 40 of many tRNAs become the targets for pseudouridylation by TruA. *Mol Cell.* 2007;26:189-203.
- Hurst S, Garbern J, Trepanier A, Gow A. Quantifying the carrier female phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Genet Med.* 2006;8:371-8.
- Jack LS, Benson C, Sadiq MA, Rizzo WB, Margalit E. Segmentation of retinal layers in Sjögren-Larsson syndrome. *Ophthalmology.* 2015;122(8):1730-2.
- Jones DE. Early relapsing multiple sclerosis. *Continuum (Minneap Minn).* 2016;22(3):744-60.
- Joutel A, Vahedi K, Corpechot C, Troesch A, Chabriat H, Vayssière C, Cruaud C, Maciazek J, Weissenbach J, Bousser MG, Bach JF, Tournier-Lasserre E. Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet.* 1997;350(9090):1511-5.
- Joutel A, Favrole P, Labauge P, Chabriat H, Lescoat C, Andreux F, Domenga V, Cecillon M, Vahedi K, Ducros A, Cave-Riant F, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. *Lancet.* 2001;358:2049-51.
- Karczewski K, Francioli L, Tiao G, Cummings B, Alföldi J, Wang Q, Collins R, Laricchia K, Ganna A, Birnbaum D, Gauthier L, Brand H, Solomonson M, Watts N, Rhodes D, Singer-Berk M, Seaby E, Kosmicki J, Walters R, Tashman K, Farjoun Y,

Banks E, Poterba T, Wang A, Seed C, Whiffin N, Chong J, Samocha K, Pierce-Hoffman E, Zappala Z, O'Donnell-Luria A, Minikel E, Weisburd B, Lek M, Ware J, Vittal C, Armean I, Bergelson L, Cibulskis K, Connolly K, Covarrubias M, Donnelly S, Ferriera S, Gabriel S, Gentry J, Gupta N, Jeandet T, Kaplan D, Llanwarne C, Munshi R, Novod S, Petrillo N, Roazen D, Ruano-Rubio V, Saltzman A, Schleicher M, Soto J, Tibbetts K, Tolonen C, Wade G, Talkowski M, Consortium T, Neale B, Daly M, MacArthur D. Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *Biorxiv*. 2019;531210. Disponível em: <<https://gnomad.broadinstitute.org/>>. Acesso em: 30 de março de 2019.

Karle KN, Biskup S, Schüle R, Schweitzer KJ, Krüger R, Bauer P, Bender B, Nägele T, Schöls L. De novo mutations in hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids (HDLS). *Neurology*. 2013;81:2039-44.

Kaul R, Gao GP, Balamurugan K, Matalon R. Cloning of the human aspartoacylase cDNA and a common missense mutation in Canavan disease. *Nat Genet*. 1993;5(2):118-23.

Kevelam SH, Rodenburg RJ, Wolf NI, Ferreira P, Lunsing RJ, Nijtmans LG, Mitchell A, Arroyo HA, Rating D, Vanderver A, van Berkel CG, Abbink TE, Heutink P, van der Knaap MS. NUBPL mutations in patients with complex I deficiency and distinct MRI pattern. *Neurology*. 2013;80:1577-83.

Kevelam SH, Steenweg ME, Srivastava S, Helman G, Naidu S, Schiffmann R, Blaser S, Vanderver A, Wolf NI, van der Knaap MS. Update on Leukodystrophies: A historical perspective and adapted definition. *Neuropediatrics*. 2016;47:349-54.

Köhler C, Heyer C, Hoffjan S, Stemmler S, Lücke T, Thiels C, Kohlschütter A, Löbel U, Horvath R, Kleinle S, Benet-Pages A, Abicht A. Early-onset leukoencephalopathy due to a homozygous missense mutation in the DARS2 gene. *Mol Cell Probe*. 2015;29(5):319-22.

Kollberg G, Tulinius M, Melberg A, Darin N, Andersen O, Holmgren D, Oldfors A, Holme E. Clinical manifestation and a new ISCU mutation in iron–sulphur cluster deficiency myopathy. *Brain*. 2009;132(8):2170-9.

Koopman WJ, Willems PH, Smeitink JA. Monogenic mitochondrial disorders. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1132-41.

Konno T, Tada M, Tada M, Koyama A, Nozaki H, Harigaya Y, Nishimiya J, Matsunaga A, Yoshikura N, Ishihara K, Arakawa M, Isami A, Okazaki K, Yokoo H, Itoh K, Yoneda M, Kawamura M, Inuzuka T, Takahashi H, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Ikeuchi T. Haploinsufficiency of CSF-1R and clinicopathologic characterization in patients with HDLS. *Neurology*. 2014;82:139-48.

Konno T, Yoshida K, Mizuno T, Kawarai T, Tada M, Nozaki H, Ikeda SI, Nishizawa M, Onodera O, Wszolek ZK, Ikeuchi T. Clinical and genetic characterization of adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia associated with *CSF1R* mutation. *Eur J Neurol*. 2017;24:37-45.

Kühl J-S, Suarez F, Gillett G, Hemmati P, Snowden J, Stadler M, Vuong GL, Aubourg P, Köhler W, Arnold R. Long-term outcomes of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for adult cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain*. 2017;140(4):953-66.

Labauge P, Rouillet E, Boespflug-Tanguy O, Nicoli F, Le Fur Y, Cozzzone PJ, Ducreux D, Rodriguez D. Familial, adult onset form of leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement: inconstant high brain lactate and very slow disease progression. *Eur Neurol*. 2007;58:59-61.

Labauge P, Horzinski L, Ayrygnac X, Blanc P, Vukusic S, Rodriguez D, Mauguier F, Peter L, Goizet C, Bouhour F, Denier C, Confavreux C, Obadia M, Blanc F, de Sèze J, Fogli A, Boespflug-Tanguy O. Natural history of adult-onset eIF2B-related disorders: a multi-centric survey of 16 cases. *Brain*. 2009;132(8):2161-9.

Labauge P, Carra-Dalliere C, Champfleur NM, Aygnac X, Boespflug-Tanguy O. MRI pattern approach of adult-onset inherited leukoencephalopathies. *Neurol Clin Pract.* 2014;4:287-95.

Labrune P, Lacroix C, Goutières F, de Laveaucoupet J, Chevalier P, Zerah M, Husson B, Landrieu P. Extensive brain calcifications, leukodystrophy, and formation of parenchymal cysts: A new progressive disorder due to diffuse cerebral microangiopathy. *Neurology.* 1996;46(5):1297-301.

Lanska DJ, Currier RD, Cohen M, Gambetti P, Smith EE, Bebin J, Jackson JF, Whitehouse PJ, Markesbery WR. Familial progressive subcortical gliosis. *Neurology.* 1994;44:1633-43.

Lebigot E, Gaignard P, Dorboz I, Slama A, Rio M, de Lonlay P, Héron B, Sabourdy F, Boespflug-Tanguy O, Cardoso A, Habarou F, Ottolenghi C, Thérond P, Bouton C, Golinelli-Cohen MP, Boutron A. Impact of mutations within the [Fe-S] cluster or the lipoic biosynthesis pathways on mitochondrial protein expression profiles in fibroblast from patients. *Mol Genet Metab.* 2017;122:85-94.

Leegwater PA, Vermeulen G, Konst AA, Naidu S, Mulders J, Visser A, Kersbergen P, Mobach D, Fonds D, van Berkel CG, Lemmers RJ, Frants RR, Oudejans CB, Schutgens RB, Pronk JC, van der Knaap MS. Subunits of the translation initiation factor eIF2B are mutant in leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Nat Genet.* 2001;29(4):383-8.

Lei H, Berkel C, Wieringen W, Brenner C, Feigenbaum A, Mercimek-Mahmutoglu S, Philippart M, Tatli B, Wassmer E, Scheper G, Knaap M. Genotype-phenotype correlation in vanishing white matter disease. *Neurology.* 2010;75(17):1555-9.

Leite CC, Lucato LT, Santos GT, Kok F, Brandão AR, Castillo M. Imaging of adult leukodystrophies. *Arq Neuropsiquiatr.* 2014;72(8):625-32.

Liu R, van der Lei HD, Wang X, Wortham NC, Tang H, van Berkel CG, Mufunde TA, Huang W, van der Knaap MS, Scheper GC, Proud CG. Severity of vanishing white matter disease does not correlate with deficits in eIF2B activity or the integrity of eIF2B complexes. *Hum Mutat.* 2011;32(9):1036-45.

Lossos A, Khoury M, Rizzo WB, Gomori JM, Banin E, Zlotogorski A, Jaber S, Abramsky O, Argov Z, Rosenmann H. Phenotypic variability among adult siblings with Sjögren-Larsson syndrome. *Arch Neurol.* 2006;63:278-80.

Lu Y, Ondo Y, Shimojima K, Osaka H, Yamamoto T. A novel *TUBB4A* mutation G96R identified in a patient with hypomyelinating leukodystrophy onset beyond adolescence. *Hum Genome Var.* 2017;4:17035.

Lucato LT, Freua F, Kok F. Chronic stage of Marchiafava–Bignami disease. *Arq Neuropsiquiatr.* 2015;73(10):890.

Lynch D, Jaunmuktane Z, Sheerin U-M, Phadke R, Brandner S, Milonas I, Dean A, Bajaj N, McNicholas N, Costello D, Cronin S, McGuigan C, Rossor M, Fox N, Murphy E, Chataway J, Houlden H. Hereditary leukoencephalopathy with axonal spheroids: a spectrum of phenotypes from CNS vasculitis to parkinsonism in an adult onset leukodystrophy series. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;87(5):512-9.

Lynch DS, Zhang WJ, Lakshmanan R, Kinsella JA, Uzun GA, Karbay M, Tüfekçioğlu Z, Hanagasi H, Burke G, Foulds N, Hammans SR, Bhattacharjee A, Wilson H, Adams M, Walker M, Nicoll JA, Chataway S, Fox N, Davagnanam I, Phadke R, Houlden H. Analysis of mutations in *AARS2* in a series of *CSFIR*-negative patients with adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia. *JAMA Neurol.* 2016;73(12):1433-39.

Lynch DS, Paiva ARB, Zhang WJ, Bugiardini E, Freua F, Lucato LT, Macedo-Souza LI, Lakshmanan R, Kinsella JA, Merwick A, Rossor AM, Bajaj N, Herron B, McMonagle P, Morrison PJ, Hughes D, Pittman A, Laurà M, Reilly MM, Warren JD, Mummery CJ, Schott JM, Adams M, Fox NC, Murphy E, Davagnanam I, Kok F,

Chataway J, Houlden H. Clinical and genetic characterization of leukoencephalopathies in adults. *Brain*. 2017;140(5):1204-11.

Lynch DS, Wade C, Paiva ARB, John N, Kinsella JA, Merwick Á, Ahmed RM, Warren JD, Mummery CJ, Schott JM, Fox NC, Houlden H, Adams ME, Davagnanam I, Murphy E, Chataway J. Practical approach to the diagnosis of adult-onset leukodystrophies: an updated guide in the genomic era. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90:543-554.

Margolin DH, Kousi M, Chan YM, Lim ET, Schmahn JD, Hadjivassiliou M, Hall JE, Adam I, Dwyer A, Plummer L, Aldrin SV, O'Rourke J, Kirby A, Lage K, Milunsky JM, Chan J, Hedley-Whyte T, Daly MJ, Katsanis N, Seminara SP. Ataxia, dementia, and hypogonadotropism caused by disordered ubiquitination. *N Engl J Med*. 2013;368:1992-2003.

Marras C, Lang A, van de Warrenburg BP, Sue CM, Tabrizi SJ, Bertram L, Mercimek-Mahmutoglu S, Ebrahimi-Fakhari D, Warner TT, Durr A, Assmann B, Lohmann K, Kostic V, Klein C. Nomenclature of genetic movement disorders: recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Mov Disord*. 2016;31:436-457.

Mathis S, Goizet C, Tazir M, Magdelaine C, Lia AS, Magy L, Vallat JM. Charcot-Marie-Tooth diseases: an update and some new proposals for the classification. *J Med Genet*. 2015;52:681-690.

Mehta A, Hughes DA. Fabry Disease. 2002 Aug 5 [Updated 2017 Jan 5]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

Melberg A, Hallberg L, Kalimo H, Raininko R. MR characteristics and neuropathology in adult-onset autosomal dominant leukodystrophy with autonomic symptoms. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2006;27:90411.

Merzbacher L. Eine eigenartige familiär-hereditäre Erkrankungsform (aplasia axialis extracorticalis congenita). *Z Gesamte Neurol Psychiatrie*. 1910;3:1-138.

Meuwissen M, Halley D, Smit L, Lequin M, Cobben J, de Coo R, van Harsseel J, Sallevelt S, Woldringh G, van der Knaap M, de Vries L, Mancini G. The expanding phenotype of COL4A1 and COL4A2 mutations: clinical data on 13 newly identified families and a review of the literature. *Genet Med*. 2015;17(11):843-53.

Mimault C, Giraud G, Courtois V, Cailloux F, Boire JY, Dastugue B, Boespflug-Tanguy O. Proteolipoprotein gene analysis in 82 patients with sporadic Pelizaeus-Merzbacher Disease: duplications, the major cause of the disease, originate more frequently in male germ cells, but point mutations do not. The Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease. *Am J Hum Genet*. 1999;65:360-9.

Miura T, Mezaki N, Konno T, Iwasaki A, Hara N, Miura M, Funayama M, Unai Y, Tashiro Y, Okita K, Kihara T, Ito N, Kanatsuka Y, Jones DT, Hara N, Ishiguro T, Tokutake T, Kasuga K, Nozaki H, Dickson DW, Onodera O, Wszolek ZK, Ikeuchi T. Identification and functional characterization of novel mutations including frameshift mutation in exon 4 of CSF1R in patients with adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia. *J Neurol*. 2018; 265(10):2415-24.

Mochel F, Knight MA, Tong WH, Hernandez D, Ayyad K, Taivassalo T, Andersen PM, Singleton A, Rouault TA, Fischbeck KH, Haller RG. Splice mutation in iron-sulfur cluster scaffold protein ISCU causes myopathy with exercise intolerance. *Am J Hum Genet*. 2008;82: 652-60.

Morell P, Wiesmann U. A correlative synopsis of the leukodystrophies. *Neuropediatrics*. 1984;15(suppl):62-65.

Moser HW, Raymond GV, Lu SE, Muenz LR, Moser AB, Xu J, Jones RO, Loes DJ, Melhem ER, Dubey P, Bezman L, Brereton NH, Odone A. Follow-up of 89

asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil. *Arch Neurol*. 2005;62:1073-80.

Moser H, Raymond GV. Leukodystrophy and Myelin. In: Raymond GV, Eichler F, Fatemi A, Naidu S. *Leukodystrophies*. London: Mac Keith Press; 2011. p.1-4.

Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature*. 1993;361(6414):726-30.

Nagapa M, Bindu PS, Chiplunkar S, Gupta N, Sinha S, Mathuranath PS, Bharath RD, Taly AB. Child Neurology: Sjögren-Larsson syndrome. *Neurology*. 2017;88:e1-e4.

Nahhas N, Sabet Rasekh P, Vanderver A, et al. Autosomal dominant leukodystrophy with autonomic disease. 2016 Jan 7. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

Namekawa M, Takiyama Y, Aoki Y, Takayashiki N, Sakoe K, Shimazaki H, Taguchi T, Tanaka Y, Nishizawa M, Saito K, Matsubara Y, Nakano I. Identification of GFAP gene mutation in hereditary adult-onset Alexander's disease. *Ann Neurol*. 2002;52:779-85.

Nezu A, Kimura S, Takeshita S, Osaka H, Kimura K, Inoue K. An MRI and MRS study of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Pediatr Neurol*. 1998;18:334-7.

Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, Shaffer T, Wong M, Bhattacharjee A, Eichler EE, Bamshad M, Nickerson DA, Shendure J. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*. 2009;461(7261):272-6.

Nicholson AM, Baker MC, Finch NA, Rutherford NJ, Wider C, Graff-Radford NR, Nelson PT, Clark HB, Wszolek ZK, Dickson DW, Knopman DS, Rademakers R. CSF1R mutations link POLD and HDLS as a single disease entity. *Neurology*. 2013;80:1033-40.

Oh SJ. *Clinical electromyography: nerve conduction studies*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.

Ohlenbusch A, Henneke M, Brockmann K, Goerg M, Hanefeld F, Kohlschütter A, Gärtner J. Identification of ten novel mutations in patients with eIF2B-related disorders. *Hum Mutat*. 2005;25(4):411-6.

Oliveri RL, Muglia M, De Stefano N, Mazzei R, Labate A, Conforti FL, Patitucci A, Gabriele AL, Tagarelli G, Magariello A, Zappia M, Gambardella A, Federico A, Quattrone A. A novel mutation in the Notch3 gene in an Italian family with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: genetic and magnetic resonance spectroscopic findings. *Arch Neurol*. 2001;58(9):1418-22.

Olsson A, Lind L, Thornell LE, Holmberg M. Myopathy with lactic acidosis is linked to chromosome 12q23.3-24.11 and caused by an intron mutation in the *ISCU* gene resulting in a splicing defect. *Hum Mol Genet*. 2008;17:1666-72.

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. # 236792 1-2-hydroxyglutaric aciduria; l2hga. Disponível em: <<http://omim.org/entry/236792?search=l2hga&highlight=l2hga>>. Acesso em: 12 mai. 2017.

Orthmann-Murphy J, Salsano E, Abrams C, Bizzi A, Uziel G, Freidin M, Lamantea E, Zeviani M, Scherer S, Pareyson D. Hereditary spastic paraplegia is a novel phenotype for GJA12/GJC2 mutations. *Brain*. 2009;132(2):426-38.

Padiath QS, Saigoh K, Schiffmann R, Asahara H, Yamada T, Koeppen A, Hogan K, Ptáček LJ, Fu YH. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nat Genet.* 2006;38:1114-23.

Paiva ARB, Melo US, Freua F, Dória D, Cabral KSS, Macedo-Souza LI, Lucato LT, Kok F. Typical clinical and neuroimaging features in Sjögren-Larsson syndrome. *Arq Neuropsiquiatr.* 2018;76(4):283.

Paiva ARB, Freua F, Lucato LT, Parmera J, Dória D, Nóbrega PR, Olávio TR, Macedo-Souza LI, Kok F. A novel *GFAP* mutation in a type II (late-onset) Alexander disease patient. *J Neurol.* 2016;263(4):821-2.

Paul VD, Lill R. Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1853:1528-39.

Pareyson D, Fancellu R, Mariotti C, Romano S, Salmaggi A, Carella F, Girotti F, Gattellaro G, Carriero MR, Farina L, Ceccherini I, Savoiaro M. Adult-onset Alexander disease: a series of eleven unrelated cases with review of the literature. *Brain.* 2008;131:2321-31.

Parikh S, Bernard G, Leventer RJ, van der Knaap MS, van Hove J, Pizzino A, McNeill NH, Helman G, Simons C, Schmidt JL, Rizzo WB, Patterson MC, Taft RJ, Vanderver A on behalf of the GLIA Consortium. A clinical approach to the diagnosis of patients with leukodystrophies and genetic leukoencephalopathies. *Mol Genet Metab.* 2015;114(4):501-15.

Patay Z, Mills JC, Löbel U, Lambert A, Sablauer A, Ellison DW. Cerebral Neoplasms in L-2 Hydroxyglutaric Aciduria: 3 New Cases and Meta-Analysis of Literature Data. *Am J Neuroradiol.* 2012;33(5):940-3.

Patay Z, Orr B, Shulkin B, Hwang S, Ying Y, Broniscer A, Boop F, Ellison D. Successive distinct high-grade gliomas in L-2-hydroxyglutaric aciduria. *J Inherit Metab Dis.* 2015;38(2):273-7.

Pedroso JL, Munford V, Bastos AU, Castro LP de, Marussi VHR, Silva GS, Arita JH, Menck CFM, Barsottini OG. LMNB1 mutation causes cerebellar involvement and a genome instability defect. *J Neurol Sci.* 2017;379:249-52.

Pelizaeus F. Ueber eine eigenartige familiäre Entwicklungshemmung vornehmlich auf motorischem Gebiet. *Arch Psychiatrie Nervenkr.* 1899;31:100-4.

Polten A, Fluharty AL, Fluharty CB, Kappler J, von Figura K, Gieselmann V. Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy. *N Engl J Med.* 1991;324(1):18-22.

Preston DC, Shapiro BE. *Electromyography and neuromuscular disorders: clinical-electrophysiologic correlations.* 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013.

Prust M, Wang J, Morizono H, Messing A, Brenner M, Gordon E, Hartka T, Sokohl A, Schiffmann R, Gordish-Dressman H, Albin R, Amartino H, Brockman K, Dinopoulos A, Dotti MT, Fain D, Fernandez R, Ferreira J, Fleming J, Gill D, Griebel M, Heilstedt H, Kaplan P, Lewis D, Nakagawa M, Pedersen R, Reddy A, Sawaishi Y, Schneider M, Sherr E, Takiyama Y, Wakabayashi K, Gorospe JR, Vanderver A. GFAP mutations, age at onset, and clinical subtypes in Alexander disease. *Neurology.* 2011;77:1287-94.

Rademakers R, Baker M, Nicholson AM, Rutherford NJ, Finch N, Soto-Ortolaza A, Lash J, Wider C, Wojtas A, DeJesus-Hernandez M, Adamson J, Kouri N, Sundal C, Shuster EA, Aasly J, MacKenzie J, Roeber S, Kretzschmar HA, Boeve BF, Knopman DS, Petersen RC, Cairns NJ, Ghetti B, Spina S, Garbern J, Tselis AC, Uitti R, Das P, Van Gerpen JA, Meschia JF, Levy S, Broderick DF, Graff-Radford N, Ross OA, Miller BB, Swerdlow RH, Dickson DW, Wszolek ZK. Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nature Genet.* 2012;44:200-5.

Raini G, Sharek R, Herrero M, Atzmon A, Shenoy A, Geiger T, Elroy-Stein O. Mutant eIF2B leads to impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in vanishing white matter disease. *J Neurochem*. 2017;141(5):694-707.

Regis S, Biancheri R, Bertini E, Burlina A, Lualdi S, Bianco MG, Devescovi R, Rossi A, Uziel G, Filocamo M. Genotype-phenotype correlation in five Pelizaeus-Merzbacher disease patients with *PLP1* gene duplications. *Clin Genet*. 2008;73:279-87.

Renaud D. Clinical approach to leukoencephalopathies. *Semin Neurol*. 2012;32:29-33.

Renaud D. Adult-onset leukoencephalopathies. *Continuum* (Minneapolis, Minn). 2016;22(2):559-78.

Richards A, van den Maagdenberg AMJM, Jen JC, Kavanagh D, Bertram P, Spitzer D, Liszewski MK, Barilla-LaBarca ML, Terwindt GM, Kasai Y, McLellan M, Grand MG, Vanmolkot KRJ, de Vries B, Wan J, Kane MJ, Mamsa H, Schäfer R, Stam AH, Haan J, de Jong PTVM, Storimans CW, van Schooneveld MJ, Oosterhuis JA, Gschwendter A, Dichgans M, Kotschet KE, Hodgkinson S, Hardy TA, Delatycki MB, Hajj-Ali RA, Kothari PH, Nelson SF, Frants RR, Baloh RW, Ferrari MD, Atkinson JP. C-terminal truncations in human 3' -5' DNA exonuclease TREX1 cause autosomal dominant retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy. *Nat Genet*. 2007;39(9):1068-70.

Rizzo WB, Dammann AL, Craft DA. Sjögren-Larsson syndrome. Impaired fatty alcohol oxidation in cultured fibroblasts due to deficient fatty alcohol:nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase activity. *J Clin Invest*. 1988;81(3):738-44.

Rizzo WB, Carney G, Lin Z. The molecular basis of Sjögren-Larsson syndrome: mutation analysis of the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Am J Hum Genet*. 1999;65:1547-60.

Robinson M-È, Rossignol E, Brais B, Rouleau G, Arbour J-F, Bernard G. Vanishing white matter disease in French-Canadian patients from Quebec. *Pediatr Neurol*. 2014;51(2):225-32.

Rubegni A, Battisti C, Tessa A, Cerase A, Doccini S, Malandrini A, Santorelli FM, Federico A. SPG2 mimicking multiple sclerosis in a family identified using next generation sequencing. *J Neurol Sci*. 2017;375:198-202.

Russo LS, Aron A, Anderson PJ. Alexander's disease: A report and reappraisal. *Neurology*. 1976;26:607-14.

Rutten J, Lesnik Oberstein SAJ. CADASIL. 2000 Mar 15 [Updated 2016 Jul 14]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

Rzem R, Veiga-da-Cunha M, Noel G, Goffette S, Nassogne MC, Tabarki B, Scholler C, Marquardt T, Vikkula M, Van Schaftingen E. A gene encoding a putative FAD-dependent L2-hydroxyglutarate dehydrogenase is mutated in L2-hydroxyglutaric aciduria. *Proc Nat Acad Sci*. 2004;101(16):849-54.

Sakai N, Inui K, Fujii N, Fukushima H, Nishimoto J, Yanagihara I, Isegawa Y, Iwamatsu A, Okada S. Krabbe disease: isolation and characterization of a full-length cDNA for human galactocerebrosidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;198(2):485-91.

Santens P, Van Damme T, Steyaert W, Willaert A, Sablonniere B, De Paepe A, Coucke P J, Dermaut B. RNF216 mutations as a novel cause of autosomal recessive Huntington-like disorder. *Neurology*. 2015;84:1760-6.

Scaglia F1, VogelH,Hawkins EP, Vladutiu GD, Liu LL,Wong LJ.Novel homoplasmic mutation in the mitochondrial tRNA^{Tyr} gene associated with atypical mitochondrial cytopathy presenting with focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Med Genet A*. 2003;123A:172-8.

Schiffmann R, van der Knaap MS. An MRI-based approach to the diagnosis of white matter disorders. *Neurology*. 2009;72:750-9.

Schiffmann R, Fogli A, van der Knaap MS, et al. Childhood ataxia with central nervous system hypomyelination/vanishing white matter. 2003 Feb 20 [Updated 2012 Aug 9]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*. 2012;13(12):878-90.

Seeman P, Krsck P, Namestkova K, Malikova M, Belsan T, Proskova M. Pelizaeus-Merzbacher's Disease (PMD) - Detection of the most frequent mutation of the Proteolipid protein gene in Czech patients and families with the classical form of PMD. *Ceska Slovenska Neurol Neurochir*. 2003;66:95-104.

Seitelberger F. Structural manifestations of leukodystrophies. *Neuropediatrics*. 1984;15(suppl):53-61.

Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Elsasser HP, Muhlenhoff U, Webert H, Hobler A, Hannemann F, Bernhardt R, Lill R. Humans possess two mitochondrial ferredoxins, FDX1 and FDX2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107: 11775-80.

Simons C, Wolf NI, McNeil N, Caldovic L, Devaney JM, Takanohashi A, Crawford J, Ru K, Grimmond SM, Miller D, Tonduti D, Schmidt JL, Chudnow RS, van Coster R, Lagae L, Kisler J, Sperner J, van der Knaap MS, Schiffmann R, Taft RJ, Vanderver A. A de novo mutation in the β -tubulin gene TUBB4A results in the leukoencephalopathy hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *Am J Hum Genet*. 2013;92(5):767-73.

- Shaheen R, Han L, Fageih E, Ewida N, Alobeid E, Phizicky E, Alkuraya F. A homozygous truncating mutation in PUS3 expands the role of tRNA modification in normal cognition. *Hum Genet.* 2016;135(7):707-13.
- Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26:1135-45.
- Shiikara T, Sawaishi Y, Adachi M, Kato M, Hayasaka K. Asymptomatic hereditary Alexander's disease caused by a novel mutation in GFAP. *J Neurol Sci.* 2004; 225(1-2):125-7.
- Sjögren T, Larsson T. Oligophrenia in combination with congenital ichthyosis and spastic disorders: a clinical and genetic study. *Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl.* 1957;113:1-112.
- Sondergaard CB, Nielsen JE, Hansen CK, Christensen H. Hereditary cerebral small vessel disease and stroke. *Clin Neurol Neurosurg.* 2017;155:45-57.
- Southwood CM, Garbern J, Jiang W, Gow A. The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neuron.* 2002;36:585-96.
- Souza PVS, Pinto WBVR, Oliveira ASB. Lumbago and alopecia in patient with leukodystrophy: think on CARASIL. *Arq Neuropsiquiatr.* 2016;74(7):599-600.
- Spiegel R, Saada A, Halvardson J, Soiferman D, Shaag A, Edvardson S, Horovitz Y, Khayat M, Shalev SA, Feuk L, Elpeleg O. Deleterious mutation in *FDX1L* gene is associated with a novel mitochondrial muscle myopathy. *Eur J Hum Genet.* 2014; 22:902-6.
- Srivastava S, Naidu S. Alexander Disease. 2002 Nov 15 [Updated 2015 Jan 8]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

Stabile C, Taglia I, Battisti C, Bianchi S, Federico A. Hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids (HDLS): update on molecular genetics. *Neurol Sci.* 2016;37(9):1565-9.

Stanley ER, Chitu V. CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6:a021857.

Steenweg ME, Jakobs C, Errami A, van Dooren SJ, Adeva Bartolomé MT, Aerssens P, Augoustides-Savvapoulou P, Baric I, Baumann M, Bonafé L, Chabrol B, Clarke JT, Clayton P, Coker M, Cooper S, Falik-Zaccai T, Gorman M, Hahn A, Hasanoglu A, King MD, de Klerk HB, Korman SH, Lee C, Meldgaard Lund A, Mejaski-Bosnjak V, Pascual-Castroviejo I, Raadhyaksha A, Rootwelt T, Roubertie A, Ruiz-Falco ML, Scalais E, Schimmel U, Seijo-Martinez M, Suri M, Sykut-Cegielska J, Trefz FK, Uziel G, Valayannopoulos V, Vianey-Saban C, Vlaho S, Vodopiutz J, Wajner M, Walter J, Walter-Derbort C, Yapici Z, Zafeiriou DI, Spreuwenberg MD, Celli J, den Dunnen JT, van der Knaap MS, Salomons GS. An overview of L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene (L2HGDH) variants: a genotype-phenotype study. *Hum Mutat.* 2010;31(4):380-90.

Steenweg ME, Ghezzi D, Haack T, Abbink TE, Martinelli D, van Berkel CG, Bley A, Diogo L, Grillo E, Te Water Naude J, Strom TM, Bertini E, Prokisch H, van der Knaap MS, Zeviani M. Leukoencephalopathy with thalamus and brainstem involvement and high lactate 'LTBL' caused by EARS2 mutations. *Brain.* 2012;135(5):1387-94.

Steinber SJ, Moser AB, Raymond GV. X-linked adrenoleukodystrophy. 1999 Mar 26 [Updated 2015 Apr 9]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *Gene Reviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NST, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): 2003 Update. *Hum Mutat* 2003;21:577-81. The Human Gene Mutation Database.

[Http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=abcd1](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=abcd1). Disponível em: <<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>>. Acesso em: 04 de março de 2019.

Stevens A. Pigments and minerals. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and practice of histological techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1990. p. 245-67.

Sundal S, Lash J, Aasly J, Oygarden S, Roeber S, Kretzochman H, Garbern JY, Tselis A, Rademakers R, Dickson DW, Broderick D, Wszolek ZK. Hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids (HDLS): a misdiagnoses disease entity. *J Neurol Sci*. 2012;314:130-7.

Sundal C, Wszolek Z. Adult-Onset Leukoencephalopathy with Axonal Spheroids and Pigmented Glia. 2012 Aug 30 [Updated 2014 Dec 18]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

Sundblom J, Melberg A, Kalimo H, Smits A, Raininko R. MR imaging characteristics and neuropathology of the spinal cord in adult-onset autosomal dominant leukodystrophy with autonomic symptoms. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009;30:328-35.

Suzuki S, Iwaki T, Arakawa K, Furuya H, Fujii N, Iwaki A. An autopsy case of adult-onset hereditary spastic paraplegia type 2 with a novel mutation in exon 7 of the proteolipid protein 1 gene. *Acta Neuropathol*. 2011;122(6):775-81.

Synofzik M, Gonzalez MA, Lourenço CM, Coutelier M, Haack TB, Rebelo A, Hannequin D, Strom TM, Prokisch H, Kernstock C, Duur A, Schöls L, Lima-Martinez MM, Farooq A, Schüle Rebecca, Stevanin G, Marques Jr W, Züchner S. PNPLA6 mutations cause Boucher-Neuhäuser and Gordon Holmes syndromes as part of a broad neurodegenerative spectrum. *Brain*. 2014;137:69-77.

Tikka S, Baumann M, Siitonen M, Pasanen P, Pöyhönen M, Myllykangas L, Viitanen M, Fukutake T, Cognat E, Joutel A, Kalimo H. CADASIL and CARASIL. *Brain Pathol.* 2014;24(5):525-44.

Torres AG, Batlle E, Ribas de Pouplana L. Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends Mol Med.* 2014;20:306-14.

Uhlenberg B, Schuelke M, Rüschendorf F, Ruf N, Kaindl AM, Henneke M, Thiele H, Stoltenburg-Didinger G, Aksu F, Topaloğlu H, Nürnberg P, Hübner C, Weschke B, Gärtner J. Mutation in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher like disease. *Am J Hum Genet.* 2004;75(2):251-60.

van Berge L, Hamilton EM, Linnankivi T, Uziel G, Steenweg ME, Isohanni P, Wolf NI, Krägeloh-Mann I, Brautaset NJ, Andrews PI, de Jong BA, al Ghamdi M, van Wieringen WN, Tannous BA, Hulleman E, Würdinger T, van Berkel CG, Polder E, Abbink TE, Struys EA, Scheper GC, van der Knaap MS; LBSL Research Group. Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation: clinical and genetic characterization and target for therapy. *Brain.* 2014;137(4):1019-29.

van der Knaap MS, Barth PG, Stroink H, van Nieuwenhuizen O, Arts WFM, Hoogenraad F, Valk J. Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann Neurol.* 1995;37:324-34.

van der Knaap MS, Barth PG, Gabreels FJM, Franzoni E, Begeer JH, Stroink H, Rotteveel JJ, Valk J. A new leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Neurology.* 1997; 48:845-55.

van der Knaap MS, Breiter SN, Naidu S, Hart AA, Valk J. Defining and categorizing leukoencephalopathies of unknown origin: MR imaging approach. *Radiology.* 1999;213(1):121-33.

van der Knaap MS, Naidu S, Pouwels PJW, Bonavita S, van Coster R, Lagae L, Sperner J, Surtees R, Schiffmann R, Valk J. New syndrome characterized by hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *Am J Neuroradiol*. 2002a;23:1466-74.

van der Knaap MS, van der Voorn P, Barkhof F, Van Coster R, Krageloh-Mann I, Feigenbaum A, Blaser S, Vles JSH, Rieckmann P, Pouwels PJW. A new leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and high lactate. *Ann Neurol* 2002b;53:252-8.

van der Knaap MS, van der Voorn P, Barkhof F, van Coster R, Krageloh-Mann I, Feigenbaum A, Blaser S, Vles JS, Rieckmann P, Pouwels PJ. A new leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and high lactate. *Ann Neurol* 2003;53:252-8.

van der Knaap MS, Valk J. *Magnetic Resonance of Myelin, Myelination and Myelin Disorders*. Berlin: Springer; 2005a. Cap 1, p.1-19: Myelin and White Matter.

van der Knaap MS, Valk J. *Magnetic Resonance of Myelin, Myelination and Myelin Disorders*. Berlin: Springer; 2005b. Cap 65, p.481-95: Leukoencephalopathy with vanishing white matter.

van der Knaap MS, Valk J. *Magnetic Resonance of Myelin, Myelination and Myelin Disorders*. Berlin: Springer; 2005c. Cap 43, p.334-7: Leukoencephalopathy with vanishing white matter.

van der Knaap MS, Salomons GS, Li R, Franzoni E, Gutierrez-Solana LG, Smit LM, Robinson R, Ferrie CD, Cree B, Reddy A, Thomas N, Banwell B, Barkhof F, Jakobs C, Johnson A, Messing A, Brenner M. Unusual variants of Alexander's disease. *Ann Neurol* 2005d;57:327-38.

van der Knaap MS, Ramesh V, Schiffmann R, Blaser S, Kyllerman M, Gholkar A, Ellison DW, van der Voorn JP, van Dooren SJ, Jakobs C, Barkhof F, Salomons GS.

