



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

WAYDJA LÂNIA VIRGÍNIA DE ARAÚJO MARINHO

**ANÁLISE COMPUTACIONAL DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES
LIGADOS À CALCIFICAÇÃO VASCULAR CEREBRAL EM BASE DE
DADOS ONLINE**

Recife – PE

2021

WAYDJA LÂNIA VIRGÍNIA DE ARAÚJO MARINHO

**ANÁLISE COMPUTACIONAL DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES
LIGADOS À CALCIFICAÇÃO VASCULAR CEREBRAL EM BASE DE
DADOS ONLINE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do título de doutor em Biologia
Aplicada à Saúde

Orientador Prof Dr João Ricardo Mendes de Oliveira

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Marinho, Waydja Lânia Virgínia de Araújo

Análise computacional do padrão de expressão dos genes ligados à calcificação vascular cerebral em base de dados online / Waydja Lânia Virgínia de Araújo Marinho. - 2021.

76 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Sistema nervoso – Doenças. 2. Sistema nervoso – Degeneração. 3. Genética. I. Oliveira, João Ricardo Mendes de (orientador). II. Título.

616.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-321

WAYDJA LÂNIA VIRGÍNIA DE ARAÚJO MARINHO

**ANÁLISE COMPUTACIONAL DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES
LIGADOS À CALCIFICAÇÃO VASCULAR CEREBRAL EM BASE DE DADOS
ONLINE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutor em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Aprovada em: 30/08/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira - Orientador (UFPE)

Profª Drª. Danyelly Bruneska Gondim Martins - Examinador externo (UFRPE)

Prof. Dr Rafael Lima Guimarães - Examinador interno (UFPE)

Profª Drª. Belmira Lara Da Silveira Andrade Da Costa - Examinador interno (UFPE)

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleuterio de Souza - Examinador externo (UFRPE)

Dedico a todos que saíram de sua zona de conforto, em busca dos seus sonhos, para desenvolver a ciência. Em especial, dedico à Prof^a Dr^a Doralúcia Pedrosa de Araújo (*in memoriam*), por todos os ensinamentos prestados, iniciados na graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus.

Agradeço aos meus pais.

Agradeço aos meus irmãos.

Agradeço à minha família.

Agradeço aos meus amigos.

Agradeço ao meu orientador.

Agradeço aos meus colegas.

Agradeço ao tempo.

Agradeço à vida.

Agradeço a mim.

"As paixões são como as ventanias que inflam as velas do navio. Algumas vezes o
afundam, mas sem as ventanias não se pode navegar."

Voltaire

RESUMO

A CCFP é uma doença neurológica degenerativa, pouco comum, que pode ser hereditária ou esporádica. Manifesta-se igualmente em ambos os sexos e em qualquer idade e caracteriza-se pela presença de depósitos anormais de cálcio no cérebro. Apesar do importante progresso na descoberta da arquitetura genética da CCFP, mais da metade dos casos permanece geneticamente não resolvida. Foram identificadas variações em seis diferentes genes como causa da desordem, sendo quatro com padrão de herança autossômico dominante: SLC20A2, PDGFR β , PDGF β e XPR1; e mais recentemente o MYORG e o JAM2, com um padrão de herança autossômico recessivo. O objetivo desse trabalho foi avaliar através de um banco de dados: *Vascular Single Cells (Betsholtzlab)* e através do Atlas de vasculatura de *Mus musculus*, o padrão de expressão de genes ligados a calcificação vascular cerebral. Foi realizada uma busca pela expressão individual de cada gene no banco de dados, no link <<http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>>. A ordem de busca seguiu o padrão de herança autossômico dominante, seguida dos genes de padrão de herança autossômico recessiva. Foi realizada uma análise manual milimetrada dos valores aproximados. Cada “*average counts*” foi subdividido e uma projeção gráfica foi realizada, dessa forma pudemos quantificar numericamente as expressões gênicas nos tipos celulares. Dessa forma, os dados extraídos de forma milimétrica, por medida indireta, demonstram uma maior expressão do gene SLC20A2, XPR1 e MYORG nos astrócitos, PDGFRB nas células endoteliais subtipo 3, do PDGFB nos pericitos, do JAM2 nos capilares das células endoteliais. A expressão vascular específica de genes que são mutados em indivíduos com doenças neurológicas ilustram a importância crítica da vascularização saúde para a função cerebral. Enquanto especialização do endotélio vascular é conhecida por ser uma característica fundamental da BHE, a contribuição de células vasculares murinas (pericitos e células de músculo liso (SMCs)) e tipos de células associadas a vasos, como astrócitos, é menos claro. Entender os fundamentos moleculares dessas diferenças e caracterizá-los torna possível um alvo terapêutico no futuro.

Palavras-chave: PFBC; pericitos; calcificação vascular cerebral.

ABSTRACT

The PFBC is an uncommon, degenerative neurological disease that can be hereditary or sporadic. It manifests equally in both sexes and at any age and is characterized by the presence of abnormal calcium deposits in the brain. Despite important progress in discovering the genetic architecture of PFBC, more than half of the cases remain genetically unresolved. Variations in six different genes were identified as the cause of the disorder, four with an autosomal dominant pattern of inheritance: SLC20A2, PDGFR β , PDGF β and XPR1; and more recently MYORG and JAM2, with an autosomal recessive pattern of inheritance. The aim of this work was to evaluate through a database: Vascular Single Cells (Betsholtzlab) and through the Mus musculus Vasculature Atlas, the expression pattern of genes linked to cerebral vascular calcification. A search was carried out for the individual expression of each gene in the database, at the link <<http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>>. The search order followed the autosomal dominant inheritance pattern, followed by the autosomal recessive inheritance pattern genes. A manual millimeter analysis of approximate values was performed. Each “average counts” was subdivided and a graphic projection was performed, in this way we could numerically quantify the gene expressions in cell types. Thus, the data extracted in a millimetric way, by indirect measurement, demonstrate a greater expression of the SLC20A2, XPR1 and MYORG gene in astrocytes, PDGFRB in subtype 3 endothelial cells, PDGFB in pericytes, JAM2 in capillaries of endothelial cells. A vascular-specific expression of genes that are mutated in neurological diseases, illustrating the critical importance of vascular health for brain function. While vascular endothelial specialization is known to be a key feature of BBB, a contribution from murine vascular cells (pericytes and smooth muscle cells (SMCs)) and vessel-associated cell types such as astrocytes is less clear. Understanding the molecular foundations of these differences and characterizing them makes a therapeutic target possible in the future.

Keywords: PFBC; pericytes; cerebral vascular calcification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Padrão de distribuição da calcificação. **A.** Tomografia Computadorizada (TC) do cérebro de indivíduo normal; ausência de calcificações. **B.** Calcificação simétrica e bilateral nos gânglios da base (seta amarela) e no tálamo (seta vermelha)

Figura 2. Função dos principais genes relacionados à CCFP. **A,** Em condições fisiológicas, as células endoteliais secretam PDGFB que se liga ao receptor β de PDGF (PDGFRB) em pericitos. Este processo é necessário para o recrutamento de pericitos e correta proliferação e migração ao longo dos vasos sanguíneos. O Fosfato inorgânico (Pi) no é absorvido pelo Pitransporter 2 (PiT-2). No cérebro, Pi é secretado por meio do XPR1. **B,** em condições patológicas, o ligante ou receptor de PDGF perde sua função normal, levando à disfunção do pericito e uma alteração barreira hematoencefalica. O Pi se acumula no parênquima cerebral devido a sua reduzida absorção pelo PiT-2. O mecanismo de doença proposto de XPR1 mutado ainda não foi publicado em detalhes. No entanto, o mecanismo foi encontrado para reduzir o efluxo de fosfato das células.

Figura 3. Evolução histórica da Unidade Neurovascular. N: neurônio; GM-A, astrócito de substância cinzenta; WM-A, astrócito de substância branca; OD: oligodendrócito; PC, pericito; PM, macrófago perivascular

Figura 4. Mecanismo molecular de toxicidade neuronal após interrupção da BHE. “Vazamento” das células vermelhas do sangue para o microambiente neuronal e lisam, liberando a hemoglobina, após a perda de pericito e a degradação da BHE, consequentemente a hemoglobina libera ferro livre, que pode catalisar a formação de espécies de radicais livres, moléculas tóxicas para os neurônios motores.

Figura 5. Seções sagitais do cérebro de camundongos machos em P56. Crédito da imagem: Instituto Allen. As imagens estão disponíveis no site: <http://mouse.brain-map.org/>. A barra de escala é 2098 μm . As figuras ampliadas representam o córtex (forro vermelho), plexo coróide (forro azul), mesencéfalo (forro verde). A barra de escala é 839 μm .

Figura 6. Expressão de Ai464131 (MYORG), Xpr1, Slc20a2, Pdgfb e Pdgfrb no nível de RNA em diferentes tipos de células e tecidos em camundongos. **A.** Seções sagitais de embriões de camundongo no dia 14,5 (espessura da seção 20 μm e distância entre

seções de 100 µm). Barra de escala 400 µm. As imagens foram retiradas do banco de dados público GenePaint disponível no site: <http://www.genepaint.org> e descritas em (Visel et al. 2004). C. RNAseq de diferentes tipos de células (A - astrócito, N - neurônio, OPC - célula progenitora de oligodendrócito, NFO - oligodendrócito recém-formado, MO - oligodendrócito mielinizante, M –microglia / macrófago, EC - célula endotelial) isolado de cérebros de camundongo. Os dados foram retirados de www.brainrnaseq.org (Zhang et al. 2014).

Figura 7. Representação esquemática das junções de aderência (JA). VE-caderina é estabilizada por íons de cálcio e por conexões intracelulares para o citoesqueleto de actina: α -, β -, γ e p120-catenina conectam a VE-caderina aos microfilamentos de actina. Proteínas de outras junções, como JAM e PECAM-1, contribuem para estruturar a JA.

Figura 8. Imagens cerebrais da doença relacionada com JAM2. B1 a B3 são tomografias adquiridas do sujeito do caso F1-II: 2 da família 1 e B4 a B6 são tomografias adquiridas do sujeito do caso F2-III: 3 da família 2. Nos dois indivíduos, existe uma calcificação extensiva, simétrica e bilateral envolvendo a gânglios da base, substância cinzenta cortical profunda e cerebelo. B7, 8 e 9 são CT do caso F3-II: 1 demonstrando calcificação nos gânglios da base e giros corticais, mas não no cerebelo. B10, 11 e 12 são exames de ressonância magnética axial do indivíduo F3-II: 1 da família 3 mostrando gânglios basais e calcificação frontal (B10 é T1, B11 é T2 e B12 é reconstrução axial Ven Bold, sensível ao cálcio mostradas como regiões hipointensas). Áreas de asterisco (*) de calcificação na RM. [adaptada].

Figura 9. Layout da base de dados Vascular Single Cells (Betsholtzlab). Em 1) ComboBox para busca da expressão gênica na base de dados; em 2) ComboBox para seleção dos tipos celulares a serem buscados.

Figura 10. Manuscrito Publicado no Journal of Molecular Neuroscience. Em fevereiro de 2021.

Figura 11. Distribuição dos genes ao longo das células. Aonde PC - Pericytes; SMC - Smooth muscle cells; MG - Microglia; FB - Vascular fibroblast-like cells; OL - Oligodendrocytes; EC - Endothelial cells; AC - Astrocytes; v - venous; capil - capillary; a - arterial; aa - arteriolar; 1,2,3- subtypes.

Figura 12. Detailed expression in each cell. Genes SLC20A2 (A), PDGFB (B), PDGFRB (C), XPR1 (D), JAM2 (E) e MYORG (F). Observamos uma maior expressão do gene SLC20A2, XPR1 e MYORG nos astrócitos, PDGFRB nas células endoteliais subtipo 3, do PDGFB nos pericitos, do JAM2 nos capilares das células endoteliais.

Figura 13. Especificidade do tecido do RNA. Gráfico de barras: Resultados mostrando as relações entre os 27 tecidos e órgãos diferentes, maior expressão na placenta (aproximadamente 26 RPKM), seguida pelo cérebro (aproximadamente 14 RPKM). **A** - localização de todos os 27 tecidos analisados e órgãos no corpo humano. **B** - a relação entre os tecidos. Resultados de agrupamento hierárquico mostrando as relações entre os 27 tecidos e órgãos diferentes baseados e um mapa de calor mostrando a correlação de Spearman em pares. Os números entre parênteses mostram o número de amostras replicadas para cada tecido.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,2,3 – subtipos

a – arterial

aa – arteriolar

BBB - blood brain barrier

BHE - barreira hematoencefálica

CA – astrócitos

capil – capilar

CCFP - Calcificação Cerebral Familiar Primária

CE - células endoteliais

CECs - células endoteliais cerebrais

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FB - células vasculares semelhantes a fibroblastos

GM-A - astrócito de substância cinzenta

JA - junções de aderência

JAM - molécula de adesão juncional

KO – *Knockout*

MG – Microglia

MMPs - Metaloproteinases de Matriz

MYORG – *Myogenesis Regulating Glycosidase*

N - neurônio

NET37 - nuclear envelope transmembrane proteins

NVU - Unidade Neurovascular Central

OD - oligodendrócito

OL – Oligodendrócitos

PC – Pericitos

PDGFB - Platelet Derived Growth Factor subunit Beta

PDGF β – *Platelet Derived Growth Factor Subunit β*

PFBC - Calcificação Cerebral Familiar Primária

Pi – Fosfato inorgânico

PM - macrófago perivascular

RNA – Ácido ribonucleico

RPKM - *Reads Per Kilobase Million*

SLC20A2 - Solute Carrier Family 20 Member 2

SMC - células musculares lisas

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD1 - cobre zinco superóxido dismutase 1

TJs - junções estreitas interendoteliais

v – venoso

VEFG - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VSMC - células do músculo liso vascular

WM-A - astrócito de substância branca

XPR1 - *Xenotropic and Polytropic Retrovirus Receptor 1*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 Calcificação cerebral	19
3.2 Genética e calcificação vascular	21
3.2.1 SLC20A2	23
3.2.2 PDGFR β e PDGF β	24
3.2.3 <i>XPR1</i>	26
3.3 Unidade Neurovascular (NVU)	27
3.4 Pericitos e calcificação vascular	30
3.4 JAM 2	36
3.5 MYORG	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Busca nas bases de dados	40
4.2 Análise dos gráficos	41
4.3 Análise Estatística	41
5 RESULTADOS	43
5.1 Parte 1 – Manuscrito Publicado	43
5.2 Parte 2 – Resultados e Discussão dos demais achados	44
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICES	60
APÊNDICE A – Manuscrito publicado	61
APÊNDICE B – Sumário das atividades desenvolvidas durante o doutorado	63

1 INTRODUÇÃO

Calcificações cerebrais são lesões resultantes do acúmulo de cristais de hidroxiapatita no tecido encefálico por mecanismos que ainda não foram completamente esclarecidos (DENG; ZHENG; JANKOVIC, 2015; CEN et al., 2020). O principal exemplo de doença genética caracterizada pela presença de calcificações cerebrais bilaterais é a Calcificação Cerebral Familiar Primária (CCFP), que é considerada uma doença genética rara, cujas lesões características são detectadas através de exames de imagem, normalmente afetando regiões subcorticais como os núcleos da base, tálamo e cerebelo (TAGLIA et al., 2014; BALCK et al., 2021). A doença, que pode ter perfil de herança tanto autossômico dominante quanto autossômico recessivo, pode também ocorrer na ausência de histórico familiar devido a mutações *de novo* (YAO et al., 2018; BALCK et al., 2021).

Patologicamente, os cérebros humanos exibem depósitos de sal de cálcio distribuídos predominantemente em torno de pequenos vasos sanguíneos (TAGLIA et al., 2015) e um sujeito relatado com uma mutação SLC20A2 apresentou calcificação na média túnica de pequenas artérias, arteríolas e capilares, mas não em veias distribuídas nos gânglios da base, tálamo, substância branca cerebelar e camadas mais profundas do córtex cerebral (SCHOTTLAENDER et al., 2020).

Apesar do importante progresso na descoberta da arquitetura genética da CCFP, mais da metade dos casos permanece geneticamente não resolvida. Podemos observar características clínicas e de neuroimagem da doença relacionada ao JAM2 (SCHOTTLAENDER et al., 2020). As moléculas de adesão juncional são uma família de proteínas que desempenham um papel importante na regulação da polaridade celular, permeabilidade ao endotélio e migração de leucócitos e na função da Barreira Hematoencefálica (BHE). Além do JAM2, variantes recessivas no JAM3 e OCLN estavam ligadas a distúrbios neurológicos complexos que se apresentam com calcificação no cérebro (MOCHIDA et al., 2010; CEN et al., 2020), sugerindo que a desregulação da Unidade Neurovascular Central (NVU) é importante na patogênese do CCFP.

Embora o aumento da permeabilidade do BHE não tenha sido confirmado em camundongos JAM2 *Knockout* (KO) até o momento (TIETZ, et al., 2018), incluindo este estudo, agora foram identificadas mutações em três genes que codificam

proteínas de junção apertada em humanos (JAM2, JAM3 e OCLN), sugerindo que a perda de adesão célula a célula com subsequente disfunção da passagem do soluto é uma importante causa de calcificação cerebral.

Os mecanismos pelos quais variantes em diferentes genes causam o mesmo padrão de calcificação em áreas específicas, ainda não estão completamente estabelecidos, assim como a base celular da associação do MYORG com a CCFP ainda é incerta, tendo sido identificada por Yao et al. (2018), que logo após, desenvolveram um camundongo KO homozigoto para o referido gene e conseguiram com sucesso mimetizar a doença no animal. Ao analisarem a composição dos nódulos verificaram que eram compostos principalmente por cálcio, fósforo e oxigênio, sugerindo um agregado de fosfato de cálcio, semelhante aos encontrados em humanos e em outros modelos animais.

O MYORG e o JAM2, por serem os genes mais recentemente associados à CCFP, possuem menos estudos explorando suas funções na formação de calcificações ectópicas (SCHOTTTLAENDER et al., 2020; YAO et al., 2018). Estudos sobre o MYORG, entretanto, são mais numerosos do que estudos sobre o JAM2, e modelos animais *knockout* para esse gene confirmam que mutações de perda de função no mesmo levam à formação de calcificações cerebrais (YAO et al., 2018). Estudos indicam ainda que as calcificações causadas por variantes no MYORG aparecem mais tardiamente do que aquelas vistas em modelos dos genes SLC20A2 e PDGFB (YAO et al., 2018).

A calcificação cerebral vem sendo estudada pelo nosso grupo de pesquisa, que possui vasta experiência no tema, seja em estudos com pacientes, seja com modelos celulares ou animais. Nosso grupo tem liderado o estudo dessa condição durante a última década e participou ativamente deste processo, na co-autoria de 3 artigos na Nature Genetics (KELLER et al., 2013; LEGATI et al., 2015; WANG et al., 2012), reportando várias famílias com mutações no SLC20A2, PDGFB e XPR1. O primeiro e mais importante deles, por afetar um maior número de família, é o SLC20A2, no entanto, quase 50% dos pacientes permanecem sem um esclarecimento genético. Curiosamente, os genes SLC20A2 e XPR1 foram inicialmente descritos como receptores virais e só mais recentemente foram entendidos como transportadores de fosfato inorgânico, para dentro e fora da célula (Wang et al, 2012; Legati et al, 2015). Nosso grupo tem liderado este processo e

participou da descoberta de 4 dos 6 genes ligados às calcificações cerebrais primárias. Nesse trabalho, especificamente, buscamos através de uma análise de bioinformática, elucidar questões básicas, fundamentais, a respeito do comportamento dos pericitos e de determinados genes em um ambiente de calcificação vascular. Pesquisas em bancos de dados visam acelerar a pesquisa em todo o mundo por meio de lançamentos públicos de novos dados, conhecimento e ferramentas, e está vinculado a ferramentas de bioinformática. Portanto, tendo em vista isso, a análise do padrão de expressão dos genes MYORG e JAM2 poderá ser um importante diferencial na compreensão da susceptibilidade que algumas estruturas possuem para formar calcificações vasculares cerebrais e suas repercussões clínicas. Visto que as técnicas atuais usadas para estudar os pericitos no cérebro e os avanços da pesquisa atual, visam caracterizá-los e possivelmente ter como alvo terapêutico os pericitos no futuro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar através de um banco de dados: *Vascular Single Cells (Betsholtzlab)* e através do Atlas de vasculatura de *Mus musculus*, o padrão de expressão de genes ligados a calcificação vascular cerebral.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar através do Atlas de vasculatura de *Mus musculus*, o padrão de expressão dos genes *SLC20A2*, *PDGFR β* , *PDGF β* , *XPR1*, *MYORG* e *JAM2*, ligados a calcificação vascular cerebral.

- Avaliar através do banco de dados *Vascular Single Cells (Betsholtzlab)* a expressão gênica em células únicas vasculares.

- Avaliar a expressão de dois genes envolvidos com a calcificação vascular cerebral quando apresentam variantes em homozigose: *JAM2* e *MYORG*, no *Vascular Single Cells (Betsholtzlab)*.

- Criar um modelo de distribuição da expressão gênica dos genes *MYORG* e *JAM2* nas células vasculares: Pericitos, Células Musculares Lisas, Microglia; Fibroblastos, Oligodendrócitos, Células Endoteliais e Astrócitos.

- Comparar o modelo de distribuição da expressão gênica dos genes *MYORG* e *JAM2* nas células vasculares, com os genes *SLC20A2*, *PDGFR β* , *PDGF β* e *XPR1*, no *Vascular Single Cells (Betsholtzlab)*.