Alexander disease: ventricular garlands and abnormalities of the medulla and spinal cord. *Neurology*. 2006;66:494-8.

van der Knaap MS, Salomons GS. Leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. 2010 May 25 [Updated 2015 Feb 12]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

van der Knaap MS, Bugiani M. Leukodystrophies: a proposed classification system based on pathological changes and pathogenetic mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2017;134(3):351-82.

van Domburg PHMF, Willemsen MAAP, Rotteveel JJ, de Jong JGN, Thijssen HOM, Heerschap A, Cruysberg JRM, Wanders RJA, Gabreels FJM, Steijlen PM. Sjögren-Larsson syndrome: Clinical and MRI/MRS findings in FALDH-deficient patients. *Neurology*. 1999;52:1345-52.

Vanderver A, Tonduti D, Schiffmann R, Schmidt J, van der Knaap MS. Leukodystrophy Overview. 2014 Feb 6. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *Gene Reviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

Vanderver A, Prust M, Tonduti D, Mochel F, Hussey HM, Helman G, Garbern J, Eichler F, Labauge P, Aubourg P, Rodriguez D, Patterson MC, van Hove JLK, Schmidt J, Wolf NI, Boespflug-Tanguy O, Schiffmann R, van der Knaap MS on behalf of the GLIA Consortium. Case definition and classification of leukodystrophies and leukoencephalopathies. *Mol Genet Metab*. 2015;114(4):1494-500.

Vanderver A, Simons C, Helman G, Crawford J, Wolf NI, Bernard G, Pizzino A, Schimidt JL, Takanohashi A, Miller D, Khouzam A, Rajan V, Ramos E, Chowdhury S, Hambuch T, Ru K, Baillie GJ, Grimmond SM, Caldovic L, Devaney J, Bloom M, Evans SH, Murphy JL, McNeill N, Fogel BL, Schiffmann R, van der Knaap MS,

- Taft RJ. Whole exome sequencing in patients with white matter abnormalities. *Ann Neurol*. 2016a;79(6):1031-7.
- Vanderver A. Genetic leukoencephalopathies in adults. *Continuum* (Minneap Minn). 2016b;22(3):916-42.
- Verhoog J, Fuijkschot J, Willemsen M, Ketelaar M, Rotteveel J, Gorter JW. Sjögren-Larsson syndrome: motor performance and everyday functioning in 17 patients. *Dev Med Child Neurol*. 2008;50(1):38-43.
- Vilarinho L, Cardoso ML, Gaspar P, Barbot C, Azevedo L, Diogo L, Santos M, Carrilho I, Fineza I, Kok F, Chorão R, Alegria P, Martins E, Teixeira J, Fernandes H, Verhoeven NM, Salomons GS, Santorelli FM, Cabral P, Amorim A, Jakobs C. Novel L2HGDH mutations in 21 patients with L-2-hydroxyglutaric aciduria of Portuguese origin. *Hum Mutat*. 2005;26(4):395-6.
- Wajner M, Coelho M, Ingrassia R, de Oliveira AB, Busanello EN, Raymond K, Flores-Pires R, de Souza CF, Giugliani R, Vargas CR. Selective screening for organic acidemias by urine organic acid GC-MS analysis in Brazil: fifteen-year experience. *Clin Chim Acta*. 2009;400(1-2):77-81.
- Waldman AT. Leukodystrophies. *Continuum* (Minneap Minn). 2018;24(1):130-49.
- Wider C, Van Gerpen JA, Dearmond S, Shuster EA, Dickson DW, Wszolek ZK. Leukoencephalopathy with spheroids (HDLS) and pigmentary leukodystrophy (POLD): a single entity? *Neurology*. 2009;72:1953-9.
- Willemsen MAAP, Lodewijk IJ1st, Steijlen PM, Rotteveel JJ, de Jong JGW, van Domburg PHMF, Mayatepek E, Gabreels FJM, Wanders RJA. Clinical, biochemical, and molecular genetic characteristics of 19 patients with the Sjögren-Larsson syndrome: Characterization of the leukoencephalopathy. *Brain*. 2001;124:1426-37.

Willemsen MAAP, van der Graaf M, van der Knaap MS, Heerschap A, van Domburg PHMF, Gabreels FJM, Rotteveel JJ. MR imaging and proton MS spectroscopic studies in Sjögren-Larsson syndrome: Characterization of the leukoencephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2004;25:649-57.

Wolf NI, Vanderver A, van Spaendonk RML, Schiffmann R, Brais B, Bugiani M, Sistermans E, Catsman-Berrevoets C, Kros JM, Pinto PS, Pohl D, Tirupathi S, Stromme P, Grauw T, Fribourg S, Demos M, Pizzino A, Naidu S, Guerrero K, van der Knaap MS, Bernard G, On behalf of the 4H Research Group. Clinical spectrum of 4H leukodystrophy caused by *POLR3A* and *POLR3B* mutations. *Neurology*. 2014;83:1898-905.

Wong LJC. Mitochondrial syndromes with leukoencephalopathies. *Semin Neurol*. 2012;32:55-61.

Wortham NC, Proud CG. eIF2B: recente structural and functional insights into a key regulator of translation. *Biochem Soc Trans*. 2015;43(6):1234-40.

Yamamoto Y, Craggs L, Baumann M, Kalimo H, Kalaria RN. Review: molecular genetics and pathology of hereditary small vessel diseases of the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011;37:94-113.

10 Apêndices

10 APÊNDICES

10.1 Apêndice A – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: LEUCOENCEFALOPATIAS GENETICAMENTE DETERMINADAS DE INÍCIO NA IDADE ADULTA: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, ELETROFISIOLÓGICA E DE NEUROIMAGEM
Pesquisador Responsável: Prof.Dr. Fernando Kok **Versão:** 1
Pesquisador Executante: Anderson Rodrigues Brandão de Paiva **CAAE:** 11980213.5.0000.0068
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: NEUROLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10298

Número do Parecer: 214.262

Data da Relatoria: 06/03/2013

Apresentação do Projeto: As leucoencefalopatias constituem um grupo de doenças raras, geneticamente determinadas, que afetam a bainha de mielina e que podem manifestar-se em crianças ou na idade adulta. Os autores apresentam uma abrangente revisão da literatura sobre o tema expõem com clareza os objetivos do estudo que estão já contidos no título do projeto: Leucoencefalopatias geneticamente determinadas de início na idade adulta: caracterização clínica, eletrofisiológica e de neuroimagem.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo da pesquisa, já mencionado no título do projeto, será a caracterização de leucoencefalopatias geneticamente determinadas de início na idade adulta. O estudo será em parte retrospectivo através de compilação de dados de pacientes já diagnosticados e que se encontram em seguimento na Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas e, também prospectivo, com a inclusão de novos pacientes que preencham os critérios de seleção adotados. A caracterização dos casos será baseada em: a) avaliação clínica; b) ressonância magnética de crânio; c) eletroencefalograma; d) eletroneuromiografia; e) estudo de potenciais evocados visual, auditivo e somato-sensorial e eventualmente outros exames laboratoriais conforme julgamento clínico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos são mínimos: dor e eventual hematoma nas coletas de sangue; dor e desconforto causados pela introdução de agulha e pelos estímulos elétricos durante o exame de eletroneuromiografia e desconforto pela exposição a ruídos durante a realização de ressonância magnética. Os benefícios poderão ser representados por avanços nos conhecimentos a respeito deste grupo de doenças.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A metodologia do estudo está elaborada de forma adequada e enquadra-se tipicamente nos propósitos de linhas de investigação em Hospital de atendimento a casos complexos e raros.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os termos obrigatórios requeridos foram devidamente apresentados

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Recomendações: O projeto de estudo está elaborado atendendo as normas éticas e dado o potencial de benefícios recomendamos sua aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Com base nas considerações anteriores e não havendo pendências ou inadequações sugerimos concluímos que o estudo seja aprovado

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 12 de Março de 2013

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

10.2 Apêndice B – Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº..... APTO:

BAIRRO:..... CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº..... APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP:TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : **LEUCOENCEFALOPATIAS GENETICAMENTE DETERMINADAS DE INÍCIO NA IDADE ADULTA: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, ELETROFISIOLÓGICA E DE NEUROIMAGEM.**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: **Prof.Dr. Fernando Kok**

CARGO/FUNÇÃO: Médico Supervisor INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 32.255

PESQUISADOR EXECUTANTE: **Anderson Rodrigues Brandão de Paiva**

CARGO/FUNÇÃO: **Médico** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 126.690 (CREMESP)

UNIDADE DO HCFMUSP: Neurologia Clínica – Divisão de Clínica Neurológica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☒ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : **3 anos**

1 – Estamos fornecendo estas informações com o intuito de solicitar que o senhor(a) ou seu dependente participe voluntariamente de um estudo descritivo que visa melhorar o entendimento de um grupo de doenças raras que se caracterizam pela presença de desmielinização. A mielina é uma substância que contribui para o funcionamento dos nervos e atua como o revestimento de um fio elétrico. O objetivo do estudo é investigar as manifestações clínicas desse grupo de doenças e de como os exames complementares podem contribuir para o seu diagnóstico.

2 – Serão realizados alguns exames de sangue, urina e líquido cefalorraquiano; procedimentos que avaliam o funcionamento elétrico dos nervos (eletromiografia) e do cérebro (eletroencefalograma e potenciais evocados) e exames para estudar a imagem do cérebro (ressonância magnética).

3 – Para estudar as manifestações clínicas o médico coletará informações a respeito da história da doença e fará perguntas além de o examinar cuidadosamente, como é feito habitualmente em consultas médicas mas com especial atenção a parte neurológica.

As amostras de sangue serão obtidas por meio de coleta de sangue de veia periférica. A urina será obtida por meio de coleta em frasco estéril. O líquido cefalorraquiano será obtido por punção lombar, que será realizada por profissional médico.

Para estudar o funcionamento do cérebro e dos nervos, poderão ser realizados eletroencefalograma, eletroneuromiografia, potencial evocado visual e potencial evocado auditivo. A escolha dos exames que serão realizados depende dos sintomas que o(a) senhor(a) ou dependente apresenta e da hipótese diagnóstica que foi realizada. Esses exames precisam de uma colaboração mínima e por isso serão realizados sem sedação.

O eletroencefalograma é um exame que estuda as correntes elétricas geradas pelo cérebro através de um registro gráfico. Consiste em fixar pequenos fios no couro cabeludo para detectar a atividade elétrica do cérebro. O exame deve ser realizado durante o sono e com a pessoa acordada.

A eletroneuromiografia é um exame que avalia a função dos nervos e dos músculos. É dividida em duas partes: o estudo de condução nervosa e a eletromiografia de agulha. O estudo de condução nervosa estuda a função dos nervos. Consiste na aplicação de impulsos ou choques elétricos de baixa intensidade nos nervos periféricos com o objetivo de estimulá-los e produzir uma resposta. A segunda etapa é representada pela eletromiografia de agulha. Nessa fase, pequenas agulhas descartáveis são introduzidas nos músculos para a análise da atividade do músculo em repouso e durante a contração. Uma sensação de picada é sentida quando a agulha é inserida no músculo. Apesar de o exame ser composto por choques elétricos e introdução de agulhas nos músculos, a maioria dos pacientes tolera o procedimento muito bem.

Os potenciais evocados são exames que medem as respostas elétricas do cérebro a estímulos sensoriais externos como visão (potencial evocado visual) ou audição (potencial evocado auditivo). Os potenciais evocados visuais (PEV) são testados colocando-se pequenos fios na parte de trás da cabeça e estimulando a visão de cada olho separadamente por meio de uma tela quadriculada que passa em uma tela de computador. Cada olho é estimulado por duas vezes, sendo que a duração total do procedimento pode ser de 45 – 60 minutos.

Os potenciais evocados auditivos são testados colocando-se fios na região lateral do couro cabeludo e estimulando a audição de cada ouvido separadamente através de um fone que emite um click sonoro. Cada ouvido é estimulado por duas vezes e o procedimento pode demorar entre 30 a 45 minutos.

A ressonância magnética é um exame que fornece uma imagem detalhada do cérebro. Para sua realização, o (a) senhor(a) deverá entrar no aparelho da ressonância que tem formato de túnel. O exame tem duração de 20 a 30 minutos e durante sua realização, deverá ficar imóvel e escutará um barulho alto para o qual usará um protetor de ouvido. Por esse motivo algumas pessoas não conseguem cooperar e precisam de sedação. Caso ela seja necessária, será feita por anestesiista.

Todos os exames serão realizados no Hospital das Clínicas e com horário previamente marcado.

4 – Não haverá inicialmente nenhum benefício direto para o (a) senhor(a). Como vantagem, terá acesso a exames de maior complexidade e a uma revisão de todos os exames. A possibilidade de definir um diagnóstico poderá ter implicações futuras, uma vez que as doenças estudadas nesta investigação têm origem genética e desta forma apresentam risco de se repetir na família. Além disto, o diagnóstico poderá contribuir para o planejamento do tratamento e da reabilitação. .

6 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são Prof.Dr. Fernando Kok / Dr. Anderson Rodrigues Brandão de Paiva que podem ser encontrados na Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 5º. Andar, Divisão de Clínica Neurológica - Cerqueira César – 05403-000, Telefone(s) 3069-6401 / (71) 9924-9888 .

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

7 – É garantida a liberdade, a qualquer momento, da retirada deste consentimento e da saída do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na Instituição;

09 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações de outros pacientes do estudo e não será divulgada a identificação de nenhum paciente;

10 – Pais e responsáveis terão direito a acesso aos resultados do estudo que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Não haverá despesas pessoais para os participantes em qualquer fase do estudo, incluindo consultas e exames. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação.

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (com relação causal comprovada), você terá direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

13 – Os pesquisadores têm o compromisso de utilizar o material coletado somente para esta pesquisa. Os dados obtidos no estudo, de interesse científico, poderão ser submetidos a publicação em revistas ou jornais da área médica.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Leucoencefalopatias geneticamente determinadas de início na idade adulta: caracterização clínica, eletrofisiológica e de neuroimagem”**

Eu discuti com o **Dr. Anderson Rodrigues Brandão de Paiva** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

10.3 Apêndice C – Endereços eletrônicos dos artigos científicos relacionados a esta tese publicados em revistas indexadas

Artigos como primeiro autor ou coautor (em ordem cronológica):

Leite CC, Lucato LT, Santos GT, Kok F, **Brandão AR**, Castillo M. Imaging of adult leukodystrophies. *Arq Neuropsiquiatr* 2014;72(8):625-632.
<https://doi.org/10.1590/0004-282X20140095>

Freua F, Parmera JB, Doria DO, **Paiva AR**, Macedo-Souza LI, Kok F. Leukodystrophy with premature ovarian failure: think on white matter disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2015;73(1):65.
<https://doi.org/10.1590/0004-282X20140183>

Paiva ARB, Freua F, Lucato LT, Parmera J, Dória D, Nóbrega PR, Olávio TR, Macedo-Souza LI, Kok F. A novel *GFAP* mutation in a type II (late-onset) Alexander disease patient. *J Neurol* 2016;263(4):821–822.
<https://doi.org/10.1007/s00415-016-8065-8>

Lynch DS, **Paiva ARB**, Zhang WJ, Bugiardini E, Freua F, Lucato LT, Macedo-Souza LI, Lakshmanan R, Kinsella JA, Merwick A, Rossor AM, Bajaj N, Herron B, McMonagle P, Morrison PJ, Hughes D, Pittman A, Laurà M, Reilly MM, Warren JD, Mummery CJ, Schott JM, Adams M, Fox NC, Murphy E, Davagnanam I, Kok F, Chataway J, Houlden H. Clinical and genetic characterization of leukoencephalopathies in adults. *Brain* 2017;140(5):1204-1211.
<https://doi.org/10.1093/brain/awx045>

Paiva ARB, Pucci Filho CR, Porto AM, Feltrin FS, Kok F, Camargo CHF. When multiple sclerosis and X-linked adrenoleukodystrophy are tangled. *Neurol Clin Pract* 2018;8(2):156–158.
<https://doi.org/10.1212/CPJ.0000000000000431>

Paiva ARB, Melo US, Freua F, Dória D, Cabral KSS, Macedo-Souza LI, Lucato LT, Kok F. Typical clinical and neuroimaging features in Sjögren-Larsson syndrome. *Arq Neuropsiquiatr* 2018;76(4):283.
<http://dx.doi.org/10.1590/0004-282x20180024>

Gurgel-Giannetti J, Lynch DS, **Paiva ARB**, Lucato LT, Yamamoto G, Thomsen C, Basu S, Freua F, Giannetti AV, de Assis BDR, Ribeiro MDO, Barcelos I, Sayão Souza K, Monti F, Melo US, Amorim S, Silva LGL, Macedo-Souza LI, Vianna-Morgante AM, Hirano M, Van der Knaap MS, Lill R, Vainzof M, Oldfors A, Houlden H, Kok F. A novel complex neurological phenotype due to a homozygous mutation in *FDX2*. *Brain* 2018;141(8):2289-2298.
<https://doi.org/10.1093/brain/awy172>

Lynch DS, Wade C, **Paiva ARB**, John N, Kinsella JA, Merwick Á, Ahmed RM, Warren JD, Mummery CJ, Schott JM, Fox NC, Houlden H, Adams ME, Davagnanam I, Murphy E, Chataway J. Practical approach to the diagnosis of adult-onset leukodystrophies: an updated guide in the genomic era. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019;90:543-554.
<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2018-319481>

Resende LL, **Paiva ARB**, Kok F, da Costa Leite C, Lucato LT. Adult Leukodystrophies: A Step-by-Step Diagnostic Approach. *Radiographics* 2019;39(1):153–168.
<https://doi.org/10.1148/rg.2019180081>

De Paiva A, Lynch D, Melo U, Lucato L, Freua F, de Assis B, Barcelos I, Listik C, de dos Santos D, Macedo-Souza L, Houlden H, Kok F. *PUS3* mutations are associated with intellectual disability, leukoencephalopathy, and nephropathy. *Neurol Genet* 2019;5(1):e306.
<https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000306>

10.4 Apêndice D - Imaging of adult leukodystrophies. *Arq Neuropsiquiatr* 2014;72(8):625-632.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> or send a letter to Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.

Leite CC, Lucato LT, Santos GT, Kok F, **Brandão AR**, Castillo M. Imaging of adult leukodystrophies. *Arq Neuropsiquiatr* 2014;72(8):625-632.
<https://doi.org/10.1590/0004-282X20140095>

Imaging of adult leukodystrophies

Imagem nas leucodistrofias do adulto

Claudia Costa Leite^{1,2}, Leandro Tavares Lucato³, Germana Titanelli Santos³, Fernando Kok⁴, Anderson Rodrigues Brandão⁴, Mauricio Castillo²

ABSTRACT

Leukodystrophies are genetically determined white matter disorders. Even though leukodystrophies essentially affect children in early infancy and childhood, these disorders may affect adults. In adults, leukodystrophies may present a distinct clinical and imaging presentation other than those found in childhood. Clinical awareness of late-onset leukodystrophies should be increased as new therapies emerge. MRI is a useful tool to evaluate white matter disorders and some characteristic findings can help the diagnosis of leukodystrophies. This review article briefly describes the imaging characteristics of the most common adult leukodystrophies.

Keywords: leukodystrophies, adult form, magnetic resonance imaging, imaging.

RESUMO

Leucodistrofias são doenças geneticamente determinadas. Apesar das leucodistrofias afetarem principalmente crianças lactentes e infantes, estas doenças podem acometer a faixa etária adulta. Nos adultos, as leucodistrofias podem ter uma apresentação clínica e de imagem distinta daquela da infância. Um aumento na suspeita clínica de leucodistrofias com início tardio deve ocorrer associado ao aparecimento de novas alternativas terapêuticas. Este artigo de revisão descreve sumariamente as características de imagem nas leucodistrofias no adulto.

Palavras-chave: leucodistrofias, formas do adulto, ressonância magnética, métodos de imagem.

Leukodystrophies are genetically determined disorders that primarily affect the white matter. In recent years, advances in molecular genetics have made the characterization and diagnosis of many leukodystrophies possible with the identification of defective genes. Furthermore, the widespread use of magnetic resonance imaging (MRI) allows the identification of white matter changes even at the beginning of the disease, in pre-symptomatic patients and carriers.

Even though leukodystrophies essentially affect children and present in early infancy and childhood, these disorders may affect adults and many times, with a distinct clinical and imaging presentations other than those found in childhood. As leukodystrophies are a heterogeneous group of diseases, many pathological findings are common to all, such as demyelination, hypomyelination and vacuolization. Commonly the white matter involvement is bilateral and symmetric.

Adult leukodystrophies or late-onset leukodystrophies can manifest initially as isolated psychiatric symptoms such as cognitive decline, behavioral problems, memory loss, psychosis and dementia. Other clinical manifestations

include motor signs, peripheral neuropathy, bulbar dysfunction and epilepsy. Furthermore, in adults, disease progression is slower in comparison to the childhood subtypes of the same leukodystrophy.

Clinical awareness of late-onset leukodystrophies should be increased, as new therapeutic approaches have been developed, such as stem cell transplantation, enzyme replacement and gene therapy¹. MRI is a useful tool to evaluate new forms of leukodystrophies and to allow longitudinal studies of disease progression^{2,3,4}. The aim of this review is to briefly describe the imaging characteristics of the most common adult leukodystrophies.

IMAGING FINDINGS

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD)

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is associated with the accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA) in serum, neural tissues and adrenal glands. The

¹Departamento de Radiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo SP, Brasil;

²Radiology Department, School of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, United States;

³Instituto de Radiologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo SP, Brasil;

⁴Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo SP, Brasil

Correspondence: Claudia Costa Leite (Radiologia, Faculdade de Medicina USP, Av. Dr. Ovidio Pires Campos, s/n Inrad Portaria 5, Ressonância Magnética; 06403-010 São Paulo SP, Brasil).

Conflict of interest: There is no conflict of interest to declare.

Received 23 April 2014; Received in final form 07 May 2014; Accepted 27 May 2014.

Figure 1. Adrenomyeloneuropathy with brain involvement in a 38-year-old male. Axial FLAIR (A and B) demonstrates bilateral hyperintensities in the deep white matter, body of the corpus callosum and internal capsules. Axial enhanced T1-weighted images (C and D) shows enhancement of the internal capsules and the body of the corpus callosum (arrows).

mutation associated to ALD-X is in the ABCD1 gene. The cell accumulation of VLCFA causes demyelination in the central nervous system (CNS) and cell destruction in the adrenal glands. As an X-linked inherited disease, X-ALD affects mostly males. In adult males the predominant form is adrenomyeloneuropathy. ALD mutation may occur in women and they sometimes manifest milder symptoms⁸.

Adrenomyeloneuropathy is a slowly progressive disease that presents with adrenal insufficiency, distal axonopathy (predominantly affecting the corticospinal tracts and dorsal columns of spinal cord) and peripheral neuropathy¹⁴. The clinical presentation is usually spastic paraparesis. Brain MRI shows signs of involvement of the corticospinal tracts, dorsal columns, corpus callosum and periventricular white matter (Figure 1). Around 20% of adrenomyeloneuropathy patients develop a more severe phenotype called adult cerebral adrenoleukodystrophy. Psychiatric signs, followed by motor signs, optic atrophy, epilepsy and death characterize this form of cerebral ALD.

As in childhood ALD, contrast enhancement can be seen in the periphery of the white matter lesions⁹ (Figure 2). Cerebral adult form can manifest as asymmetric focal lesions sometimes mimicking a tumor, and in some reports has been related to previous traumatic episodes (Figure 3)^{15,6}.

Heterozygous women are usually asymptomatic or present brisk tendon reflexes and impaired vibration sensation. An ill-defined pain syndrome may occur. In 15% of females progressive spastic paraparesis can ensue around 40 years of age. Very rarely, the X-ALD women present adrenal insufficiency or brain involvement. Brain MRI can be normal or be similar to that seen in adrenomyeloneuropathy^{15,7}.

Metachromatic leukodystrophy

Metachromatic leukodystrophy is an autosomal recessive lysosomal disease caused by a deficiency of the enzyme aryl-sulfatase A (ARSA) that leads to the accumulation of sulfatides in oligodendrocytes, Schwann cells and some neurons causing

Figure 2. Adult cerebral leukodystrophy in a 54-year-old male with fast cognitive decline and pyramidal symptoms. Axial FLAIR and T2 (A and B) demonstrates bilateral periventricular, subcortical frontal and parieto-occipital white matter involvement. Note also hyperintensity in the internal capsules. Contrast enhanced axial T1-weighted images (C) shows faint enhancement in the periphery of the frontal lesions (arrows).

Figure 3: Adult cerebral leukodystrophy with an asymmetric presentation in a 28-year-old male who had a direct trauma to the right parietal region a few months earlier. Axial FLAIR (A) demonstrates a subcortical lesion in the right parietal lobe. Enhanced axial T1-weighted image (B) shows a peripheral discontinuous rim of enhancement. Coronal T2-weighted image (C) shows extension of the signal abnormality to the internal capsule. Axial diffusion-weighted image (D) shows a hyperintense rim in the lesion.

demyelination both in the central as well as in the peripheral nervous systems². More than 100 mutations causing metabolic leukodystrophy have been identified.

The adult-onset form, which occurs after 16 years of age, accounts for 20% of cases. The disease can manifest as late as the seventh decade of life². In adulthood the main clinical presentations are psychiatric problems (cognitive, behavioral problems and memory deficits) sometimes mimicking schizophrenia followed by motor signs, such as spastic paraparesis, cerebellar ataxia and mild polyneuropathy. The disease course is self-limiting¹⁸.

MRI shows a bilateral periventricular leukoencephalopathy predominantly in the frontal regions, sparing the U-fibers in the initial phase of the disease. The corpus callosum can be affected. Cortical atrophy is also seen predominantly late in the course of the disease^{9,10,11}.

Krabbe's disease (Globoid cell leukodystrophy)

Krabbe's disease is an autosomal recessive lysosomal storage disease caused by the deficiency of β -galactocerebrosidase (GALC) enzyme activity. The GALC defect leads to the accumulation of galactocerebroside and psychosine, which causes oligodendrocyte apoptosis and gliosis. The gene encoding for GALC is localized to chromosome 14q31. Unfortunately, neither the galactocerebrosidase activity nor the gene mutation can define the genotype in Krabbe disease¹².

Adult Krabbe patients are older than 16 years, and the disease can manifest as late as in the fifth decade of life. Clinically late onset forms present pyramidal tract involvement with spastic paraparesis or tetraparesis. A peripheral demyelinating polyneuropathy occurs in up to 60% of patients, sometimes being asymmetric and involving bulbar muscles. Progressive cognitive decline, seizures and cortical blindness can also ensue. The disease progression is slow^{13,14}.

On MRI, the deep supratentorial and cerebellar white matter are affected. Pyramidal tracts, splenium of corpus

callosum and optic radiation can present hyperintensity on T2-weighted and FLAIR images. The signal abnormalities in the corticospinal tracts start in the periolandic regions and extend to corona radiata, internal capsules, cerebral peduncles, ventral part of the pons and medulla bilaterally (Figure 4). Corpus callosum atrophy can also be seen. In rare occasions, MRI can be normal^{15,17}.

Alexander disease

Alexander disease is a leukodystrophy characterized pathologically by diffuse Rosenthal fibers accumulation in astrocyte cytoplasm. The defect associated with this disease is located in the gene encoding for GFAP (glial fibrillary acid protein). After the identification of the gene defect, the number of adult-onset cases described in the literature has increased.

In Alexander disease, Rosenthal fibers are scattered throughout the cortex and in white matter and are most numerous in the subpial, perivascular and subependymal regions. The adult-onset form is diagnosed after 12 years of age up to the eighth decade of life. Clinical presentation includes a slowly progressive bulbar dysfunction (dysphagia, dysarthria, dysphonia), pyramidal signs and ataxia, with normal psychic and intellectual functions. When present, palatal myoclonus is suggestive of this diagnosis^{14,16,18}.

MRI shows mild- to- severe atrophy of the medulla oblongata extending caudally to the cervical spinal cord, sometimes associated with signal abnormalities (Figure 5). Midbrain tegmentum atrophy has also been described, with preservation of the pontine base and this finding is quite specific of adult-onset Alexander disease¹⁷. Basal ganglia abnormalities (diffuse or patchy) have also been described, especially in patients under 40 years of age. In a few cases, periventricular garland that is typical of the juvenile form has been documented. Contrast enhancement is also reported in some patients especially in those under 40 years of age¹⁴. Relatives

Figure 4. Late-onset Krabbe disease. Axial T2-weighted images (A and B) disclose bilateral and symmetric hyperintensity involving the corticospinal tracts from the centrum semiovale to the posterior limb of the internal capsule. There are similar changes appreciated in the splenium of corpus callosum.

with the gene mutation but without clinical manifestations (asymptomatic Alexander disease) can present a periventricular band of signal abnormality on MRI²⁵.

Vanishing white matter disease

Vanishing white matter disease patients have mutations in the eIF2B (eukaryotic initiation factor 2B) complex genes. A mild variant of this disease has been described in adolescence and adulthood. The clinical onset in the juvenile or adult forms is characterized by migraine, psychiatric symptoms and dementia. Pseudobulbar palsy and progressive spastic paraparesis have also been described.

Women present ovarian insufficiency (dysgenesis) and leukodystrophy, a condition known as ovarioleukodystrophy. The ovarian failure may precede neurologic symptoms^{2,26}.

MRI can show enlargement of the lateral ventricles and the white matter can be normal or present hyperintensity on T2-weighted and FLAIR images (Figure 6). Limited subcortical white matter hypointensity on FLAIR associated to the cystic breakdown or cavitation can be seen¹⁹.

Leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia

This very rare entity encompasses leukoencephalopathy with spheroids (HDLS) and pigmentary leukodystrophy (POLD), whether they represent the same disease or not is still controversial. They are hereditary diseases that unlike other leukodystrophies manifests exclusively in adults, most cases occurring in the 20- to 50-year age range. The clinical picture consists of behavioral changes, dementia, motor impairment (Parkinsonism, paraparesis or tetraparesis and ataxia) and epilepsy. There is an apparent autosomal dominant inheritance for HDLS and an autosomal recessive or dominant one for POLD²⁸.

CT can show atrophy predominantly in the frontal lobes. MRI in HDLS shows frontal lobe atrophy and white matter lesions that can be diffuse, patchy or confluent and predominantly frontal or frontoparietal. The lesions are non-enhancing and hyperintense on T2-weighted images. Signal intensity abnormalities in the internal capsules and corticospinal tracts have also been described^{24,29}.

Figure 5. Adult-onset Alexander disease in a 47-year-old female. Axial FLAIR images shows atrophy of the medulla with hyperintensity in the projection of corticospinal tracts (arrow in A), bilateral hyperintensity in the deep cerebellar white matter (B) and in the cerebellar hemispheres (C). Enhanced sagittal T1-weighted image (D) shows medulla and upper cervical cord atrophy (arrow).

Figure 6. Vansluis white matter in a 48-year-old male. Axial T2-weighted (A) and FLAIR (B) images showing diffuse bilateral hyperintensity in the white matter extending to the U fibers, internal and external capsules, with cavitations in the deep white matter.

Adult-onset autosomal dominant leukodystrophy (ADLD)

Adult-onset autosomal dominant leukodystrophy (ADLD) is a very rare slowly progressive neurological disorder characterized by symmetric widespread myelin loss in the CNS. Patients usually present in the fourth to sixth decades of life with autonomic symptoms, bowel and bladder dysfunction, and orthostatic hypotension, later progressing to pyramidal symptoms and ataxia²¹. The gene that causes ADLD is located in chromosome 5q31. Two neuropathological observations make this leukodystrophy unique: preservation of oligodendroglia in the presence of subtotal demyelination and a lack of astrogliosis²².

The signal intensity abnormalities are most prominent in the frontoparietal white matter, cerebellar peduncles, corticospinal tracts and corpus callosum (Figure 7). The periventricular white matter is relatively spared. The changes in the uppermost corticospinal tracts underlying the motor cortex may represent the earliest radiologic imaging manifestation of the disease and also can be seen in asymptomatic family

members. Extensive involvement of the cerebral white matter may be seen in the final stages of the disease. The MRI lesion pattern, in combination with the typical clinical symptoms and mode of inheritance, enable the diagnosis of ADLD²³.

Cerebrotendinous xanthomatosis

Cerebrotendinous xanthomatosis is a rare autosomal recessive disease of the lipid metabolism. It is characterized by the deficiency of the mitochondrial enzyme sterol 27-hydroxylase (CYP27) that is involved in the synthesis of bile acids from cholesterol leading to the accumulation of cholesterol and cholestanol. Storage compounds can form xanthomata in various tissues. Initial symptoms occur in childhood with mental retardation, juvenile cataracts or chronic diarrhea. Progressive neurological deterioration occurs in adolescence or adulthood.

The clinical presentation includes psychiatric symptoms, spastic paraparesis, cerebellar ataxia, polyneuropathy. Tendon xanthomas can be found, especially in the

Figure 7. Adult-onset autosomal dominant leukodystrophy with autonomic symptoms (ADLD) in a 54-year-old male. Axial T2 images (A and B) shows high signal in the deep cerebellar white matter, middle cerebellar peduncles and pons. Axial FLAIR images (C and D) demonstrate diffuse hyperintensities in the periventricular and subcortical white matter, splenium of corpus callosum and atrophy. The corticospinal tracts show hypointensity in the internal capsules (arrows in C) and pons (arrows in B).

Figure 8. Cerebrotendinous xanthomatosis in a 47-year-old male with ataxia. Coronal T2-weighted imaging (A) demonstrates hyperintensity in the deep cerebellar white matter. Axial T2* (B) and FLAIR images (C and D) show hyperintensity in the cerebellar hemispheres, cerebellar peduncles (arrows in C), globus pallidus and deep cerebellar white matter. Notice a hypointense area in B; seen in the left cerebellar hemisphere, a finding that can be appreciated eventually in the disease.

Achilles tendon³. Early treatment is important as patients can benefit from therapy²⁴.

MRI shows hyperintensity on T2-weighted images in the dentate nucleus, cerebellar white matter (Figure 8), cerebellar peduncles, pyramidal tracts, periventricular white matter, corpus callosum and basal ganglia. In the late stages, hypointensity on T2-weighted images can be seen in the dentate nucleus³. Brain and cerebellar atrophy can also be seen²⁴.

Nasu-Hakola disease

Nasu-Hakola disease (NHD) or polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy is a rare, autosomal recessive disorder, caused by mutations in two genes: TREM 2 and DAP 12. NHD is characterized by a combination of diffuse bone cysts and pre-senile dementia. Most of the NHD patients first present in early adulthood with skeletal abnormalities (osseous phase). Neurological symptoms manifest in the fourth decade of life as psychiatric symptoms and memory loss (neuropsychiatric phase), which

precedes the dementia phase. Progressive decline evolves to a profound dementia and death by the fifth decade of life²⁵.

Bone imaging shows multiple cystic-like lesions leading to fractures in the wrists and ankles. In the brain, calcifications in the basal ganglia can be seen on CT, while cortical atrophy and nonspecific white matter involvement are best appreciated using MRI (Figure 9)^{26,27}.

Cadasil and carasil

CADASIL and CARASIL are small vessel diseases associated to ischemia and/or hemorrhage, diffuse white matter disease and vascular dementia²⁸.

CADASIL is an acronym standing for cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy; while CARASIL is similar, but is recessive instead of dominant.

CADASIL is caused by the mutation in NOTCH3 gene and affects adolescents and adults presenting with migraines, transient ischemic attacks, strokes, psychiatric

Figure 9. Nasu-Hakola disease in a 46-year-old man. Unenhanced CT (A) shows punctuate calcifications in the lentiform nuclei. Axial FLAIR image (B) demonstrates mild hyperintensity in the periventricular white matter. Note cortical atrophy. A radiograph of the hands (C) demonstrates cystic lesions in the carpal bones bilaterally (arrows).

Figure 10. CADASIL in a 54-year-old male. Axial T2-weighted image (A) shows white matter hyperintense lesions in the temporal poles (arrows). Axial FLAIR image (B) shows hyperintensity in the periventricular white matter and external capsule (arrows). Note hypointensity in the lentiform nucleus. Axial SWI (susceptibility-weighted image - C) demonstrates some hypointense foci in the basal ganglia that may represent microbleeds (arrows).

disorders and cognitive decline. CADASIL is the most common cause of inherited vascular dementia in adults.

White matter involvement is usually found in the external capsules and anterior temporal poles, this last location being highly suggestive of CADASIL. The corpus callosum is less frequently involved. MRI changes precede the onset of symptoms by 10-15 years. On T2-weighted and FLAIR images there are round, predominantly periventricular lesions in the centrum semiovale, external capsules and anterior temporal poles (Figure 10). The signal changes tend to be symmetrical. Basal ganglia, thalamus, brainstem and corpus callosum can also be involved. Enlarged Virchow-Robin spaces, small foci of restricted diffusion suggesting recent infarcts and microhemorrhage on T2* images were described as well. The MRI abnormalities appear in the fourth decade of life and increase with age^{28,29}.

CARASIL affects a younger population than CADASIL. The neurological symptoms are transient ischemic attacks and strokes. The MRI findings are diffuse white matter changes and lacunar infarcts³⁰.