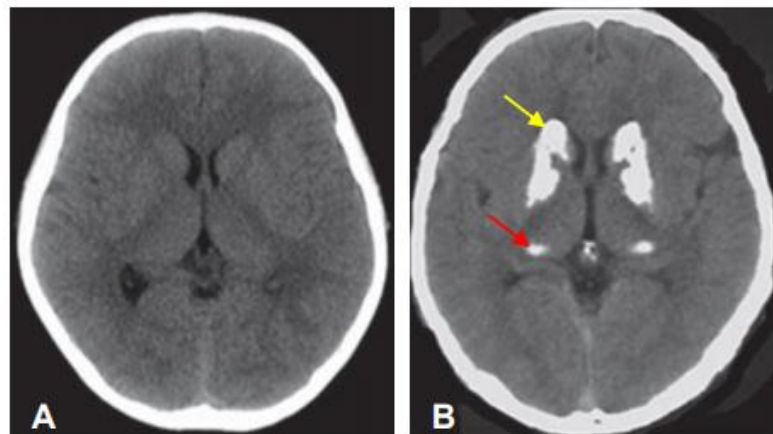
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Calcificação cerebral

É uma doença neurológica degenerativa, pouco comum, que pode ser hereditária ou esporádica. Manifesta-se igualmente em ambos os sexos e em qualquer idade, sendo mais frequente na quarta década de vida e caracteriza-se pela presença de depósitos anormais de cálcio no cérebro, associada a perda de massa celular, conforme podemos observar na Figura 1 (MALHEIRO, 2017; BATLA et al., 2017; CEN et al., 2020).

Figura 1 - Padrão de distribuição da calcificação. **A.** Tomografia Computadorizada (TC) do cérebro de indivíduo normal; ausência de calcificações. **B.** Calcificação simétrica e bilateral nos gânglios da base (seta amarela) e no tálamo (seta vermelha)

Fonte: WANG et al., 2012



As calcificações se formam lentamente e podem ser assintomáticas por vários anos. A idade de início é tipicamente entre 30 e 60 anos, mas já foram descritas manifestações clínicas em crianças, de forma esporádica mas também com padrão de herança dominante e recessivo. Há décadas se relatam casos isolados e familiares de calcificações cerebrais e desde 2012 foram identificados

quatro genes associados a esta forma de calcificação, sendo eles: SLC20A2, PDGFRB, PDGFB e XPR1. A calcificação ectópica ou ossificação heterotópica, é caracterizada como a biomineralização inadequada de tecidos moles, consequentemente acarreta em danos *per se* (LI; UITTO, 2018). São vários os fatores que contribuem para essa condição, como infecções, traumas, alterações metabólicas e genéticas. Dentre os tecidos moles suscetíveis a esse processo, os mais afetados são: coração, vasos, pulmão, rim e cérebro (LEMOS et al., 2013). São formados tipicamente por sais de fosfato de cálcio, incluindo a hidroxiapatita como principal componente, além de possuir também zinco, ferro e magnésio na sua composição (GIACHELLI, 1999; SCANNAPIECO et al., 2020).

Seu quadro clínico é bastante variável. Pode apresentar-se desde a forma assintomática, até à conjugação de diversos sintomas neurológicos, que incluem deterioração da função cognitiva (demência), alterações motoras, alteração da linguagem, convulsões, cefaleias, aumento da rigidez muscular. Outros sintomas descritos são lentificação dos movimentos de escrita e manifestações extrapiramidais como parkinsonismo, distonia e tiques (RUSSELL, 2011). Em alguns casos também, os pacientes podem apresentar enxaqueca ou convulsões (QUINTANS; OLIVEIRA; SOBRIDO, 2018; CEN et al., 2020).

O padrão de distribuição e a maneira como as calcificações se apresentam são diversos, mas, de maneira geral, ocorrem bilateralmente e usualmente são identificadas nos gânglios da base, cerebelo, tálamo e tronco encefálico (DENG; ZHENG; JANKOVIC, 2015; LEMOS et al., 2013; BALCK et al., 2021). As calcificações nos vasos cerebrais foram relatados inicialmente em 1855, há relatos de uma mulher que tinha retardo mental e convulsões (BAMBERG, 1855). Na calcificação cerebral a deposição de minerais ocorre tanto na parede dos vasos como no parênquima cerebral, causando neurodegeneração e gliose (LEMOS et al., 2013; SCANNAPIECO et al., 2020).

Junto com a heterogeneidade genética, a Calcificação Cerebral Familiar Primária, exibe uma ampla gama de fenótipos neurorradiológicos e clínicos. Embora calcificações pareçam surgir inevitavelmente em todos os portadores de mutação adultos, a manifestação clínica varia de cefaleia a diversos sintomas / sinais neurológicos ou psiquiátricos ou pode estar totalmente ausente. Em outras

palavras, as variantes patogênicas segregam perfeitamente com os achados de imagem (paraclínicos) enquanto exibem penetrância reduzida em relação ao fenótipo clínico (BALCK et al., 2021).

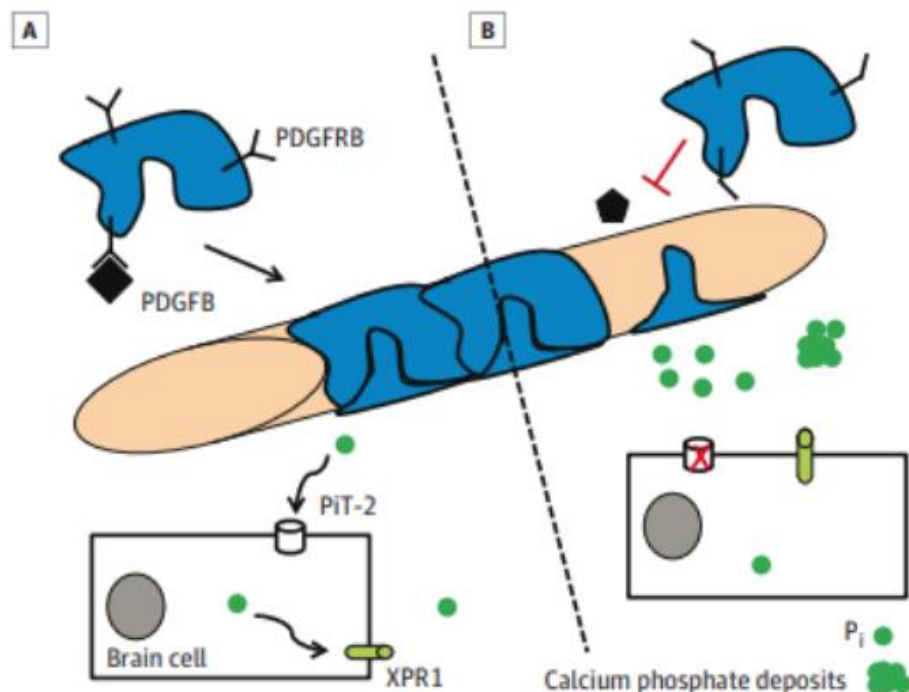
3.2 Genética e calcificação vascular

De acordo com Sobrido et al. (2013) os mecanismos que davam início as calcificações aconteciam em indivíduos sem qualquer distúrbio bioquímico, elencando o termo “idiopático”, porém deixou de ser utilizado após a descoberta do primeiro gene associado a doença, quando então se propôs o termo “calcificação cerebral familiar primária” (CCFP). O termo “primário” remete a origem genética das calcificações (LEMOS et al., 2015). Na tentativa de elucidar quais alterações acarretavam nesse distúrbio e sinais e sintomas consequentes, estudiosos das diferentes regiões do mundo buscaram alternativas, e foram então identificadas variações em cinco diferentes genes como causa da desordem, sendo quatro com padrão de herança autossômico dominante: *SLC20A2*, *PDGFR β* , *PDGF β* e *XPR1* (Figura 2 – principais genes relacionados a PFBC). Em 2018, foram identificadas variantes no gene *MYORG* (YAO et al., 2018), que diferente dos outros, por possuir um padrão de herança autossômico recessivo.

Na maioria dos relatos de CCFP hereditárias, observa-se um padrão de segregação autossômico dominante. No entanto, existem casos raros reportados com modelo recessivo, apesar de não serem bem definidos, analisados com base na presença de cruzamentos consanguíneos (YAO et al., 2018).

Figura 2 - Função dos principais genes relacionados à CCFP. **A**, Em condições fisiológicas, as células endoteliais secretam PDGFB que se liga ao receptor β de PDGF (PDGFRB) em pericitos. Este processo é necessário para o recrutamento de pericitos e correta proliferação e migração ao longo dos vasos sanguíneos. O Fósforo inorgânico (Pi) não é absorvido pelo *Pitransporter 2* (PiT-2). No cérebro, Pi é secretado por meio do XPR1. **B**, em condições patológicas, o ligante ou receptor de PDGF perde sua função normal, levando à disfunção do pericito e uma alteração na barreira hematoencefálica. O Pi se acumula no parênquima cerebral devido à sua reduzida absorção pelo PiT-2. O mecanismo de doença proposto de XPR1 mutado ainda não foi publicado em detalhes. No entanto, o mecanismo foi encontrado para reduzir o efluxo de fósforo das células.

Fonte: Adaptado de Tadic et al. 2015



Dos quatro genes com padrão de herança autossômico dominante, dois são relacionados com a homeostase do fósforo inorgânico (Pi), o *SLC20A1*, que codifica um importador de Pi para dentro das células e o *XPR1*, que codifica uma proteína que exporta o Pi para fora das células. Já o *PDGFRB* e *PDGFB* estão associados com a integridade da barreira hematoencefálica (BHE) e manutenção dos pericitos. É extremamente recente a ligação do MYORG com a calcificação cerebral familiar primária, permanece pouco estudado e com funções não tão claras, mas sabe-se

que codifica uma proteína transmembrana, de envelope nuclear, que está envolvida na diferenciação de mioblastos e que no cérebro pode regular a glicosilação de proteínas no retículo endoplasmático de astrócitos (YAO et al., 2018).

3.2.1 SLC20A2

Foi o primeiro gene identificado como causador da PFBC e, atribui-se a maior parte dos casos da doença (DENG; ZHENG; JANKOVIC, 2015) cerca de 40% dos casos tem causa genética identificada e existem tanto casos relacionados à herança autossômica dominante e recessiva. O SLC20A2 (Solute Carrier Family 20 Member 2) codifica uma proteína transmembrana (PiT-2, type III sodium-dependent inorganic phosphate transporter) relacionada à manutenção da homeostase do fósforo, mineral importante para diversos processos celulares (GIOVANNINI et al., 2013), é o gene responsável por codificar a proteína PiT-2 que, junto com seu homólogo PiT-1, codificado pelo gene *SLC20A1* (2q13), compreende a família dos transportadores de Pi dependentes de sódio (NaPiTs).

A maioria dos casos hereditários são ligados ao SLC20A2. O gene SLC20A2 e seu homólogo SLC20A1 (PiT1) fazem parte da família tipo III de transportadores de fósforo dependente de sódio, esses dois genes são constitutivamente expressos em vários tecidos, inclusive na glândula tireoide, paratireoide e cérebro. Estudos funcionais do padrão de expressão dos genes SLC20A2 e SLC20A1 nos rins, tireoides e paratireoides, demonstram uma intrínseca relação desses genes com a concentração de fósforo inorgânico (Pi) sendo, PiT1 e PiT2 responsáveis pelo controle da recepção do Pi sob diferentes condições de pH e dieta de Pi (KAVANAUGH & KABAT, 1996; VILLA-BELLOSTA et al., 2009). Atualmente já foram identificadas aproximadamente 50 mutações neste gene associadas ao fenótipo em questão (LEmos et al, 2015). Ele é reportado como o principal elemento do mecanismo patológico da Doença de Fahr, visto que, sua perda funcional está relacionada com o acúmulo de fósforo inorgânico (Pi) na matriz extracelular, causando, assim, a deposição de fósforo de cálcio. Os transportadores foram localizados imunohistoquimicamente em astrócitos, neurônios e células vasculares

endoteliais, sugerindo um papel fundamental na manutenção dos níveis de Pi celular no cérebro. Desde 2012, diversas variantes no gene *SLC20A2* tem sido encontradas em pacientes com PFBC, o que causa perda da função da proteína PiT-2, e impacta diretamente no transporte de Pi, um dos principais mecanismos subjacentes a doença (HSU et al., 2013; WANG et al., 2012).