Other small vessel, genetically inherited disease, is the so-called autosomal dominant retinal vasculopathy with leukodystrophy and TREX1 mutation. It can present with white matter involvement in the brain and cerebellum and areas of contrast enhancement.

Other reported instances of adult-onset leukodystrophies include Pelizaeus-Merzbacher disease and vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. Pelizaeus-Merzbacher is rarely described in adults and the MRI findings include white matter diffuse T2-hyperintensities sparing small focal areas. MRI of patients with vacuolating leukoencephalopathy with subcortical cysts in adults shows bilateral extensive white matter changes with cysts in the temporal regions, sometimes the patients also present megalencephaly^{31,32}.

Final remarks, leukodystrophies should be kept in mind in the differential diagnosis of bilateral white matter disease in adults. Some imaging findings can help suggest a final diagnosis. Involvement of the corticospinal tract can be seen in Krabbe's disease, adrenomyeloneuropathy, cerebrotendinous xanthomatosis and ADLD. Contrast enhancement can be seen in the adult cerebral form of ALD and Alexander disease. In adult-onset Alexander disease atrophy and signal abnormalities can be seen in the medulla oblongata and cervical cord. Limited subcortical hypointensity on FLAIR images is present sometimes in ovaryleukodystrophy. Dentate nucleus and cerebellar white matter abnormalities can occur in cerebrotendinous xanthomatosis. Brain calcifications, white matter abnormalities and bone cysts are present in Nasu-Hakola disease. In CADASIL, involvement of the external capsules and anterior temporal poles are characteristic.

References

1. Achter W. Leukodystrophies with late disease onset: an update. *Curr Opin Neurol* 2010;23:234-241.
2. Costello DJ, Eichler AF, Eichler PS. Leukodystrophies. Classification, Diagnosis and treatment. *The Neurologist* 2009;15:319-328.
3. Sedel F, Tourbah A, Fontaine G, et al. Leukoencephalopathies associated with inborn errors of metabolism in adults. *J Inher Metab Dis* 2008;31:295-307.
4. Lyon G, Fattal-Valevsky A, Kolodny EH. Leukodystrophies. Clinical and genetic aspects. *Top Magn Reson Imaging* 2006;17:219-242.
5. Moser HR, Mahmood A, Raymond GV. X-linked adrenoleukodystrophy. *Nature Clin Pract Neurol* 2007;3:140-151.
6. Raymond GV, Seidman R, Monteth TS, et al. Head trauma can initiate the onset of adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci* 2010;290:70-74.

7. Schiffmann R, van der Knaap M. The latest on leukodystrophies. *Curr Opin Neurol* 2004;17:187-192.
8. Gieselmann Y, Krageleh-Mann I. Metachromatic leukodystrophy - an update. *Neuropediatrics* 2010;41:1-8.
9. Chebel S, Barboura I, Boughamouira-Bouatay A, et al. Adult-type metachromatic leukodystrophy mimicking multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 2009;28:621-623.
10. Eichler F, Drodd W, Grant E, et al. Metachromatic leukodystrophy: a scoring system for brain MRI imaging observations. *AJNR* 2009;30:1893-1897.
11. Martin A, Sevin C, Lazarus C, et al. Toward a better understanding of brain lesions during metachromatic leukodystrophy evolution. *AJNR* 2012;33:1731-1738.
12. Abdelhaim AN, Alberico RA, Barczykowski AL, et al. Patterns of magnetic resonance abnormalities in symptomatic patients with Krabbe disease correspond to phenotype. *Pediatr Neurol* 2014;50:127-134.
13. Debe R, Froissart R, Aubourg P, et al. Krabbe disease in adults: phenotypic and genotypic update from a series of 11 cases and review. *J Inher Metab Dis* 2013;36:859-868.
14. Parayon D, Faholali R, Mariotti C, et al. Adult-onset Alexander disease: a series of 11 unrelated cases with review of the literature. *Brain* 2008;131:2321-2331.
15. Sawashi Y. Review of Alexander disease: beyond the classical concept of leukodystrophy. *Brain Dev* 2009;31:493-498.
16. Balbi P, Sakini S, Fuciani C, et al. The clinical spectrum of late-onset Alexander disease: a systematic literature review. *J Neurol* 2010;257:1965-1982.
17. Namioka Y, Takiyama Y, Honda J, et al. Adult-onset Alexander disease with typical "spoke" brainstem atrophy and unusual bilateral basal ganglia involvement: a case report and review of the literature. *BMC Neurology* 2010;10:21-27.
18. Eugeni M, Boor I, Powers J, et al. Leukoencephalopathy with vanishing white matter: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010;89:987-996.
19. Schiffmann R, Elroy-Stein O. Childhood ataxia with CNS hypomyelination/vanishing white matter disease - a common leukodystrophy caused by abnormal control of protein synthesis. *Mol Genet Metab* 2006;88:71-76.
20. Wider C, Van Gerpen JA, Wszolek ZK. Leukoencephalopathy with spheroids (HDL) and pigmentary leukodystrophy (POLD): A single entity? *Neurology* 2009;72:1953-1959.
21. Finnsson J, Melberg A, Raininko R. 1H-MR spectroscopy of adult-onset autosomal dominant leukodystrophy with autonomic symptoms. *Neuroradiology* 2012;56:930-939.
22. Coffman CM, McKenna CE, Koeppe AH, et al. Genetic localization of an autosomal dominant leukodystrophy mimicking chronic progressive multiple sclerosis to chromosome 5q31. *Hum Mol Genet* 2000;9:787-793.
23. Melberg A, Halber L, Kaimo H, Raininko R. MR characteristics and neuropathology in adult-onset autosomal dominant leukodystrophy with autonomic symptoms. *Am J Neuroradiol* 2008;27:904-911.
24. Podhavan A, Agrawal A, Chaudhari S, Shukla A. Cerebroendoneurial xanthomatosis - the spectrum of imaging findings. *J Radiology Case Rep* 2013;7:1-9.
25. Klunemann HH, Ridha EH, Magy L, et al. The genetic causes of basal ganglia calcification, dementia, and bone cysts: DAP12 and TREM2. *Neurology* 2009;64:1602-1607.
26. Bock V, Bottani A, Gavani R, et al. Polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy (PLOS): a new report of an Italian woman and review of the literature. *J Neurol Sci* 2013;326:115-119.
27. Kılıç SA, Öner AY, Yüce C, Özlu IC. Imaging findings of Nasu-Hakola disease: a case report. *Clin Imaging* 2012;36:877-880.
28. Federico A, Di Donato I, Di Palma C, Taglia I, Dotti MT. Hereditary small vessel diseases: a review. *J Neurol Sci* 2010;322:26-30.
29. Chabriat H, Jourel A, Dichgans J, et al. CADASIL. *The Lancet Neurology* 2009;8:843-853.
30. Fukutake T. Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL): from discovery to gene identification. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2011;20:85-93.
31. Sasaki A, Miyahara Y, Ohtsuki M, et al. Two autopsy cases with Pelizaeus-Erdos disease phenotype of adult onset, without mutation of proteolipid protein gene. *Acta Neuropathol* 2006;99:7-13.
32. Itoh N, Maeda M, Naito Y, et al. An adult case of megalocephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts with 993L mutation in MLC1 gene: a case report and diffusion MRI. *Eur Neurol* 2006;56:243-246.

10.5 Apêndice E - Leukodystrophy with premature ovarian failure: think on white matter disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2015;73(1):65.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> or send a letter to Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.

Freua F, Parmera JB, Doria DO, **Paiva AR**, Macedo-Souza LI, Kok F. Leukodystrophy with premature ovarian failure: think on white matter disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2015;73(1):65.
<https://doi.org/10.1590/0004-282X20140183>

Leukodystrophy with premature ovarian failure: think on vanishing white matter disease (VWMD)

Leucodistrofia com falência ovariana prematura: pense na doença da substância branca evanescente

Fernando Freua, Jacy Bezerra Parmera, Denise de Oliveira Doria, Anderson Rodrigues Brandão de Paiva, Lucia Ines Macedo-Souza, Fernando Kok

A 46-year-old female presented progressive hand tremor at age of 8, associated to cognitive and motor deterioration. She developed incapacitating head tremor and was wheelchair-bound 12 years after onset. Premature ovarian failure (POF) occurred at 27-year-old. In the last 3 years, head tremor became less intense, but she remained with horizontal bidirectional nistagmus.

Vanishing white matter disease (VWMD) is an autosomal recessive disorder characterized by cerebellar ataxia, spasticity, and cognitive impairment^{1,2}. Brain MRI discloses symmetric and diffuse white matter lesions (figure). VWMD manifests from infancy to adulthood; in female, POF may occur³. It is caused by mutations in both alleles of one of five genes coding for subunits of eukaryotic translation initiation factor 2B.

Figure. (A, B, and C) T2-weighted acquisition showing diffuse abnormal white matter signal, with intensity close to that of the cerebrospinal fluid; and (D) Fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR), showing diffuse hyperintensity in white matter.

References

1. Knaap MS, Karsphorst W, Barth PG, Knaflitz CL, Gut F, Valk J. Phenotypic variation in leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Neurology*. 1998;51(2):343-7.
2. Cocchi DJ, Eichler AF, Eichler FS. Leukodystrophies: classification, diagnosis, and treatment. *Neurologist*. 2009;19(5):319-28. <http://dx.doi.org/10.1097/NRL.0b013e3181e287a8>
3. Schiffmann R, Tedeschi G, Kinkel RR, Trapp BD, Frank JA, Karlesi CR, et al. Leukodystrophy in patients with ovarian dysgenesis. *Ann Neurol*. 1997;41(3):654-67.

Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo SP, Brazil.

Correspondence: Fernando Freua; Rua Nestor de Barros, 116 / cj. 36; 03328-060 São Paulo SP, Brazil; E-mail: fernando.freua@gmail.com

Conflict of interest: There is no conflict of interest to declare.

Received 04 August 2014; Received in final form 02 September 2014; Accepted 22 September 2014.

10.6 Apêndice F - A novel *GFAP* mutation in a type II (late-onset) Alexander disease patient. *J Neurol* 2016;263(4):821–822.

Reprinted by permission from Springer Nature: Springer Nature, Journal of Neurology - A novel *GFAP* mutation in a type II (late-onset) Alexander disease patient. **Paiva ARB**, Freua F, Lucato LT, Parmera J, Dória D, Nóbrega PR, Olávio TR, Macedo-Souza LI, Kok F. COPYRIGHT 2016, advance online publication: 1 Jan 2016

<https://doi.org/10.1007/s00415-016-8065-8>

A novel *GFAP* mutation in a type II (late-onset) Alexander disease patientAnderson Rodrigues Brandão de Paiva¹ · Fernando Freua¹ · Leandro Tavares Lucato² · Jacy Parmera¹ · Denise Dória¹ · Paulo Ribeiro Nóbrega¹ · Thiago Rosa Olívio³ · Lúcia Inês Macedo-Souza³ · Fernando Kok¹Received: 14 January 2016 / Revised: 9 February 2016 / Accepted: 10 February 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Dear Sirs,

Alexander disease (AxD) is a rare neurodegenerative disorder caused by mutations in *GFAP* gene, encoding glial fibrillary acidic protein, and affects primarily astrocytes. Two clinical subtypes are described: an early onset one characterized by failure to thrive, macrocephaly and a predominantly frontoparietal leukodystrophy—named type I; and a late-onset phenotype, type II, characterized by spastic gait, cerebellar ataxia and atrophy of the medulla [1].

A 36-year-old woman presented to our service with a slowly progressive complaint with loss of balance, frequent falls, mild dysarthria, and urinary incontinence initiated after her second uneventful pregnancy, when she was 25-year-old. By the age 32, she developed weakness on her left lower limb. Two years later, the left arm was also affected, and she became wheelchair-bound when she was 35. She became depressed, apathetic and experienced insomnia. Her past medical history was remarkable by tobacco and alcohol abuse. Her mother died at age 46 due to breast cancer, her father died at age 68 after ischemic stroke complications, and she had eight siblings—one brother died at age 34 of sudden death, one sister died at age 8 years (she was diagnosed with mental retardation,

but no further information were available). The six remaining siblings were healthy. On neurologic exam she scored 23/30 on the Mini Mental State Examination, and presented an asymmetric spastic quadriparesis, worst on the left hemibody, predominantly axial cerebellar ataxia, hypometric horizontal saccades, gaze-evoked nystagmus to the left, absent gag-reflex, dysarthria and dysphagia. There was no palatal tremor. Ancillary tests, CSF analysis and nerve conduction studies were unremarkable. MRI disclosed abnormal periventricular white matter hyperintensity and “tadpole atrophy”, suggesting AxD (Fig. 1). Molecular analysis of *GFAP* gene disclosed a novel pathogenic variant chr12:42,989,137 C>G, c.809G>C (p.Arg270Pro), on exon 5. Algorithms of pathogenicity prediction (SIFT, PolyPhen, and Mutation Taster) are in agreement that this variant is deleterious or probably damaging. She died of acute respiratory failure at 39, presumably by pulmonary embolism—necropsy was declined.

This is a challenging case and the diagnosis was not suspected until a detailed review of the MRI was done by an experienced neuroradiologist (L.T.J.). The adult-onset asymmetric presentation without a clear family history might divert the clinician away from a possible genetic etiology [2, 3]. The tobacco and alcohol abuse could also be misleading, raising the possibility of a Marchiafava-Bignami disease, although this one has a quite distinct MRI pattern, with demyelination of the corpus callosum [4]. Another important clinical clue for the diagnosis of late-onset AxD that was lacking in this patient was palatal tremor. The presence of that sign in a patient with spastic-ataxia syndrome would have narrowed the differential diagnosis to AxD and progressive ataxia and palatal tremor syndrome. The presence of atrophy of medulla and upper cervical spinal cord prompted to a target molecular analysis

✉ Anderson Rodrigues Brandão de Paiva
arbrandao@oi.com.br¹ Neurogenetics, Neurology Department, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 255, São Paulo, SP 05403-000, Brazil² Radiology Institute, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil³ Centro de Estudos do Genoma Humano, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Fig. 1 Axial T2-weighted images (**a**, **b**) demonstrate symmetric periventricular hyperintensity in periventricular white matter (**a**) and hyperintensity in both corticospinal tracts (arrows in **b**). Sagittal

postcontrast T1-weighted image (**c**) demonstrates atrophy of the medulla and upper cervical spinal cord (arrow), with relative sparing of the pons, the so-called "tadpole atrophy"

that made the correct diagnosis. This is a missense mutation and involves an arginine residue, like the majority of the 110 previously reported pathogenic variants.

We highlight that, despite being an autosomal dominant condition, the majority of the cases are due to *de novo* mutations and a high index of suspicion is needed to not miss this diagnosis.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest The authors report no disclosures relevant to the manuscript.

Ethical approval This study was approved by the Institutional Ethical Committee in Research (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa).

Informed consent Written informed consent was obtained from the relatives according to ethical committee standards—available in Portuguese.

References

1. Prusi M, Wang J, Morizono H et al (2011) GFAP mutations, age at onset, and clinical subtypes in Alexander disease. *Neurology* 77:1287–1294
2. Graff-Radford J, Schwartz K, Gavrilova RM, Lachance DH, Kumar N (2014) Neuroimaging and clinical features in type II (late-onset) Alexander disease. *Neurology* 82:49–56
3. Leite CC, Lucato LT, Santos GT, Kok F, Brandão AR, Mauricio Castilho M (2014) Imaging of adult leukodystrophies. *Arq Neuropsiquiatr* 72(8):625–632
4. Lucato LT, Frezza F, Kok F (2015) Chronic stage of Marchiafava-Bignami disease. *Arq Neuropsiquiatr* 73(10):890

10.7 Apêndice G - Clinical and genetic characterization of leukoencephalopathies in adults. *Brain* 2017;140(5):1204-1211.

Reprinted by permission from Oxford University Press: Oxford University Press, Brain - Clinical and genetic characterization of leukoencephalopathies in adults. Lynch DS, **Paiva ARB**, Zhang WJ, Bugiardini E, Freua F, Lucato LT, Macedo-Souza LI, Lakshmanan R, Kinsella JA, Merwick A, Rossor AM, Bajaj N, Herron B, McMonagle P, Morrison PJ, Hughes D, Pittman A, Laura M, Reilly MM, Warren JD, Mummery CJ, Schott JM, Adams M, Fox NC, Murphy E, Davagnanam I, Kok F, Chataway J, Houlden H. COPYRIGHT 2017, advance online publication: 2 Mar 2017

<https://doi.org/10.1093/brain/awx045>

REPORT

Clinical and genetic characterization of leukoencephalopathies in adults

David S. Lynch,^{1,2} Anderson Rodrigues Brandão de Paiva,³ Wei Jia Zhang,¹ Enrico Bugiardi,⁴ Fernando Freua,³ Leandro Tavares Lucato,⁵ Lucia Inês Macedo-Souza,⁶ Rahul Lakshmanan,⁷ Justin A. Kinsella,⁸ Aine Merwick,^{9,10} Alexander M. Rossor,^{4,11} Nin Bajaj,¹² Brian Herron,¹³ Paul McMonagle,¹⁴ Patrick J. Morrison,¹⁵ Deborah Hughes,¹ Alan Pittman,¹ Matilde Laurà,⁴ Mary M Reilly,⁴ Jason D Warren,¹⁶ Catherine J Mummery,¹⁶ Jonathan M. Schott,¹⁶ Matthew Adams,⁷ Nick C. Fox,¹⁶ Elaine Murphy,⁹ Indran Davagnanam,⁷ Fernando Kok,³ Jeremy Chataway¹⁷ and Henry Houlden^{1,18}

Leukodystrophies and genetic leukoencephalopathies are a rare group of disorders leading to progressive degeneration of cerebral white matter. They are associated with a spectrum of clinical phenotypes dominated by dementia, psychiatric changes, movement disorders and upper motor neuron signs. Mutations in at least 60 genes can lead to leukoencephalopathy with often overlapping clinical and radiological presentations. For these reasons, patients with genetic leukoencephalopathies often endure a long diagnostic odyssey before receiving a definitive diagnosis or may receive no diagnosis at all. In this study, we used focused and whole exome sequencing to evaluate a cohort of undiagnosed adult patients referred to a specialist leukoencephalopathy service. In total, 100 patients were evaluated using focused exome sequencing of 6100 genes. We detected pathogenic or likely pathogenic variants in 26 cases. The most frequently mutated genes were *NOTCH3*, *EIF2B5*, *AARS2* and *CSF1R*. We then carried out whole exome sequencing on the remaining negative cases including four family trios, but could not identify any further potentially disease-causing mutations, confirming the equivalence of focused and whole exome sequencing in the diagnosis of genetic leukoencephalopathies. Here we provide an overview of the clinical and genetic features of these disorders in adults.

- 1 Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, London, UK
- 2 Leonard Wolfson Experimental Neurology Centre, UCL Institute of Neurology, London, UK
- 3 Neurogenetics Unit, Neurology Department, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
- 4 MRC Centre for Neuromuscular Diseases, UCL Institute of Neurology, London, UK
- 5 Instituto de Radiologia, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
- 6 Centro de Estudos do Genoma Humano, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
- 7 Lysholm Department of Neuroradiology, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, Queen Square, London, UK
- 8 Neurology Department, St. Vincent's University Hospital and University College Dublin, Ireland
- 9 Charles Dent Metabolic Unit, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, Queen Square, London, UK
- 10 Chelsea and Westminster NHS Foundation Trust, London, UK
- 11 Sobell Department of Motor Neuroscience and Movement Disorders, UCL Institute of Neurology, London, UK
- 12 Department of Neurology, Queens Medical Centre, Nottingham, UK
- 13 Department of Neuropathology, Royal Victoria Hospital, Belfast, Northern Ireland, UK
- 14 Department of Neurology, Royal Victoria Hospital, Belfast, Northern Ireland, UK
- 15 Centre for Cancer Research and Cell Biology, Queens University of Belfast, 97 Lisburn Road, Belfast BT9 7AE, UK
- 16 Dementia Research Centre, UCL Institute of Neurology, London, UK
- 17 Department of Neuroinflammation, UCL Institute of Neurology, London, UK
- 18 Neurogenetics Laboratory, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, Queen Square, London, UK

Received October 6, 2016; Revised January 5, 2017; Accepted January 16, 2017.

© The Author (2017). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Correspondence to: Dr David S. Lynch,
Department of Molecular Neuroscience,
UCL Institute of Neurology, Queen Square,
London WC1N 3BG,
UK
E-mail: David.lynch.13@ucl.ac.uk

Keywords: leukodystrophy; neurodegeneration; white matter lesion; imaging

Abbreviation: WES = whole exome sequencing

Introduction

Leukodystrophies and genetic leukoencephalopathies represent a diverse group of disorders in which there is progressive degeneration of CNS white matter. They can present in children or adults, often with a constellation of clinical features including dementia, movement disorders, ataxia and upper motor neuron signs, accompanied by hyperintense signal abnormalities in the brain/spinal cord on T₂-weighted MRI (Vanderver *et al.*, 2015).

There are at least 60 genes implicated in the development of these disorders, involved in diverse cellular pathways including myelin formation, mitochondrial health and protein translation (Parikh *et al.*, 2015). This heterogeneity, in combination with often overlapping clinical and radiological phenotypes, make definitive diagnosis challenging. In addition, the large number of genes and pathways involved means that the traditional approach to diagnosis, involving extensive metabolic and biochemical testing, is time consuming, costly, and often fails to reach a diagnosis (Richards *et al.*, 2015a).

In recent years, advances have been made in the understanding of leukodystrophy and leukoencephalopathy in children, with particular emphasis on improvements in diagnostic approach (Vanderver *et al.*, 2016). However, little is known about the genetic spectrum of these disorders in adults, where in many cases a definitive diagnosis is not reached.

In this study, we used focused and whole exome sequencing (WES) to genetically evaluate a cohort of 100 adult patients with undiagnosed leukodystrophy/leukoencephalopathy, describe the clinical spectrum of these disorders in adults and explore the efficiency of next generation sequencing in their diagnosis.

Materials and methods

Patient recruitment

Patients were recruited from the Queen Square Adult Leukodystrophy Group (QSALG), a multidisciplinary expert group that accepts referrals on patients with undiagnosed leukodystrophy/leukoencephalopathy, the Dementia Research Center and Neurogenetics Departments of the National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London and the

Neurology Department of the University of São Paulo, Brazil. The primary inclusion criteria included the presence of a progressive neurological syndrome with prominent T₂-weighted hyperintensity of the cerebral/spinal cord white matter, which was conformant and not consistent with an acquired inflammatory cause such as multiple sclerosis. Haematological, biochemical and metabolic testing was performed by the referring centre according to published guidelines (Ahmed *et al.*, 2014). All patients underwent Round 1 investigations to exclude acquired causes such as infections or autoimmune syndromes, and Round 2 investigations to exclude the classical leukodystrophies (white cell enzyme studies, very long chain fatty acids, amino/organic acids and bile alcohols). Some patients also underwent additional muscle/nerve or brain biopsy. Patients were only included if a diagnosis could not be reached after these investigations. Informed consent was obtained from all study participants for genetic analysis and the study was carried out with institutional ethical approval. All patients were at least 16 years old at the time of referral to our centres.

Focused exome and whole exome sequencing

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes. Focused exome sequencing was performed using the Agilent Sure Select Focused Exome (Agilent) according to the manufacturer's protocol. WES was performed using Nextera chemistry (Illumina Inc). Sequencing was performed using the HiSeq platform (Illumina).

The Illumina fastq sequencing data were mapped to the human reference assembly, hg19 (GRCh37; UCSC genome browser) by Novoalign Software (Novocraft Inc). After removal of PCR duplicates (Picard) and reads without a unique mapping location, variants were extracted using the Maq model in SAMtools and outputted by the following criteria: consensus quality > 30, SNP quality > 30 and root mean square mapping quality > 30. These variant calls were then annotated using Annovar software (Wang *et al.*, 2010).

Variant prioritization

We initially prioritized variants in known leukodystrophy/genetic leukoencephalopathy genes as recommended by the GLIA consortium in 2015 (Parikh *et al.*, 2015). We removed synonymous/intronic variants and variants with minor allele frequency (MAF) > 0.01 on the ExAC database.

Potentially pathogenic variants were confirmed using conventional Sanger sequencing and all variants were classified

using American College of Medical Genetics (ACMG) criteria (Richards *et al.*, 2015b).

Results

Focused exome sequencing identified pathogenic or likely pathogenic variants in known leukodystrophy/leukoencephalopathy genes in 26 cases (Table 1). The most frequently mutated genes were *EIF2B4/5* causing vanishing white matter (VWM), *CSF1R*, causing adult onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSP), *AARS2*, causing a leukoencephalopathy with ovarian failure and *NOTCH3*, causing cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) (Fig. 1). We detected variants of uncertain significance in *POLR3A*, *MRPS22* and *TNR* in three patients (Supplementary material).

To assess the utility of focused exome sequencing compared to WES we sequenced the remaining 71 negative cases (including four family trios) using WES. However, we did not make any further diagnoses from this approach, confirming that in adult leukoencephalopathies, WES offers no benefit over focused exome sequencing. This is likely because the target coverage is better on focused exome compared to WES. In our study, coverage metrics showed that focused exome had mean target coverage of 140 with 99% of targeted bases read > 10 times, compared to WES where mean targeted coverage was 66 with 94% of targeted bases read > 10 times (Fig. 1).

It was not possible to predict prospectively which cases were likely to be positive for a known disease gene. While negative cases had a slightly older age of onset (mean 35 years) compared to positive cases (mean 32 years), this was not statistically different (unpaired *t*-test *P*-value 0.50). Similarly, while more positive cases had a family history (positive cases 42%, negative cases 24%), this was also not statistically significant (Fisher's exact test *P*-value 0.10). There was no difference in typical clinical features or MRI appearance between the two groups (Supplementary Table 1).

Disease spectrum

Vanishing white matter

We identified five patients with VWM disease, four with mutations in *EIF2B5* and one with mutations in *EIF2B4*. The average age of onset of neurological symptoms was 36 years. The most frequent symptoms reported were cognitive decline, ataxia and epilepsy. Of the three female cases, two experienced premature ovarian failure, with the remaining female case undergoing menopause at age 45 years. One patient (Patient P7) presented with trigeminal neuralgia aged 52 years, and was initially diagnosed with multiple sclerosis following an abnormal MRI scan. Ten years later, she developed partial epilepsy and cognitive decline and a repeat MRI showed findings typical of VWM. In all cases,

MRI demonstrated bilateral confluent T₂-weighted/FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) hyperintensities with white matter rarefaction and global atrophy.

CADASIL

We identified four patients with mutations in the *NOTCH3* gene. The average age at onset for these patients was 35 years. Ischaemic stroke and migraine with aura were the most common symptoms, occurring in three of four patients. One patient (Patient P4) presented with a prefrontal subarachnoid haemorrhage. Cognitive decline was mild in all cases. One patient (Patient P4) had no progression 5 years from symptom onset; the remaining three patients had mild cognitive impairment only after 10 years of follow-up. The *NOTCH3* cases were the only patients to demonstrate T₂-weighted/FLAIR hyperintensity in the temporal poles (Fig. 2A), although this was not universal, with Patient P1 not showing temporal pole abnormalities on imaging taken more than 10 years after symptom onset.

CARASAL

We identified a single patient with the recently described syndrome of cathepsin A-related arteriopathy with strokes and leukoencephalopathy (CARASAL) (Bugiani *et al.*, 2016). The patient had a history of migraine since age 20 in addition to hypertension and depression. She developed persistent facial pain at age 42 years, which was accompanied by very mild cognitive symptoms consisting of problems with episodic memory and facial recognition. By age 48, the syndrome had progressed and the patient developed mild behavioural changes with some disinhibition. Mini-Mental State Examination was 27/30 and performance IQ was 99. The neurological examination was normal. The patient's father had died from stroke at age 60 years but no other family members were known to be affected. MRI demonstrated extensive signal abnormality in the deep and periventricular white matter sparing the U-fibres, extending into the thalamus, basal ganglia, pyramidal and tegmental tracts, the superior and middle cerebellar peduncles and the right dentate nucleus. A few old lacunes were demonstrated in the deep grey matter nuclei, although no acute infarcts or microhaemorrhages were present (Fig. 2B). Both the history and imaging appearance strongly suggested CADASIL, but no *NOTCH3* mutation was identified. The same heterozygous *CTSA* mutation, c.973C>T, p.R325C, described in two families by Bugiani *et al.* (2016) was detected by focused exome sequencing, confirming the diagnosis of the novel entity CARASAL.

CSF1R

We identified four patients with mutations in *CSF1R*, which causes ALSP (Rademakers *et al.*, 2011). Mean age of onset was 47 years. Two patients (Patients P22 and P27) presented with cognitive decline and psychiatric symptoms followed later by upper limb dyspraxia, alien limb phenomenon and parkinsonism. Patients P20 and P21 presented with ataxia and spasticity, and later

Table 1 Pathogenic and likely pathogenic variants detected in known leukodystrophy and leukoencephalopathy genes

Patient ID	Gene	Variant	Predicted protein effect	Sex	AAO	Family history	Initial syndrome	Additional features
Vascular leukoencephalopathy								
P1	NOTCH3	c.505C > T	p.R149C	M	30	AD	Migraine with aura	Perinatal ischaemic stroke
P2	NOTCH3	c.794C > T	p.R332C	M	37	AD	Recurrent TIA	Progressive gait deterioration, dysarthria, cognitive decline
P3	NOTCH3	c.2497C > T	p.R132C	F	36	No	Migraine with aura	Ischaemic stroke, cognitive decline
P4	NOTCH3	c.1591T > G	p.C531G	F	36	AD	Prepubertal SAH	Migraine with aura
P28	CTSA	c.975C > T	p.R325C	F	42	AD	Migraine, hyperreflexia	Mild cognitive decline, behavioural change
Vanishing white matter disease								
P5	EP2B4	c.1495 + 3delA (s.623G > A)	p.T (s. R208Q)	F	20	AR	Epilepsy	Spastic tetraparesis, ataxia, cognitive decline
P6	EP2B5	c.1308G > A (s.380T > C)	p.N131H (s.L127H)	F	53	No	Cognitive decline	Migraine, ataxia, personality change
P7	EP2B5	c.1308G > A (s.380T > C)	p.N131H (s.M365L)	F	52	No	Trigeminal neuralgia	Temporal lobectomy, ataxia, cognitive decline
P8	EP2B5	c.1308G > A (s.380T > C)	p.N131H (s.R113H)	M	31	No	Slowly progressive hemiparesis	Cognitive decline, ataxia
P26	EP2B5	c.1308G > A (s.380T > C)	p.N131H (s.R113H)	M	26	No	Cognitive decline	Falls, parkinsonism
Hypomyelinating disorders								
P9	PLP1	c.276G > A	p.Y92*	F	30	AD/XLD	Spastic gait, ataxia	Executive dysfunction, impaired visual memory
P10	PLP1	c.1355delG	p.Q121H (s.Y9)	M	30	No	Spastic gait, head tremor	Executive dysfunction, cognitive decline, bladder/bowel disturbance
P12	TLB8A1	c.6538C > A	p.V180H	F	Infancy	De novo	Spasticity, dystonia	Dysarthria, cognitive decline
Mitochondrial proteins								
P13	DARS2	c.1228-20_-21 delTTTTC (s.1433T > C)	p.R2658* (s.1479S)	M	15	No	LL weakness, neuropathy	Ataxia
P14	DARS2	c.1228-20_-21 delTTTTC (s.1466C > T)	p.V1658* (s.1466P)	F	5	No	Blateral UL intention tremor, progressive gait impairment	Cognitive decline, spastic paraplegia, sensory ataxia
Genes involved in microglial signalling								
P16	CSF1R	c.1901T > G	p.L634R	F	53	No	Ataxia, spasticity	Cognitive, dyspraxia
P17	CSF1R	c.2570C > T	p.R857L	F	38	No	Spastic gait	Severe spastic tetraparesis, dystonia, cognitive decline
P18	CSF1R	c.2381T > C	p.T94T	M	52	No	Cognitive decline	UL dyspraxia, alien limb, spasticity, parkinsonism
P27	CSF1R	c.2346G > A	p.R782H	M	46	AD	Cognitive decline	Depression, apraxia
P19	TREM2	c.1377T > G (s.377T > G)	p.V126G (s.V126G)	M	25	AR	Cognitive decline	Frequent generalized seizures
Miscellaneous								
P21	RNF216	c.1480C > A (s.1480C > A)	p.Y494Y (s.Y494Y)	M	31	Cousing	Cognitive decline	Ataxia, hypogonadotropic hypogonadism

AAO = age at onset; AD = autosomal dominant; AR = autosomal recessive; XLD = X-linked dominant; consang = consanguineous relationship; SAH = subarachnoid haemorrhage; TIA = transient ischaemic attack; UL = upper limb; LL = lower limb.

developed cognitive decline. In all cases, there was significant cognitive decline within 2 years of onset. MRI in all cases demonstrated slightly asymmetric T₂ hyperintense signal abnormality in the cerebral white matter affecting the frontal, parietal and temporal lobes with frequent

involvement of the corticospinal tracts and atrophy of the cerebral white matter and corpus callosum. Punctate areas of restricted diffusion were also evident in the cerebral white matter, which persisted and sometimes increased over time.

Figure 3 AARS2, DARS2 and RNF216 imaging appearance. (A) Typical imaging appearance of AARS2-related leukoencephalopathy. There is an extensive, symmetric white matter abnormality in the frontal, parietal and occipital lobes on the FLAIR imaging (left), with evidence of restricted diffusion on diffusion weighted imaging (middle) and apparent diffusion coefficient (right). (B) DARS2-related leukoencephalopathy. Axial FLAIR MRI image (top left) discloses bilateral deep and periventricular cerebral white matter involvement. Axial and sagittal T₂-weighted MRI images show hyperintensity in the medullary pyramids (red arrows), the posterior columns of the spinal cord (white arrow), the deep white matter of the cerebellum and along the intraparenchymal tracts of the trigeminal nerves bilaterally (blue arrows), in addition to a lactate peak on short-echo time magnetic resonance spectroscopy (yellow arrow). (C) RNF216-related leukoencephalopathy with diffuse supratentorial white matter signal abnormality appreciated in axial FLAIR MRI images.

AARS2

Five patients were identified with biallelic mutations in AARS2, which has recently been associated with a novel ovario-leukodystrophy (Dallabona *et al.*, 2014). The clinical details and mutations detected are reported in more detail elsewhere (Lynch *et al.*, 2016). Briefly, the phenotype consisted of adult onset leukoencephalopathy with a

variable combination of dementia, upper motor neuron signs, ataxia and ovarian failure in females. MRI revealed slightly asymmetric abnormal T₂ hyperintense signal in the frontoparietal and periventricular white matter, with white matter rarefaction, involvement of the corpus callosum and pyramidal tracts and punctate areas of restricted diffusion, reminiscent of ALSP (Fig. 3A). In one case for which brain

tissue was available, frequent axonal spheroids and pigmented microglia were seen.

Hypomyelinating disorders

We identified three patients with mutations in genes causing hypomyelination. Two patients were found to carry loss-of-function mutations in *PLP1*. Both patients developed symptoms at age 30 years. A female patient (Patient P9), carrying a novel nonsense mutation, presented with progressive spastic paraplegia and gait ataxia, followed by executive dysfunction and impaired visual memory. It has been shown that symptoms manifest more commonly in female patients carrying nonsense mutations in *PLP1* (Hurst *et al.*, 2006). A male patient (Patient P10), carrying a novel frameshift mutation, presented with a 'no-no' head tremor, gait disturbance and bowel and bladder symptoms at age 30 years. On examination at age 40 years, there was severe cognitive impairment with frontal release signs, severe spastic paraparesis requiring wheelchair use, ideomotor apraxia and near constant head tremor. Both patients demonstrated mildly increased cerebral white matter signal on T₂-weighted/FLAIR imaging, with the white matter appearing isointense on T₁-weighted images, indicating hypomyelination.

We identified a novel *de novo* mutation in *TUJBB4A* in a 24-year-old female with a childhood-onset dystonic syndrome with severe lower limb spasticity, dysarthria, cognitive decline and epilepsy (Patient P12). MRI revealed extensive T₂-weighted hyperintensity of the periventricular and cerebellar white matter extending to the posterior limb of the internal capsules. The white matter appeared normal on T₁-weighted imaging. The basal ganglia and cerebellum were not visibly involved by age 24 years.

DARS2

We detected two patients with novel compound heterozygous mutations in *DARS2*, the mitochondrial aminoacyl tRNA synthetase for aspartic acid. Recessive mutations in this gene are associated with the disorder leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation (LBSL) (Scheper *et al.*, 2007). Patient P17 presented at age 8 years with exercise-induced calf cramps. By age 16, he had developed distal weakness and wasting with impaired deep tendon reflexes and pes cavus. By age 23 there was bilateral extensor plantars and he was diagnosed with hereditary spastic paraplegia with distal amyotrophy. The patient continued to decline and by his 40s had developed a moderate gait ataxia with severe distal weakness and sensory neuropathy. MRI revealed T₂ hyperintense signal abnormality in the cerebral white matter, splenium of the corpus callosum, medullary pyramids, medial lemnisci, intraparenchymal trigeminal nerves, superior, middle and inferior cerebellar peduncles, cerebellar white matter and dorsal columns and lateral corticospinal tracts in the spinal cord. A lactate peak was detected on intermediate and long echo time magnetic resonance spectroscopy. These findings met the radiological criteria for diagnosis of

LBSL, and the diagnosis was confirmed by the detection of the compound heterozygous *DARS2* variants. Patient P18 developed upper limb intention tremor and slowly progressive gait impairment at age 5. There was slow progression and gradual development of a sensory ataxia. By age 25 she had spastic paraplegia with reduced verbal fluency and mild cognitive impairment. The MRI was consistent with LBSL and this was confirmed by the presence of compound heterozygous *DARS2* mutations (Fig. 3B).

RNF216

We identified a novel homozygous nonsense mutation in *RNF216* in a 42-year-old male with slowly progressive cognitive decline, gait impairment and erectile dysfunction, starting at age 31 years. A brother was also affected, with a more rapid progression and death at age 38 years. On examination, there was evidence of mild cognitive impairment (MMSE 25/30), mild cerebellar ataxia and choreic movements of the hands and face. MRI demonstrated a symmetrical and diffuse supra and infra-tentorial leukoencephalopathy with involvement of the thalamus, external capsules, pons, middle cerebellar peduncles and dentate nucleus (Fig. 3C).

Discussion

We used focused exome sequencing as an approach to diagnosis in a heterogeneous group of unsolved adult leukodystrophies/genetic leukoencephalopathies. All of the patients in our cohort had previously been extensively investigated without diagnosis. In a cohort of 100 patients, we made a definitive diagnosis in 26. This diagnostic rate compares favourably to other studies using a similar approach. In particular, Vanderver *et al.* (2016) made a diagnosis in 25 cases from 71 families, all of whom were childhood-onset cases with full family trios. In general, diagnostic rates in adult-onset genetic disorders tend to be lower than in children. This is because the population is more heterogeneous, often containing some patients with acquired disorders such as severe small vessel disease and because familial DNA is not often available in adult-onset cases.

In some leukodystrophy/genetic leukoencephalopathy syndromes there is a close phenotype-genotype relationship allowing for accurate pre-test prediction. For example, the presence of ataxia and hypogonadotropic hypogonadism with leukoencephalopathy strongly suggests Gordon-Holmes syndrome due to *RNF216* mutations. Similarly, particular MRI patterns might significantly reduce the number of genes to screen, such as when hypomyelination is the predominant feature or the specific and striking features of LBSL. However, there remain a large number of patients who all present in a similar way with a subacute dementing illness with pyramidal and extrapyramidal features and a symmetric, non-specific white matter abnormality. In these cases, extensive biochemical or metabolic testing is less likely to be helpful after initial screening is performed (Ahmed

et al., 2014). Without specific pretest probability, sequential candidate gene sequencing is time-consuming, expensive and can significantly delay diagnosis. By contrast focused exome sequencing is an efficient approach to diagnosis as it simultaneously covers all known genes causing leukodystrophies/genetic leukoencephalopathies.

The number of new genes implicated in genetic leukoencephalopathies is growing each year. This provides challenges for the use of targeted panels, which inevitably become obsolete when a number of new genes are described. Using a focused exome approach offsets this, as the data can be reanalysed intermittently in light of new genetic discoveries and compares favourably with regard to coverage when compared to WES.

In summary, focused exome sequence performs as well as WES in the diagnosis of adult onset leukodystrophies, providing a definite genetic diagnosis in 26%, and revealing variants of uncertain significance in 3%. The 71 negative cases in our cohort continue to present a diagnostic challenge. Some of these may not have a Mendelian monogenic disorders, being either acquired, or due to the interaction of numerous genetic variants in a polygenic fashion. Some patients may carry pathogenic intronic variants in known genes or other mutations not readily detected by NGS including heterozygous copy number variants. Finally, some patients will carry pathogenic variants in genes not yet linked to leukodystrophies/genetic leukoencephalopathies. Further whole exome/genome sequencing along with family segregation and functional studies may in future resolve some, if not all, of these cases.

Acknowledgements

The authors would like to thank the patients and their families for participation in this study.

Funding

This study was supported by the Medical Research Council, The Leonard Wolfson Experimental Neurology Centre, The Wellcome Trust and The Brain Research Trust (BRT). This study was also supported by the National Institute for Health Research (NIHR), University College London Hospitals (UCLH)/UCL Biomedical Research Centre (BRC) and the NIHR Queen Square Dementia Biomedical Research Unit.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

- Ahmed RM, Murphy E, Devagunam L, Parton M, Schott JM, Munimery CJ, et al. A practical approach to diagnosing adult onset leukodystrophies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85: 770–81.
- Bugiani M, Kerevan SH, Bakke HS, Wainfara Q, Croucher de Groote C, Nissen HW, et al. Catecholamine-related arteriopathy with strokes and leukoencephalopathy (CARASAL). *Neurology* 2016; 87: 1777–86.
- Dallabona C, Diodato D, Kerevan SH, Haack TB, Wang LJ, Salomons GS, et al. Novel (ovario) leukodystrophy related to AARS2 mutations. *Neurology* 2014; 82: 2063–71.
- Hurst S, Garbern J, Trepanier A, Gow A. Quantifying the carrier female phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Genet Med* 2006; 8: 371–8.
- Lynch DS, Zhang WJ, Lakshmanan R, Kinsella JA, Uzun GA, Karbay M, et al. Analysis of mutations in AARS2 in a series of CSF1R-negative patients with adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia. *JAMA Neurol* 2016; 114: 494–500.
- Parikh S, Bernard G, Leverter RJ, van der Knaap MS, van Hove J, Pizzino A, et al. A clinical approach to the diagnosis of patients with leukodystrophies and genetic leukoencephalopathies. *Mol Genet Metab* 2015; 114: 501–15.
- Rademakers R, Baker M, Nicholson AM, Rutherford NJ, Finch N, Soto-Ortolaza A, et al. Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nat Genet* 2011; 44: 200–5.
- Richards J, Korgenski EK, Taft RJ, Vanderver A, Bonkowski JL. Targeted leukodystrophy diagnosis based on changes and yields for testing. *Am J Med Genet A* 2015a; 167A: 2541–3.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Beck D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015b; 17: 405–23.
- Scheper GG, van der Kleef T, van Andel RJ, van Berckel CGM, Sisler M, Smit J, et al. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet* 2007; 39: 534–9.
- Vanderver A, Prust M, Tomblin D, Michel F, Hussey HM, Helman G, et al. Case definition and classification of leukodystrophies and leukoencephalopathies. *Mol Genet Metab* 2015; 114: 494–500.
- Vanderver A, Simons C, Helman G, Crawford J, Wolf NL, Bernard G, et al. Whole exome sequencing in patients with white matter abnormalities. *Ann Neurol* 2016; 79: 1011–7.
- Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: e164.

10.8 Apêndice H - When multiple sclerosis and X-linked adrenoleukodystrophy are tangled. *Neurol Clin Pract* 2018;8(2):156–158.

Paiva ARB, Pucci Filho CR, Porto AM, Feltrin FS, Kok F, Camargo CHF. When multiple sclerosis and X-linked adrenoleukodystrophy are tangled. *Neurol Clin Pract* 2018;8(2):156–158.

<https://doi.org/10.1212/CPJ.0000000000000431>

CASE

When multiple sclerosis and X-linked adrenoleukodystrophy are tangled

A challenging case

Anderson Rodrigues Brandão de Paiva, MD, Carlos Rory Pucci Filho, Alan Monteiro Porto, Fabrice Stéphan Feltrin, MD, PhD, Fernando Kok, MD, PhD, and Carlos Henrique Ferreira Camargo, MD, PhD
Neurology: Clinical Practice April 2018 vol. 8 no. 2 156-158 doi:10.1212/CPJ.0000000000000431

Correspondence
 Dr. Camargo
 chcamargo@uol.com.br

Diagnosis of multiple sclerosis (MS) is often difficult because of the wide range of clinical presentations and the absence of biomarkers or specific test to confirm the disease. The condition can therefore be confounded with other inflammatory or genetic conditions that affect the CNS, like inherited leukoencephalopathies. Among inherited leukoencephalopathies, X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) figures out as one of the most common.^{1,2}

X-ALD is associated with mutations in *ABCD1* on X chromosome, leading to accumulation of very long-chain fatty acids (VLCFAs) and consequent functional changes in adrenal cortex, CNS, bladder, and bowel tissue.^{3,5}

Women who are heterozygous for these mutations may present with neurologic symptoms but are generally asymptomatic. They may present with brisk deep tendon reflexes or mild late-onset spastic paraparesis. Brain or adrenal involvement are exceptionally rare.⁴⁻⁶

PRACTICAL IMPLICATIONS

Differential diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy vs multiple sclerosis may be aided by examining family pedigree for very long-chain fatty acids.

Case report

A 46-year-old woman presented with changed right homonymous hemianopia and dizzy spells that improved spontaneously. After 2 years, she presented with binocular persistent vertical diplopia, ocular skew deviation, upbeat nystagmus, dizzy spells, hyperreflexia, and Babinski sign on the left side. Her family history was remarkable for 2 sons who received a diagnosis of X-ALD—a 21-year-old with genetically confirmed diagnosis of cerebral form X-ALD and a 27-year-old with X-linked adrenomyeloneuropathy. Her MRI showed elongated areas of T2 hyperintensities, some oriented perpendicularly to the cortical or pial surfaces of the cerebral hemispheres. Lesions in the juxtacortical, periventricular, and infratentorial compartments were observed, one of which showed an annular pattern of gadolinium uptake. Lesions were also visible in the callosal-septal interface (figure). There were infratentorial lesions in the pons, one of which followed the intrapontine trigeminal nerve tract. Taken together, these findings are suggestive of demyelinating disease, such as MS.

CSF analysis revealed oligoclonal immunoglobulin G bands (OlgGBs). The patient's symptoms improved after she received methylprednisolone. She was diagnosed with MS and given interferon- β -1b. Her Expanded Disability Status Scale remained at 1.5, and she has been kept on immunomodulatory therapy. Based on her family history, we ordered serum VLCFA dosage, which was elevated.

Faculdade de Medicina (ARBP, FK), Hospital das Clínicas, University of São Paulo; and Neurology Service (CHF, AMP, CHFC) and Radiology Unit (PSF), Hospital Universitário, State University of Ponta Grossa, Brazil.
 Funding information and disclosures are provided at the end of this article. Full disclosure form information provided by the authors is available with the full text of this article at neurology.org/np.

Figure MRI findings

(A, B) Sagittal T2-fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) images show elongated hyperintense lesions in the white matter oriented perpendicularly to the ependymal surface of the lateral ventricles that are very similar to those found in the classic presentation of multiple sclerosis (MS). (C, D) Axial T1- and T2-FLAIR images show lesions in the brainstem. As in the sagittal T2-FLAIR images, these lesions have an elongated morphology very similar to that observed in the classic presentation of MS. There is no contrast uptake (C). (E) Axial postcontrast T1 image shows annular contrast uptake in a lesion close to the atrium of the lateral ventricle very similar to the uptake pattern observed in MS. (F) Coronal T2 image with lesions in the white matter, brainstem, and cerebellum.

Discussion

The clinical and laboratory findings for our patient were fairly typical of relapsing-remitting MS, but she also had VLCFA accumulation, confirming an X-ALD carrier status. The patient met the diagnostic criteria and responded to pulse methylprednisolone therapy. Unlike other cases of X-ALD in women described previously, this patient did not present spastic paraparesis, and her cerebral symptoms were exceedingly rare for a woman with X-ALD.^{4,6} Her symptoms manifested in 2 clearly defined relapses. Brain MRI also showed multifocal supratentorial and infratentorial white matter changes at various stages, including a gadolinium-enhanced lesion.

In X-ALD, as in MS, MRI findings vary. In more typical cases, these include signs of demyelination starting at the splenium of the corpus callosum with intermediate areas of demyelination and perivascular inflammation, particularly in the frontal, parietal, and occipital lobes. Changes in the corticospinal tract and gadolinium enhancement may also occur. However, only a small proportion of women present with this number of signs of the disease in the brain.^{1,4} While in MS there is usually multifocal demyelination, X-ALD is characterized by extensive confluent demyelination. MRI in MS usually shows multifocal lesions disseminated in the periventricular, juxtacortical, and

infratentorial compartments and can also reveal spinal cord involvement. The lesions, which are very common in the callosal-septal interface, are usually small, elongated, and oriented perpendicularly to the pial surface of the ventricular system or the cortical surface of the brain. MRI findings can also include acute gadolinium-enhanced lesions. These may disappear over time, with little damage to the underlying parenchyma, or may evolve to pronounced tissue damage, usually with axonal damage, and black holes may be seen. To confirm a diagnosis of MS, imaging findings should show dissemination of the lesions in space and time.⁷ In adult-onset X-ALD, a wide range of MRI abnormalities can be seen. These may be restricted to the pyramidal tracts or be diffuse, involving the cerebral hemispheres, posterior limbs of the internal capsules, brainstem, and cerebellum. In this subgroup in particular, it is not uncommon for X-ALD to be misdiagnosed as MS.¹

Another confounding factor in the diagnosis was the finding of OlgGBs, which are common in patients with MS, but this is not specific and can also be present in patients with X-ALD.³ Adrenocortical insufficiency is rare in women (1%), and our patient tested negative.

Obeying Occam's razor, strictly adhering to available diagnostic criteria, is often the best principle to disentangle misleading findings.

Author contributions

A.R. Brandão de Paiva: analysis and interpretation of the data, drafting and revising the manuscript for intellectual content. C.R. Pucci Filho: analysis and interpretation of the data, drafting the manuscript for intellectual content. A. Monteiro Porto: analysis and interpretation of the data. F.S. Feltrin: analysis and interpretation of the data, drafting the manuscript for intellectual content. F. Kok: revising the manuscript for intellectual content. C.H. Ferreira Camargo: design and conceptualization of the study, analysis and interpretation of the data, revising the manuscript for intellectual content.

Study funding

No targeted funding reported.

Disclosure

A.R. Brandão Paiva, C.R. Pucci Filho, A. Monteiro Porto, and F.S. Feltrin report no disclosures. F. Kok serves on the editorial advisory board of *Arquivos de Neuropsiquiatria*; is author on a patent re: Methylmalonic acid determination by tandem mass spectrometry using stable isotope; is Medical Director of

Mendelics Genomic Analysis, a NGS laboratory, since 2013; has received speaker honoraria from Actelion Pharmaceuticals; and is a shareholder in Mendelics Genomic Analysis. C. H. Ferreira Camargo reports no disclosures. Full disclosure form information provided by the authors is available with the full text of this article at Neurology.org/cp.

Received September 6, 2017. Accepted in final form November 6, 2017.

References

1. Kiese AJ, Köster W, Kiese B, et al. MR findings in adult-onset adrenoleukodystrophy. *AJNR Am J Neuroradiol* 1993;16:1237-1237.
2. Mignanti G. Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: analysis of 270 cases. *Acta Neuropathol* 2001;101:561-569.
3. Jellison T, Sussman P, Gillet G, Coley S, Scharck B. Multiple sclerosis in an adrenoleukodystrophy carrier. *Chia Pract* 2012;1:1125.
4. Di Filippo M, Lachini E, Pavesi P, et al. Heterozygous X-linked adrenoleukodystrophy associated with epilepsy mimicking primary progressive multiple sclerosis. *J Neurol* 2011;258:325-328.
5. Engelen M, Buitier M, Dikken B, et al. X-linked adrenoleukodystrophy is associated with a cross-sectional cohort study. *Brain* 2014;137:693-706.
6. Jack GH, Malm-Wiklund K, Bradenham A, Gharib D, Anttonen M. Clinical marker X-linked adrenoleukodystrophy in a female. 2013. *Curr Rep Neurol Med* 2013;2013:491780.
7. Polman CH, Reingold SC, Rudolf B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revision to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2016;69:292-302.

Practical Implications

Neurology® Clinical Practice is committed to providing clinical insights helpful to neurologists in everyday practice. Each Full Case includes a "Practical Implications" statement, a pearl of wisdom for the practicing clinician.

10.9 Apêndice I- Typical clinical and neuroimaging features in Sjögren-Larsson syndrome. *Arq Neuropsiquiatr* 2018;76(4):283.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> or send a letter to Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.

Paiva ARB, Melo US, Freua F, Dória D, Cabral KSS, Macedo-Souza LI, Lucato LT, Kok F. Typical clinical and neuroimaging features in Sjögren-Larsson syndrome. *Arq Neuropsiquiatr* 2018;76(4):283.
<http://dx.doi.org/10.1590/0004-282x20180024>

Typical clinical and neuroimaging features in Sjögren-Larsson syndrome

Características clínicas e neurorradiológicas típicas na síndrome de Sjögren-Larsson

Anderson Rodrigues Brandão de Paiva¹, Uirá Souto Melo², Fernando Freua¹, Denise Dória¹, Katiane Sayão Souza Cabral¹, Lúcia Inês Macedo-Souza², Leandro Tavares Lucato³, Fernando Kok¹

Sjögren-Larsson syndrome is an autosomal recessive disorder characterized by ichthyosis, intellectual disability, spastic paraplegia, macular dystrophy, and leukoencephalopathy. It is caused by mutations in *ALDH3A2*, which leads to accumulation of long chain fatty alcohols. Herein we report on a 28-year-old man with congenital ichthyosis (Figure A) and profound intellectual disability, who is severely spastic and had undergone several orthopedic procedures for correction

of deformities. Brain MRI disclosed leukoencephalopathy and cortical atrophy (Figure B), while MR spectroscopy allowed identification of peaks assigned to lipids (Figure C). Sequencing of *ALDH3A2* revealed he is a compound heterozygote for two previously-reported splice site mutations: maternally inherited c.798+5 G > A, and paternally transmitted c.1108-1 G > C. Treatment of Sjögren-Larsson syndrome is symptomatic.

Figure. A. Congenital ichthyosis. B. MRI: axial FLAIR image demonstrates diffuse leukoencephalopathy. C. MR spectroscopy: single voxel, echo time = 30 ms, region of interest placed in the parieto-occipital white matter, discloses peaks assigned to lipids in 0.8-0.9 ppm and in 1.3 ppm (arrows); which can be appreciated in the disease. The NAA peak is decreased (signaling neuroaxonal loss or dysfunction) and the ml peak is increased (probably related to gliosis). NAA: N-acetyl aspartate; Cr: creatine; Cho: choline; ml: myo-inositol.

References

1. Lossos A, Khoury M, Rizzo WB, Gomon JM, Barin E, Zlotogorski A, et al. Phenotypic variability among adult siblings with Sjögren-Larsson syndrome. *Arch Neurol*. 2006;63(2):278-80. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.2.278>
2. Willemsen MAAR, Graaf M, Knaap MS, Heerschap A, Domburg PHMF, Gabriëls RJM, et al. MR imaging and proton MR spectroscopic studies in Sjögren-Larsson syndrome: characterization of the leukoencephalopathy. *JNR Am J Neuroradiol*. 2004;25(4):849-57.
3. Rizzo W, Carney S, Lin Z. The molecular basis of Sjögren-Larsson syndrome: mutation analysis of the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Am J Hum Genet*. 1999;65(6):1547-60. <https://doi.org/10.1086/302681>

¹Universidade de São Paulo, Hospital das Clínicas, Departamento de Neurologia, São Paulo SP, Brasil;

²Universidade de São Paulo, Centro de Estudos do Genoma Humano, São Paulo SP, Brasil;

³Universidade de São Paulo, Hospital das Clínicas, Instituto de Radiologia, São Paulo SP, Brasil.

Correspondence: Anderson Rodrigues Brandão de Paiva; Rua Waldemar Falcão, 1547 / ap 1602A; 40295-010 Salvador BA, Brazil; E-mail: arbrandao@oi.com.br

Conflict of interest: There is no conflict of interest to declare.

Received 03 January 2018; Received in final form 26 January 2018; Accepted 28 January 2018.

10.10 Apêndice J - A novel complex neurological phenotype due to a homozygous mutation in *FDX2*. *Brain* 2018;141(8):2289-2298.

Reprinted by permission from Oxford University Press: Oxford University Press, Brain - A novel complex neurological phenotype due to a homozygous mutation in *FDX2*. Gurgel-Giannetti J, Lynch DS, **Paiva ARB**, Lucato LT, Yamamoto G, Thomsen C, Basu S, Freua F, Giannetti AV, de Assis BDR, Ribeiro MDO, Barcelos I, Sayão Souza K, Monti F, Melo US, Amorim S, Silva LGL, Macedo-Souza LI, Vianna-Morgante AM, Hirano M, Van der Knaap MS, Lill R, Vainzof M, Oldfors A, Houlden H, Kok F. COPYRIGHT 2018, advance online publication: 13 Jul 2018 <https://doi.org/10.1093/brain/awy172>

A novel complex neurological phenotype due to a homozygous mutation in *FDX2*

Juliana Gurgel-Giannetti,^{1,*} David S. Lynch,^{2,3,*} Anderson Rodrigues Brandão de Paiva,⁴ Leandro Tavares Lucato,⁵ Guilherme Yamamoto,⁶ Christer Thomsen,⁷ Somsuvro Basu,⁸ Fernando Freua,⁴ Alexandre Varella Giannetti,⁹ Bruno Della Ripa de Assis,⁴ Mara Dell Ospedale Ribeiro,⁴ Isabella Barcelos,⁴ Katiane Sayão Souza,⁴ Fernanda Monti,⁴ Uirá Souto Melo,⁶ Simone Amorim,⁴ Leonardo G. L. Silva,⁶ Lúcia Inês Macedo-Souza,⁶ Angela M. Vianna-Morgante,⁶ Michio Hirano,¹⁰ Marjo S. Van der Knaap,¹¹ Roland Lill,^{8,12} Mariz Vainzof,⁶ Anders Oldfors,⁷ Henry Houlden^{2,3} and Fernando Kok^{4,6}

*These authors contributed equally to this work.

Defects in iron-sulphur [Fe-S] cluster biogenesis are increasingly recognized as causing neurological disease. Mutations in a number of genes that encode proteins involved in mitochondrial [Fe-S] protein assembly lead to complex neurological phenotypes. One class of proteins essential in the early cluster assembly are ferredoxins. *FDX2* is ubiquitously expressed and is essential in the *de novo* formation of [2Fe-2S] clusters in humans. We describe and genetically define a novel complex neurological syndrome identified in two Brazilian families, with a novel homozygous mutation in *FDX2*. Patients were clinically evaluated, underwent MRI, nerve conduction studies, EMG and muscle biopsy. To define the genetic aetiology, a combination of homozygosity mapping and whole exome sequencing was performed. We identified six patients from two apparently unrelated families with autosomal recessive inheritance of a complex neurological phenotype involving optic atrophy and nystagmus developing by age 3, followed by myopathy and recurrent episodes of cramps, myalgia and muscle weakness in the first or second decade of life. Sensory-motor axonal neuropathy led to progressive distal weakness. MRI disclosed a reversible or partially reversible leukoencephalopathy. Muscle biopsy demonstrated an unusual pattern of regional succinate dehydrogenase and cytochrome *c* oxidase deficiency with iron accumulation. The phenotype was mapped in both families to the same homozygous missense mutation in *FDX2* (c.431C > T, p.P144L). The deleterious effect of the mutation was validated by real-time reverse transcription polymerase chain reaction and western blot analysis, which demonstrated normal expression of *FDX2* mRNA but severely reduced expression of *FDX2* protein in muscle tissue. This study describes a novel complex neurological phenotype with unusual MRI and muscle biopsy features, conclusively mapped to a mutation in *FDX2*, which encodes a ubiquitously expressed mitochondrial ferredoxin essential for early [Fe-S] cluster biogenesis.

1 Department of Paediatrics, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

2 Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, London, UK

3 Leonard Wolfson Experimental Neurology Centre, UCL Institute of Neurology, London, UK

4 Neurogenetics Unit, Neurology Department, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

5 Neuroradiology Section, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

6 Human Genome and Stem Cell Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

7 Department of Pathology and Genetics, Sahlgrenska University Hospital, University of Gothenburg, Sweden

8 Institute for Cytobiology and Cytopathology, Philipps-Universität Marburg, Robert-Koch-Strasse 6, 35032 Marburg, Germany

9 Department of Surgery, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Received November 15, 2017; Revised March 30, 2018; Accepted April 26, 2018.

© The Author(s) (2018). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.

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

10 Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, USA

11 Department of Child Neurology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

12 LOEWE Center for Synthetic Microbiology, SynMikro, Hans-Meerwein-Strasse, 35043 Marburg, Germany

Correspondence to: Dr Juliana Gurgel Giannetti

Rua Santa Catarina 1042, 201, Belo Horizonte, Brazil

E-mail: gurgelju@yahoo.com.br

Correspondence may also be addressed to: Dr David Lynch

Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, WC1N 3BG UK

E-mail: david.lynch.13@ucl.ac.uk

Keywords: FDX2; brain; nerve; muscle; optic atrophy

Abbreviations: [Fe-S] = iron-sulphur; COX = cytochrome *c* oxidase; SDH = succinate dehydrogenase

Introduction

Iron-sulphur [Fe-S] clusters are essential biological cofactors found in all living organisms, from archaea to eukaryotes (Fontecave, 2006; Lill, 2009). They consist of protein-bound Fe ions, linked by sulphide bridges and are essential in a large number of electron transfer reactions. [Fe-S] clusters are almost unique in their ability to access various redox states over a wide range, with electron transport roles in critical processes like the mitochondrial respiratory chain. [Fe-S] clusters have also been found to play important roles in more diverse cellular pathways from catalysis to gene regulation (Beinert *et al.*, 1997; Rouault, 2015). The biogenesis of [Fe/S] proteins in the mitochondria is a complex process and takes place in several stages (Braymer and Lill, 2017). The early stage of biogenesis involves a cysteine desulphurase as a source of sulphur and frataxin as a potential source of iron, with the cluster being formed on the scaffold protein iron-sulphur cluster assembly enzyme (ISCU). The newly made [2Fe-2S] cluster is then transferred to numerous downstream biogenesis proteins that will use the cofactor for transfer to target [Fe/S] proteins such as the subunits of mitochondrial complexes I and II.

Another class of proteins essential for *de novo* [2Fe-2S] cluster assembly on ISCU are ferredoxins (Webert *et al.*, 2014; Boniecki *et al.*, 2017). Humans possess two ferredoxins, *FDX1* and *FDX2* (formerly *FDX1L*) (Sheftel *et al.*, 2010). While both proteins localize to the mitochondrion, expression of *FDX1* is highest in the adrenal gland, where the protein functions in the steroid synthesis pathway. *FDX2*, however, is ubiquitously expressed and is essential in the formation of [Fe-S] clusters in humans (Sheftel *et al.*, 2010).

Mutations in a number of genes that encode proteins involved in [Fe-S] cluster assembly lead to complex neurological phenotypes (Stehling *et al.*, 2014). The most common of these syndromes is Friedreich's ataxia, an autosomal recessive multisystem neurodegenerative disorder characterized by ataxia, peripheral neuropathy and cardiomyopathy (Beilschmidt and Puccio, 2014). It is typically

caused by a trinucleotide repeat intronic expansion in *FXN*, encoding frataxin (Durr *et al.*, 1996). Loss of function mutations in *ISCU* lead to myopathy with severe exercise intolerance (Mochel *et al.*, 2008; Olsson *et al.*, 2008; Nordin *et al.*, 2011; Legati *et al.*, 2017) and mutations in *NUBPL*, an [Fe-S] protein involved in complex I assembly (Sheftel *et al.*, 2009), lead to leukoencephalopathy, ataxia and developmental regression (Calvo *et al.*, 2010). In 2014, a single case was described with isolated mitochondrial myopathy due to a homozygous translation start site mutation in *FDX2* (Spiegel *et al.*, 2014). More recently, mutations in *FDXR*, encoding ferredoxin reductase, were described in eight patients with a syndrome including hearing loss, optic atrophy and sensory neuropathy (Paul *et al.*, 2017).

In this study, we describe the clinical phenotype of six patients from two apparently unrelated Brazilian families but living in the same geographic region with a complex phenotype including optic atrophy, reversible leukoencephalopathy, mitochondrial myopathy with exercise intolerance and axonal polyneuropathy and, in some patients, pyramidal signs. Using a combination of homozygosity mapping and whole exome sequencing, we mapped this phenotype to the same homozygous, deleterious mutation in *FDX2*.

Materials and methods

Subjects

Clinical evaluation was performed on both families by two independent research groups that shared their data. All patients were clinically and neurologically evaluated, and underwent EMG and nerve conduction studies and muscle biopsy.

We received approval of the ethical standards committee at both institutions (São Paulo University and Federal University of Minas Gerais) and written informed consent was obtained from all included family members.

Neuroimaging

All patients underwent at least one exam. We analysed 13 brain MRIs performed at different ages ranging from 8

months to 41 years. Since MRIs were performed in different centres, analysis was based mainly on multiplanar FLAIR, T₁ and T₂-weighted images. Intensity of T₂ changes were graded in a semi-quantitative manner as absent, mild, moderate or severe. Diffusion-weighted images and apparent diffusion coefficient maps, when available, were scrutinized in the search for lesions with restricted diffusion. Magnetic resonance spectroscopy was also analysed when available, and we focused on the detection of lactate peaks.

Muscle biopsy

Muscle biopsies were performed on the biceps brachialis and cryostat sections were obtained with 8 µm thickness. Conventional histochemical techniques were performed: haematoxylin and eosin, modified Gomori trichrome, Periodic acid-Schiff technique, Oil Red O, reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase-tetrazolium reductase (NADH-TR), succinate dehydrogenase (SDH), cytochrome c oxidase (COX), and adenosine triphosphatase (ATPase) preincubated at pH 9.4, 4.63 and 4.35. Perls' Prussian Blue staining was performed as described (Stevens, 1990) and with DAB enhancement (Mochel, 2008) to identify iron deposition.

For immunohistochemistry, 8 µm sections were fixed in 4% formaldehyde at 4°C for 10 min, washed in Tris-buffered saline-Tween 20 (TBS-T) for 10 min, permeabilized in a graded methanol series (70% 10 min, 95% 10 min, 100% 20 min, 95% 10 min, 70% 10 min), washed in TBS-T for 5 min and further processed in a Dako Autostainer using the Dako EnVision™ FLEX High pH kit. The following antibodies were applied for 1 h: anti-SDHB ab14714 Abcam (1:500), anti-MTCO1 ab14705 Abcam (1:2000) and anti-VDAC1 ab14734 Abcam (1:2000).

Electron microscopy was performed on tissue specimens that had been fixed in glutaraldehyde, post-fixed in OsO₄ and embedded in resin. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate.

The respiratory chain enzyme analysis was performed on frozen tissue using spectrophotometry (DiMauro *et al.*, 1987).

Molecular analysis

Genome wide genotyping was performed on Patients 1–4, both parents and an unaffected sibling from Family 1 using the Axiom® Genome-Wide LAT 1 Array (Affymetrix). Runs of homozygosity were identified using PLINK software (Purcell *et al.*, 2007). Whole exome sequencing was performed on Patients 3 and 4 from Family 1 and in four members (Patients 5, 6 and parents of Patient 5) from Family 2 using the Agilent SureSelect Exon Enrichment kit. Segregation of the FDX2 mutation was confirmed by Sanger sequencing of FDX2 exon 5 using the following primer sequences: Forward: 5'-ATCCTCCGCCACTTCCAGTTC-3'; Reverse: 5'-TCTTAAGC TCCTGGCCTCAA-3'.

Prior to whole exome sequencing, Sanger sequencing of EARS2, SDHA and SDHB was performed in Patient 5, and no potential pathogenic variant was identified in homozygosity or compound heterozygosity in this subject. Cytogenetic investigation was performed on cultured peripheral blood lymphocytes from Patient 1 and her parents, including G-

and C-banding, and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analyses.

Functional studies

Human RNA extraction, cDNA synthesis and RT-qPCR

RNA extracted from muscle from four patients and two healthy controls was used for quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). RNA extraction was performed using TRIzol® (ThermoFisher Scientific) and RNA quality was evaluated by agarose gel electrophoresis; and all samples had 260:230 ratio above 1.90, measured using a NanoDrop (ThermoFisher Scientific). Total RNA (1 µg/µl) was reverse-transcribed with oligo(dT) primers using SuperScript™ III First-strand Synthesis System (ThermoFisher Scientific). FDX2 primers for RT-qPCR spanned the exon 4–5 junction: Forward 5'- GTGAGTGAAGACCACCTGGAT-3'; Reverse 5'- GCCA TGTCTAGCATGTCGTC-3'.

RT-qPCR was normalized to TBP and the cDNA amplification was performed using Applied Biosystems® 7500 Fast Real-time PCR System. Relative gene expression was calculated using 2^{-ΔΔCT} method (Schmittgen and Livak, 2008). Each experiment was performed in triplicate considering standard deviation of triplicate positive when <0.1.

Western blot study

Muscle tissue was lysed in RIPA buffer (Pierce) and protein concentration was determined with Pierce 660 nm protein assay. Lysed skeletal muscle samples were subjected to SDS-PAGE (6–18% gradient gel; Stehling *et al.*, 2018) and immunostaining. Antibodies were targeted against FDX2 (affinity purified, Sheftel *et al.*, 2010), F1 αβ subunits of complex V (kind gift of Drs H. Schagger and L. Wittig, 1:1000), VDAC (Cell Signalling Technology, 1:1000), tubulin (Sigma, 1:10 000), and actin (BD Transduction Laboratories, 1:2000).

Results

We identified six patients from two apparently unrelated Brazilian families living in the same geographic area with a complex multisystem phenotype: childhood onset of optic atrophy, recurrent episodes of myalgia and/or proximal weakness, axonal polyneuropathy, pyramidal signs (present in two patients) and reversible or partially reversible leukoencephalopathy on MRI. A summary of clinical findings is presented in Tables 1 and 2, and a simplified pedigree of Families 1 and 2 is shown in Fig. 1.

Clinical findings

The first recognizable clinical sign in all patients was nystagmus, secondary to low visual acuity caused by non-progressive optic atrophy, seen before the age of 3 years in all patients. A mild motor delay was observed in all patients, except Patient 1, who had a global developmental delay, and Patient 5, who had a normal development.

In all patients there was evidence of recurrent episodes of cramps, myalgia and muscle weakness, often precipitated

Table 1 Summary of clinical findings

Patient	Current age	Age of onset	First symptoms	Developmental delay	Nyctagmus/ optic atrophy	Exercise-induced myalgia/ myopathy	Axonal sensorimotor polyneuropathy	Endocrine abnormalities		Haematological abnormalities	
								Subclinical hypothyroidism	Type II diabetes	Neutropenia	Microcytic anaemia
P1	13 y	<6 m	Flappy baby	Global	-	+	(eo)	+	-	+	+
P2	6 y	1 y 4 m	Nyctagmus, LVA	Minor motor ^a	-	+	(eo)	-	+	+	+
P3	29 y	1 y	Nyctagmus, LVA	Minor motor ^a	-	+	(eo)	+	-	+	+
P4	34 y	1 y	Nyctagmus, LVA	Minor motor ^a	-	+	(eo)	+	+	+	+
P5	11 y	8 m	Nyctagmus, LVA	-	-	+	(eo)	-	-	-	-
P6	41 y	6 m	Nyctagmus, LVA	Minor motor ^a	-	+	(eo)	+	+	(+ + to)	+

^aPatients walked at around 2 years of age. + = present; - = absent; eo = early-onset; oo = adult-onset; LVA = low visual acuity; NA = not available; to = teenage-onset.

by exercise, infections or low temperature. These events started in childhood or adolescence, sometimes leading to temporary loss of ambulation for 1 to 3 weeks. In Patient 5, a creatine kinase level during an episode was >3000 U/L, indicating rhabdomyolysis.

Motor features included a combination of myopathy, upper motor neuron dysfunction and sensorimotor axonal neuropathy. Weakness was progressive in Patient 6, who became wheelchair-bound at the age of 33 years. Hypoactive deep tendon reflexes were seen in all individuals, except Patient 5. Babinski signs with mild spasticity were seen in Patients 3 and 4. Sensory ataxia, characterized by positive Romberg sign and decreased vibration and position sensitivity, was present in Patients 3 and 4. Permanent weakness was related to age and disease duration, since it was present in two of the three adult patients: Patient 3 had proximal and distal involvement, and Patient 6 only distal weakness. Clinical features of neuropathy and abnormal nerve conduction study were seen in all four older patients with more than 10 years of age. Finally, prosis was seen in Patients 3 and 6 (Table 2).