Além de alterações pontuais, variações no número de cópia como duplicações e grandes deleções cromossômicas envolvendo todo o gene *SLC20A2* ou parte dele, também foram relatadas em famílias com membros afetados pelas CCFP (PASANEN et al., 2016). Modelos animais knock-out demonstraram que o silenciamento do *SLC20A2* foi capaz de replicar os achados patológicos observados nos pacientes, revelando extensas áreas de calcificações nos gânglios basais, no tálamo, cerebelo e córtex (WALLINGFORD et al., 2017). Ademais, também foi relatado o impacto da deficiência do *SLC20A2* acarretando no aumento dos níveis de Pi no líquido cefalorraquidiano (CSF – cerebrospinal fluid), apoiando a ideia de que a PiT2 atuaria no transporte do fosfato presente no CSF para o sangue (JENSEN, AUTZEN E PEDERSEN, 2016). Modelos *in vitro* revelaram, ainda, que algumas variantes patogênicas identificadas no *SLC20A2* podem exercer uma função dominante-negativa na proteína selvagem e acarretar no comprometimento do influxo de fosfato, levando à deposição mineral no meio extracelular (LARSEN et al., 2017). Estudos com amostras de sangue periférico de pessoas afetadas pelas CCFP, revelaram alterações no perfil de expressão do gene diante da presença de diferentes tipos de mutações patogênicas (ZHANG; GUO; WU, 2013).

3.2.2 PDGFR β e PDGF β

Os genes *PDGFB* (*Platelet Derived Growth Factor subunit Beta*) e *PDGFRB* (*Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta*) foram relacionados à doença, também com padrão de herança autossômica dominante (KELLER et al., 2013). Estes genes, que codificam, respectivamente, o fator de crescimento derivado de

plaqueta beta e seu receptor, aparentam atuar sobre a integridade e permeabilidade da barreira hemato-encefálica (MOURA; LEMOS; OLIVEIRA, 2017).

Os PDGFs incluem uma família de mitógenos para células do tecido conjuntivo, tais como células do músculo liso, fibroblastos e células da glia (LEVÉEN et al., 1994). Além do crescimento, os efeitos celulares dos PDGFs incluem quimiotaxia, diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário, e modulação de outras funções celulares, como a produção de componentes da matriz extracelular, vasoconstrição e fator neuroprotetor no sistema nervoso central (SNC) (ZHAO et al., 2013).

Os genes PDGFB e PDGFRB, responsáveis pela codificação de um membro da família do fator de crescimento derivado de plaqueta e seu receptor, respectivamente, sugerem que várias vias podem acarretar em fenótipos semelhantes (KELLER ET AL., 2013). As mutações no sistema PDGFB –PDGFRB (crucial para a manutenção da barreira hemato-encefálica) sugerem que o comprometimento dos pericitos pode também estar por trás da formação das calcificações.

Claramente, um papel fundamental do PDGF β no SNC é a formação e manutenção de pericitos, que interferem diretamente na morfogênese dos vasos sanguíneos e, seu consequente prejuízo, desencadeia a formação de calcificações cerebrais em regiões específicas (BETSHOLTZ; KELLER, 2014). Ainda não se sabe como o comprometimento da BHE pode levar ao fenótipo de calcificação e a razão para o padrão desenvolvido em camundongos e humanos ser simétrico e bilateral.

O gene PDGFR β (5q32) codifica uma proteína receptora de tirosina quinase presente na membrana celular e é expresso em células neuronais, células vasculares da musculatura lisa, pericitos, plexo coroide, núcleo dentado e gânglios da base do cérebro humano. A via celular envolvendo os genes PDGF β (22q13.1) e seu receptor desempenha função importante no processo de angiogênese, recrutamentos de pericitos e na manutenção da integridade da barreira hematoencefálica (BBB - blood brain barrier). Mutações de perda de função nesses dois genes comprometem a permeabilidade da BBB e podem ocasionar, potencialmente, calcificações vasculares e na região perivascular do cérebro. Camundongos hipomórficos para o gene PDGF β também reproduziram os

fenômenos observados em pacientes, desenvolvendo progressivos processos de calcinose devido à deficiência de pericitos na proteção da BBB (KELLER et al., 2013; NAKAMURA, ARIMURA E NISHIMURA, 2016).

4.2.3 *XPR1*

Em 2015, o *XPR1* (*Xenotropic and Polytopic Retrovirus Receptor 1*) foi o quarto gene a ser relacionado à CCFP, afetando cerca de 2% dos pacientes (LEGATI et al., 2015; RAMOS et al., 2017). Através de modelos celulares, a função do *XPR1* foi esclarecida, de modo que a proteína atua na exportação celular de fosfato inorgânico, de maneira oposta ao *PiT-2*, contribuindo para a manutenção da homeostase do fosfato (ANHEIM et al., 2016; GIOVANNINI et al., 2013). Além disso, estudos avaliando a expressão de mRNA do *XPR1* em modelos animais mostraram maior expressão do gene em áreas cerebrais comumente afetadas na CCFP, assim como interação desta proteína com o *PDGFRB* (YAO et al., 2017).

As variantes do gene *XPR*, de caráter autossômico recessivo, foram encontradas em famílias com CCFP sem alterações nos genes *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ*. Os indivíduos apresentavam demência, comprometimento da fala, coréia e marcha instável. Notava-se extensas calcificações nos GB além de córtex ou cerebelo, nos exames realizados. Estudos funcionais mostraram que variantes no *XPR1* alteravam sua localização na membrana celular e/ou diminuía significativamente sua função de exportar o Pi (ANHEIM et al., 2016; LEGATI et al., 2015). Com a função de exportação prejudicada, é comum o acúmulo de Pi dentro da célula, o que pode contribuir negativamente para a formação de cristais de hidroxiapatita.

De acordo com Giovannini et al., (2013), os efeitos funcionais da depleção do gene *XPR1* se refletem na a exportação prejudicada de fosfato do citoplasma para o meio extracelular enquanto a perda de função do *PDGFRβ* causa danos à BHE. O gene *XPR1* codifica uma proteína transmembrana identificada em células de mamíferos como o receptor retroviral de vírus xenotrópico e politrópico de

murinos. A função da proteína codificada pelo XPR1 é bastante conservada evolutivamente e envolve a homeostase de fosfato celular, mediando sua exportação do citoplasma para o meio extracelular. Mutações ligadas às CCFP relatadas nesse gene são herdadas sob um caráter autossômico dominante e localizam-se no domínio regulatório da proteína, inibindo a exportação do Pi e alterando a expressão proteica na superfície celular (ANHEIM et al., 2016; LEGATI et al., 2015).

3.3 Unidade Neurovascular (NVU)

A barreira hematoencefálica (BHE) ajuda a manter um microambiente rigidamente regulado para homeostase ideal do sistema nervoso central (SNC) e facilita as comunicações com a circulação periférica. As células endoteliais do cérebro, que revestem a vasculatura do cérebro, mantêm interações próximas com as células cerebrais circundantes, por exemplo, astrócitos, periquitos e macrófagos perivascularres. Esta função facilita a comunicação intercelular, dando origem ao conceito de unidade neurovascular (NVU). A comunicação entre todos os componentes da NVU é essencial para a homeostase, a desregulação de um de seus constituintes pode resultar em doença. Entre as diferentes regiões do cérebro, e ao longo da árvore vascular, a composição da NVU varia. Portanto, os sinais diferenciais do sistema vascular imediato ambiente pode afetar o fenótipo da BHE. Para apoiar a flutuação metabólica e necessidades funcionais, uma heterogeneidade vascular especializada é necessária, e é conseguida por variações na função da barreira, expressão de transportadores, receptores e moléculas de adesão (VILLABONA-RUEDA et al., 2019).

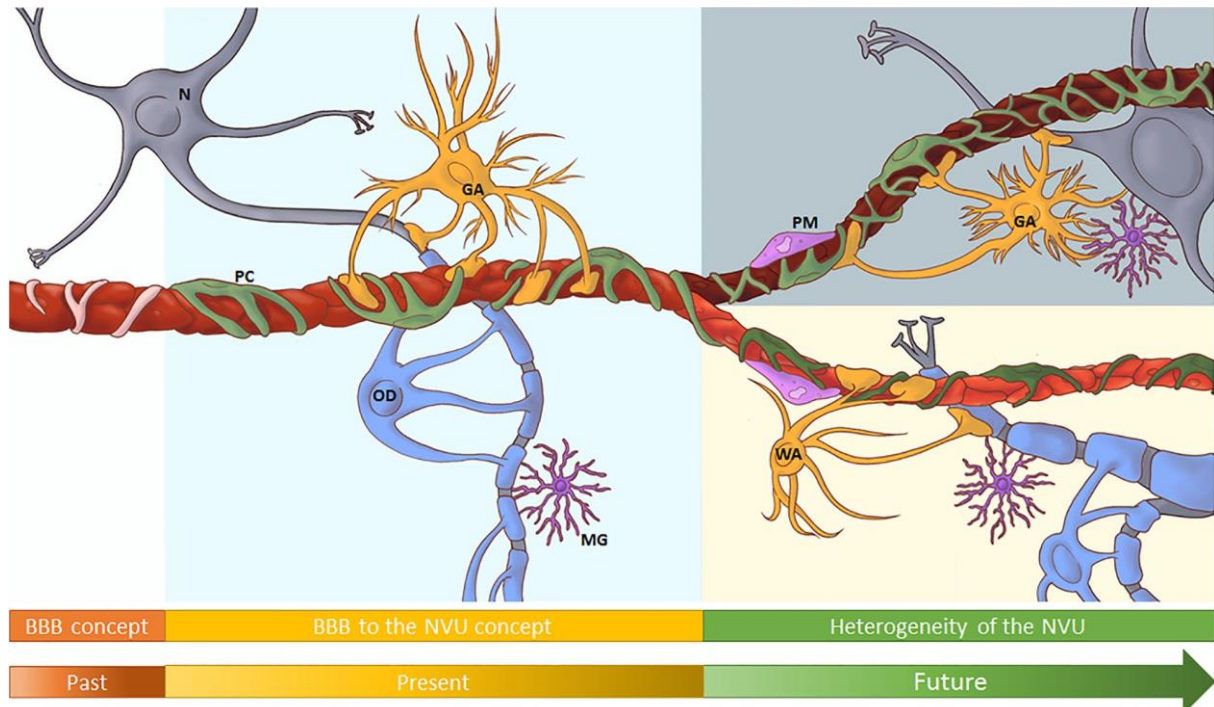
A regulação neural da microcirculação é realizada pela unidade neurovascular (NVU) funcional, é uma unidade morfo-funcional, composta por células vasculares, astrogliais e neuronais, que representa a interface entre o sistema nervoso central e o sistema vascular. Além de sua função de barreira, tem papéis importantes na regulação da entrada de substratos e saída de resíduos, bem como na regulação da

microcirculação local (TAKANO et al., 2006). A BHE não é uma estrutura anatômica única isolada, mas faz parte da chamada unidade neurovascular (NVU), essa unidade, circunda a astroglia perivascular, células da microglia e terminais neuronais intervenientes (OBERMEIER et al., 2013). A heterogeneidade das células da unidade neurovascular contribui para uma heterogeneidade vascular significativa do endotélio da barreira hematoencefálica em diferentes regiões do cérebro, como a substância branca e a substância cinzenta, como podemos observar na Figura 3 (VILLABONA-RUEDA et al., 2019).