In Family 1, all tested members (Patients 1–4) had mild microcytic anaemia without iron deficiency, sometimes accompanied by thrombocytopenia or neutropenia.

All patients underwent nerve conduction studies and EMG, which showed sensorimotor polyneuropathy in Patients 1, 3, 4 and 6, but no abnormalities in Patients 2 and 5.

Additionally, Patient 1 had global developmental delay, intellectual disability and dysmorphic features, characterized by protruding ears, micrognathia, high arched palate, almond-shaped eyes, high nasal bridge, dolicocephaly, and brachydactyly. The dysmorphic features were thought to be due to an unrelated and separate condition not affecting the other five patients described here.

Neuroimaging

The common finding observed in brain MRI from all patients was the presence of hypoplastic optic nerves and chiasm (Fig. 2). In three patients, magnetic resonance abnormalities progressed in a somewhat similar fashion (Patients 1, 2 and 5). In Patient 2 the first exam done at 1 year and 8 months demonstrated T₂ hyperintensity involving subcortical and deep cerebral white matter and corpus callosum (genu and splenium), associated with restricted diffusion. There was also mild pontine T₂ hyperintensity sparing both corticospinal tracts and some thinning of the isthmus of the corpus callosum. Magnetic resonance findings were more evident between 3 and 5 years of age, not only the white matter lesions, but also the pontine changes and a peculiar pattern of thalamic involvement. This pattern was characterized by T₂ hyperintensity and restricted diffusion in anterior nuclei, sparing mammillothalamic tracts and extending also to the internal medullary lamina.

By the age of 7 to 9 years of life, MRI changes presented remarkable improvement. In two patients, Patients 1 and 5, MRI exams at this age became essentially normal, except

Table 2 Summary of the neurological findings

Patient	Learning disability	Low visual acuity and optic atrophy	Ptosis	Proximal weakness	Distal weakness	Pes cavus	Sensory abnormalities	DTRs	Spasticity	Babinski sign
P1	+	+	+	–	–	+	–	H	–	–
P2	–	–	–	–	–	–	–	H	–	–
P3	–	+	+	+	+	+	+	H	Mild	+
P4	–	+	–	–	–	+	+	H	Mild	+
P5	–	+	–	–	–	–	–	N	–	–
P6	–	+	+	–	+	+	+	H	–	–

+ = present; – = absent; DTRs = deep tendon reflexes; H = hyperactive; N = normoactive.

Table 3 Summary of the neuroimaging findings from the six patients performed at different ages

Age	Case/MR number	Subcortical white matter (T ₂ hypertensity)	Thalamus (T ₂ hypertensity)	Brainstem (T ₂ hypertensity)	DWI hyperintensity	Restricted diffusion (ADC map)	Corpus callosum (thinning)	MRS (lactate peaks)
8 m	P1/01	+	–	–	NA	NA	Mild global; posterior predominance	NA
1 y 8 m	P2/01	++	+	+	Yes	Yes	Isthmus	NA
3 y	P2/02	+++	+++	+++	Yes	No (facilitated diffusion)	Isthmus	NA
3 y	P5/01	+++	+++	+++	Yes	NA	Isthmus	Yes
5 y	P1/02	+++	++	++	Yes	NA	Mild global; posterior predominance	NA
6 y	P5/02	++	+	+	Yes	Yes	Isthmus	Yes
7 y	P5/03	+	+	+	Yes	Yes	Isthmus	NA
9 y	P5/04	–	–	–	No	No	Isthmus	No
9 y	P1/03	+	–	+	Yes	Yes	Mild global; posterior predominance	No
10 y	P1/04	–	–	+	No	No	Mild global; posterior predominance	No
Adult	P3/01	+	–	–	No	No	Mild global; posterior predominance	No
Adult	P4/01	–	–	–	No	No	Normal	NA
Adult	P6/01	–	–	–	No	No	Normal	No

ADC = apparent diffusion coefficient; DWI = diffusion-weighted image; MRS = magnetic resonance; NA = not available. T₂-hypertensity changes were graded using a semiquantitative scale: absent (–); mild (+); moderate (++) and severe (+++).

for some callosal thinning. In two patients (Patients 4 and 6), brain imaging was obtained at adult life and the exams were otherwise normal (except for the optic pathway involvement). In the youngest adult patient (Patient 3) there were also patchy T₂ hyperintense abnormalities throughout the supratentorial white matter (without diffusion changes) and reduced thickness of the corpus callosum, particularly the posterior portions.

Lactate peaks were found using magnetic resonance spectroscopy in only one patient (Patient 5), from the four patients who had at least one magnetic resonance spectroscopy exam in our series. In this patient lactate peaks were found when the patient presented significant structural MRI changes (at 3 and 6 years old), and were not present when structural MRI was essentially normal (at age 9). In the other three patients the magnetic resonance spectroscopy was performed when the brain MRI has mild white matter abnormalities (Patients 1 and 3) or when it was normal (Patient 5).

In Patients 1, 2 and 5, who were clinically evaluated at the time that the brain magnetic resonance showed the white matter, thalamus and brainstem abnormalities, there was no evidence of any pyramidal or extrapyramidal signs in the neurological examination. Only one patient was submitted to an MRI during the first year of life, at the age of 8 months, and this exam revealed some widening of the lateral ventricles and mild diffuse T₂ hyperintensity in white matter (suggesting at least some delay in myelination) (Patient 1). However, this patient has also a coincidental chromosomal abnormality.

Muscle pathology

Patients 3–6 underwent muscle biopsy and in all samples there was the presence of ragged red fibres and SDH and COX negative fibres. Respiratory chain enzyme analysis was only performed in Patient 5 and showed no abnormalities. In Patient 5, the muscle biopsy was performed at 3

years of age and the proportion of ragged red fibres was less frequent than in the others patients. The other three patients (Patients 3, 4 and 6) underwent muscle biopsy in adult life.

In Patient 3, the muscle showed more intense alterations, which are illustrated in Fig. 3.

There were SDH- and COX-negative fibres that were clustered together in patch-like areas (Fig. 3A and B). Furthermore, punctate iron accumulation was observed in SDH and COX deficient fibres by iron staining (Fig. 3C). Electron microscopy revealed mitochondrial paracrystalline inclusions in numerous fibres. In these fibres frequent electron-dense irregular inclusions were identified that presumably represent iron deposition in the mitochondria (Fig. 3D). Immunohistochemical analysis of complex II and complex IV subunits showed markedly reduced expression in

fibres with low SDH and COX enzymatic activity (Fig. 3E, F, H and I) while mitochondrial mass was increased as revealed by the mitochondrial marker VDAC1 (porin; Fig. 3G).

Genetic results

Genome-wide homozygosity mapping in all affected members of Family 1 revealed two shared homozygous regions, a 1Mb region on Chromosome 19 (Chr19: 9400194–10492040) and a 500kb region on Chromosome 2 (Chr2: 89469319–89994709). We next examined the whole exome sequencing data from Family 1, limiting our analysis to rare, homozygous variants that were not synonymous or intronic and mapped within the regions of homozygosity identified. The only such variant detected

Figure 2 Neuroimaging findings. In Subject 5, at age 3 years, axial T₂-weighted post-contrast image (A) demonstrates hypointensity in the subcortical white matter, without abnormal enhancement. Axial T₂-weighted images from the same patient at ages 3 (B), 6 (C), 7 (D) and 9 years (E) disclose progressive improvement of T₂ hyperintense abnormalities in thalami, subcortical white matter and corpus callosum, initially appreciated in B. Axial T₂-weighted image from the same patient at age 6 years (F) shows sparing of mammillothalamic tracts, seen as T₂ hypointense dots in the centre of the signal change in the anterior portion of thalami. Considering the subsequent improvement, the restricted diffusion [hyperintensity in diffusion image (G) and hypointensity in apparent diffusion coefficients map (H)] probably reflects intramyelinic oedema. Axial and coronal T₂-weighted images from Subject 3 at age 27 years (I and J), demonstrate residual T₂ hyperintensity in subcortical white matter (I) and hypoplasia of both optic nerves (arrows in J).

was in *FDX2* (NM_001031734 c.431C>T, p.P144L). This variant was not found in the ExAC or 1000G databases but was found in the heterozygous state in 1 of 600 controls from the Brazilian ABraOM database (minor allele frequency: 0.000821) (Naslavsky *et al.*, 2017). We validated the variant by Sanger sequencing, confirming that all affected family members were homozygous, whereas the patients' parents and an unaffected sibling were all heterozygous. Patient 1, who had some additional dysmorphic features not seen in the other five patients described, was found to carry a coincidental tetrasomy for the short arm of chromosome 9, karyotype: 46,XX,+i(9)(p10). Both her parents had normal karyotypes.

Family 2 underwent independent genetic studies. The index case (Patient 5) was first investigated for mutations in *EARS2* (Steweg *et al.*, 2012), because of the reversible leukoencephalopathy, and for mutations in the *SDHA* and *SDHB* (Alston *et al.*, 2012), based on the presence of SDH negative fibres in muscle biopsy. No mutations were identified in these genes. Whole exome sequencing analysis was performed in four members of this family and the same *FDX2* mutation detected in Family 1 was identified as the only segregating variant, homozygous in the two affected patients (Patients 5 and 6) and heterozygous in the parents of Patient 5.

The *FDX2* p.P144L variant affects a highly conserved residue that is identical in all mammals with an

orthologous gene, and in invertebrates such as *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*.

Functional validation of the *FDX2* mutation

Real-time RT-PCR was performed using muscle samples from Patients 3–6 and control muscle from two unrelated individuals. We identified no difference in *FDX2* mRNA expression between patients and controls (Fig. 4A).

To determine whether the mutation affected protein stability, we examined the *FDX2* protein levels in muscle from Patients 3 and 6 (one patient from each family) and two unrelated controls by immunostaining. This revealed a severe reduction of *FDX2* levels in patients as compared to controls. Equal protein loading was confirmed by Ponceau S staining (not shown) and by immunoblotting for a number of other mitochondrial (F1 α/β , VDAC) and cytosolic (actin, tubulin) proteins (Fig. 4B). The low amount of *FDX2* in patient samples provides additional evidence that the *FDX2* p.P144L mutation is pathogenic.

Discussion

In this study, we describe a novel childhood onset disorder in two families with unusual clinical, radiological and

pathological features. The clinical syndrome included early-onset optic atrophy, recurrent episodes of myalgia with progressive myopathy, axonal polyneuropathy and a variety of haematological and endocrine abnormalities including microcytic anaemia, subclinical hypothyroidism, diabetes mellitus and reversible leukoencephalopathy. We used a combination of homozygosity and whole exome sequencing to identify the cause as a recurrent homozygous mutation in *FDX2*. We validated our findings genetically through segregation analysis and biochemically by demonstrating the almost complete absence of *FDX2* protein by western blot in affected patient tissue.

Our clinical assessments of six patients with ages ranging from childhood to adult life allow us to infer the natural history of this disorder. Nystagmus and optic atrophy was the first sign of the disease and was present in the first 3 years of life in all six patients. Myopathic features

developed during the first or second decade of life and presented with mild proximal weakness in limbs and/or recurrent acute episodes of myalgia and weakness precipitated by triggers such as cold weather and infections. Axonal neuropathy developed in the second decade or in adulthood leading to progressive distal weakness.

Interestingly, two individual reports have implicated mutations in *FDX2* causing a relatively discrete phenotype of mitochondrial myopathy and rhabdomyolysis without the additional features seen in our patients, or the unique radiological or pathological changes described here (Spiegel *et al.*, 2014; Lebigot *et al.*, 2017). Both previously reported cases shared the same mutation affecting the ATG start codon of *FDX2* (c.1A > T) and was predicted to lead to loss of *FDX2* expression. Despite normal mRNA levels of *FDX2*, we could demonstrate severely reduced protein expression in patient tissue, which could represent

Figure 4 Functional studies. (A) RT-qPCR showing relative *FDX2* expression normalized to TBP in patients and controls. (B) Western blotting in patient and control muscle. Immunostaining was performed using specific antibodies against the mitochondrial protein *FDX2*, the F1 α/β subunits of complex V, and the voltage-dependent anion channel (VDAC, porin). Staining against actin and tubulin served as a loading control.

instability or excess degradation of misfolded or otherwise dysfunctional protein.

The extensive and multisystem involvement in our patients is reflected by the phenotype associated with mutations in the gene of an essential *FDX2* interaction partner within the [Fe-S] cluster assembly machinery, *FDXR*, encoding ferredoxin reductase. These patients develop optic atrophy in addition to deafness and sensory neuropathy (Paul *et al.*, 2017).

Leukoencephalopathy is reported in several other disorders of [Fe-S] biogenesis, e.g. *NFU1* and *NUBPL* mutations. In *NUBPL* mutations (Kevelam *et al.*, 2013; Ahlring *et al.*, 2015), some patients show progressive improvement of signal abnormality in the corpus callosum and cerebral white matter, although this occurs in the setting of clinical worsening over time (Kevelam *et al.*, 2013). In our patients we observed a progressive improvement of the white matter, thalamus and brainstem lesions compatible with reversible or partially reversible leukoencephalopathy. This finding is intriguing and further studies will be necessary to explain the improvement of the cerebral abnormalities. However defects in *MLC1*, *HEPACAM* and *CLCN2* cause leukoencephalopathies characterized by intramyelinic oedema (T-hyperintensity in subcortical white matter and corpus callosum, associated with restricted diffusion), and in some the intramyelinic oedema can be reversible (Depienne *et al.*, 2013). This may explain the reversibility seen in our patients in whom intramyelinic oedema was a feature.

Interestingly, we observed that the leukoencephalopathy did not show a clinical correlation. None of the three patients (Patients 1, 2 and 5) demonstrated any pyramidal or extrapyramidal signs at the time that the brain MRI demonstrated white matter, thalamus and brainstem abnormalities. Therefore, we can conclude the leukoencephalopathy related to the *FDX2* p.P144L mutation was reversible and asymptomatic in the patients here described. However, in two adult patients mild upper motor neuron

signs were observed indicating that the pyramidal tracts may become involved over time. Follow-up of these patients can clarify this neurological finding.

The muscle histology in our patients is unusual, with a pattern characterized by fibres with mitochondrial proliferation in Gomori trichrome staining, and clusters of fibres that were SDH- and COX-negative. This histochemical abnormality is unusual for classical mitochondrial myopathies in which the ragged red fibres are SDH positive and COX negative (DiMauro and Gurgel-Giannetti, 2005). The histopathological findings are also different to findings in most cases of mitochondrial complex II deficiency, in which there are ragged red fibres that are SDH negative but positive in the COX reaction (Alston *et al.*, 2012). These findings are consistent with the function of *FDX2* in the [Fe/S] cluster assembly of respiratory complexes I–III and heme A production for complex IV (Sheftel *et al.*, 2010). The immunohistochemical deficiency of subunits of complexes II and IV showed the same distribution as the enzyme histochemical deficiency of COX and SDH indicating that defective assembly of the respiratory chain complexes cause the enzyme deficiency. The patchy distribution of deficiency and variability from one cell to another remains unexplained.

The peculiar and characteristic regional SDH and COX deficiency and iron accumulation as revealed by iron staining and electron microscopy observed here have also been reported in ISCU myopathy (Olsson *et al.*, 2008; Kollberg *et al.*, 2009). These similarities suggest that both ISCU and *FDX2* are important for cellular iron homeostasis via their role in the maturation of cytosolic IRP1 to an aconitase (Paul and Lill, 2015).

Defects in [Fe-S] cluster biogenesis are increasingly recognized as causing neurological disease. They play a critical role in mitochondrial function, which is exemplified by the varied neurological features in these cases, affecting the CNS as well as peripheral nerve and muscle. In conclusion, this study reveals that a biallelic mutation in *FDX2* causes

a complex childhood onset syndrome with unusual histopathological features, and confirms the important role that *FDX2* plays in mitochondrial health and disease.

Acknowledgments

Maurilio Pacheco e a Larissa Torres: logistic support in Allenas (MG, Brazil).

Funding

This work was in part financed by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Fapemig, FAPESP-CEPID e INCT-CNPq; The Leonard Wolfson Experimental Neurology Centre, The Medical Research Council (MRC) and the Wellcome Trust. R.L. acknowledges generous financial support from Deutsche Forschungsgemeinschaft (SPP 1927) and networking support from the COST Action FeBioNet (Contract CA15133). The Swedish Research Council Proj no 2012-02014 (to A.O.).

References

- Ahting U, Mayr JA, Vanlander AV, Hardy SA, Santra S, Makowski C, et al. Clinical, biochemical, and genetic spectrum of seven patients with NFUI deficiency. *Front Genet* 2015; 6: 123.
- Alston CL, Davison JE, Meloni F, van der Westhuizen FH, He L, Hornig-Do HT, et al. Recessive genome SDHA and SDHB mutations causing leukodystrophy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *J Med Genet* 2012; 49: 569–77.
- Beilschmidt LK, Puccio HM. Mammalian Fe-S cluster biogenesis and its implication in disease. *Biochimie* 2014; 100: 48–60.
- Beinert H, Holm RH, Münck E. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 1997; 277: 653–9.
- Boniewicz MT, Freibert SA, Mühlenhoff U, Lill R, Cygler M. Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nat Commun* 2017; 8: 1287.
- Braymer JJ, Lill R. Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J Biol Chem* 2017; 292: 12754–63.
- Calvo SE, Tucker EJ, Compton AG, Kirby DM, Crawford G, Burn NP, et al. High throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nat Genet* 2010; 42: 851–58.
- Depienne C, Bugiani M, Dupuis C, Galaniat D, Touitou V, Postma N, et al. Brain white matter oedema due CIC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study. *Lancet Neurol* 2013; 12: 659–68.
- DiMauro S, Gurgel-Gunnetti J. The expanding phenotype of mitochondrial myopathy. *Curr Opin Neurol* 2005; 18: 538–42.
- DiMauro S, Servadei S, Zeviani M, DiRocco M, DeVivo DC, DiDonato S, et al. Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh syndrome. *Ann Neurol* 1987; 22: 498–506.
- Düer A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Pénier C, et al. Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 1996; 335: 1169–75.
- Fontecave M. Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 171–4.
- Kevelam SH, Rodenburg RJ, Wolf NL, Ferreira P, Lansing RJ, Nijtmans LG, et al. NUBPL mutations in patients with complex I deficiency and distinct MRI pattern. *Neurology* 2013; 80: 1577–83.
- Kollberg G, Tulinius M, Melberg A, Durán N, Andersen O, Holmgren D, et al. Clinical manifestation and a new ISCU mutation in iron-sulphur cluster deficiency myopathy. *Brain* 2009; 132(Pt 8): 2170–9.
- Lebegot E, Gaignard P, Dorbox I, Slama A, Rio M, de Lonlay P, et al. Impact of mutations within the [Fe-S] cluster or the lipoic biosynthesis pathways on mitochondrial protein expression profiles in fibroblast from patients. *Mol Genet Metab* 2017; 122: 85–94.
- Legati A, Reyes A, Coccatelli Berti C, Stehling O, Marcher S, Lamperti C, et al. A novel de novo dominant mutation in ISCU associated with mitochondrial myopathy. *J Med Genet* 2017; 54: 815–24.
- Lill R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 2009; 460: 831–38.
- Mochel F, Knight MA, Tong WH, Hernandez D, Ayyad K, Tajavassalo T, et al. Splice mutation in iron-sulfur cluster scaffold protein ISCU causes myopathy with exercise intolerance. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 652–60.
- Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Esquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exonic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat* 2017; 38: 751–63.
- Nordin A, Larsson E, Thornell LE, Holmberg M. Tissue-specific splicing of ISCU results in a skeletal muscle phenotype in myopathy with lactic acidosis, while complete loss of ISCU results in early embryonic death in mice. *Hum Genet* 2011; 129: 371–78.
- Olsson A, Lind L, Thornell LE, Holmberg M. Myopathy with lactic acidosis is linked to chromosome 12q23.3–24.11 and caused by an intron mutation in the ISCU gene resulting in a splicing defect. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1666–72.
- Paul A, Drecourt A, Petit F, Deguine DD, Vamier C, Oufadem M, et al. FDXR mutations cause sensorial neuropathies and expand the spectrum of mitochondrial Fe-S-Synthesis Diseases. *Am J Hum Genet* 2017; 101: 630–7.
- Paul VD, Lill R. Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1853: 1528–39.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 559–75.
- Rouault TA. Iron-sulfur proteins hiding in plain sight. *Nat Chem Biol* 2015; 11: 442–5.
- Schmittgen TD, Livak K. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* 2008; 3: 1101–08.
- Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Netz DJ, Kerschner S, Elaissier HP, et al. Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 6059–73.
- Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Elaissier HP, Mühlenhoff U, Weber H, et al. Humans possess two mitochondrial ferredoxins, FDX1 and FDX2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 11775–80.
- Spiegel R, Saada A, Halvardson J, Soferman D, Shaag A, Edvardson S, et al. Deleterious mutation in FDX1L gene is associated with a novel mitochondrial muscle myopathy. *Eur J Hum Genet* 2014; 22: 902–6.
- Steeweg ME, Ghezzi D, Haack T, Abbink TE, Martinelli D, van Berkel CG, et al. Leukoencephalopathy with thalamus and brainstem involvement and high lactate 'LTBL' caused by EARS2 mutations. *Brain* 2012; 135(Pt 5): 1397–94.
- Stehling O, Paul VD, Bergmann J, Bass S, Lill R. Biochemical analyses of human iron-sulfur protein biogenesis and of related diseases. *Methods Enzymol* 2018; 599: 227–63.
- Stehling O, Wilbrecht C, Lill R. Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* 2014; 100: 61–77.
- Stevens A. Pigments and minerals. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and practice of histological techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1990. p. 245–67.
- Weber H, Freibert SA, Gallo A, Heidenreich T, Linne U, Amlacher S, et al. Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat Commun* 2014; 5: 5013.

10.11 Apêndice K - Practical approach to the diagnosis of adult-onset leukodystrophies: an updated guide in the genomic era. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019;90:543-554.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> or send a letter to Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.

Lynch DS, Wade C, **Paiva ARB**, John N, Kinsella JA, Merwick Á, Ahmed RM, Warren JD, Mummery CJ, Schott JM, Fox NC, Houlden H, Adams ME, Davagnanam I, Murphy E, Chataway J. Practical approach to the diagnosis of adult-onset leukodystrophies: an updated guide in the genomic era. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019;90:543-554.
<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2018-319481>

REVIEW

Practical approach to the diagnosis of adult-onset leukodystrophies: an updated guide in the genomic era

David S Lynch,^{1,2} Charles Wade,² Anderson Rodrigues Brandão de Paiva,³ Nevin John,⁴ Justin A Kinsella,⁵ Aine Merwick,⁶ Rebekah M Ahmed,⁷ Jason D Warren,⁸ Catherine J Mummery,⁸ Jonathan M Schott,⁸ Nick C Fox,⁸ Henry Houlden,¹ Matthew E Adams,⁹ Indran Davagnanam,^{9,10} Elaine Murphy,¹¹ Jeremy Chataway⁴

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2018-319481>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to
Dr David S Lynch, Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, London WC1N 3BG, UK; david.lynch.13@ucl.ac.uk

Received 19 August 2018
Revised 24 September 2018
Accepted 7 October 2018

ABSTRACT

Adult-onset leukodystrophies and genetic leukoencephalopathies comprise a diverse group of neurodegenerative disorders of white matter with a wide age of onset and phenotypic spectrum. Patients with white matter abnormalities detected on MRI often present a diagnostic challenge to both general and specialist neurologists. Patients typically present with a progressive syndrome including various combinations of cognitive impairment, movement disorders, ataxia and upper motor neuron signs. There are a number of important and treatable acquired causes for this imaging and clinical presentation. There are also a very large number of genetic causes which due to their relative rarity and sometimes variable and overlapping presentations can be difficult to diagnose. In this review, we provide a structured approach to the diagnosis of inherited disorders of white matter in adults. We describe clinical and radiological clues to aid diagnosis, and we present an overview of both common and rare genetic white matter disorders. We provide advice on testing for acquired causes, on excluding small vessel disease mimics, and detailed advice on metabolic and genetic testing available to the practising neurologist. Common genetic leukoencephalopathies discussed in detail include *CSF1R*, *AARS2*, cerebral arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), and mitochondrial and metabolic disorders.

combined with the often-overlapping clinical and radiological phenotypes can make definitive diagnosis challenging.

In 2014 we set out a practical approach to navigate through the maze.¹ However, even in the space of 5 years, there has been a substantial increase in the number of implicated genes. Improved phenotype-genotype correlation and increased access to advanced sequencing technologies have therefore changed our diagnostic approach.

This new review provides an opportunity to update and refine our practical approach for the diagnosis of genetic leukoencephalopathies in the era of whole genome sequencing. We would strongly recommend that it be read with the previous paper to avoid any repetition. As before, we emphasise the need to exclude as far as possible any acquired disorder, emphasise facets of the relatively commoner classical leukodystrophies/leukoencephalopathies, then highlight newer emerging diseases. Clinical/MRI features which point towards certain conditions are described. We end with an algorithm that we have found useful and describe our own experience.

For clarity, we are describing an approach where the symptoms have begun after the age of 16 and the MRI shows widespread cranial white matter change on standard (T2, fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR)) sequences.

INTRODUCTION

Adult patients with extensive white matter hyperintensities on MRI present the neurologist with a complex diagnostic task. There are a wide variety of disorders that can lead to these imaging appearances, including inflammatory, infective and malignant causes, as well as extensive small vessel disease. Often the most difficult patients to diagnose however are those with presumed genetic conditions, including the classical leukodystrophies, where the primary pathology is based in the myelin, or the genetic leukoencephalopathies, where the pathology is mainly neuronal or systemic. Patients may present with a wide spectrum of clinical features, including cognitive and neuropsychiatric changes, movement disorders, spasticity and seizures. The diversity of genetic aetiologies

Excluding common acquired leukoencephalopathies

As emphasised previously it is imperative that treatable and acquired causes of white matter disease are ruled out as far as possible, before the patient is referred for investigation of a genetic leukodystrophy. As a minimum, all patients should undergo infective screening, including testing for HIV, syphilis, hepatitis B/C and tuberculosis. Patients with a history of immunosuppression should be tested for progressive multifocal leukoencephalopathy by cerebrospinal fluid (CSF) examination for the presence of JC virus. A high index of suspicion should remain for neoplasia, including primary central nervous system (CNS) lymphoma and gliomatosis cerebri. A careful history will reveal if the patient has been exposed to chemotherapy/radiotherapy

© Author(s) (or their employer(s)) 2018. Re-use permitted under CC BY. Published by BMJ.

To cite: Lynch DS, Wade C, Paiva ARB, et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Epub ahead of print. Please include Day Month Year. doi:10.1136/jnnp-2018-319481

Neurogenetics

Figure 1 Axial T2-weighted MRI of radiotherapy changes (A), as well as axial FLAIR MRI of cerebral Systemic Lupus Erythematosus (SLE) (B) and PRES (C) demonstrating symmetrical and confluent periventricular and subcortical white matter signal hyperintensity (WMH). Axial non-contrast CT demonstrating subcortical volume loss, punctate calcification and confluent hypodensity adjacent to the frontal horns of the lateral ventricles (D). Axial B1000 DWI and FLAIR MRI acquisitions showing DWI avid punctate lesions (E) as well as confluent periventricular hyperintense signal changes (F) in CSF7R leukodystrophy. MRI sagittal T1W acquisition showing diffuse thinning of the corpus callosum (G), as well as axial T1W (H) and FLAIR (I) sequences demonstrating confluent rarefaction of the subcortical and periventricular white matter adjacent to the frontal horns and ventricular trigones of the lateral ventricles in VWM disease. FLAIR, fluid-attenuated inversion recovery; PRES, posterior reversible leukoencephalopathy syndrome; T1W, T1-weighted; VWM, vanishing white matter.

(figure 1A) (in particular 5-fluorouracil and methotrexate) and recreational drugs like heroin or methanol, which can all lead to confluent, symmetrical leukoencephalopathy. Treatable inflammatory disorders like systemic lupus erythematosus must be considered (figure 1B,C). Posterior reversible leukoencephalopathy syndrome is a dramatic leukoencephalopathy often with infarcts and microhaemorrhages (figure 1D), which improves over time. Further guidance on the initial work-up of these patients can be found in round 1 investigations (online supplementary table 1 in: Ahmed *et al.*,³ *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*).

Features suggestive of an acquired disorder include rapid onset, steroid responsiveness, systemic features, MRI gadolinium enhancement and cervical cord involvement—although of course there are exceptions as discussed below.

Severe small vessel disease or genetic leukoencephalopathy?

A large number of patients referred for investigation will not be diagnosed with a genetic leukodystrophy, but instead will be diagnosed with severe acquired small vessel disease. These patients are more likely to present at an older age, have significant cardiovascular risk factors, and clinically are often asymptomatic or experience slow, indolent decline. They lack a clear family history to suggest a genetic origin. Imaging is likely to show increased T2/FLAIR signal in the periventricular and cerebral white matter, the basal ganglia, pons and cerebellum with chronic lacunes and cerebral microbleeds.² In contradistinction to many inflammatory disorders such as multiple sclerosis, cervical cord imaging will be normal. In older patients (eg, >60 years), extensive genetic testing is unlikely to reveal a cause.³ However, in patients with this imaging appearance at a younger age, consideration should be given to the genetic forms of small vessel disease (eg, cerebral arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), *COL4A1*), which are discussed below.

Clinical and radiological pattern recognition

Many adult-onset leukoencephalopathies present in the same way, with a variable degree of cognitive decline, spasticity, apraxia and ataxia. This presentation is non-specific, and in these cases a non-biased approach using knowledge of the most frequent syndromes and next-generation sequencing technologies is the most efficient route to a diagnosis. However, many of the syndromes described below have particular clues to diagnosis which may be found in a careful history and neurological examination. The mode of inheritance is important and can limit the number of conditions to consider (table 1); however, the most common inheritance pattern in adults is sporadic. This may suggest an autosomal recessive mode of inheritance in a small family, reduced penetrance in an autosomal dominant condition or even a censored family history. The ethnicity of the patient and geographical region of origin are relevant as the frequency of each disorder can vary substantially in different regions.

>The most helpful and discriminating symptoms and signs are described in table 2. These include the importance of noting endocrine abnormalities such as premature ovarian failure (POF) (vanishing white matter (VWM) disease, AARS2) or hypogonadotropic hypogonadism (Gordon Holmes syndrome, POLR3-related disorders). Movement disorders such as prominent parkinsonism or chorea are important, as are the presence of early autonomic (LMNB1) or urinary symptoms (adult polyglucosaminidosis). Peripheral demyelinating neuropathy may suggest metachromatic leukodystrophy (MLD), and adrenal failure is highly suggestive of adrenoleukodystrophy (ALD).

Similarly to the clinical presentations, the radiological appearance of genetic leukoencephalopathies can be non-specific, but there are important features to note. Deep white matter diffusion abnormalities have been well described in CSF7R and AARS2, in addition to prominent involvement of the corpus callosum. A patchy leukoencephalopathy with lacunes, microhaemorrhages and anterior temporal lobe involvement is suggestive of a vascular disorder such as CADASIL or cathepsin A-related arteriopathy with strokes and leukoencephalopathy (CARASIL). Hypomyelination is an important sign to note, as there are only a small number of genetic diseases known to cause this radiological appearance. Useful radiological signs can be found in table 3.

Table 1 Leukoencephalopathies known to present in adulthood

Disorder	Inheritance	Investigation	Gene
Adult-onset leukodystrophies			
Inherited disorders of metabolism associated with abnormal biochemical tests			
X linked adrenoleukodystrophy	X linked	Very long chain fatty acids	ABCD1
Krabbe disease	AR	WCE (galactocerebrosidase)	GALC, PSAP
Metachromatic leukodystrophy	AR	WCE (arylsulfatase A)	ARSA
Cerebrotendinous xanthomatosis	AR	Serum cholesterol, urine bile alcohols	CYP27A1
Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency	AR	Plasma amino acid profile	MTHFR
Homocystinuria	AR	Plasma amino acid profile	CBS
mtDNA mutations	Maternal	mtDNA sequencing Blood/cerebrospinal fluid lactate Muscle biopsy	Various
Disorder	Acronym	Inheritance	Gene
Genetic leukoencephalopathies			
Hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia	HDLS	AD	CSF1R
Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy	CADASIL	AD	NOTCH3
Cerebral autosomal recessive cerebral arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy	CARASIL	AR	HTRA1
Cathepsin A-related arteriopathy with strokes and leukoencephalopathy	CARASIL	AD	CTSA
Cerebral leukodystrophy with retinal vasculopathy		AD	TREX1
Small vessel disease with ocular abnormalities		AD	COL4A1
Alexander disease		AD	GFAP
Adult-onset autosomal dominant leukodystrophy	ADLD	AD	LMNB1 duplication
AARS2-related leukodystrophy	AARS2-L	AR	AARS2
Vanishing white matter disease	VWM	AR	EIF2B1-5
Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation	LBSL	AR	DARS2
Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy	MNGIE	AR	TYMP
Pelizaeus-Merzbacher disease	PMD	X linked dominant	PLP1
Pelizaeus-Merzbacher-like disease	PMLD	AR	GJC2
Adult polyglucosan body disease	APBD	AR	GBE
Hypomyelinating leukodystrophy with atrophy of the basal ganglia and cerebellum	H-ABC	AD	TUBB4A
Leukoencephalopathy with ataxia	LKPA1	AR	CLCN2
4H syndrome		AR	POLR3A/POLR3B
Labrune syndrome		AR	SNORD118
Gordon Holmes syndrome		AR	RNF216
Polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy	PLOSL	AR	TREM2 TYROBP

AD, Autosomal Dominant; AR, Autosomal recessive; WCE, White Cell Enzymes.

Metabolic leukodystrophies

After excluding common acquired leukoencephalopathies, the first priority should be to identify patients with an inherited metabolic disorder. A small number of tests will detect the diseases that present in adulthood. Recommended testing includes a very long chain fatty acid (VLCFA) profile in men (ALD), specific white cell enzyme activities (Krabbe disease, MLD), raised serum cholesterol/urinary bile alcohols (cerebrotendinous xanthomatosis (CTX)) and plasma amino acids (methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) deficiency and homocystinuria) (table 1).

X linked ALD

Adult-onset ALD is a rare X linked metabolic disorder of peroxisomal fatty acid beta-oxidation which results in the accumulation of VLCFA in plasma and tissues, including white matter and the adrenal cortex.⁴

ALD is associated with three main phenotypes, including Addison-only disease, adrenomyeloneuropathy (AMN) and

cerebral ALD (CALD). Addison-only presents most commonly by age 8 years, and although it begins without evidence of neurological abnormality some degree of disability (most commonly AMN) usually develops later. Indeed, virtually all patients with ALD who reach adulthood develop AMN, usually between 20 and 30 years of age. AMN is a non-inflammatory distal axonopathy, and is characterised by progressive spastic paraparesis, sensory ataxia, sphincter dysfunction, impotence and pain. CALD usually only affects men and presents with rapidly progressive inflammatory demyelination in the brain, leading to rapid cognitive and neurological decline, dementia, ataxia, seizures and death.

MRI is always abnormal in neurologically symptomatic men with cerebral disease. Early changes include T2/FLAIR hyperintensities in the parieto-occipital regions and splenium of the corpus callosum. A minority of patients will demonstrate signal abnormalities predominantly in the frontal lobes and genu of the corpus callosum. Peripheral rim enhancement is a typical feature.^{4,5}

Neurogenetics

Table 2 Clinical features that can be associated with specific leukodystrophies

Clinical characteristics of specific leukodystrophies	
Premature ovarian failure	WMM, Galactosaemia, AARS2-L
Hypogonadotropic hypogonadism	Gordon Holmes syndrome, 4R syndrome
Parkinsonism	HDLs
Chorea	Gordon Holmes syndrome
Palatal myoclonus	Alexander disease
Axonal peripheral neuropathy	ALD, LBSL, APBD, CTX
Demyelinating peripheral neuropathy	MLD
Optic atrophy	MLD, Krabbe disease, ALD, PMD mtDNA mutations
Adrenal insufficiency	ALD
Dental abnormalities	4R syndrome
Tendon xanthoma	CTX
Early urinary frequency	APBD
Early autonomic features	ALD
Early prominent ataxia	CTX, Gordon Holmes syndrome, UKPAL
Migraine with aura	CADASIL
Cataracts	CTX mtDNA mutations
Occasional rapid progression (<1 year)	ALD, Krabbe disease

ALD, adult-onset, autosomal dominant leukodystrophy; ALD, adrenoleukodystrophy; APBD, adult polyglucosan body disease; CADASIL, cerebral arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy; CTX, cerebrotendinous xanthomatosis; HDLs, hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids; LBSL, leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement with elevated lactate; UKPAL, leukoencephalopathy with ataxia; MLD, metachromatic leukodystrophy; PMD, Pelizaeus-Merzbacher disease; WMM, vanishing white matter.

Elevated levels of VLCFAs in the blood are suggestive of a peroxisomal disorder, and the diagnosis of ALD can be confirmed by sequencing of the *ABCD1* gene. Early diagnosis and family screening are essential to reduce the risk of untreated hypoadrenalism, and to identify early those patients who may benefit from haematopoietic stem cell transplantation (HSCT).⁶

Krabbe disease

Krabbe disease is a rare autosomal recessive disorder caused by loss of function mutations in *GALC*, leading to deficiency of galactocerebrosidase, a lysosomal enzyme responsible for the degradation of galactocerebroside to ceramide and galactose. In Krabbe disease, galactocerebroside accumulates in the peripheral and central nervous system producing cerebral atrophy, loss of myelin, gliosis and globoid cells.⁷

There are three forms of Krabbe disease: infantile, juvenile and adult. The infantile form is the most severe and usually presents between 3 and 6 months of age. After a normal neonatal period, those affected develop a rapidly progressive course involving irritability, hyperaesthesia, visual and hearing loss, severe cognitive and motor deterioration, and seizures. This group rarely survives beyond 2 years. Nerve conduction studies

Table 3 Imaging features associated with specific leukodystrophies

Imaging characteristics of specific leukodystrophies	
Frontal predominance	Alexander disease
Basal ganglia abnormalities	H-ABC, mtDNA mutations, PLOSL (calcifications)
Hypomyelination	PMID/PMID, H-ABC, 4R syndrome
Anterior temporal lobe signal abnormality	CADASIL, CARASIL, CARASIL
Deep white matter diffusion dots	HDLs, AARS2-L
Corpus callosum involvement	HDLs, AARS2-L, HSP genes (<i>SPG11</i> , <i>SPG15</i> , <i>FAT2H</i>)
'Tadpole brainstem' (atrophy of the cervical cord and medulla with preserved pons)	Alexander disease
Dentate nucleus signal changes/cysts	CTX
Spinal cord abnormalities	Adrenomyeloneuropathy, LBSL, APBD, Alexander disease
Middle cerebellar and cerebral peduncles	UKPAL
Contrast enhancement	ALD, Alexander disease, Krabbe disease
Periventricular microcalcifications (visible on CT)	HDLs
Extensive calcifications and cysts	Liburne syndrome
Bone cysts on X-ray	PLOSL

ALD, adrenoleukodystrophy; APBD, adult polyglucosan body disease; CADASIL, cerebral arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy; CARASIL, cathepsin A-related arteriopathy with strokes and leukoencephalopathy; CARASIL, cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy; CTX, cerebrotendinous xanthomatosis; H-ABC, hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum; HDLs, hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids; HSP, Hereditary Spastic Paraplegia; LBSL, leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement with elevated lactate; UKPAL, leukoencephalopathy with ataxia; PLOSL, polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy; PMID, Pelizaeus-Merzbacher disease; PMID, Pelizaeus-Merzbacher-like disorder.

show a demyelinating peripheral neuropathy and CSF analysis may reveal increased total protein concentration.⁸

Juvenile and adult (late) forms of the disease have a milder, more varied phenotype, a slower rate of progression and a significantly longer lifespan (although we have observed a rapid deterioration over a year in one case). Typical features include spasticity, dementia, ataxia, peripheral neuropathy and visual loss. The T2/FLAIR signal abnormality in Krabbe disease predominantly affects the corticospinal tracts, from the cortex, through the corona radiata internal capsules and cerebral peduncles.⁹ The optic radiations are frequently involved,⁹ and intracranial calcifications have been reported, but may only be apparent on CT imaging.¹⁰

The diagnosis of Krabbe disease can be made by assay of galactosylceramidase activity via white cell enzyme testing.

Metachromatic leukodystrophy

MLD is an autosomal recessive disorder caused mainly by deficient activity of arylsulfatase A (ARSA). ARSA is responsible for the desulfation of cerebroside sulfate, a major glycolipid of myelin, and decreased ARSA activity leads to the accumulation

of cerebroside sulfate in the CNS and peripheral nerves (as well as the kidneys and other visceral organs). The result is central and peripheral demyelination.¹¹

In almost all cases, recessive mutations in the *ARSA* gene are responsible, although very rarely, MLD can be caused by mutations in the *PSAP* gene.¹² Three major subtypes exist—late infantile (age 6 months to 2 years), juvenile (age 3–16 years) and adult (age > 16). Peripheral neuropathy occurs in all forms and gall-bladder involvement (hyperplastic polyps) is also common. Late infantile onset is associated with poor prognosis (death typically occurs within 5–6 years) and manifests as regression of motor skills, gait abnormalities, seizures, ataxia, hypotonia, extensor plantars and optic atrophy. Juvenile disease presents similarly but is more heterogeneous. Progression is slower, and these children may survive until early adulthood. Adult onset is usually heralded by dementia, behavioural difficulties, and in a minority with psychosis.¹³

Nerve conduction studies show marked slowing. Brain MRI reveals symmetric periventricular white matter lesions and cortical atrophy, often with a tigroid or stripe pattern, caused by the appearance of the spared perivascular white matter.¹⁴ Diagnosis is established by demonstrating deficient *ARSA* activity in leucocytes (white cell enzyme testing) or cultured skin fibroblasts. Clinicians should be aware of the pseudodeficiency state, in which *ARSA* activity levels are low, but do not cause disease. In pseudodeficiency, the activity level is typically 5%–20% of controls.¹⁵ In affected individuals with MLD, urine sulfatide excretion is increased, generally tenfold to a hundred-fold greater than controls. Urine sulfatide excretion may therefore be used to differentiate pseudodeficiency from deficiency. However, the assay for urine sulfatide excretion is not currently routinely available in the UK and, as testing for the pseudodeficiency variants can be done rapidly, this is the usual first-line test.

No curative treatment is currently available, but HSCT has slowed disease progression in some patients.¹⁶ Other promising novel treatments include gene therapy and enzyme replacement.¹⁷

Cerebrotendinous xanthomatosis

CTX is an autosomal recessive disorder of bile acid synthesis caused by mutation of the cytochrome P450 gene *CYP27A1*, resulting in the production of defective sterol 27-hydroxylase. Consequently, CTX is associated with high levels of cholestanol in plasma and its accumulation in tissue. This gives rise to hallmark clinical manifestations of chronic diarrhoea, bilateral cataracts, tendon xanthomas or tendon thickening, and neurological dysfunction.¹⁸

Typical neurological manifestations can include intellectual disability, autism, behavioural and psychiatric problems, dementia, ataxia and epilepsy. MRI studies show cerebral and cerebellar atrophy, extensive white matter lesions of the spinal cord, and bilateral T2/FLAIR hyperintensity of the dentate nuclei and surrounding white matter.

Cholestanol concentrations are increased in plasma, brain, xanthomas and bile. Increased quantities of bile alcohols are useful as a secondary diagnostic test. CSF levels of cholestanol, cholesterol, apolipoprotein B, apolipoprotein A1 and albumin are increased.¹⁹

Treatment is with chenodeoxycholic acid (a cholesterol 7 α -hydroxylase enzyme inhibitor), which is effective in improving biochemical findings, and in those without advanced disease may improve or stabilise neurological features.¹⁹

MTHFR deficiency

Autosomal recessive mutations in the *MTHFR* gene cause a spectrum of symptoms, with onset ranging from childhood to adulthood. Biochemically, there are elevated plasma homocysteine, homocystinuria and low methionine levels. Patients may develop seizures, cognitive decline, recurrent thrombotic stroke and leukoencephalopathy. The neurological signs may improve with treatment, the mainstay of which is folic acid and betaine supplementation.²⁰

Genetic leukoencephalopathies

Since our previous review, a number of conditions have gained in prominence or have been newly described. They are diagnosed genetically, although as shown in tables 2 and 3 there can be typical diagnostic features to focus the genetic analysis.

CSF1R

Mutations in the *CSF1R* (colony stimulating factor-1 receptor) gene are known to cause an adult-onset leukodystrophy termed hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids (HDLS).²¹ This condition has been shown to be one of the most common causes of adult-onset leukodystrophy, accounting for approximately 10% of cases.²² First described in a large Swedish kindred,²³ this is an autosomal dominant disorder in which affected members develop a clinical course characterised by dementia, psychiatric changes and motor decline. The age of onset is variable, even within families, but typically patients develop symptoms in their 40s (range 18–78 years). The penetrance of the disorder is not known, but is likely to be high. Because of incomplete penetrance (and the possibility of de novo mutations), some affected patients will not have a family history and may appear to have a sporadic disorder.

The condition is found worldwide and has a well-described clinical phenotype. Prominent symptoms include parkinsonism,²⁴ which is usually not levodopa-responsive, and upper motor neuron signs such as spasticity and ataxia. A recent large review found the mean disease duration to be 6.8 years from symptom onset to death.²⁵

Pathologically the disease is characterised by the presence of astrogliosis with myelin and axonal loss and frequent axonal spheroids in the cerebral white matter. The spheroids are visible with H&E staining, but also stain positive for neurofilaments, p62, amyloid precursor protein APP and β amyloid. There are typically pigmented microglia present which are autofluorescent and stain positive for CD68. The pathological appearance of this disorder is relatively specific and lends the disease its name. Prior to the identification of the responsible gene, the diagnosis of HDLS could only be confirmed pathologically.

The MRI appearance of HDLS is consistent, with typical features including confluent, largely symmetric T2 hyperintense/T1 hypointense signal abnormality in the frontoparietal and periventricular white matter, which spares the U-fibres, and involves the pyramidal tracts and corpus callosum.²⁶ Punctate areas of restricted diffusion may be present (termed deep white matter diffusion dots) and their appearance may even mimic CNS vasculitis.²² Calcifications may be present, particularly in the periventricular white matter adjacent to the frontal horns (figure 1D–F).

It was shown in 2011 that HDLS is largely caused by mutations in the *CSF1R* gene.^{21–27} Almost all mutations are found in the tyrosine kinase domain of the *CSF1R* protein and the majority of mutations are missense. A small number of splice site, frameshift and indel mutations have also been identified.

Neurogenetics

AARS2

Mutations in *AARS2* (alanine-transfer (t)RNA synthetase 2) are emerging as a rare cause of leukodystrophy with similar clinical, imaging and radiological phenotype to *CSF1R* mutations.^{28,29} This is an autosomal recessive disorder, but frequently appears sporadic, with a younger age of onset than *CSF1R* (mean age 29 years, range 15–44 years). However the initial symptoms are very similar, with psychiatric changes and cognitive decline, parkinsonism, pyramidal signs, ataxia and seizures. Almost all female cases have experienced POF, although no endocrine or reproductive abnormalities are found in men. MRI features include largely symmetric and confluent T2 hyperintense/T1 hypointense white matter signal change in the frontoparietal white matter, corpus callosum and pyramidal tracts. There are punctate areas of restricted diffusion on diffusion weighted imaging (DWI) often running parallel to the ventricles. A distinguishing feature from *CSF1R* is that the white matter signal suppresses on FLAIR imaging, indicating a degree of rarefaction.²⁸

The clinical picture over time remains similar to *CSF1R*, with early cognitive symptoms followed by severe and rapid motor decline. Most patients are fully dependent within 5 years of symptom onset. In one case, pathological features of HDLS were found on brain biopsy, with axon and myelin loss and frequent axonal spheroids containing neurofilament, p62, APP and β amyloid. Pigmented microglia were also seen, and the pathological features were felt to be indistinguishable from HDLS. In another case, no pathological abnormalities were found in a brain biopsy,^{29,30} and further pathological descriptions are required.

AARS2 encodes a t-RNA synthetase responsible for correctly loading alanine onto tRNA-ala for the translation of mitochondrial proteins. Most commonly patients will have compound heterozygous *AARS2* mutations, although homozygous cases have also been reported. Loss of function mutations (frameshift, nonsense, splice site) are the most common, but there are some pathogenic missense mutations, including the recurrent R199C mutation. Mutations in this class of genes (tRNA synthetases) are increasingly implicated in a diverse range of neurological disorders.^{31,32}

VWM disease

VWM disease is an autosomal recessive disorder characterised by progressive neurological impairment and the cystic degeneration of white matter that is visible on MRI. It most commonly presents in childhood, but many adult-onset cases have been reported. The most frequent presenting features include ataxia, spasticity, seizures and cognitive decline. Often patients will experience episodes of severe neurological deterioration after a minor insult, such as a head trauma, an infection or even emotional distress.³³ An additional feature in women with VWM is POF; hence, VWM is sometimes referred to as ovariokodystrophy.

In one study of adult-onset VWM, the mean age of onset was found to be 31 years, with clinical features including neurological and psychiatric presentations. Frequent MRI features included cerebral and cerebellar atrophy and cavitating leukoencephalopathy with involvement of the corpus callosum.³⁴ The characteristic feature is that the periventricular white matter takes on the same signal intensity as the CSF on T2-weighted and FLAIR imaging (figure 1G–I). VWM is caused by homozygous and compound heterozygous mutations in any of the five genes that encode the subunits of the translation initiation factor EIF2B (*EIF2B1–EIF2B5*).³⁵

Vascular leukoencephalopathies

A number of different genes come under the umbrella term of vascular leukoencephalopathies, including *NOTCH3* (CADASIL), *HTRA1* (cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)), *CTSA* (CARASAL), *COL4A1* and *TREX1*.

Cerebral arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy

CADASIL is caused by heterozygous mutations in the *NOTCH3* gene. The condition is autosomal dominant and is characterised by recurrent stroke at a young age, cognitive decline, migraine with aura and depression.³⁶ The mean age of first stroke is 46 years and typically the events are subcortical, ischaemic lacunes. Reversible episodes of encephalopathy may also occur. On brain MRI, the first abnormality detected is often white matter signal abnormality in the temporal poles. Over time the burden of white matter lesions increases, with the periventricular, frontoparietal and external capsular white matter most affected.³⁷ There are frequently dilated perivascular spaces and subcortical lacunes. Microhaemorrhages may be detected on gradient echo imaging (figure 2A–C). The diagnosis is supported by the finding of granular osmiophilic material in small arterioles by electron microscopic examination of tissue, usually a skin biopsy. Pathogenic *NOTCH3* mutations lead to the gain or loss of a cysteine residue in one of the epidermal growth factor-like repeat (EGFr) domains of the *NOTCH3* protein. These EGFr domains normally contain six cysteine residues, and any alteration in this number has been shown to lead to *NOTCH3* aggregation. *NOTCH3* mutations are not fully penetrant, but it has been shown that cysteine altering mutations affecting the first six EGFr domains are the most penetrant and are associated with the highest burden of white matter disease.³⁸

Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy

This autosomal recessive disorder is caused by biallelic mutations in the *HTRA1* gene. CARASIL was first identified and is most common in Japan, but cases in Europe and South America have also been identified.^{39,40} Clinically it is characterised by dementia, parkinsonism, upper motor neuron signs, and extraneurological features including alopecia and back pain with spondylosis deformans. Acute strokes are common and the typical age of onset is the teenage years to 20s. MRI appearance is similar to CADASIL (above), with spondylosis deformans potentially visible on spinal imaging.⁴¹

Recently, it has been proposed that heterozygous *HTRA1* mutations can also lead to autosomal dominant severe small vessel disease. In one study these patients were termed 'manifesting heterozygotes with CARASIL' and were described with a similar but less severe phenotype to recessive mutations.⁴² Spondylosis was found in all manifesting heterozygotes. However, another recent study found that the phenotype of heterozygous *HTRA1* mutations was different from both CADASIL and CARASIL, and no extraneurological features were observed, although the imaging appearance was similar.⁴³

Cathepsin A-related arteriopathy with strokes and leukoencephalopathy

This very recently described entity due to heterozygous mutations in the *CTSA* gene is named cathepsin A-related arteriopathy with strokes and leukoencephalopathy (CARASAL). The initial

Figure 2 Axial FLAIR MRI sequences demonstrating confluent signal hyperintensity involving the external capsules, posterior limb of the internal capsules, peritrigonal white matter and splenium of the corpus callosum (A), as well as of the subcortical white matter of the temporal poles and central pons (B) in CADASIL. Minimal intensity projection from a susceptibility weighted imaging acquisition MRI demonstrating multiple punctate foci of paramagnetic susceptibility limited within the thalamus, left putamen and subcortical white matter of the left occipital lobe (C), in keeping with multiple microhaemorrhages in CADASIL. Axial T2W MRI sequences demonstrating signal hyperintensity within the trigeminal fascicles and cerebellar white matter (D), as well as within the pyramids, decussation of the medial lemnisci and inferior cerebellar peduncles at the level of the medulla oblongata (E) in LBSL. A sagittal T2W sequence of the upper spinal cord in the same patient demonstrates contiguous longitudinally extensive signal hyperintensity of the dorsal columns and lateral cortical spinal tracts (F). Axial T2W (G) and T1W (H) MRI sequences in a patient with Pelizaeus-Merzbacher disease illustrating the confluent diffuse T2W hyperintense signal within the white matter of the cerebrum, appearing unremarkable on the T1W sequences, suggestive of hypomyelination. Axial T2W sequences demonstrating confluent hyperintense signal change within the pons, middle cerebellar peduncles and dentate nuclei in a patient with a *CNCL2* leukodystrophy (I). CADASIL, cerebral arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy; FLAIR, fluid-attenuated inversion recovery; T1W, T1-weighted; LBSL, leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement with elevated lactate; T2W, T2-weighted.

report described two Dutch families, distantly related, in whom members were affected by a severe leukoencephalopathy, accompanied often by ischaemic or haemorrhagic stroke, therapy-resistant hypertension and later cognitive decline.⁴⁴ The MRI pattern was very similar to CADASIL. Since the initial report, another case has been described from the UK with identical imaging and

a similar phenotype, although with additional prominent brainstem features reported.⁴⁵ To date, all patients described have carried the same R325C mutation in *CTSA*. It is unclear whether this is the only mutation in *CTSA* which is causal for CARASIL or whether further mutations will be identified.

COL4A1 and TREX1

Both *COL4A1* and *TREX1* are associated with leukoencephalopathies in which ocular or retinal abnormalities may be present. *COL4A1* is characterised by diffuse leukoencephalopathy, often with dilated perivascular spaces and microhaemorrhages, and retinal abnormalities including arteriolar tortuosity or retinal haemorrhage.⁴⁶ It is an autosomal dominant disorder and shows incomplete penetrance. Additional CNS features include intracerebral haemorrhage, calcifications and cerebellar atrophy. Ocular abnormalities are not exclusively confined to the retina in *COL4A1* with anterior segment dysgenesis, congenital cataract and nystagmus all reported.⁴⁷ A second form of leukoencephalopathy with retinal vasculopathy is caused by heterozygous frameshift mutations in the c-terminus of the *TREX1* gene.⁴⁸ In addition to the microvascular disease of the retina which can lead to visual loss, Raynaud's phenomenon and migraine are both frequently found.⁴⁹ A phenotype of *TREX1* mutations called hereditary endotheliopathy with retinopathy, nephropathy and stroke may present with progressive, contrast-enhancing lesions with surrounding oedema, which may be mistaken for tumours.⁵⁰ Calcifications are found in more than 50% of patients.⁵¹

Mitochondrial DNA mutations

Mitochondrial DNA mutations are a rare cause of adult-onset leukoencephalopathy. Typically patients will present with a multisystem disorder, often including short stature, migraine, sensorineural deafness, cardiac defects and exercise intolerance. There is often involvement of the deep grey structures on imaging, such as the basal ganglia and thalamus, but symmetric and confluent white matter abnormalities can occur.⁵² Stroke-like episodes or cortical blindness would point to mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (m.3243A>G); myoclonus, seizures and ataxia are suggestive of mitochondrial encephalopathy with ragged red fibres (m.8344A>G). Periventricular signal abnormalities have been reported in Leber's hereditary optic neuropathy, but only as a minor feature.⁵³ Common mitochondrial point mutations can be readily screened in blood, but if these are negative and a suspicion of mitochondrial disease remains, next-generation sequencing of the complete mitochondrial genome from the muscle may be necessary. Clinicians should be aware that exome sequencing and panel-based sequencing typically target only nuclear genes, that is, not mitochondrial DNA. There are methods to extract mitochondrial DNA sequence from exome data, but this is not commonly done.

Nuclear encoded mitochondrial genes

There are a large number of nuclear encoded genes with established or putative mitochondrial functions (>1000 in MitoCarta).⁵⁴ This section could never be exhaustive, and some genes, such as *AARS2* and *DARS2*, are discussed elsewhere in detail. Many of these disorders are only known to affect children, but two disorders of mtDNA maintenance can present with prominent leukoencephalopathy in adulthood, namely mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) and *POLG* mutations. MNGIE is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the *TYMP* gene.⁵⁵ It usually presents in

Neurogenetics

adulthood with ptosis, chronic progressive external ophthalmoplegia, gastrointestinal dysmotility including pseudo-obstruction, peripheral neuropathy, and diffuse leukoencephalopathy. A similar disorder can be caused by mutations in *POLG*, although these cases usually have less prominent leukoencephalopathy.⁵⁶ Involvement of the pulvinar of the thalamus has been reported in *POLG* mutations.⁵⁷ Nuclear encoded mitochondrial gene defects can be identified by whole exome or panel sequencing. Variants, either single nucleotide variants or deletions, of mtDNA are usually identified by specific mtDNA sequencing from affected tissue, often muscle.

Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement with elevated lactate

Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement with elevated lactate (LBSL) is an unusual and rare leukoencephalopathy caused by autosomal recessive mutations in the *DARS2* gene.⁵⁸ Usually patients develop symptoms in childhood, but the condition tends to be slowly progressive and evolves over time, so the diagnosis is usually made when the patient is an adult. The most common presentation consists of childhood onset of distal weakness and wasting, with pes cavus, and initially patients may be given a diagnosis of hereditary sensory motor neuropathy. Over time, upper motor neuron signs including spasticity and extensor plantar responses develop. Slowly progressive ataxia is another common feature, and is due to both cerebellar involvement and dorsal column loss. The neuroimaging appearance of LBSL is quite distinct, with a diffuse T2 hyperintense signal abnormality of the cerebral and cerebellar white matter, corpus callosum, medullary pyramids, medial lemniscus, intraparenchymal course of the trigeminal nerves, superior, middle and inferior cerebellar peduncles, and the dorsal columns and lateral corticospinal tracts of the spinal cord. A lactate peak is seen on magnetic resonance spectroscopy, but blood and CSF lactate are not elevated⁵⁹ (figure 2D–F). *DARS2* mutations are usually compound heterozygous, and the most frequent variant is a splice site mutation in intron 2.⁵⁸ This region is poorly covered by next-generation sequencing approaches, and single-gene testing is recommended if the clinical and radiological picture is suggestive of LBSL.

Alexander disease

Caused by heterozygous mutations in *GFAP*, Alexander disease has infantile, juvenile and adult onset forms.⁶⁰ Mutations are often de novo, and young children typically present with seizures, motor regression and macrocephaly. *GFAP* encodes the glial fibrillar acidic protein, an essential component of astrocytes. Alexander disease is characterised pathologically by the presence of Rosenthal fibres, which are long, filamentous eosinophilic fibres largely composed of GFAP protein.⁶¹

In infantile cases, death occurs before 2 years. In juvenile cases, onset is between 4 and 10 years and is typified by ataxia, cognitive decline and bulbar symptoms. Survival can be up to 20–30 years. Adults tend to present with bulbar or pseudobulbar palsy, spasticity, ataxia, cognitive decline and dysautonomia.

The MRI pattern in Alexander disease often falls into two extremes. In most infantile and juvenile cases, there is extensive white matter abnormality with a frontal predominance. In adults, however, the abnormalities are often restricted to the posterior fossa, particularly atrophy of the medulla and cervical spinal cord. Often the lesions are contrast-enhancing, or there may be contrast enhancement of the ventricular lining or periventricular rim.⁶²

LMNB1 duplication

Duplication of *LMNB1* causes a form of adult-onset, autosomal dominant leukodystrophy (ADLD) characterised by autonomic dysfunction, spasticity, ataxia and cognitive decline. Symptoms usually develop in the fifth or sixth decade.⁶³ Autonomic symptoms may be prominent and include orthostatic hypotension, urinary incontinence, constipation and erectile dysfunction. MRI features include T2W/FLAIR hyperintensity of the subcortical and deep cerebral white matter, the cerebellar peduncles, the pyramidal tracts and brainstem.⁶⁴ It is important to note that copy number variants are not reliably identified by next-generation sequencing. Therefore, if ADLD is suspected clinically, specific testing for *LMNB1* duplications should be performed.

Hypomyelinating disorders (*PLP1*, *GJC2*, *TUBB4A*, *POLR3A*, *POLR3B*, *CLCN2*, *NKX6-2*)

Hypomyelination is an extremely useful radiological sign, and in adults can significantly reduce the number of potential genes to test. Hypomyelination should be considered where the T2/FLAIR hyperintensity is diffuse, and often seems to be affecting all of the white matter uniformly. In contrast to demyelinating disorders where the white matter signal is hypointense on T1 imaging, in hypomyelination it may be isointense, or mildly hypointense or hyperintense.⁶⁵ This sign is easily overlooked if the T1 sequences are not examined (figure 2G–H).

The most common cause of hypomyelinating leukoencephalopathy is Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD), caused by mutations in the proteolipid gene *PLP1*. The most common presentations of PMD include the congenital form, where symptoms are present at the time of birth, and the classical form, where symptoms develop within the first months of life.⁶⁶ Symptoms begin with nystagmus, hypotonia, ataxia and head tremor. Later motor and language development is delayed. *PLP1* duplications are the most common mutation type in children. As *PLP1* is an X linked gene, typically male patients are more severely affected than female patients. The congenital and classical forms are not seen in female patients. However, female *PLP1* mutation carriers can develop symptoms in adulthood. The phenotype in women often consists of slowly progressive spastic paraplegia and this presentation has been assigned SPG2.⁶⁷ The most common mutation type in female carriers who manifest symptoms is a nonsense mutation.⁶⁸ Adult-onset disease in male patients is more aggressive, with prominent head tremor, ataxia, spasticity and cognitive decline. MRI in both male and female patients shows a diffuse hypomyelinating leukodystrophy which is hyperintense on T2/FLAIR and often isointense or mildly hyperintense on T1. The pattern can resemble tiger stripes (tigroid pattern).

Autosomal recessive mutations in *GJC2* are a cause of a Pelizaeus-Merzbacher-like disorder.⁶⁹ The phenotype is similar to that of *PLP1* mutations but male and female patients are equally affected. Like *PLP1*, most patients have onset of symptoms in early life, but there are reports of later onset with slow progression into adulthood, again mostly manifesting by spastic paraplegia, cerebellar signs and a hypomyelinating picture on MRI.⁷⁰

Autosomal recessive mutations in *CLCN2* are a very rare cause of adult-onset leukoencephalopathy, with findings mainly limited to the posterior limb of the internal capsules, the dentate nucleus, the cerebellar peduncles and middle cerebellar peduncles (figure 2I). There may be evidence of restricted diffusion in these areas. There may be more extensive involvement of cerebellar white matter, and cerebral white matter may demonstrate

features of hypomyelination. In adults, the most common presentation is mild cerebellar ataxia.⁷¹

A number of other genes have been associated with hypomyelination, including *TUBB4A* (with basal ganglia abnormalities),⁷² *POLR3*-related disorders (dental abnormalities and hypogonadotropic hypogonadism)⁷³ and *NKX6-2*,⁷⁴ although to date these syndromes are only described with childhood onset.

Very rare genes (*RNF216*, *TREM2*, *SNORD118*)

Gordon Holmes syndrome is a rare autosomal recessive disorder characterised by hypogonadotropic hypogonadism and ataxia. It is usually accompanied by cognitive decline, diffuse leukoencephalopathy with cerebellar atrophy and chorea. Age of onset is variable and the disorder is caused by mutations in the gene *RNF216*. The combination of chorea and dementia is reminiscent of an autosomal recessive form of Huntington disease.⁷⁵

Polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy, also known as Nasu-Hakola disease, is a rare syndrome caused by autosomal recessive mutations in *TREM2* or *TYROBP*. The disorder usually presents in adulthood, with bone pain and pathological fractures due to bone cysts. Later, a severe neuropsychiatric syndrome develops due to a progressive leukoencephalopathy. It is most common in Japan and Finland.⁷⁶ Different *TREM2* variants are also significant risk factors for Alzheimer disease.⁷⁷

Labrune syndrome, also known as leukoencephalopathy with brain calcification and cysts, is a rare autosomal recessive disorder caused by mutations in *SNORD118*. Labrune syndrome most commonly presents in early life, but there are reports of patients presenting in their 50s. The syndrome consists of progressive dementia, with motor decline and seizures. Large areas of cystic degeneration and calcification occur with a symmetric leukoencephalopathy affecting the periventricular, deep and subcortical white matter.⁷⁸ *SNORD118* is not well

covered by next-generation sequencing, and in the right clinical context single-gene sequencing is recommended.

The Queen Square Adult Leukodystrophy Group

The Queen Square Adult Leukodystrophy Group (QSALG) is a multidisciplinary special interest group with input from neuroinflammation, neurogenetics, inherited metabolic disease, cognitive neurology and neuroradiology. Since inception, the group has investigated 116 patients with a wide variety of white matter syndromes, referred from hospitals worldwide. In our experience, a diagnosis can be made in approximately half of patients (54). The most common diagnoses are found in online supplementary figure 1. The most common diagnosis reached is of small vessel disease, followed by *CSF1R* mutations, mitochondrial diseases, ALD and multiple sclerosis. The remainder of diagnoses were highly heterogeneous, with often only one or at most two cases for each disorder. There were 15 diagnoses that affected only one patient each, and these included CADASIL and CARASIL, *PLP1* mutations, Alexander disease and Fabry disease, VWM disease and familial British dementia. This review is representative of the diagnostic approach of the QSALG.

Diagnostic algorithm

Figure 3 shows an algorithm that clinicians can use when evaluating adults presenting with a suspected leukoencephalopathy. As described above, initial assessment should focus on the exclusion of common acquired causes and severe small vessel disease (round 1). If these initial tests are negative and the patient is suspected to have a genetic disorder, then the first line of testing should include white cell enzyme activities, a VLCFA profile (in men), plasma cholesterol and bile alcohols and plasma amino acids, to exclude the classical leukodystrophies which can present in adulthood (round 2). This step is important, as

Figure 3 A schematic diagram to illustrate currently available sequencing technologies. Single-gene (Sanger) sequencing is widely available and is performed by amplifying coding regions of the gene of interest by PCR, before sequencing these regions. Introns and promoter regions are not routinely sequenced. Next-generation sequencing-based panel or exome sequencing is becoming more widely available clinically. In this technique, DNA is fragmented, and the exons of multiple genes of interest are selected out for sequencing. Although many genes are sequenced, again only the coding regions are selected. In whole genome sequencing, which is not routinely available to clinicians yet, the DNA is also fragmented, but all the resulting DNA is sequenced, without a selection step. This results in a large amount of data, as the coding regions, intergenic regions, introns and promoters of all human genes are sequenced. Advanced bioinformatics and computing technology are a required part of whole genome sequencing.

Figure 4 A recommended algorithm for the evaluation of adults with suspected inherited white matter disorders. CSF, cerebrospinal fluid; mtDNA, mitochondrial DNA; PML, progressive multifocal leukoencephalopathy; VLCFA, very long chain fatty acids; WCE, White cell enzymes.

enzyme replacement therapy and stem cell transplant are being explored as treatment options for some of these conditions.

If metabolic testing is not revealing, then the clinician should move on to genetic testing in the context of round 3 clinical or imaging patterns. A schematic illustrating the differences between sequencing approaches can be found in figure 4. Next-generation sequencing via *diagnostic panels* is becoming more widely available through regional genetic testing services, and these can be the most rapid and cost-effective route to diagnosis. It is worth determining which genes are covered by the panel requested, as each panel will differ depending on its design. If there is no access to a diagnostic panel, then consideration should be given to *single-gene* testing guided by the clinical and radiological phenotypes described above, and found in tables 1 and 2. It should be noted that single-gene testing is a low-yield route to diagnosis, and if a number of genes are sequenced the cost will quickly exceed that of a diagnostic panel. There are a small number of genes where a panel will not be sufficient for diagnosis, usually where copy number variants are a significant concern, and these would include *LMNB1* and *PLP1*. In these cases, clinical suspicion should guide directed testing.

If a panel-based approach is not successful but a genetic leukoencephalopathy is still considered likely, then consideration

should be given to whether the disorder might be due to a mutation in the *mitochondrial genome* (not targeted by traditional panels). It may be necessary to contact a research group who can offer more extensive genetic testing including *whole exome* or *even whole genome sequencing*. In these cases, it is helpful to have obtained DNA from as many affected and unaffected family members as possible.

In our experience of difficult-to-diagnose patients who have already been extensively investigated, a focused exome panel led to a diagnosis in almost 30% of patients.³

DISCUSSION

Leukoencephalopathies are a heterogeneous group of disorders with a wide range of genetic and acquired causes. They are frequently difficult to diagnose, and patients with these disorders typically undergo a large number of expensive, time-consuming and often invasive tests over a long timeframe. This presents a significant burden to patients who usually are deteriorating from a severe and progressive neurological syndrome. The aim of the treating neurologist should be to make a definitive diagnosis, as this allows for better prognostication, more definitive family counselling and prevents further worry about the diagnosis. We

hope that we have given a current useful, straightforward logical algorithm that others will find useful. It is clear that careful clinical and radiological assessment, in combination with early use of focused genetic testing, is needed to maximise the probability of making these diagnoses. However, even with this approach, more than half of patients currently do not receive a definitive diagnosis.⁷⁹ This may be because the disorders are so heterogeneous or because there are still more genes to be described. Advances in genetic technology like whole genome sequencing may solve some cases, but only in combination with a thorough phenotypic approach.

Ultimately, these diagnoses are important because the development of novel therapies for these disorders depends primarily on forming cohorts of patients for clinical trials. HSCT from donors is a potential treatment for ALD, MLD and a number of other disorders. Recently, gene correction has also shown promise. In principle, gene correction (eg, through lentiviral transduction of the patient's own cells) should be possible in most loss of function genetic disorders, but to show efficacy in rare diseases sufficient numbers of patients must be identified.⁸⁰

As in 2014, the authors are happy to be contacted to discuss or see adult-onset patients with possible leukodystrophies or genetic leukoencephalopathies.

Author affiliations

- ¹Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, London, UK
- ²Department of Neurology, Royal Free Hospital, London, UK
- ³Neurogenetics Unit, Neurology Department, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
- ⁴Department of Neuroinflammation, UCL Institute of Neurology, London, UK
- ⁵Department of Neurology, St Vincent's University Hospital University College Dublin, Dublin, Ireland
- ⁶Department of Neurology, Beaumont Hospital and Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Ireland
- ⁷Memory and Cognition Clinic, Department of Clinical Neuroscience, Royal Prince Alfred Hospital and the Brain and Mind Centre, University of Sydney, Camperdown, New South Wales, Australia
- ⁸Dementia Research Centre, UCL Institute of Neurology, London, UK
- ⁹Lysosomal Department of Neuroradiology, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, UK
- ¹⁰Brain Repair & Rehabilitation, UCL Institute of Neurology, London, UK
- ¹¹Charles Dent Metabolic Unit, National Hospital for Neurology and Neurosurgery Queen Square, London, UK

Contributors DSL, CW, ARSOP, NJ critically reviewed the literature and drafted the manuscript. JAM, AM, RMA, CJA, JDN, JMS, NCF, HH, MEA, ID, EM, JC critically reviewed and edited the manuscript. DSL, JC devised and oversaw the study.

Funding We would like to gratefully acknowledge our funders, which include the Leonard Wolfson Experimental Neurology Centre, the UK NIHR UCL/UCLH Biomedical Research Centre, the Wellcome Trust and the Medical Research Council.

Competing interests None declared.

Patient consent Not required.

Ethics approval Ethical approval was not required for this study, which did not involve human participants or their data.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data sharing statement There are no additional unpublished data.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution 4.0 Unported (CC BY 4.0) license, which permits others to copy, redistribute, remix, transform and build upon this work for any purpose, provided the original work is properly cited, a link to the license is given, and indication of whether changes were made. See: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

REFERENCES

- 1 Ahmed RM, Murphy E, Davagnanam L, et al. A practical approach to diagnosing adult-onset leukodystrophies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85:770–81.
- 2 Heis WD, Rosenberg GA, Tiel A, et al. Neuroimaging in vascular cognitive impairment: a state-of-the-art review. *BMC Med* 2016;14:174.