Ainda de acordo com Villabona-Rueda et al., (2019), experimentos de transplante de células e exclusão de azul de tripano confirmaram que os astrócitos contribuíram para o fenótipo da BBB e estudos subsequentes mostraram que a sinalização derivada de astrócitos para células endoteliais cerebrais (CECs) levando ao aumento da expressão de junções estreitas. Além disso, os astrócitos regulam a expressão de fosfatase alcalina e Na-ATPase em CECs via cAMP e IL6, sugerindo que os astrócitos regulam a homeostase iônica; em conjunto, o reconhecimento da contribuição da comunicação intercelular entre astrócitos, pericitos e neurônios para o fenótipo específico das CECs levou à reformulação do conceito de NVU. Este modelo enfatiza a manutenção da homeostase do SNC por meio da comunicação multidimensional, contínua e recíproca entre todos os membros da NVU por meio de contatos físicos e / ou liberação de mediadores de sinalização. Portanto, a desregulação de um dos componentes da NVU pode levar à “neuro-doença”.

Figura 3. Evolução histórica da Unidade Neurovascular. N: neurônio; GM-A, astrócito de substância cinzenta; WM-A, astrócito de substância branca; OD: oligodendrócito; PC, pericito; PM, macrófago perivascular

Fonte: Adaptada de Villabona-Rueda et al. (2019)



As células endoteliais possuem função central para a BHE da NVU, são marcadamente diferentes de outros endotélios no corpo, pois exibem junções estreitas interendoteliais (TJs) organizadas em uma extensa variedade de filamentos juncionais; uma rede de ligações proteína-proteína transmembranares próximas que, juntamente com junções aderentes e moléculas de adesão juncional, impedem essencialmente que pequenas moléculas e células invasoras passem pela parede do vaso por uma via paracelular (CHOW; GU, 2015). Várias proteínas diferentes estão envolvidas na formação de TJs na vasculatura cerebral, mas duas das mais importantes são as moléculas *occludin* e *claudin-5*, que formam pontes homodiméricas que ligam as células vizinhas (HASELOFF et al., 2015). Essas moléculas, por sua vez, são complexas com uma série de elementos intracelulares, que se acoplam ao citoesqueleto de actina e ajudam a dar rigidez às junções (TIET; ENGELHARDT, 2015).

Diferenças na morfologia, conteúdo celular e densidade microvascular foram observadas entre as diferentes regiões do cérebro e são especialmente aparentes na substância branca (SB) *versus* substância cinzenta (SC). Historicamente, as classificações astrogliais foram baseadas em sua morfologia e posição anatômica; como é o caso de “astrócitos fibrosos” com processos longos em SB e mais “astrócitos protoplasmáticos” em forma de estrela em SC. No entanto, os astrócitos têm extensas diferenças funcionais, conforme indicado pela expressão diferencial de transportadores, incluindo transportadores de glutamato e subtipos de GLUT-1 (VILLABONA-RUEDA et al., 2019).

As necessidades fisiológicas / metabólicas do meio neural altamente ativo estão em fluxo constante. As demandas de troca de nutrientes, solutos, água e oxigênio são transmitidas por meio de pistas para a microvasculatura do cérebro. Como citado acima, há uma grande diversidade na composição celular da NVU, que inclui uma heterogeneidade significativa de astrócitos, pericitos e oligodendrócitos em diferentes áreas do cérebro. Levando em consideração as interações recíprocas dessas células cerebrais dentro da NVU e as diferentes necessidades metabólicas e diferenças no fluxo sanguíneo / tensão de cisalhamento, o fenótipo microvascular que diferem entre as diferentes regiões do cérebro, especialmente entre as regiões da substância branca e a substância cinzenta (VILLABONA-RUEDA et al., 2019). Caracterizar e compreender as implicações da heterogeneidade regional da microvasculatura cerebral na saúde e na doença é uma nova fronteira para a pesquisa vascular cerebral

3.4 Pericitos e calcificação vascular

Os pericitos foram identificados pela primeira vez no final do século 19 por Eberth, depois Rouget, como células isoladas espacialmente associadas à parede capilar (ATTWELL et al., 2016). Eles foram encontrados embutidos na membrana basal, tanto em seções retas quanto em pontos de ramificação dos capilares, com projeções que se estendem do soma para envolver o vaso subjacente. Na década de 1920, Zimmerman chamou essas células de pericitos, afirmando que incluiu

várias morfologias celulares sob essa definição, incluindo suas formas de transição para células do músculo liso vascular (VSMC) na extremidade arteriolar. Os pericitos são células perivasculares ao longo dos capilares, essenciais para o desenvolvimento de um leito vascular funcional no sistema nervoso central e em outros órgãos. As funções dos pericitos no cérebro adulto são menos compreendidas. Os pericitos têm sido sugeridos para mediar a hiperemia funcional no nível capilar, regular a barreira hematoencefálica e dar origem a tecido cicatricial após lesão da medula espinhal (WINKLER et al., 2011; ZARB, FRANZOSO, KELLER, 2019).

Além das células endoteliais, a BHE é composta pela matriz extracelular, astrócitos, neurônios, microglia e pericitos. A interação entre essas células é conhecida como unidade neurovascular. As células endoteliais são circundadas por lâmina basal e endoplasto perivascular astrocítico. Os astrócitos fornecem a ligação celular aos neurônios (ABBOTT et al. 2006; ARMULIK et al. 2010).

Os pericitos estendem longos processos citoplasmáticos na superfície das células endoteliais, fazendo contatos interdigitantes. As células endoteliais e os pericitos são separados pela membrana basal e, nos pontos de contato, o pericito se comunica diretamente com as células endoteliais por meio de contatos "*peg e socket*" (ALLT; LAWRENSON, 2001); interação com astrócitos regulando a proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais (ARMULIK et al. 2010). Atuam na estabilização física dos vasos, na regulação da microcirculação e no fluxo sanguíneo capilar. Eles afetam a coagulação do sangue e a função imunológica, e podem regular a ativação de linfócitos, participar da angiogênese e da vasculogênese (BIRBRAIR et al. 2015).

Tem-se determinado em estudos *in vivo* que as interações de pericitos com as células endoteliais são críticos para regular a BHE e a ruptura dessas interações pode levar a disfunção desta barreira e a neuroinflamação (DANEMAN et al., 2010). Além disso, estudos *in vitro* demonstram que os pericitos expressam moléculas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEFG) e metaloproteinases de matriz (MMPs) que regulam a integridade da BHE (THANABALASUNDARAM et al., 2010).

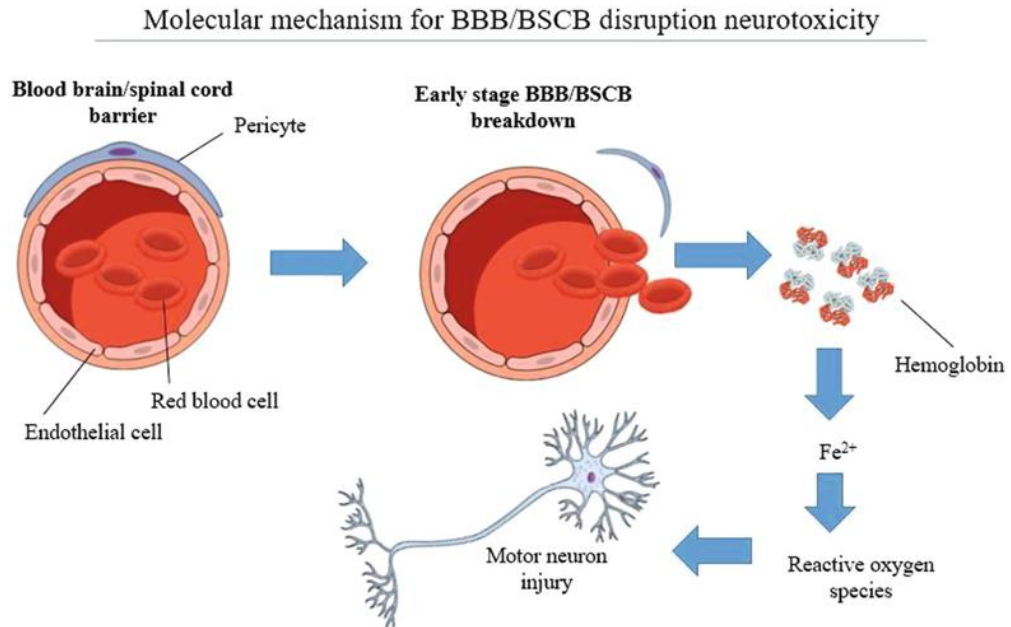
Em algumas doenças neurodegenerativas, a degradação da BHE permite que os componentes do sangue se infiltrem no ambiente neuronal, agravando a

inflamação existente e acelerando a progressão dos sintomas (WINKLER et al. 2011) (Figura 4). Disfunções dos pericitos são cada vez mais reconhecidas como contribuintes para a progressão de doenças vasculares, como acidente vascular cerebral e doenças neurodegenerativas (Figura 3). O potencial terapêutico dos pericitos para reparar os vasos sanguíneos cerebrais e promover a angiogênese, devido à sua capacidade de se comportar como células-tronco, foi recentemente revelado. Os pericitos são centrais para a função NVU, pois estão localizados na interface entre o parênquima cerebral e os vasos sanguíneos e, portanto, podem atuar como sensores químicos para permitir a comunicação entre os dois grupos de células (LACHLAM et al., 2019).

O BHE é uma barreira de difusão vital para evitar que material tóxico da circulação entre no cérebro. A função da BBB depende de EC não fenestrados que formam a parede do vaso sanguíneo e é sustentada por pericitos e astrócitos. Os pericitos podem modular e manter a BBB por meio da liberação de fatores de sinalização para determinar o número de junções estreitas EC e direcionar a polarização dos pés finais dos astrócitos. Uma redução no número de pericitos pode causar uma perda de junções estreitas entre CE, levando ao aumento da permeabilidade BBB. Além disso, os pericitos podem controlar o movimento de substâncias entre a corrente sanguínea e o parênquima cerebral, incluindo a depuração vascular de espécies tóxicas para fora do cérebro (LACHLAM et al., 2019).

Figura 4. Mecanismo molecular de toxicidade neuronal após interrupção da BHE. “Vazamento” das células vermelhas do sangue para o microambiente neuronal e lisam, liberando a hemoglobina, após a perda de pericito e a degradação da BHE, consequentemente a hemoglobina libera ferro livre, que pode catalisar a formação de espécies de radicais livres, moléculas tóxicas para os neurônios motores.

Adaptado de Coatti, Cavaçana e Zatz, (2019).