- 3 Lynch DS, Rodrigues Brandão de Sá A, Zhang WJ, et al. Clinical and genetic characterization of leukoencephalopathies in adults. *Brain* 2017;140:1204–11.
- 4 Engelen M, Kemp S, de Visser M, et al. X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:51.
- 5 Loes DJ, Fatemi A, Mehem ER, et al. Analysis of MRI patterns aids prediction of progression in X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology* 2003;61:369–74.
- 6 Eichler F, Duncan C, Mudrolo PL, et al. Hematopoietic stem-cell gene therapy for cerebral adrenoleukodystrophy. *N Engl J Med* 2017;377:1630–8.
- 7 Wenger DA. *Krabbe disease*. GeneReviews®(8), 1993.
- 8 Kolodny EH, Raghuwani S, Knut W. Late-onset Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy): clinical and biochemical features of 15 cases. *Dev Neurosci* 1991;13:221–9.
- 9 Ibeis H, Froissant R, Aubourg P, et al. Krabbe disease in adults: phenotypic and genotypic update from a series of 11 cases and a review. *J Inher Metab Dis* 2013;36:859–68.
- 10 Livingston JH, Gradano C, Pyden K, et al. Intracranial calcification in early infantile Krabbe disease: nothing new under the sun. *Dev Med Child Neurol* 2012;54:376–9.
- 11 Sadei E, Tourbah A, Fontaine B, et al. Leukoencephalopathies associated with inborn errors of metabolism in adults. *J Inher Metab Dis* 2008;31:295–307.
- 12 Cesari M, Liorio L, Grossi S, et al. Mutation update of ARSA and PSAP genes causing metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat* 2016;37:16–27.
- 13 Rauschka H, Colich B, Baumann N, et al. Late-onset metachromatic leukodystrophy: genotype strongly influences phenotype. *Neurology* 2006;67:850–63.
- 14 Cheon JE, Kim JO, Haang YS, et al. Leukodystrophy in children: a pictorial review of MRI imaging features. *Radiographics* 2002;22:467–76.
- 15 Barth ML, Ward C, Harris A, et al. Frequency of arylsulphatase A pseudodeficiency associated mutations in a healthy population. *J Med Genet* 1994;31:667–71.
- 16 de Haanse LD, van de Warrenburg BP, Preijns FW, et al. Adult metachromatic leukodystrophy treated by allo-SCT and a review of the literature. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:1071–6.
- 17 Ruzenberg JB, Kaminsky SM, Aubourg P, et al. Gene therapy for metachromatic leukodystrophy. *J Neurosci Res* 2016;94:1169–79.
- 18 Nie S, Chen G, Cao X, et al. Cerebrotendinous xanthomatosis: a comprehensive review of pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and management. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:179.
- 19 Pilo-de-la-Fuente B, Jimenez-Escrig A, Lorenzo JR, et al. Cerebrotendinous xanthomatosis in Spain: clinical, prognostic, and genetic survey. *Eur J Neurol* 2011;18:1203–11.
- 20 Froese DS, Huemer M, Suomalainen T, et al. Mutation update and review of severe methylcrotonylglutamate decarboxylase deficiency. *Hum Mutat* 2016;37:427–38.
- 21 Rademakers R, Baker M, Nicholson AM, et al. Mutations in the Colony Stimulating Factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nat Genet* 2011;44:700–5.
- 22 Lynch DS. Hereditary leukoencephalopathy with axonal spheroids: a spectrum of phenotypes from CNS vasculitis to parkinsonism in an adult-onset leukodystrophy series. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015.
- 23 Axelsson R, Rönkä M, Sourander R, et al. Hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1984;314:1–65.
- 24 Sundal C, Fajoka S, Van Geven JA, et al. Parkinsonian features in Hereditary Diffuse Leukoencephalopathy with Spheroids (HDL) and CSF1R mutations. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19:869–77.
- 25 Konno T, Yoshida K, Mizuno T, et al. Clinical and genetic characterization of adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia associated with CSF1R mutation. *Eur J Neurol* 2017;24:37–45.
- 26 Lakshmanan R, Adams ME, Lynch DS, et al. Redefining the phenotype of ALSP and AARS2 mutation-related leukodystrophy. *Neural Genet* 2017;3:e135.
- 27 Guenier R, Kara E, Le Ber L, et al. Genetic analysis of inherited leukodystrophies: genotype-phenotype correlations in the CSF1R gene. *JAMA Neurol* 2013;70:875–82.
- 28 Lynch DS, Zhang WJ, Lakshmanan R, et al. Analysis of mutations in AARS2 in a series of CSF1R-negative patients with adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia. *JAMA Neurol* 2016;73:1433–500.
- 29 Dallabona C, Di Girolamo D, Favelet SH, et al. Novel (juvenile) leukodystrophy related to AARS2 mutations. *Neurology* 2014;82:2063–71.
- 30 Sprinjak L, Zsindely N, Engelhardt JJ, et al. Novel AARS2 gene mutation producing leukodystrophy: a case report. *J Hum Genet* 2017;62:329–33.
- 31 Yao P, Fox PL. Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease. *EMBO Mol Med* 2013;5:332–43.
- 32 Boczonadi V, Jennings ML, Horvath R. The role of tRNA synthetases in neurological and neuromuscular disorders. *FEBS Lett* 2018;592:703–17.
- 33 Vermeulen G, Seck R, Mercimek-Mahmutoglu S, et al. Fright is a provoking factor in vanishing white matter disease. *Ann Neurol* 2005;57:560–3.
- 34 Labauge P, Horzetski L, Aygnier X, et al. Natural history of adult-onset eIF2B-related disorders: a multi-centric survey of 16 cases. *Brain* 2009;132(Pt 8):2161–9.
- 35 van der Knaap MS, Leegwater PA, Kört AA, et al. Mutations in each of the five subunits of translation initiation factor eIF2B can cause leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Ann Neurol* 2002;51:164–70.
- 36 Chabriat H, Joule A, Dichgans M, et al. Cadeis. *Lancet Neurol* 2009;8:643–53.

Neurogenetics

37. Di Donato J, Bianchi S, De Stefano N, et al. Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) as a model of small vessel disease: update on clinical, diagnostic, and management aspects. *BMC Med* 2017;15:41.
38. Rutten JW, Dauwerse HG, Grootenboer G, et al. Archaic *NOTCH3* mutations frequent in public exome: implications for CADASIL. *Ann Clin Transl Neurol* 2016;3:844–53.
39. Bianchi S, Di Palma C, Galles GN, et al. Two novel HTRA1 mutations in a European CADASIL patient. *Neurology* 2014;82:898–900.
40. Fukutake T, Hirayama K. Familial young-adult-onset arteriosclerotic leukoencephalopathy with alopecia and limbago without arterial hypertension. *Eur Neurol* 1995;35:69–79.
41. Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O. Features of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Stroke* 2014;45:3447–53.
42. Nozaki H, Kato T, Nishimatsu M, et al. Distinct molecular mechanisms of HTRA1 mutants in manifesting heterozygotes with CADASIL. *Neurology* 2016;86:1964–74.
43. Verdura E, Hervé D, Schaner E, et al. Heterozygous HTRA1 mutations are associated with autosomal dominant cerebral small vessel disease. *Brain* 2015;138(Pt 8):2347–58.
44. Bugiani M, Kovelam SH, Bales HS, et al. Cathepsin A-related arteriopathy with strokes and leukoencephalopathy (CARASIL). *Neurology* 2016;87:1777–85.
45. Hwang YI, Lakshtman R, Dasgupta R, et al. Brainstem phenotype of cathepsin A-related arteriopathy with strokes and leukoencephalopathy. *Neurol Genet* 2017;3:e165.
46. Vahedi K, Massie P, Guichard JP, et al. Hereditary infantile hemiparesis, retinal arteriolar tortuosity, and leukoencephalopathy. *Neurology* 2003;60:57–63.
47. Meuwissen ME, Halley DJ, Smith LS, et al. The expanding phenotype of COL4A1 and COL4A2 mutations: clinical data on 13 newly identified families and a review of the literature. *Genet Med* 2015;17:642–53.
48. Richards A, van den Maagdenberg AM, Jen JC, et al. C-terminal truncations in human 2'-5' DNA exonuclease TREX1 cause autosomal dominant retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy. *Nat Genet* 2007;39:1068–70.
49. Ophoff RA, DeYoung J, Service SK, et al. Hereditary vascular retinopathy, cerebretinal vasculopathy, and hereditary endotheliopathy with retinopathy, nephropathy, and stroke map to a single locus on chromosome 3p21.1-p21.3. *Am J Hum Genet* 2001;69:447–53.
50. Jen J, Cohen AH, Yue Q, et al. Hereditary endotheliopathy with retinopathy, nephropathy, and stroke (HERNS). *Neurology* 1997;49:1322–30.
51. Stam AH, Kothari PH, Shaikh A, et al. Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations. *Brain* 2016;139:2909–22.
52. Wang JJ. Mitochondrial syndromes with leukoencephalopathies. *Semin Neurol* 2012;32:655–61.
53. Kilar W, Wei A, Ouaghebe G, et al. White matter changes in Leber's hereditary optic neuropathy: MRI findings. *Eur J Neurol* 2007;14:591–3.
54. Calvo SE, Clauser KR, Mochly V, Mochly V. An updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res* 2016;44(D1):D1251–57.
55. Nishino I, Spinazzola A, Hironaka M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999;283:689–92.
56. Tang S, Dimberg EL, Milone M, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)-like phenotype: an expanded clinical spectrum of POLG1 mutations. *J Neurol* 2012;259:862–8.
57. Tzoulis C, Neukelmann G, Mork S, et al. Localized cerebral energy failure in DNA polymerase gamma-associated encephalopathy syndrome. *Brain* 2010;133(Pt 5):1425–37.
58. Scheper GC, van der Klok T, van Aude RD, et al. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet* 2007;39:534–9.
59. van Berge L, Hamblin EM, Linnankivi T, et al. Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation: clinical and genetic characterization and target for therapy. *Brain* 2014;137(Pt 4):1019–29.
60. Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, et al. Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* 2001;27:117–20.
61. Prust M, Wang J, Morizono H, et al. GFAP mutations, age at onset, and clinical subtypes in Alexander disease. *Neurology* 2011;77:1287–94.
62. Farina L, Pareyson D, Minati L, et al. Can MRI imaging diagnose adult-onset Alexander disease? *Ann Am J Neurol* 2008;29:1190–6.
63. Padial OS, Saigoh K, Schiffmann R, et al. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nat Genet* 2005;38:1114–23.
64. Schrater L, Sundblom J, Thoresen AC, et al. Genomic duplications mediate overexpression of lamin B1 in adult-onset autosomal dominant leukodystrophy (ADLD) with autonomic symptoms. *Neurogenetics* 2011;12:65–72.
65. Schiffmann R, van der Knaap MS. Invited article: an MRI-based approach to the diagnosis of white matter disorders. *Neurology* 2009;72:750–9.
66. Hodes ME, Platt VM, Drouot SR. Genetics of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Dev Neurosci* 1993;15:383–94.
67. Calloux F, Gauthier-Barbier F, Mimaud C, et al. Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. Clinical European network on brain dysmyelinating diseases. *Eur J Hum Genet* 2000;8:837–45.
68. Huot S, Garbani J, Trepanier A, et al. Quantifying the carrier female phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Genet Med* 2006;8:271–8.
69. Uhlberg B, Schuelke M, Rischendorf T, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Am J Hum Genet* 2004;75:251–60.
70. Orthmann-Murphy JL, Salzano E, Abrams CK, et al. Hereditary spastic paraplegia is a novel phenotype for GJA12/GJC2 mutations. *Brain* 2009;132(Pt 2):426–38.
71. Depienne C, Bugiani M, Dupuis C, et al. Brain white matter oedema due to CLIC-2 chloride channel deficiency: an observational analytical study. *Lancet Neurol* 2013;12:659–68.
72. Pietros A, Penson TM, Guo Y, et al. TUBB4A de novo mutations cause isolated hypomyelination. *Neurology* 2014;83:898–903.
73. Wolf NI, Vandenberg A, van Spaendonck RM, et al. Clinical spectrum of 4H leukodystrophy caused by POLR3A and POLR3B mutations. *Neurology* 2014;83:1898–905.
74. Chelban V, Patel N, Vladavrova J, et al. Mutations in NCKX-2 cause progressive spastic ataxia and hypomyelination. *Am J Hum Genet* 2017;100:969–77.
75. Saiters P, Van Damme T, Steyaert W, et al. RNF216 mutations as a novel cause of autosomal recessive Huntington-like disorder. *Neurology* 2015;84:1760–6.
76. Paloneva J, Manninen T, Christman G, et al. Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am J Hum Genet* 2002;71:656–62.
77. Guenier R, Wojtas A, Bras J, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2013;368:117–27.
78. Jenkinson EM, Rudner MP, Kacher PR, et al. Mutations in SNORD118 cause the cerebral microangiopathy leukoencephalopathy with calcifications and cysts. *Nat Genet* 2016;48:1185–92.
79. Richards J, Kozlowski EK, Tah R, et al. Targeted leukodystrophy diagnosis based on changes and yields for testing. *Am J Med Genet A* 2015;167A:2541–3.
80. Simonato M, Bennett J, Bouls NM, et al. Progress in gene therapy for neurological disorders. *Nat Rev Neurol* 2013;9:177–91.

10.12 Apêndice L - Adult Leukodystrophies: A Step-by-Step Diagnostic Approach. *Radiographics* 2019;39(1):153–168.

Reprinted by permission from copyright holder Radiological Society of North America.

Resende LL, **Paiva ARB**, Kok F, da Costa Leite C, Lucato LT. Adult Leukodystrophies: A Step-by-Step Diagnostic Approach. *Radiographics* 2019;39(1):153–168.

<https://doi.org/10.1148/rg.2019180081>

Adult Leukodystrophies: A Step-by-Step Diagnostic Approach

Lucas Lopes Resende, MD
Anderson Rodrigues Brandão de Paiva, MD
Fernando Kok, MD, PhD
Cláudia da Costa Leite, MD, PhD
Leandro Távares Lucato, MD, PhD

Abbreviations: CADASIL = cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy; CTX = cerebrotendinous xanthomatosis; FLAIR = fluid-attenuated inversion recovery; X-ALD = X-linked adrenoleukodystrophy

RadioGraphics 2019; 39:153–168

<https://doi.org/10.1148/rq.2019180081>

Content Codes: **MR** **NR**

From the Neuroendocrinology Section, Instituto de Radiologia (InRad), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), R. Dr. Ovidio Pires de Campos 75, São Paulo, SP 05403-010, Brazil (L.L.R., C.d.C.L., L.T.L.); and Neurogenetics Unit, Department of Neurology, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil (A.R.B.d.P., F.K.). Recipient of a Certificate of Merit award for an education exhibit at the 2017 RSNA Annual Meeting. Received March 12, 2018; revision requested May 8 and received July 3; accepted July 23. For this journal-based SA-CME activity, the authors C.d.C.L. and L.T.L. have provided disclosures; all other authors, the editor, and the reviewers have disclosed no relevant relationships. **Address correspondence to** L.L.R. (e-mail: lucasresende@gmail.com).

©RSNA, 2019

SA-CME LEARNING OBJECTIVES

After completing this journal-based SA-CME activity, participants will be able to:

- Discuss a framework that could help radiologists and clinicians narrow the usually broad differential diagnosis for adult patients suspected of having leukodystrophy.
- Identify the imaging features of some of the most prevalent adult leukodystrophies.
- Describe the key image points that might lead to a confirmed diagnosis in patients suspected of having adult leukodystrophies.

See rma.org/learning-center/rq.

Leukodystrophies usually affect children, but in the last several decades, many instances of adult leukodystrophies have been reported in the medical literature. Because the clinical manifestation of these diseases can be nonspecific, MRI can help with establishing a diagnosis. A step-by-step approach to assist in the diagnosis of adult leukodystrophies is proposed in this article. The first step is to identify symmetric white matter involvement, which is more commonly observed in these patients. The next step is to fit the symmetric white matter involvement into one of the proposed patterns. However, a patient may present with more than one pattern of white matter involvement. Thus, the third step is to evaluate for five distinct characteristics—including enhancement, lesions with signal intensity similar to that of cerebrospinal fluid, susceptibility-weighted MRI signal intensity abnormalities, abnormal peaks at MR spectroscopy, and spinal cord involvement—to further narrow the differential diagnosis.

©RSNA, 2019 • radiographics.rsna.org

Introduction

Leukodystrophies currently are defined as genetically determined disorders that primarily affect the white matter of the central nervous system, regardless of the structural white matter component, molecular process, patient age group, and disease course involved. Genetic testing is of paramount importance (1).

Although these disorders primarily manifest in early infancy and childhood, they may also affect adults, who occasionally present with clinical and imaging findings that are distinct from those observed in children (2,3). There is growing recognition that leukodystrophies may manifest initially during adulthood (4).

Adult leukodystrophies usually are progressive diseases. Patients may present with movement disturbance, vision problems, hearing impairment, imbalance, memory loss, behavioral changes, and attention deficits (5–8).

Because the clinical manifestation of leukodystrophy can be nonspecific, MRI has been used as a powerful paraclinical tool; it sometimes can be the key to narrowing the diagnosis, even at the early stages of the disease in presymptomatic patients and carriers (5,7). Symmetric involvement in the white matter at MRI is an essential finding in patients with adult leukodystrophies, because it commonly is associated with inherited disorders. However, the imaging pattern of adult leukodystrophy can vary according to the disease and its time course (9,10).

In addition to symmetry, many other MRI features can help in reaching a final diagnosis in patients who are presumed to have adult leukodystrophy or at least in narrowing the list of diagnoses for which to evaluate as part of the differential diagnosis. An algorithm that allows evaluation of all of these characteristics has been developed to help differentiate among white matter diseases overall (11).

TEACHING POINTS

- Symmetric involvement in the white matter at MRI is an essential finding in patients with adult leukodystrophies, because it commonly is associated with inherited disorders.
- T2-weighted and fluid-attenuated inversion-recovery (FLAIR) MRI are the best sequences to use to determine white matter involvement.
- Sometimes the same patient presents with more than one pattern during the time course of the disease, and a given leukodystrophy may manifest with more than one of these patterns. In this situation, searching for distinctive findings (step 3) will help to restrict the conditions to consider in the differential diagnosis and target the specific confirmatory tests.
- The periventricular pattern is probably the most prevalent of all patterns, and myriad distinct diseases, including diseases other than leukodystrophies, can manifest with periventricular involvement.
- MR spectroscopy might be used as a potential noninvasive biomarker of treatment response in treatable diseases such as CTX.

The purpose of this review is to adapt this algorithm for adult leukodystrophies and to demonstrate the imaging features of some of the most prevalent forms of this disease. The approach we propose here must be used mainly as a framework. The characterization of all possible types of leukodystrophies and eventual atypical presentations is beyond the scope of this review.

Step 1: Identify Symmetric White Matter Involvement

Symmetric white matter involvement at MRI is a typical finding in patients with leukodystrophies. Thus, recognizing this involvement is important when leukodystrophies are suspected, although there are exceptions to this pattern (12). T2-weighted and fluid-attenuated inversion-recovery (FLAIR) MRI are the best sequences to use to determine white matter involvement, as shown in Figure 1, which illustrates symmetric white matter involvement compared with an asymmetric pattern. White matter lesions appear as hyperintensity on T2-weighted and FLAIR MR images and hypo- or isointensity on T1-weighted images. Depending on the cause and stage of the disease, signal intensity may vary. Familiarity with typical manifestations is important (13).

Important exceptions to this rule are genetically defined vasculopathies, such as CADASIL, in which abnormalities in signal intensity (ie, increased signal intensity on T2-weighted or FLAIR MR images) can be multifocal and asymmetric instead of symmetric, especially in the early phases of the disease. However, these diseases usually manifest with other distinctive MRI findings that can help in reaching the correct diagnosis.

In addition to recognizing symmetric white matter involvement, characterizing the white matter involvement pattern is necessary to continue with the differential diagnosis.

Step 2: Look for a White Matter Involvement Pattern

The next step in the diagnostic approach is to look for the pattern of white matter involvement. There are six patterns of white matter involvement with which radiologists should be aware to reduce the list of possible diagnoses, as shown in Figure 2. However, sometimes the same patient presents with more than one pattern during the time course of the disease, and a given leukodystrophy may manifest with more than one of these patterns. In this situation, searching for distinctive findings (step 3) helps to restrict the conditions to consider in the differential diagnosis and target the specific confirmatory tests.

Parieto-occipital Pattern

X-linked Adrenoleukodystrophy.—X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD), one of the most common adult leukodystrophies, is caused by a mutation in the adenosine triphosphate-binding cassette subfamily D member 1 gene (*ABCD1*), which codes for an adenosine triphosphate-binding cassette transporter and is located in the peroxisomal membrane. The biochemical hallmark of this condition is an elevation in serum levels of very long-chain fatty acids, which also accumulate in neural tissues and in the adrenal gland. Molecular confirmation of X-ALD is performed by sequencing the *ABCD1* gene (10,13,14).

In adults, there are different forms of X-ALD. The most common is "pure" adrenomyeloneuropathy, which manifests with slowly progressive spastic paraparesis, sensory disturbances, and bladder dysfunction. These patients usually experience spinal cord atrophy, mainly in its thoracic segment, but the brain shows no abnormalities. The cerebral manifestation of X-ALD is less frequent in adults and is characterized by psychiatric features followed by dementia, ataxia, seizures, and even death. In these patients, MR images of the brain are similar to those observed in children with ALD, and the spinal cord shows no abnormalities. Other patients present with intermediate forms of the disease that include involvement of the spinal cord and brain (3,15–17).

Approximately 80% of men with the cerebral form of X-ALD have abnormalities at MRI (ie, high signal intensity on T2-weighted or FLAIR MR images) in the parieto-occipital white matter, splenium of the corpus callosum, visual and audi-

Figure 1. Symmetric versus asymmetric white matter involvement in two patients. **(a)** Axial T2-weighted MR image in a 23-year-old woman with leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement shows symmetric white matter involvement. **(b)** Axial FLAIR MR image shows an asymmetric pattern in a 46-year-old woman with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL).

Figure 2. White matter involvement patterns and examples of differential diagnosis. FXTAS = fragile X-associated tremor or ataxia syndrome.

tory pathways, and occasionally the corticospinal tract (Fig 3). However, these features may not manifest concomitantly in a given patient.

Isolated corticospinal tract or cerebellar white matter involvement at MRI of the brain is seen in a small number of patients and represents more slowly progressive involvement (13,18,19). Contrast material enhancement on T1-weighted MR images at the edges of affected white matter is predictive of clinical activity and disease progression (20).

Krabbe Disease (Globoid Cell Leukodystrophy).—Krabbe disease is an autosomal recessive lysosomal storage disease caused by deficiency of the β -galactocerebrosidase enzyme, which leads to oligodendrocyte apoptosis and gliosis (21).

Adult Krabbe disease can manifest as late as the 5th decade of life. Clinically late-onset forms manifest with pyramidal tract involvement and spastic paraparesis or tetraparesis. A peripheral demyelinating polyneuropathy occurs in up to 60% of patients and may be asymmetric and involve bulbar muscles. Progressive cognitive decline, seizures, and cortical blindness also can ensue. The disease progression is slow (22–27).

MRI may show bilateral white matter involvement or may be normal even when the patient has neurologic symptoms. Predominant parieto-occipital white matter changes and involvement of the splenium of the corpus callosum typically are observed (Fig 4). T2-hyperintense changes are observed along the corticospinal tracts, the

Figure 3. X-ALD in three patients. (a) Axial T2-weighted MR image in a 36-year-old man shows parieto-occipital symmetric white matter hyperintensity. (b) Contrast-enhanced axial T1-weighted MR image in the same patient shows enhancement foci in the white matter (arrow). (c) Axial T2-weighted MR image in the same patient as in a and b shows corticospinal tract involvement (arrows). (d) Sagittal FLAIR MR image in a 30-year-old man with X-ALD shows corpus callosum involvement (arrows). (e) Sagittal T2-weighted MR image in a 29-year-old man with adrenomyeloneuropathy shows only thoracic cord atrophy. The brain MR image (not shown) was normal.

posterior limb of the internal capsule, and the pyramidal tracts in the brainstem (15,25,28).

Frontal Pattern

X-ALD.—Patients with X-ALD also may present with a frontal pattern of white matter involvement (Fig 5). The features of this disease were described in the parieto-occipital pattern section. Frontal white matter is involved in approximately 15% of children with X-ALD but also can be seen in adult patients (Fig 5).

When there is concomitant involvement of parieto-occipital and frontal white matter, patients usually experience rapidly progressive disease (13,18,19).

Metachromatic Leukodystrophy.—Metachromatic leukodystrophy is an autosomal recessive lysosomal condition due to arylsulfatase A (*ARSA*) gene mutations, resulting in deficiency of the enzyme arylsulfatase A (ASA) that leads to accumulation of 3-*O*-sulfogalactosylceramide (sulfatide) in oligodendrocytes, Schwann cells, and some neurons (29,30).

Adults account for approximately 20% of patients with metachromatic leukodystrophy. The initial symptoms are often behavioral and psychiatric changes, followed by a slow decline in memory and intellectual abilities. Later, the onset of motor symptoms including spastic paraparesis and cerebellar ataxia and peripheral neuropathy occur. Cholecystitis due to accumulation of sulfatide in the gallbladder wall is an important nonneurologic complication (31).

MRI findings consist of confluent, symmetric T2 hyperintensity in the frontal or periventricular white matter (Fig 6). The subcortical U fibers are spared, and frequently some frontal predominance is present in patients with adult-onset metachromatic leukodystrophy. Loss of white matter volume results in brain atrophy in the late stages of the disease (32,33).

Leukoencephalopathy with Axonal Spheroids and Pigmented Glia

—Leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia also can show a frontal pattern; however, it will be discussed in step 3, because these additional

Figure 4. Krabbe disease in a 48-year-old man. (a) Axial FLAIR image shows bilateral parieto-occipital white matter involvement, extending to the splenium of the corpus callosum. (b) Coronal T2-weighted MR image also shows a posterior white matter involvement pattern extending to the corticospinal tracts bilaterally (arrows).

Figure 5. X-ALD in a 54-year-old man. Coronal T2-weighted MR image (a) shows predominant involvement of frontal white matter, including peripheral enhancement (arrow) on the corresponding axial contrast-enhanced T1-weighted MR image (b).

features are a more substantial diagnostic clue for this disease.

Periventricular Pattern

The periventricular pattern is probably the most prevalent of all patterns, and myriad distinct diseases, including diseases other than leukodystrophies, can manifest with periventricular involvement.

Metachromatic Leukodystrophy.—MRI findings in patients with metachromatic leukodystrophy also can reveal a periventricular white matter pattern without lobar predominance (32,33).

Krabbe Disease.—Less commonly, Krabbe disease can manifest as diffuse periventricular white matter involvement (7).

Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement.—Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement may manifest with a periventricular involvement

pattern, as shown in Figure 2. However, because brainstem involvement is characteristic, it is discussed in the brainstem involvement section.

Sjögren-Larsson Syndrome.—Sjögren-Larsson syndrome is a rare autosomal recessive disorder characterized by spastic diplegia or tetraplegia, dementia, speech disturbance, and congenital ichthyosis. Sjögren-Larsson syndrome is caused by inactivating mutations in the aldehyde dehydrogenase 3 (family member A2) gene (*ALDH3A2*), which encodes for fatty aldehyde dehydrogenase (*FALDH*) and results in abnormal metabolism of long-chain aliphatic aldehydes and alcohols (34,35).

At MRI, patients show diffuse white matter hyperintensity on FLAIR and T2-weighted MR images, mainly in the periventricular white matter of the frontal lobes and at the level of the centrum semiovale and corpus callosum (Fig 7).

MR spectroscopy allows disclosure of some ancillary changes that eventually can be of some help. Spectroscopic abnormalities consist of

Figure 6. Melachromatic leukodystrophy in a 51-year-old man. (a) Axial T2-weighted MR image shows the predominance of frontal white matter involvement. (b, c) Coronal FLAIR images show the frontal white matter involvement associated with atrophy (b), but also show posterior periventricular bilateral lesions (c). (d) Sagittal reformatted contrast-enhanced three-dimensional T1-weighted MR image shows brain atrophy (mainly frontal), with corpus callosum involvement (arrow). There is no contrast enhancement.

lipid peaks in the white matter, which are related to the accumulation of lipid substrates that occurs in Sjögren-Larsson syndrome, especially a peak located at 1.3 ppm. N-acetyl aspartate peaks are usually relatively preserved, and elevated levels of creatine, choline, and myo-inositol can be seen (34,36).

Subcortical Pattern

L-2-hydroxyglutaric aciduria is a rare neuro-metabolic disorder with autosomal recessive inheritance (L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase [*L2HGDH*] gene) that is characterized by leukoencephalopathy that predominantly affects subcortical white matter (Fig 8) (14).

Patients initially may appear asymptomatic or may have a static encephalopathy. The neurologic symptoms are progressive and include cerebellar ataxia and intellectual decline. Hearing

loss is another possible symptom of the disease. In certain patients, these features become apparent only in adulthood. Increased L-2-hydroxyglutaric acid in urine is diagnostic (37).

MRI in patients with L-2-hydroxyglutaric aciduria shows predominant subcortical white matter involvement, initially focal and evolving to become confluent. Periventricular white matter is spared. Increased signal intensity on T2-weighted or FLAIR MR images may be observed in the globus pallidus, and less importantly, in the caudate nucleus and putamen, with symmetric distribution. These same signal intensity abnormalities also may be observed in the dentate nucleus (38).

Brainstem Involvement

Alexander Disease.—Alexander disease is the result of an autosomal dominant mutation in

Figure 7. Late-phase Sjögren-Larsson syndrome in a 27-year-old man. (a) Axial FLAIR MR image shows a periventricular white matter involvement pattern. (b) Proton spectroscopic image of the frontal white matter, obtained with a short echo time, shows abnormal peaks at 1.3 ppm (arrow), indicating lipid deposition. Cho = choline, Cr = creatine, ml = myo-inositol, NAA = N-acetyl aspartate.

Figure 8. L-2-hydroxyglutaric aciduria in a 29-year-old woman. (a) Axial FLAIR MR image shows a subcortical pattern of white matter involvement. (b) Coronal T2-weighted MR image shows the same pattern and bilateral hyperintensities in the dentate nuclei (arrow), which are commonly observed in patients with this disease.

the glial fibrillary acidic protein (*GFAP*) gene. These mutations usually are de novo but may be hereditary in patients with adult-onset disease. This condition is characterized pathologically by diffuse Rosenthal fiber accumulation in astrocyte cytoplasm. Molecular testing is diagnostic, and a brain biopsy is no longer required to confirm the diagnosis (37,39).

The clinical presentation includes slowly progressive bulbar dysfunction (dysphagia, dysarthria, and dysphonia), pyramidal signs, and ataxia, with normal cognitive and intellectual functions. When present, palatal myoclonus is suggestive of this diagnosis (8,40,41).

MRI findings in patients who develop Alexander disease in adulthood differ substantially from those of the early-onset form of the disease (Fig 9). White matter signal intensity abnormalities (increased signal intensity on T2-weighted and FLAIR MR images) and mild to severe atrophy of the medulla oblongata extending caudally to the upper cervical spinal cord are the hallmarks of

this condition. Middle cerebellar peduncle signal intensity abnormalities also may be observed, and patchy enhancement may be present in affected regions (39,42,43).

Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement.

Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement is a rare autosomal recessive disorder related to aspartyl-tRNA synthetase 2 (*DARS2*) mutations. Diagnostic criteria have been developed. This condition is a monogenic disease directly related to mutations in the gene encoding mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetase (44). Patients with adult-onset disease have been reported to have progressive pyramidal, dorsal column, and cerebellar dysfunction. Symptoms include motor deterioration, progressive spastic ataxia, cognitive decline, and sensory neuropathy (45–47).

At the brainstem level, typical MRI findings include trigeminal mesencephalic tract hyperintensity on T2-weighted and FLAIR MR images

Figure 9. Alexander disease in two patients. (a) Axial T2-weighted MR image in a 36-year-old woman shows atrophy of the medulla with some hyperintense areas. (b) Sagittal contrast-enhanced T1-weighted MR image in the same patient shows atrophy of the cervicomedullary junction (arrow), a common finding in patients with this condition. (c) Axial reformatted three-dimensional T2-weighted MR image in a 20-year-old man shows bilateral middle cerebellar peduncle involvement (arrows). (d) Axial contrast-enhanced T1-weighted MR image in the same patient shows enhancement foci (arrows) in the same region. (e) Axial FLAIR image in the same patient as in c and d shows hyperintense lesions in the mesencephalon (arrows).

Figure 10. Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement in a 19-year-old woman. (a) Axial FLAIR image shows symmetric white matter involvement. (b) Axial T2-weighted MR image shows selective brainstem (arrowheads) and cerebellar (bent arrows) hyperintensities, including the intraparenchymal tracts of the trigeminal nerves bilaterally (straight arrows). (c) Cervical spine sagittal T2-weighted MR image shows cervical spinal cord involvement, characterized by hyperintense areas. (d) Proton MR spectroscopic image with a short echo time shows an increased lactate peak (Lac).

Figure 11: CTX in a 46-year-old man. (a) Axial FLAIR MR image shows symmetric white matter involvement. (b) Axial T2-weighted MR image shows deep cerebellar hyperintensities. (c) Proton MR spectroscopic image of the cerebellar hemisphere with a short echo time shows increased lactate (Lac) and lipid (Lip) peaks and a decreased *N*-acetyl aspartate (NAA) peak.

and medial lemniscus and pyramidal tract lesions (Fig 10). Involvement of the inferior and superior cerebellar peduncles and deep cerebellar white matter are frequently observed. There is also selective involvement throughout the entire length of the pyramidal tracts, including the spinal cord (14,37). MR spectroscopy occasionally allows visualization of lactate peaks.

Adult-onset Autosomal Dominant Leukodystrophy.—Adult-onset autosomal dominant leukodystrophy also has brainstem involvement, but it will be discussed under the associated spinal cord involvement section in step 3.

Cerebellar Involvement (Including Middle Cerebellar Peduncles)

Cerebrotendinous Xanthomatosis.—Cerebrotendinous xanthomatosis (CTX) is a treatable autosomal recessive disorder and is characterized as a lipid storage disease caused by a mutation of the cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1 (*CYP27A1*) gene, which leads to a deficiency of the mitochondrial enzyme 27-hydroxylase. This enzyme catalyzes one of the first

steps in the metabolism of sterols. CTX results in the development of a tendinous xanthoma, early cataracts, diarrhea, and leukoencephalopathy. If left untreated, patients might develop progressive dementia and psychiatric symptoms (7,48–50).

The earliest and most relevant MRI features of CTX are involvement of the cerebellar white matter (Fig 11). High signal intensity in the deep periventricular white matter and low or high signal intensity in the dentate nucleus on T2-weighted MR images is characteristic. T2-hypointense areas may be observed and probably represent hemosiderin deposition (15,37).

MR spectroscopy in patients with CTX shows increases in lactate and lipid peaks and a decreased *N*-acetyl aspartate peak, mainly in the cerebellum. The presence of lipid peaks is reasonable because CTX is a lipid storage disease (51).

Alexander Disease.—In Alexander disease, the involvement of the deep cerebellar white matter occasionally can be appreciated, as can middle cerebellar peduncle signal intensity abnormalities (7).

Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement.—Leukoencephalopathy with

Figure 12. Fragile X-associated tremor and/or ataxia syndrome in a 70-year-old man. Axial FLAIR MR image shows symmetric bilateral hyperintensities in the middle cerebellar peduncles (arrows).

Figure 13. Distinctive features and related conditions to consider in the differential diagnosis.

brainstem and spinal cord involvement is another entity that sometimes manifests as cerebellar white matter involvement (46).

Adult-onset Autosomal Dominant Leukodystrophy.—Adult-onset autosomal dominant leukodystrophy also has cerebellar involvement but will be discussed in step 3.

L-2-Hydroxyglutaric Aciduria.—L-2-hydroxyglutaric aciduria can manifest with involvement of the dentate nuclei, as can be seen in Figure 8.

Fragile X-associated Tremor and/or Ataxia Syndrome.—Fragile X-associated tremor and/or ataxia syndrome is caused by fragile X intellectual disability 1 (*FMR1*) gene permutations and leads to cerebellar ataxia, tremor, and peripheral neuropathy.

At MRI, diffuse symmetric middle cerebellar peduncle T2 hyperintensities are a radiologic hallmark of this disease, but they are not always

present (Fig 12). Other radiologic findings include deep cerebellar white matter lesions and mild to moderate cerebellar atrophy (12,14,52).

Step 3: Recognize Distinctive Features

In this section, we will review distinctive imaging findings that can further restrict the differential diagnosis of leukodystrophies. There are five types of distinctive findings that clinicians should recognize. These findings are illustrated in Figure 13.

Lesions with Cerebrospinal Fluid Signal Intensity

The presence of lesions that show signal intensity similar to that of cerebrospinal fluid on images from all MRI sequences can be a distinctive finding, although these lesions can have different causes and pathophysiologic mechanisms. FLAIR MR images are of paramount importance for the correct identification of these lesions, which can represent, among other entities, cysts, cavitations, or lacunae.