Embora as células endoteliais sejam tipicamente orientadas longitudinalmente na direção do fluxo sanguíneo, em todos os vasos, as células que revestem os microvasos são achatadas e alongadas, ao passo que o revestimento dos grandes vasos é poligonal, embora ambos os tipos de células tenham sido encontrados ao mesmo tempo (YUAN & RIGOR, 2010).

Coatti, Cavaçana e Zatz (2019) citam que a Esclerose Lateral Amiotrófica acarreta condições nas quais a densidade microvascular estava aumentada, a cobertura de pericitos estava diminuída e que havia angiogênese anormal na medula espinhal post-mortem. A perda de pericito pode ter influenciado essas anormalidades (YAMADERA et al. 2015).

Recentes mutações de perda de função nos genes PDGFB e PDGFRB implicaram os pericitos como o principal tipo de célula afetada na calcificação cerebral familiar primária (PFBC), um transtorno neuropsiquiátrico com herança

dominante, a expressão de Ai464131 (MYORG), *Xpr1*, *Slc20a2*, *Pdgfb* e *Pdgfrb* no nível de RNA em diferentes tipos de células e tecidos em camundongos pode ser observada na Figura 5 e Figura 6 (ZARB, FRANZOSO, KELLER, 2019).

Figura 5. Seções sagitais do cérebro de camundongos machos em P56. Crédito da imagem: Instituto Allen. As imagens estão disponíveis no site: <http://mouse.brain-map.org/>. A barra de escala é 2098 μ m. As figuras ampliadas representam o córtex (forro vermelho), plexo coróide (forro azul), mesencéfalo (forro verde). A barra de escala é 839 μ m.

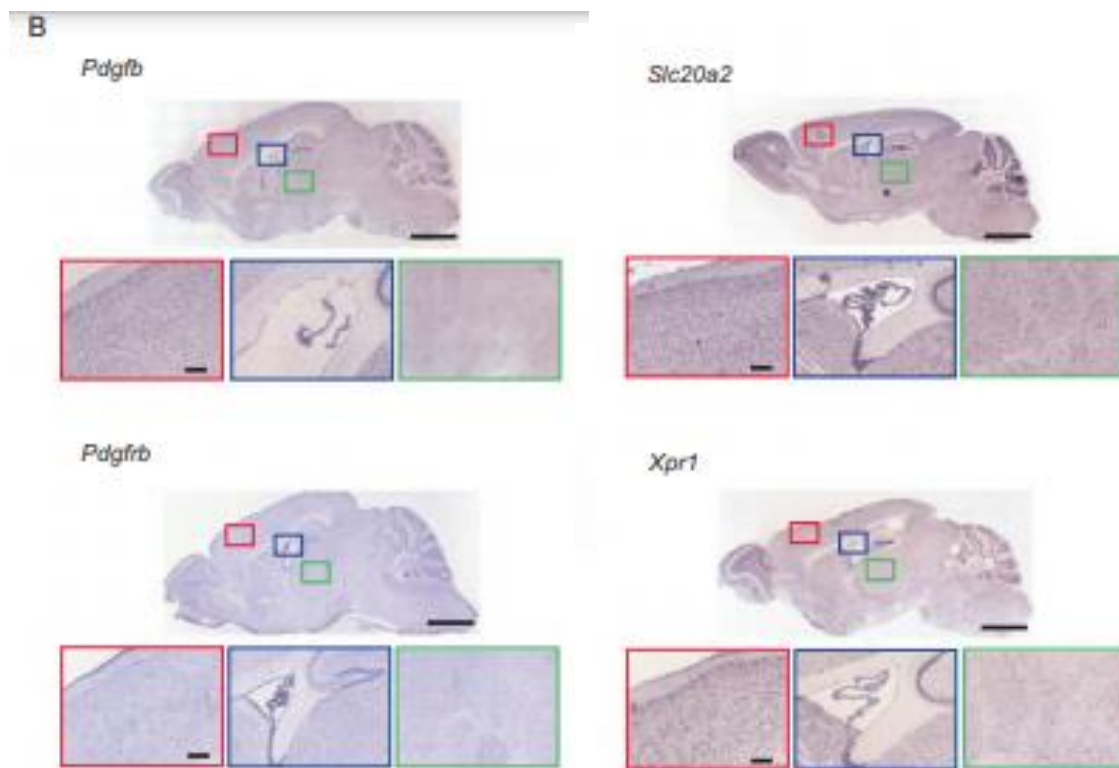
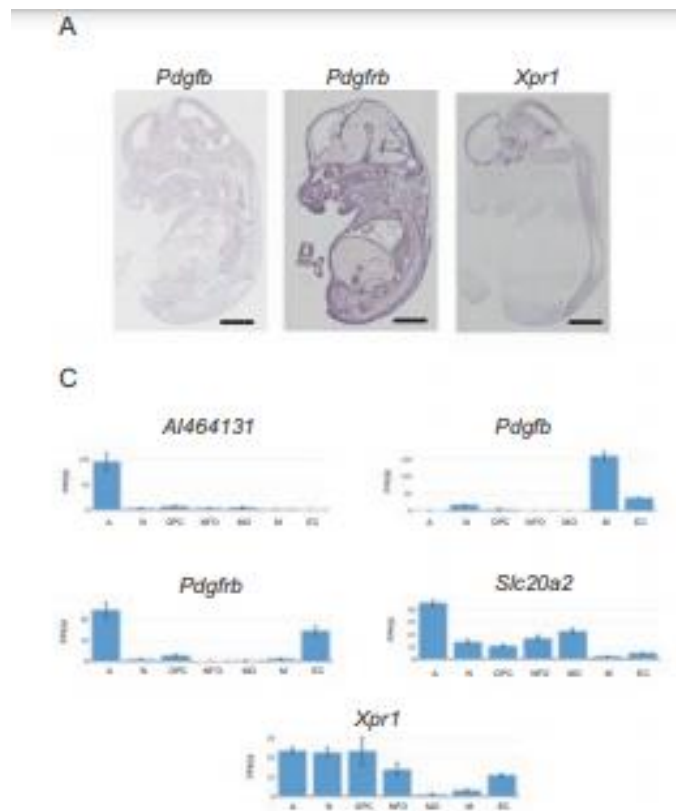


Figura 6. Expressão de Ai464131 (MYORG), *Xpr1*, *Slc20a2*, *Pdgfb* e *Pdgfrb* no nível de RNA em diferentes tipos de células e tecidos em camundongos. **A.** Seções sagitais de embriões de camundongo no dia 14,5 (espessura da seção 20 µm e distância entre seções de 100 µm). Barra de escala 400 µm. As imagens foram retiradas do banco de dados público GenePaint disponível no site: <http://www.genepaint.org> e descritas em (Visel et al. 2004). **C.** RNAseq de diferentes tipos de células (A - astrócito, N - neurônio, OPC - célula progenitora de oligodendrócito, NFO - oligodendrócito recém-formado, MO - oligodendrócito mielinizante, M –microglia / macrófago, EC - célula endotelial) isolado de cérebros de camundongo. Os dados foram retirados de www.brainrnaseq.org (Zhang et al. 2014).

Fonte: Adaptada de Zarb, Franzoso e Keller (2019)



Foi demonstrado que os pericitos sob condições de estresse podem secretar MMP-9, levando à fragilidade vascular (Bell et al. 2012). O nível de redução do pericito correlaciona-se com a magnitude do dano, em relação ao modelo animal, os camundongos SOD1 apresentam infiltração espontânea de eritrócitos devido à quebra espontânea da BHE, o que antecipa sintomas motores e perda neuronal (MIYAZAKI et al. al., 2011).

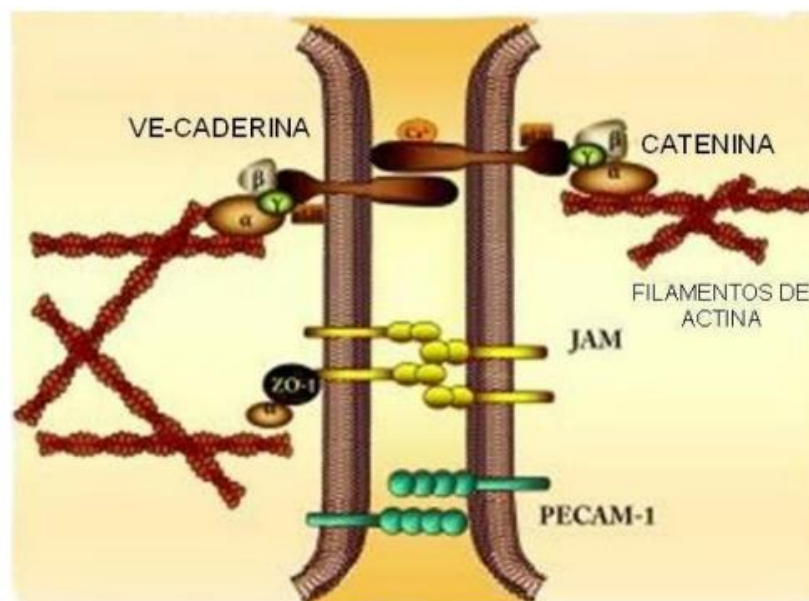
3.4 JAM 2

A molécula de adesão juncional (JAM), outra proteína integral de membrana, está envolvida na adesão intercelular entre as células das barreiras, bem como na adesão entre as barreiras e as células do sistema imunológico. Proteínas JAM são membros da superfamília de imunoglobulinas e são compostas por JAM-1, JAM-2 e JAM-3. Ambas as proteínas JAM-2 e JAM-3 controlam a transmigração de leucócitos, outro importante aspecto das funções da barreira (OGASAWARA et. al., 2009).

As proteínas transmembrana das junções são frequentemente agrupadas de acordo com o número de vezes que abrangem a membrana plasmática: JAM é uma proteína transmembrana de passagem única, enquanto ocludinas, claudinas, tricelulinas (TRIC) e marvelD3 são proteínas de passagem quádrupla, figura 7 (CARDOSO et al., 2010).

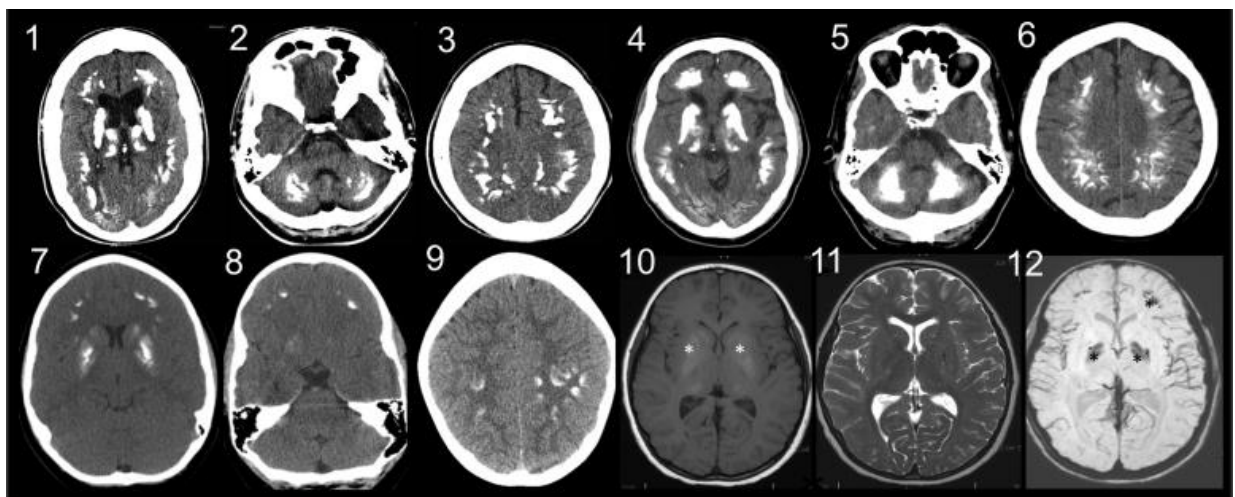
Figura 7. Representação esquemática das junções de aderência (JA). VE-caderina é estabilizada por íons de cálcio e por conexões intracelulares para o citoesqueleto de actina: α -, β -, γ e p120-catenina conectam a VE-caderina aos microfilamentos de actina. Proteínas de outras junções, como JAM e PECAM-1, contribuem para estruturar a JA.

Fonte: YUAN & RIGOR, 2010.



O JAM2 causa CCFP de maneira autossômica recessiva, de modo que poucos relatos de caso envolvendo esse gene estão presentes na literatura (CEN et al., 2019) (Figura 8). Até o momento, entretanto, nenhum estudo específico sobre o papel deste gene na formação das calcificações cerebrais foi publicado, já que este é o gene cuja relação à CCFP foi identificada mais recentemente (SCHOTTLAENDER et al., 2020). O JAM2 codifica uma proteína essencial para a formação de zonas de oclusão, apresentado elevada expressão em astrócitos e células endoteliais (CEN et al., 2019). Devido à sua função e localização na membrana plasmática, estudos sugerem que o JAM2 possua papel importante na manutenção das adesões célula-célula e, conseqüentemente, na funcionalidade na NVU (CEN et al., 2019; SCHOTTLAENDER et al., 2020). Desse modo, a NVU como um todo parece estar envolvida no desenvolvimento das calcificações cerebrais, de modo que atenção deve ser dada não só à BHE mas também a astrócitos e células endoteliais (MARINHO; DE OLIVEIRA, 2021).

Figura 8. Imagens cerebrais da doença relacionada com JAM2. B1 a B3 são tomografias adquiridas do sujeito do caso F1-II: 2 da família 1 e B4 a B6 são tomografias adquiridas do sujeito do caso F2-III: 3 da família 2. Nos dois indivíduos, existe uma calcificação extensiva, simétrica e bilateral envolvendo a gânglios da base, substância cinzenta cortical profunda e cerebelo. B7, 8 e 9 são CT do caso F3-II: 1 demonstrando calcificação nos gânglios da base e giros corticais, mas não no cerebelo. B10, 11 e 12 são exames de ressonância magnética axial do indivíduo F3-II: 1 da família 3 mostrando gânglios basais e calcificação frontal (B10 é T1, B11 é T2 e B12 é reconstrução axial Ven Bold, sensível ao cálcio mostradas como regiões hipointensas). Áreas de asterisco (*) de calcificação na RM. [adaptada].



3.5 MYORG

Já em relação a casos de CCFP causada por herança autossômica recessiva, o gene que mais merece destaque é o MYORG (*Myogenesis Regulating Glycosidase*), correlacionado à doença apenas em 2018 mas já considerado como um dos principais genes relacionados à doença. Com a descoberta da relação do MYORG, a tendência é que em muitos indivíduos que não foram identificadas variantes entre os quatro genes iniciais, apresentem variantes nesse gene.

O gene MYORG (*myogenesis regulating glycosidase*) está localizado no cromossomo 9p13.3 e possui outras nomenclaturas como NET37 (*nuclear envelope transmembrane proteins*) e KIAA1161 (YAO et al., 2018). Sabe-se que a proteína codificada é transmembrana, de envelope nuclear e que está envolvida na diferenciação de mioblastos (DATTA; GUAN; GERACE, 2009). A proteína é amplamente expressa em quase todos os tecidos humanos, incluindo o cérebro (YAO et al., 2018).

Os mecanismos pelos quais variantes em diferentes genes causam o mesmo padrão de calcificação em áreas específicas, ainda não estão completamente estabelecidos, assim como a base celular da associação do MYORG com a PFBC ainda é incerta, tendo sido identificada por Yao et al. (2018), que logo após, desenvolveram um camundongo KO homozigoto para o referido gene e conseguiram com sucesso mimetizar a doença no animal. Ao analisarem a composição dos nódulos verificaram que eram compostos principalmente por cálcio, fósforo e oxigênio, sugerindo um agregado de fosfato de cálcio, semelhante aos encontrados em humanos e em outros modelos animais. Anteriormente já havia sido demonstrado que a calcificação cerebral apresenta uma deposição de minerais, tanto na parede dos vasos como no parênquima cerebral, causando neurodegeneração e gliose (LEMOS et al., 2013).

Casos de CCFP causada por variantes nesse gene (MYORG-CCFP) já foram descritos tanto em situações de homozigose quanto em casos de heterozigose composta, e até o momento os casos de pelo menos 40 famílias com CCFP já foram relacionadas a este gene (CHEN et al., 2020). Curiosamente, pacientes com MYORG-CCFP parecem apresentar quadro clínico mais severo e de

progressão mais rápida do que pacientes com CCFP causada por outros genes, uma associação que ainda não havia feita em relação a nenhum dos outros genes associado à CCFP.

Assim como visto no MYORG, casos de JAM2-CCFP já foram relatados tanto devido à homozigose quanto à heterozigose composta (SCHOTTLAENDER et al., 2020). Entretanto, e apesar da aparente semelhança clínica entre casos de CCFP causada por variantes no JAM2 e no MYORG, mais relatos de casos de JAM2-CCFP são necessários para detalhar a clínica desses pacientes (CEN et al., 2019; SCHOTTLAENDER et al., 2020).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O *Vascular Single Cells* (Betsholtzlab) é um banco de dados de expressão gênica em células vasculares e perivasculares no cérebro de *mus musculus* adultos. Usando suas ferramentas, referentes a análise da expressão genética de tipos de células e zonação na vasculatura cerebral, para delinear um perfil de expressão para os genes *SLC20A2*, *PDGFR β* , *PDGF β* , *XPR1*, *MYORG* e *JAM2*, foram seguidos os seguintes passos:

4.1 Busca nas bases de dados

Foi realizada uma busca pela expressão individual de cada gene no banco de dados, no link <<http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>>. A ordem de busca seguiu o padrão de herança autossômico dominante: *SLC20A2*, *PDGFR β* , *PDGF β* e *XPR1*. Em seguida, foram buscados os genes *MYORG* e *JAM2*, de padrão de herança autossômico recessiva. Este banco de dados fornece definições moleculares para as principais classes de células vasculares e perivasculares do cérebro de camundongo adulto.

Foram escolhidos os tipos de células cerebrais definidas na coluna “Tipo / Grupo 1”, correspondentes a: PC - Pericitos; SMC - células musculares lisas; MG - Microglia; FB - células vasculares semelhantes a fibroblastos; OL - Oligodendrócitos; CE - células endoteliais; CA - astrócitos; v - venoso; capil - capilar; a - arterial; aa - arteriolar; 1,2,3 – subtipos, conforme podemos observar na Figura 9.

Em seguida, o banco de dados gerou gráficos da expressão gênica em cada célula analisada nesse banco de dados para as células supracitadas. O banco de dados gerou graficamente “*Detailed expression in each cell*” e “*Average expression in each cluster*” (Expressão detalhada em cada célula e Expressão média em cada grupo, respectivamente), para os tecidos do cérebro e pulmões. Os dados referentes ao tecido pulmonar foram descartados e então, a expressão de cada gene “*Average expression in each cluster*” foram analisados.

Figura 9. Layout da base de dados *Vascular Single Cells* (Betsholtzlab). Em 1) ComboBox para busca da expressão gênica na base de dados; em 2) ComboBox para seleção dos tipos celulares a serem buscados.

(1) Search gene expression in vascular single cells

Search with mouse gene symbol to display its expression profile

(2) Identify enriched genes in brain cell type(s)

Choose two cell types/groups and identify the genes enriched in type/group 1
(refresh the web browser to reset all values if needed)

- | Type/Group 1 | Type/Group 2 |
|---|---|
| ☐ Select all | ☐ Select all |
| ☐ Pericytes | ☐ Pericytes |
| ☐ venous SMC | ☐ venous SMC |
| ☐ arteriolar SMC | ☐ arteriolar SMC |
| ☐ arterial SMC | ☐ arterial SMC |
| ☐ Microglia | ☐ Microglia |
| ☐ fibroblast-like type 1 | ☐ fibroblast-like type 1 |
| ☐ fibroblast-like type 2 | ☐ fibroblast-like type 2 |
| ☐ Oligodendrocytes | ☐ Oligodendrocytes |
| ☐ EC type 1 | ☐ EC type 1 |
| ☐ EC type 2 | ☐ EC type 2 |
| ☐ EC type 3 | ☐ EC type 3 |
| ☐ venous EC | ☐ venous EC |
| ☐ capillary EC | ☐ capillary EC |
| ☐ arterial EC | ☐ arterial EC |
| ☐ Astrocyte | ☐ Astrocyte |

4.2 Análise dos gráficos

O banco de dados não disponibiliza os valores brutos referentes a expressão em cada grupo celular, optou-se então por realizar uma análise manual milimetrada dos valores aproximados. Cada “*average counts*” foi subdividido e uma projeção gráfica foi realizada, dessa forma pudemos quantificar numericamente as expressões gênicas nos tipos celulares. Através dos valores obtidos pudemos criar uma tabela e observar as regiões de maior expressão.

4.3 Análise Estatística

Os dados obtidos foram dispostos em tabela, e então sujeitos a análise e montagem de dispersão gráfica fazendo uso do Microsoft Excel 2016. Com a

confirmação dos dados brutos, os dados serão comparados entre os bancos de dados citados. Para a obtenção dos dados são utilizadas diferentes sondas e as análises serão quantificadas e expressas em Z-score, com o objetivo de esclarecer perfis de expressão que podem indicar mecanismos fisiopatológicos presuntivos.

5 RESULTADOS

5.1 Parte 1 – Manuscrito Publicado

Manuscrito publicado no *Journal of Molecular Neuroscience*, em fevereiro de 2021, conforme Figura 10. Fator de Impacto 2020-2021: 2.678. Disponível na íntegra no Apêndice A.

<https://doi.org/10.1007/s12031-021-01816-8>

Figura 10. Manuscrito Publicado no *Journal of Molecular Neuroscience*. Em fevereiro de 2021.