Figure 14. Vanishing white matter disease in a 65-year-old woman. (a) Axial T2-weighted MR image shows diffuse white matter hyperintensity in the bilateral centrum semiovale. (b) Sagittal FLAIR MR image shows hypointense areas within the T2 signal intensity abnormality, which represent cystic rarefaction of white matter.

Vanishing White Matter Disease.—Vanishing white matter disease is related to eukaryotic translation initiation factor 2B subunit α 1–5 (*EIF2B1–5*) gene mutations. A mild variant of this disease has been described in adult patients. The symptoms in the adult-onset form are migraine, spasticity, psychiatric symptoms, cerebellar signs, seizures, and dementia. Pseudobulbar palsy and progressive spastic paraparesis also may be present (9,14,15).

T2-weighted MRI may show normal white matter signal intensity or diffuse increased white matter signal intensity and enlargement of the lateral ventricles (Fig 14). Over time, FLAIR MR images show progressive rarefaction and cystic degeneration until the white matter shows isointensity compared with that of the cerebrospinal fluid.

Cerebellar white matter is relatively spared. Signal intensity abnormalities in the midbrain and the pons may be observed (53,54). In the end stage, cerebral hemispheric white matter may have vanished entirely, leaving only the ventricular walls and the cortex, with almost no white matter in between, replaced by this cystic degeneration (15).

CADASIL.—CADASIL is the most common hereditary cerebral small-vessel disease. CADASIL is caused by a mutation in the *NOTCH3* gene and is the major cause of inherited vascular leukoencephalopathies (10,14).

Adult patients with CADASIL usually present with migraine with a mean patient age at onset of 30 years, while the age of onset for ischemic events usually is when patients are in their late 40s. As microvascular changes progress, patients may develop seizures, cognitive dysfunction, and psychiatric symptoms. MRI changes usually precede the onset of symptoms by 10–15 years (9,15).

At MRI, the first changes are round or oval lesions in the periventricular white matter and

centrum semiovale, and these lesions are usually multifocal. These abnormalities subsequently become diffuse and symmetric and involve the external capsule and temporal poles (Fig 15).

Patients can present with lacunae secondary to small-vessel infarcts, which appear as areas of signal intensity similar to that of cerebrospinal fluid on images from all sequences. Another lesion with the same MRI signal intensity behavior in this disease is believed to be a distended subcortical perivascular space, which usually is found in the temporal poles (55).

Small foci of restricted diffusion that suggest recent infarcts and microhemorrhages on susceptibility-weighted images have been described as well. Microhemorrhages can be a distinctive finding for vasculopathy, and a T2*- or susceptibility-weighted MRI sequence must be performed in every patient who presents with leukodystrophy (56,57).

Leukoencephalopathy with Axonal Spheroids and Pigmented Glia.

—Besides the presence of small cysts that have similar signal intensity to that of cerebrospinal fluid, calcifications also can be detected in patients with this disease; for this reason, this disease is discussed in the next section (susceptibility signal intensity abnormalities).

Leukoencephalopathy with Calcifications and Cysts.

—As suggested by the name, cysts that sometimes resemble cerebrospinal fluid signal intensity can be found with all sequences, as can calcifications (also discussed in the next section).

Susceptibility Signal Intensity Abnormalities (Calcification and/or Microhemorrhage)

Lesions that appear as susceptibility signal intensity abnormalities, which manifest as hypointensity

Figure 15. CADASIL in two patients. (a) Axial FLAIR MR image in a 40-year-old man shows cavitated sequelae representing a lacuna (arrow) and coalescent predominantly periventricular hyperintensities. (b) Axial T2-weighted MR image in a 47-year-old woman shows involvement of the temporal poles (arrows) and small subcortical cysts (arrowheads), possibly representing enlarged perivascular spaces, which can be seen in patients with this condition. There are also T2-hyperintense lesions in the brainstem. (c) Axial susceptibility-weighted image in the same patient as in b shows microhemorrhages that appear as hypointense foci in both thalami (arrows).

Figure 16. Late-phase leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia in a 43-year-old woman. (a) Axial FLAIR MR image shows symmetric white matter involvement with diffuse hyperintensity and cysts (arrow). (b) Axial diffusion-weighted MR image shows areas of restricted diffusion, which was confirmed on the apparent diffusion coefficient map (not shown). (c) Nonenhanced CT image shows bilateral deep and periventricular cerebral calcifications.

on images from T2*- or susceptibility-weighted MRI sequences, can be a distinctive finding that indicates calcifications or hemorrhage. Separating calcifications from hemorrhages is possible with the use of CT or the processed phase images of susceptibility-weighted MRI.

Leukoencephalopathy with Axonal Spheroids and Pigmented Glia.

Studies (58–61) have shown that these pathologically defined entities are the result of autosomal dominant mutations in the colony-stimulating factor 1 receptor (*CSF1R*) gene. Both familial and de novo mutations have been described. Unlike other leukodystrophies, this disease manifests exclusively in adults, with most cases occurring in patients in the 20–50-year age range. The clinical picture consists of behav-

ioral changes, dementia, motor impairment (Parkinsonism, paraparesis or tetraparesis, and ataxia), and epilepsy (62).

MRI features include a frontal pattern of involvement of the white matter, which often is associated with restricted diffusion, in the early phases of the disease (Fig 16). There is confluent involvement of the white matter in the late phases, when some foci of restricted diffusion may persist. Small cysts, thinning of the corpus callosum, and calcifications also may be seen. The calcifications are described as small, symmetric, and mainly located adjacent to the anterior horns of the lateral ventricle and in the parietal subcortical white matter, exhibiting preserved basal ganglia. Thin-section CT may be useful for their detection (63).

Figure 17. Leukoencephalopathy with calcifications and cysts in a 25-year-old man. (a) Axial FLAIR MR image shows relatively symmetric white matter involvement. (b) Axial contrast-enhanced T1-weighted MR image shows a right frontal cyst (arrowhead) and two enhancement foci (arrows). (c) Axial T2*-weighted MR image shows calcifications (arrowheads) in the right frontal lesion and left thalamus. (d) Coronal T2-weighted MR image better shows the right frontal cyst (arrow). (Case courtesy of Leonir Terezinha Feltrin, MD.)

Leukoencephalopathy with Calcifications and Cysts.—Leukoencephalopathy with calcifications and cysts is a genetic disorder related to a mutation in the small nucleolar RNA, C/D box 118 (*SNORD118*) gene, which was identified recently. This disease is considered a microangiopathy, and as can be observed of other vasculopathies, asymmetric involvement of white matter may be a characteristic on MR images (Fig 17) (64–66).

In addition to asymmetric diffuse bilateral leukoencephalopathy, calcifications and cystic changes with mass effect can be seen. The calcifications tend to be large and can be observed anywhere in the brain but mostly in the basal ganglia. Gadolinium contrast enhancement sometimes can be observed (64–66).

CADASIL.—Microhemorrhages are a good marker of a vasculopathy and can be a clue for the diagnosis of genetically inherited vasculopathies such as CADASIL (14).

Nasu-Hakola Disease.—Polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy, or Nasu-Hakola disease, is a rare autosomal recessive disorder caused by mutations in the triggering receptor expressed on myeloid

cells 2 (*TREM2*) and *TYRO* protein tyrosine kinase binding protein (*TYROBP*) genes. Bone pain and fractures usually arise between the 3rd and 5th decades of life, followed by development of presenile cognitive impairment and death by the 5th decade of life (10).

Bone imaging shows multiple cystic-like lesions leading to fractures in the wrists and ankles. In the brain, MRI shows nonspecific white matter involvement and cortical and corpus callosum atrophy, while calcifications in the basal ganglia can be seen at CT (Fig 18) (9,67,68).

Enhancement

Enhancement is a distinctive characteristic that can be found in a few adult leukodystrophies such as X-ALD (Fig 3), Alexander disease (Fig 9), and leukoencephalopathy with calcifications and cysts (Fig 17).

Abnormal Peaks at MR Spectroscopy

Abnormal peaks at MR spectroscopy can be found in patients with certain leukodystrophies. Although abnormal peaks are relatively nonspecific most of the time, they can be a relevant ancillary finding in some clinical scenarios.

Figure 7 shows a patient with Sjögren-Larsson syndrome who has increased lipid peaks in the white matter; the peak at 1.3 ppm is somewhat distinctive in patients with the disease.

Figure 11 shows a patient with a diagnosis of CTX who shows increases in lactate and lipid peaks and a decreased *N*-acetyl aspartate peak

Figure 18. Nasu-Hakola disease in a 34-year-old woman. (a) Axial FLAIR MR image shows diffuse atrophy and slight symmetric periventricular white matter hyperintensity. (b) Nonenhanced CT image shows basal ganglia calcifications (arrow). (c) Hand radiograph shows at least one carpal bone cyst (arrowhead).

Figure 19. Adult-onset autosomal dominant leukodystrophy in a 59-year-old man. (a, b) Axial FLAIR MR images show symmetric cerebral white matter lesions (a) and a selective pattern of brainstem and middle cerebellar peduncle involvement (b). (c) Cervical spine sagittal T2-weighted MR image shows spinal cord atrophy.

in the cerebellum. These are nonspecific findings, but because this disease is related to lipid accumulation in the central nervous system, MR spectroscopy might be used as a potential noninvasive biomarker of treatment response in treatable diseases such as CTX (51). Occasionally, MR spectroscopy can show the presence of lactate peaks in patients with leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement, as shown in Figure 10.

Associated Spinal Cord Involvement

Adult-onset Autosomal Dominant Leukodystrophy.—Adult-onset autosomal dominant leukodystrophy is related to lamin B1 (*LMNB1*)

gene duplication. The clinical presentation is characterized by autonomic dysfunction, pyramidal signs, and cerebellar ataxia in the 4th or 5th decade of life (69,70).

Signal intensity abnormalities (increased signal intensity on T2-weighted or FLAIR MR images) are most prominent in the frontoparietal white matter, cerebellar peduncles, corticospinal tracts, and corpus callosum (Fig 19). The changes in the uppermost corticospinal tracts underlying the motor cortex may represent the earliest imaging manifestation of the disease and can be seen in asymptomatic family members. Atrophy of the brainstem and spinal cord also may be observed. The MRI lesion pattern, in combination with the typical clinical symptoms and mode of

inheritance, is quite suggestive of the diagnosis of autosomal dominant leukodystrophy (69).

Alexander Disease.—In patients with Alexander disease, involvement of the upper cervical spinal cord occasionally can be appreciated, most often extending from the medulla (41).

Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement.—As indicated by its name, this disease can manifest with signal intensity abnormalities in the spinal cord, which helps in diagnosing this disease (46).

Conclusion

Diagnosing adult leukodystrophies remains complex and challenging. Clinicians and radiologists should recognize MRI white matter involvement patterns and distinctive characteristics; in addition, they should work together when facing such a suspicion.

In summary, although not neglecting the complexity of the subject, our approach can be helpful as a starting point to provide an algorithmic analysis of MRI examinations of patients suspected of having adult leukodystrophy in an attempt to reduce the list of differential diagnoses and target specific confirmatory tests.

Disclosures of Conflicts of Interest.—C.d.C.L.: Activities related to the present article: disclosed no relevant relationships. Activities not related to the present article: grants/grants pending from GE. Other activities: disclosed no relevant relationships. L.T.L.: Activities related to the present article: disclosed no relevant relationships. Activities not related to the present article: payment for a lecture from Bracco. Other activities: disclosed no relevant relationships.

References

- Kevelian SH, Steenweg ME, Srivastava S, et al. Update on leukodystrophies: a historical perspective and adapted definition. *Neuropediatrics* 2016;47(6):349–354.
- Costello DJ, Eichler AF, Eichler FS. Leukodystrophies: classification, diagnosis, and treatment. *Neurologist* 2009;15(6):319–328.
- Pastores GM. Leukoencephalopathies and leukodystrophies. *Continuum (Minneapolis Minn)* 2010;16(2 Dementia):102–119.
- Helman G, Venkateswaran S, Vanderver A. The spectrum of adult-onset heritable white-matter disorders. *Handb Clin Neurol* 2018;148:669–692.
- van der Knaap MS, Bugiani M. Leukodystrophies: a proposed classification system based on pathological changes and pathogenetic mechanisms. *Acta Neuropathol (Berl)* 2017;134(3):351–382.
- Parikh S, Bernard G, Leventer RJ, et al. A clinical approach to the diagnosis of patients with leukodystrophies and genetic leukoencephalopathies. *Mol Genet Metab* 2015;114(4):501–515.
- Köhler W, Curiel J, Vanderver A. Adult-onset leukodystrophies. *Nat Rev Neurol* 2018;14(2):94–105.
- Lynch DS, Rodriguez Brandão de Paiva A, Zhang WJ, et al. Clinical and genetic characterization of leukoencephalopathies in adults. *Brain* 2017;140(5):1204–1211.
- Leite CC, Lucato LT, Santos GT, Kik F, Brandão AR, Castillo M. Imaging of adult leukodystrophies. *Arq Neuropsiquiatr* 2014;72(8):625–632.
- Morgenlander JC. MRI pattern approach of adult-onset inherited leukoencephalopathies. *Neurol Clin Pract* 2016;6(2):96.
- Schiffmann R, van der Knaap MS. Invited article: an MRI-based approach to the diagnosis of white matter disorders. *Neurology* 2009;72(8):750–759.
- Aygniel X, Carra-Dalliere C, Menjoir de Champfleury N, et al. Adult-onset genetic leukoencephalopathies: a MRI pattern-based approach in a comprehensive study of 154 patients. *Brain* 2015;138(Pt 2):284–292.
- Rennad DL. Adult-onset leukoencephalopathies. *Continuum (Minneapolis Minn)* 2016;22(2 Dementia):559–578.
- Aygniel X, Boutiere C, Carra-Dalliere C, Labauge P. Posterior fossa involvement in the diagnosis of adult-onset inherited leukoencephalopathies. *J Neurol* 2016;263(12):2361–2368.
- Ahmed RM, Murphy E, Davagnanam I, et al. A practical approach to diagnosing adult onset leukodystrophies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85(7):770–781.
- Moser HW. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* 1997;120(Pt 8):1485–1508.
- Kumar AJ, Köhler W, Kruse B, et al. MR findings in adult-onset adrenoleukodystrophy. *AJNR Am J Neuroradiol* 1995;16(6):1227–1237.
- Loes DJ, Fatemi A, Melhem ER, et al. Analysis of MRI patterns aids prediction of progression in X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology* 2003;61(3):369–374.
- Loes DJ, Hite S, Moser H, et al. Adrenoleukodystrophy: a scoring method for brain MR observations. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994;15(9):1761–1766.
- Melhem ER, Loes DJ, Georgiades CS, Raymond GV, Moser HW. X-linked adrenoleukodystrophy: the role of contrast-enhanced MR imaging in predicting disease progression. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000;21(5):839–844.
- Abdelhalim AN, Alberico RA, Barczykowski AL, Duffner PK. Patterns of magnetic resonance imaging abnormalities in symptomatic patients with Krabbe disease correspond to phenotype. *Pediatr Neurol* 2014;50(2):127–134.
- Köhler W. Leukodystrophies with late disease onset: an update. *Curr Opin Neurol* 2010;23(3):234–241.
- Debs R, Froissart R, Aubourg P, et al. Krabbe disease in adults: phenotypic and genotypic update from a series of 11 cases and a review. *J Inher Metab Dis* 2013;36(5):859–868.
- Sedel F, Tourbah A, Fontaine B, et al. Leukoencephalopathies associated with inborn errors of metabolism in adults. *J Inher Metab Dis* 2008;31(3):295–307.
- Husain AM, Altuwaijri M, Aldosari M. Krabbe disease: neurophysiologic studies and MRI correlations. *Neurology* 2004;63(4):617–620.
- Wenger DA, Rafi MA, Luzzi P, Datto J, Costantino-Vecchini E. Krabbe disease: genetic aspects and progress toward therapy. *Mol Genet Metab* 2000;70(1):1–9.
- Wenger DA, Rafi MA, Luzzi P. Molecular genetics of Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy): diagnostic and clinical implications. *Hum Mutat* 1997;10(4):268–279.
- Farina L, Bazzi A, Finocchiaro G, et al. MR imaging and proton MR spectroscopy in adult Krabbe disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000;21(8):1478–1482.
- van Rappard DF, Boelens JJ, Wolf NI. Metachromatic leukodystrophy: disease spectrum and approaches for treatment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015;29(2):261–273.
- Cesari M, Liorio L, Grossi S, et al. Mutation update of ARSA and PSAP genes causing metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat* 2016;37(1):16–27.
- Hageman AT, Gabreëls FJ, de Jong JG, et al. Clinical symptoms of adult metachromatic leukodystrophy and arylsulphatase A pseudodeficiency. *Arch Neurol* 1995;52(4):408–413.
- Groeschel S, Kehr C, Engel C, et al. Metachromatic leukodystrophy: natural course of cerebral MRI changes in relation to clinical course. *J Inher Metab Dis* 2011;34(5):1095–1102.
- Eichler F, Grodd W, Grant E, et al. Metachromatic leukodystrophy: a scoring system for brain MR imaging observations. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009;30(10):1893–1897.
- Van Miegheem P, Van Goethem JW, Parizel PM, et al. MR of the brain in Sjögren-Larsson syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol* 1997;18(8):1561–1563.

35. Rizzo WB. Genetics and prospective therapeutic targets for Sjögren-Larsson syndrome. *Expert Opin Orphan Drugs* 2016;4(4):395-406.
36. Willemsen MAAP, Van Der Graaf M, Van Der Knaap MS, et al. MR imaging and proton MR spectroscopic studies in Sjögren-Larsson syndrome: characterization of the leukoencephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2004;25(4):649-657.
37. Vanderver A. Genetic leukoencephalopathies in adults. *Continuum (Minneapolis)* 2016;22(3):916-942.
38. Steenweg ME, Salomons GS, Yapici Z, et al. L-2-Hydroxyglutamic aciduria: pattern of MR imaging abnormalities in 56 patients. *Radiology* 2009;251(3):856-866.
39. Nankawa M, Takayama Y, Honda J, Shimazaki H, Sakoe K, Nakano I. Adult-onset Alexander disease with typical "tadpole" brainstem atrophy and unusual bilateral basal ganglia involvement: a case report and review of the literature. *BMC Neurol* 2010;10(1):21.
40. Balbi P, Salvini S, Fundaro C, et al. The clinical spectrum of late-onset Alexander disease: a systematic literature review. *J Neurol* 2010;257(12):1955-1962.
41. Sawashchi Y. Review of Alexander disease: beyond the classical concept of leukodystrophy. *Brain Dev* 2009;31(7):493-498.
42. Pareyson D, Pancelli R, Mariotti C, et al. Adult-onset Alexander disease: a series of eleven unrelated cases with review of the literature. *Brain* 2008;131(Pt 9):2321-2331.
43. van der Knaap MS, Naidu S, Breiter SN, et al. Alexander disease: diagnosis with MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001;22(3):541-552.
44. Scheper GC, van der Klok T, van Andel RJ, et al. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet* 2007;39(4):534-539.
45. van der Knaap MS, Salomons GS. Leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al, eds. *GeneReviews*. Seattle, Wash: University of Washington, Seattle, 2010; 1993-2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK43417/>. Updated February 12, 2015. Accessed November 20, 2018.
46. Labauge P, Dorboz I, Eymard-Pierre E, Dereeper O, Boespflug-Tanguy O. Clinically asymptomatic adult patient with extensive LBSL MRI pattern and DARS2 mutations. *J Neurol* 2011;258(2):335-337.
47. Tzoulis C, Tran GT, Gjerde IO, et al. Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement caused by a novel mutation in the DARS2 gene. *J Neurol* 2012;259(2):292-296.
48. Björkhem I, Fausa O, Hopen G, Oftebro H, Pedersen JL, Skrede S. Role of the 26-hydroxylase in the biosynthesis of bile acids in the normal state and in cerebrotendinous xanthomatosis: an in vivo study. *J Clin Invest* 1983;71(1):142-148.
49. Dotti MT, Ruffa A, Federico A. Cerebrotendinous xanthomatosis: heterogeneity of clinical phenotype with evidence of previously undescribed ophthalmological findings. *J Inher Metab Dis* 2001;24(7):696-706.
50. Federico A, Dotti MT. Cerebrotendinous xanthomatosis: clinical manifestations, diagnostic criteria, pathogenesis, and therapy. *J Child Neurol* 2003;18(9):633-638.
51. Embiruçu EK, Otaduy MC, Taneja AK, Leite CC, Kok F, Lucato LT. MR spectroscopy detects lipid peaks in cerebrotendinous xanthomatosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010;31(7):1347-1349.
52. Brunberg JA, Jacquemont S, Hagerman RJ, et al. Fragile X premutation carriers: characteristic MR imaging findings of adult male patients with progressive cerebellar and cognitive dysfunction. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002;23(10):1757-1766.
53. van der Knaap MS, Barth PG, Gabreëls FJ, et al. A new leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Neurology* 1997;48(4):845-855.
54. Schiffmann R, Elroy-Stein O. Childhood ataxia with CNS hypomyelination/vanishing white matter disease: a common leukodystrophy caused by abnormal control of protein synthesis. *Mol Genet Metab* 2006;88(1):7-15.
55. van Den Boom R, Lesnik Oberstein SA, van Duinen SG, et al. Subcortical lacunar lesions: an MR imaging finding in patients with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Radiology* 2002;224(3):791-796.
56. Chabriat H, Joutel A, Dichgans M, Tournier-Lasserre E, Boussier MG, Cadavid. *Lancet Neurol* 2009;8(7):643-653.
57. Narayan SK, Gorman G, Kalaria RN, Ford GA, Chinnery PF. The minimum prevalence of CADASIL in northeast England. *Neurology* 2012;78(13):1025-1027.
58. Konno T, Yoshida K, Mizuno T, et al. Clinical and genetic characterization of adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia associated with CSF1R mutation. *Eur J Neurol* 2017;24(1):37-45.
59. Karle KN, Biskup S, Schüle R, et al. De novo mutations in hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids (HDLS). *Neurology* 2013;81(23):2039-2044.
60. Nicholson AM, Baker MC, Finch NA, et al. CSF1R mutations link POLD and HDLS as a single disease entity. *Neurology* 2013;80(11):1033-1040.
61. Rademakers R, Baker M, Nicholson AM, et al. Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nat Genet* 2011;44(2):200-205.
62. Wider C, Van Gerpen JA, DeArmond S, Shuster EA, Dickson DW, Wszolek ZK. Leukoencephalopathy with spheroids (HDLS) and pigmentary leukodystrophy (POLD): a single entity? *Neurology* 2009;72(22):1953-1959.
63. Konno T, Broderick DF, Mezaki N, et al. Diagnostic value of brain calcifications in adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia. *AJNR Am J Neuroradiol* 2017;38(1):77-83.
64. Aygnac X, Nicolas G, Carra-Dallière C, Hannequin D, Labauge P. Brain calcifications in adult-onset genetic leukoencephalopathies: a review. *JAMA Neurol* 2017;74(8):1000-1008.
65. Livingston JH, Mayer J, Jenkinson E, et al. Leukoencephalopathy with calcifications and cysts: a purely neurological disorder distinct from Coats plus. *Neuropediatrics* 2014;45(3):175-182.
66. Jenkinson EM, Rodero MP, Kashner PR, et al. Mutations in SNORD118 cause the cerebral microangiopathy leukoencephalopathy with calcifications and cysts. *Nat Genet* 2016;48(10):1185-1192 [Published correction appears in *Nat Genet* 2017;49(2):317.] <https://doi.org/10.1038/ng.3661>.
67. Paloneva J, Autti T, Raiminko R, et al. CNS manifestations of Nasu-Hakola disease: a frontal dementia with bone cysts. *Neurology* 2001;56(11):1552-1558.
68. Kilic SA, Oner AY, Yuce C, Oztu IC. Imaging findings of Nasu-Hakola disease: a case report. *Clin Imaging* 2012;36(6):877-880.
69. Melberg A, Hallberg L, Kalimo H, Raiminko R. MR characteristics and neuropathology in adult-onset autosomal dominant leukodystrophy with autonomic symptoms. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27(4):904-911.
70. Coffeen CM, McKenna CE, Koeppen AH, et al. Genetic localization of an autosomal dominant leukodystrophy mimicking chronic progressive multiple sclerosis to chromosome 5q31. *Hum Mol Genet* 2000;9(5):787-793.

10.13 Apêndice M - *PUS3* mutations are associated with intellectual disability, leukoencephalopathy, and nephropathy. *Neurol Genet* 2019;5(1):e306.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> or send a letter to Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.

De Paiva A, Lynch D, Melo U, Lucato L, Freua F, de Assis B, Barcelos I, Listik C, de dos Santos D, Macedo-Souza L, Houlden H, Kok F. *PUS3* mutations are associated with intellectual disability, leukoencephalopathy, and nephropathy. *Neurol Genet* 2019;5(1):e306.

<https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000306>

CLINICAL/SCIENTIFIC NOTES

OPEN ACCESS

PUS3 mutations are associated with intellectual disability, leukoencephalopathy, and nephropathy

Anderson Rodrigues Brandão de Paiva, MD, David S. Lynch, MD, PhD, Ulirã Souto Melo, PhD, Leandro Tavares Lucato, MD, PhD, Fernando Freua, MD, Bruno Della Ripa de Assis, MD, Isabela Barcelos, MD, Clarice Listik, MD, Diego de Castro dos Santos, MD, Lúcia Inês Macedo-Souza, PhD, Henry Houlden, MD, PhD, and Fernando Kok, MD, PhD

Correspondence

Dr. de Paiva
arbrandopaiva@gmail.com

Neurol Genet 2019;5:e306. doi:10.1212/NXG.0000000000000306

Mutations in *PUS3*, which encodes a highly conserved enzyme responsible for post-transcriptional modification of tRNA, have been shown in a single family to be a cause of nonsyndromic intellectual disability (ID).¹ In this study, we used whole-exome sequencing (WES) to identify biallelic mutations in *PUS3* associated with syndromic ID with dysmorphic features, white matter disease (WMD), and renal abnormalities in a nonconsanguineous family from Brazil.

Clinical findings

We evaluated 2 sisters (figure, A) who had ID, renal abnormalities, diffuse WMD, and dysmorphic features. Their brother was similarly affected and died at age 22 years of complications of renal disease. The parents were nonconsanguineous from Northeast Brazil and Southern Italy. We obtained approval from the institutional ethics committee and written informed consent from family members.

The first patient (P1; III-3; figure, A) was noted to have global developmental delay after age 1 year. As a child, she could understand short sentences, but expressive language was limited to monosyllables. She was diagnosed with profound ID but was independent in basic activities of daily living (ADLs). She had 2 focal dyscognitive seizures with secondary generalization, at age 18 and 23 years, responsive to carbamazepine. At age 37 years, asymptomatic proteinuria and reduced creatinine clearance were detected. At 44 years, she developed psychosis, with prominent auditory and visual hallucinations and episodes of aggression. Physical examination revealed her to be on the 10th centile for height, weight, and head circumference and to have genu valgum. In addition, neurologic examination revealed dysarthria, pseudobulbar affect, with impaired gait and balance.

The second patient (P2; III-6; figure, A) also presented with short stature, neurodevelopmental delay, and dysmorphic features. She was diagnosed with acute nephritis at age 6 months and coeliac disease at age 5 years. She also developed generalized phenobarbital responsive seizures. She was able to walk and could complete ADLs with assistance. At age 20 years, she developed nephrotic syndrome due to focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) with mesangial granular deposits and positive IgM and C3 immunofluorescence. She did not respond to steroids and developed end-stage renal failure requiring hemodialysis. Physical examination revealed that she was on the 3rd centile for height, weight, and head circumference and to have gray

From the Neurogenetics Unit (A.R.B.d.P., F.F., B.D.R.d.A., L.B., C.L., D.d.C.d.S., F.K.), Neurology Department, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Brazil; Department of Molecular Neuroscience (D.S.L., H.H.), UCL Institute of Neurology, London, UK; Leonard Wolfson Experimental Neurology Centre (D.S.L., H.H.), UCL Institute of Neurology, London, UK; Human Genome and Stem Cell Research Center (J.S.M., L.J.M., S., F.K.), Department of Genetics and Evolutionary Biology, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brazil; and Neuroradiology Section (L.T.), Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Brazil.

Funding information and disclosures are provided at the end of the article. Full disclosure form information provided by the authors is available with the full text of this article at Neurology.org/ng.

The Article Processing charge was funded by the authors.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND), which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Copyright © 2019 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology.

1

Figure Genetic and radiologic findings

(A) Family pedigree: 2 affected individuals were compound heterozygotes for p.Arg166Gln and p.Leu366Pro *PUS3* mutations, whereas their healthy mother and sister were heterozygotes for only 1 of the mutations. (B) Sanger sequencing electropherograms showing both c.497G>A (p.Arg166Gln) and c.1097T>C (p.Leu366Pro) *PUS3* mutations. (C) Vertebrate protein sequencing alignment showing conserved amino acid sites for both *PUS3* mutations. (D) Scattered FLAIR hyperintensities in the cerebral white matter in P1. (E) Symmetric diffuse FLAIR hyperintensity in the cerebral white matter in P2. (F) Axial T2-weighted image discloses not only the white matter changes in P2 but also mild T2 hyperintensity in the globus pallidus bilaterally (arrows). One can notice also in P2 symmetric FLAIR hyperintensities in the cerebellar white matter (arrows in G), together with signs of brain parenchyma volume loss (E–G).

sclera, genu valgum, pseudobulbar affect, and dysarthria. She died at age 40 years of complications of community-acquired pneumonia.

Neuroimaging findings

MRI identified white matter abnormalities in both patients. In P1, there were scattered T2/fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) hyperintensities in the cerebral white matter, more prominent in periventricular zones (figure, D). In P2, there was symmetric diffuse T2/FLAIR hyperintensity in the cerebral and cerebellar white matter with extension to the subcortical areas,

mild T2 hyperintensity in the globus pallidus bilaterally, and signs of brain parenchymal volume loss (figure, E–G). There was no gadolinium enhancement or areas of restricted diffusion.

Genetic findings

We performed WES on both patients and filtered the data for a presumed autosomal recessive inheritance pattern. There were no regions of homozygosity and no shared rare homozygous variants. However, when filtered for damaging, rare compound heterozygous mutations, we identified biallelic mutations only in *PUS3* (p.Arg166Gln;p.Leu366Pro)

(figure, B). Both are very rare and highly conserved residues among vertebrates. We confirmed the mutations by Sanger sequencing and demonstrated that they were inherited in trans.

Discussion

PUS3 codes for pseudouridylate synthase, a highly conserved enzyme responsible for posttranscriptional modification of tRNA,² which is critical for its structure, function, and stability. Most of these modifications have been recently recognized in a growing number of human genes leading to *ID-FTSJ1*, *TRMT1*, *NSUN2*, *WDR4*, *ADAT3*, and *PUS3*.³

The original report of *PUS3*-related disorder describes a family with 3 affected individuals (age: 3–15 years) from Saudi Arabia with severe ID, multifocal white matter changes, and in a single patient, epilepsy. No nephropathy was reported. WES detected a homozygous truncating mutation (p.Arg435Ter), predicting to lead to a loss of function. In our patients, affected individuals have a milder intellectual compromise and developed proteinuria/nephrotic syndrome after age 20 years. In addition, the white matter abnormalities were more extensive in our patients.

Of interest, a well-known mechanism of WMD is disruption of protein translation as is seen in mutations in mitochondrial aspartate (*DARS2*) or glutamate (*EARS2*) transfer-RNA synthase. It is also noteworthy that leukoencephalopathies usually cause progressive neurologic deterioration and not static encephalopathy with ID, as occurred in our patients.

The late-onset renal involvement observed in our patients expands the phenotype of *PUS3*-related disorder. Steroid-resistant PSGS has been rarely associated with mutations in mitochondrial tRNA in patients with other features typical of mitochondrial dysfunction.^{4–7} Recently, tubulopathy was reported in deficiency of tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase, an enzyme involved in posttranscriptional tRNA modification.

This study expands the known phenotypic and allelic spectrum of *PUS3*-related disorder. In addition, it provides further evidence of the relevance of posttranscriptional modification of tRNA in neurologic diseases. Given these additional findings, we believe the phenotypic spectrum of *PUS3* mutations to be wider than the initial report.

Acknowledgment

The authors thank the patients and their family for participating in this study.

Study funding

No targeted funding reported.

Disclosure

A.R.B. de Paiva, D.S. Lynch, and U.S. Melo report no disclosures. L.T. Lucato has received speaker honoraria from Bracco Imaging

Appendix 1. Author contributions

Name	Location	Role	Contribution
Anderson Rodrigues Brandão de Paiva, MD	Neurogenetics Unit, Neurology Department, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil	Author	Study concept and design, acquisition of data, and writing the manuscript.
David S. Lynch, MD, PhD	UCL Institute of Neurology, London, United Kingdom	Author	Study concept and design, acquisition of data, and writing the manuscript.
Ulrrá Souto Melo, PhD	Human Genome and Stem Cell Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil	Author	Acquisition of data and critical revision of the manuscript.
Leandro Tavares Lucato, MD, PhD	Neuroradiology Section, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil	Author	Acquisition of data and critical revision of the manuscript.
Fernando Freua, MD	Neurogenetics Unit, Neurology Department, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil	Author	Acquisition of data and critical revision of the manuscript.
Bruno Della Ripa de Assis, MD	Neurogenetics Unit, Neurology Department, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil	Author	Acquisition of data and critical revision of the manuscript.
Isabella Barcelos, MD	Neurogenetics Unit, Neurology Department, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil	Author	Acquisition of data and critical revision of the manuscript.
Clarice Listik, MD	Neurogenetics Unit, Neurology Department, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil	Author	Acquisition of data and critical revision of the manuscript.
Diego de Castro dos Santos, MD	Neurogenetics Unit, Neurology Department, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil	Author	Acquisition of data and critical revision of the manuscript.
Lúcia Inês Macedo-Souza, PhD	Human Genome and Stem Cell Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil	Author	Acquisition of data and critical revision of the manuscript.
Henry Houlden, MD, PhD	UCL Institute of Neurology, London, United Kingdom	Author	Critical revision of the manuscript.
Fernando Kok, MD, PhD	Neurogenetics Unit, Neurology Department, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil	Author	Critical revision of the manuscript.

do Brasil and has served on the editorial board of *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. F. Frezza, B.D.R. de Assis, I. Barcelos, C. Listik, D. Castro Santos, and L.L. Macedo-Souza report no disclosures. H. Houlden has received governmental and/or foundation/society support from the Medical Research Council (MRC) UK, the BRT, the MDA USA, Muscular Dystrophy UK, Ataxia UK, Muscular Dystrophy UK, Rosetrees Trust, the Wellcome Trust, and the National Institute for Health Research (NIHR) UCL/UCLH BRC. F. Kok has served on the editorial board of *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*; holds a patent for methylmalonic acid determination by tandem mass spectrometry using stable isotope; is employed as Medical Director for Mendelics Genomic Analysis; has acted as a speaker for Actelion Pharmaceuticals at the NPC symposia and for BioMarin Pharmaceuticals at the CLN2 symposia; and has been a shareholder of Mendelics Genomic Analysis. Full disclosure form information provided by the authors is available with the full text of this article at Neurology.org/NG.

Publication history

Received by *Neurology: Genetics* August 13, 2018. Accepted in final form November 8, 2018.

References

- Shahmoradian B, Han L, Fajen E, et al. A heterozygous truncating mutation in PUS3 expands the role of tRNA modification in normal cognition. *Hum Genet* 2016;135:707–713.
- Hue S, Stroud RM. How U38, 39, and 40 of many tRNAs become the targets for pseudouridylation by TruA. *Mol Cell* 2007;26:189–203.
- Torres AG, Batlle E, Eibar de Peralta L. Role of tRNA modifications in human disease. *Trends Mol Med* 2014;20:306–314.
- Dinour D, Mizel S, Polak-Charcon S, Lotan D, Holtzman EJ. Progressive nephropathy associated with mitochondrial tRNA gene mutation. *Clin Nephrol* 2004;62:149–154.
- Scaglia FI, Vogel H, Hawkins EP, Vladutin GD, Liu LL, Wong LJ. Novel homoplasmic mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu} gene associated with atypical mitochondrial cytopathy presenting with focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Med Genet A* 2003;123A:172–178.
- Gulery B, Chetkovich G, Noz LH, et al. The spectrum of systemic involvement in adults presenting with renal lesion and mitochondrial tRNA(Leu) gene mutation. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2099–2108.
- Hori O, Inoue CN, Miyabara S, Furuta T, Takeuchi A, Tazawa Y. Clinical and pathologic features of focal segmental glomerulosclerosis with mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene mutation. *Kidney Int* 2001;59:1236–1241.