Journal of Molecular Neuroscience
<https://doi.org/10.1007/s12031-021-01816-8>



JAM2: A New Culprit at the Pathophysiology of Primary Familial Brain Calcification

Waydja L. V. A. Marinho¹ · João Ricardo M. de Oliveira^{1,2}

Received: 24 October 2020 / Accepted: 15 February 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC part of Springer Nature 2021

Abstractx

Primary familial brain calcification (PFBC) is an uncommon degenerative neurological disease that can be hereditary or sporadic, and manifests equally in both sexes and at any age. Several studies initially identified variants in four different genes as the cause of the disorder, all with an autosomal dominant inheritance pattern: *SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB* and *XPRI*. However, there have been reports of the involvement of additional genes in the autosomal recessive inheritance pattern, such as *MYORG* and more recently *JAM2*, suggesting that the deregulation of the neurovascular unit (NVU) is important in the pathogenesis of PFBC. The recent study by Schottlaender and collaborators (2020) has added new data to foster these analyses and to enable a better understanding of this underdiagnosed and intriguing neuropsychiatric condition. A great challenge now is to design a model that explains how different pathways might lead to similar neuroimaging findings but with variable clinical outcome, and with marked severity in cases linked to *MYORG* and *JAM2*. Currently available databases of detailed gene expression in different vascular cell types from the mouse brain could be used to explore a possible integrative model.

Keywords Primary familial brain calcification · *JAM2* · Neurovascular unit · Neurogenetics

5.2 Parte 2 – Resultados e Discussão dos demais achados

Qualitativamente podemos inferir que no gene *SIC20A2*, a sua expressão nas células segue uma sequência decrescente, na qual observamos expressões de AC > aSMC > OL > FB1 > aaSMC > vSMC > FB2 > PC > MG > vEC > EC1 > EC3 > aEC > capilEC; a BHE é composta pela matriz extracelular, astrócitos, neurônios, microglia e pericitos.

A interação entre essas células é conhecida como unidade neurovascular. As células endoteliais são circundadas por lâmina basal e endoplasto perivascular astrocítico. Os astrócitos fornecem a ligação celular aos neurônios (ABBOTT et al. 2006; ARMULIK et al. 2010). Já o que se difere no PDGFB com uma sequência de expressão de EC3 > aEC > EC2 > EC1 > capilEC > MG > sSMC > vSMC > vSMC > PC. As células endoteliais possuem função central para a BHE da NVU, são marcadamente diferentes de outros endotélis no corpo, pois exibem junções estreitas interendoteliais (TJs) organizadas em uma extensa variedade de filamentos juncionais; uma rede de ligações proteína-proteína transmembranares próximas que, juntamente com junções aderentes e moléculas de adesão juncional, impedem essencialmente que pequenas moléculas e células invasoras passem pela parede do vaso por uma via paracelular (CHOW; GU, 2015).

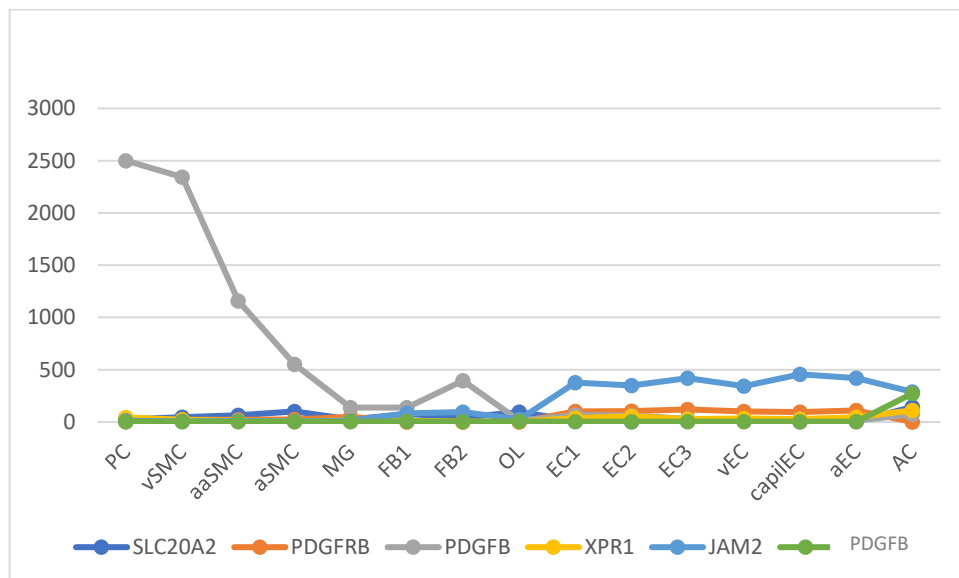
Várias proteínas diferentes estão envolvidas na formação de TJs na vasculatura cerebral, mas duas das mais importantes são as moléculas occludin e claudin-5, que formam pontes homodiméricas que ligam as células vizinhas (HASELOFF et al., 2015). Essas moléculas, por sua vez, são complexas com uma série de elementos intracelulares, que se acoplam ao citoesqueleto de actina e ajudam a dar rigidez às unções (TIET; ENGELHARDT, 2015).

Já o PDGFRB apresenta expressões maiores em PC > Vsmc > aaSMC > FB2 > MG > FB1, com demais tipos celulares com expressões próximas de zero. Achados também citados por Betsholtz; Keller, (2014), aonde um papel fundamental do PDGFβ no SNC é a formação e manutenção de pericitos, que interferem diretamente na morfogênese dos vasos sanguíneos e, seu consequente prejuízo, desencadeia a formação de calcificações cerebrais em regiões específicas Ainda não se sabe como

o comprometimento da BHE pode levar ao fenótipo de calcificação e a razão para o padrão desenvolvido em camundongos e humanos ser simétrico e bilateral.

O XPR1 e o MYORG tem uma expressão similar com um pico nos astrócitos, aonde o XPR1 apresenta um certo equilíbrio visual entre sua expressão nos subtipos das células endoteliais, conforme podemos observar na Figura 11 abaixo.

Figura 11. Distribuição dos genes ao longo das células. Aonde PC - *Pericytes*; SMC - *Smooth muscle cells*; MG - *Microglia*; FB - *Vascular fibroblast-like cells*; OL - *Oligodendrocytes*; EC - *Endothelial cells*; AC - *Astrocytes*; v - *venous*; capil - *capillary*; a - *arterial*; aa - *arteriolar*; 1,2,3- *subtypes*.



Apesar do importante progresso na descoberta da arquitetura genética do PFBC, mais da metade dos casos permanece geneticamente não resolvida. Podemos observar características clínicas e de neuroimagem da doença relacionada a JAM2 (SCHOTTLAENDER et al., 2020)

Todos os sete casos relatados por Schottlaender et al. (2020), tiveram calcificação cerebral identificada na tomografia computadorizada do cérebro e/ou ressonância magnética. Eles apresentavam um padrão consistente de calcificação simétrica bilateral dos gânglios da base e substância cinzenta cortical profunda. Além disso, os idosos das famílias 1 e 2 apresentaram calcificação severa na folia do

cerebelo e no tálamo (figura acima: 1B) Todas as famílias realizaram extensas investigações genéticas, metabólicas e mitocondriais, que excluíram as causas adquiridas e outras herdadas de calcificação cerebral.

As moléculas de adesão juncional são uma família de proteínas que desempenham um papel importante na regulação da polaridade celular, permeabilidade ao endotélio e migração de leucócitos e na função da Barreira Hematoencefálica (BHE). Além do JAM2, variantes recessivas no JAM3 e OCLN estavam ligadas a distúrbios neurológicos complexos que se apresentam com calcificação no cérebro (MOCHIDA et al., 2010), sugerindo que a desregulação da (Unidade Neurovascular Central) NVU é importante na patogênese do PFBC. Embora o aumento da permeabilidade do BBB não tenha sido confirmado em camundongos JAM2 Knockout (KO) até o momento (TIETZ, et al., 2018), incluindo este estudo, agora foram identificadas mutações em três genes que codificam proteínas de junção apertada em humanos (JAM2, JAM3 e OCLN), sugerindo que a perda de adesão célula a célula com subsequente disfunção da passagem do soluto é uma importante causa de calcificação cerebral.

Além disso, uma colaboração multicêntrica da China descreveu recentemente quatro pacientes de três famílias que apresentaram PFBC e mutações bi-alélicas no JAM2 (CEN et al., 2020). Eles mostram curiosamente falha na translocação do JAM2 para a membrana plasmática em mutantes transfectados com JAM2 de células de ovário de hamster e propõem um comprometimento da adesão de célula a célula como mecanismo causador de falha da NVU e consequente fenótipo de calcificação cerebral.

Proteínas associadas a distúrbios da calcificação cerebral em tipos celulares da NVU apresentam mutações autossômicas dominantes em genes que codificam o transportador inorgânico de fosfato 2; (PiT2 codificado por SLC20A2) e exportador de fosfato inorgânico; (XPR1 codificado por SLC53A1 / XPR1) são causadores de PFBC, destacando a desregulação da homeostase do fosfato como uma importante causa de deposição de cálcio. Subunidade B do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-B codificado por PDGFB) a sinalização através do receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas- β (PDGFR- β codificado por PDGFRB) é importante para a sobrevivência de pericitos e manutenção da barreira hematoencefálica (BBB). Mutações autossômicas dominantes em PDGFB e PDGFRB

causam PFBC sugerindo perda da integridade da BBB como um patomecanismo adicional. Em consonância com isso, mutações recessivas em *JAM3* e *OCN* que codificam proteínas de junção estreita têm sido associadas a neurológicas complexas, distúrbios que incluem calcificação cerebral. As mutações *JAM2* identificadas por Cen e col (2020), apoiam ainda mais a desregulação da integridade da BBB como um patomecanismo de PFBC.

De forma quantitativa, os dados extraídos de forma milimétrica, por medida indireta, demonstram uma maior expressão do gene *SLC20A2*, *XPR1* e *MYORG* nos astrócitos, *PDGFRB* nas células endoteliais subtipo 3, do *PDGFB* nos pericitos, do *JAM2* nos capilares das células endoteliais, conforme exposto na Tabela 1.

Tabela 1. Sumários dos resultados de expressão celular por genes. Aonde: PC - Pericitos; SMC - Células Musculares Lisas; MG - Microglia; FB - células semelhantes a fibroblastos vasculares; OL - Oligodendrócitos; EC - Células Endoteliais; AC - Astrócitos; v - venoso; capilar - capilar; a - arterial; aa - arteriolar; 1,2,3- subtipos

	<i>SLC20A2</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>PDGFB</i>	<i>XPR1</i>	<i>JAM2</i>	<i>MYORG</i>
PC	23,04	3,20	2500,00	43,29	12,50	2,50
vSMC	46,08	22,00	2343,75	20,31	7,20	2,50
aaSMC	65,28	21,00	1156,25	13,32	9,60	2,50
aSMC	101,76	24,00	550,00	4,99	6,00	2,50
MG	24,96	50,00	137,50	16,65	12,50	2,50
FB1	76,80	0,80	137,50	13,32	84,00	5,00
FB2	42,24	0,40	393,75	3,33	96,00	2,50
OL	96,00	0,80	12,50	3,33	25,00	7,50
EC1	11,52	100,00	68,75	38,29	378,00	2,50
EC2	3,84	104,00	62,50	56,61	348,00	2,50
EC3	9,60	120,00	31,25	26,64	420,00	2,50
vEC	11,52	100,00	12,50	34,96	342,00	2,50
capilEC	3,84	96,00	31,25	26,64	456,00	2,50
aEC	7,68	110,00	12,50	44,95	420,00	2,50
AC	144,00	0,40	75,00	111,55	288,00	272,50

PC – *Pericytes*: são células que revestem os vasos sanguíneos, desempenhando um importante papel na estabilização e no suporte desses vasos, além disso, eles exercem funções de interação com outras células que estão em seu microambiente.

SMC - *Smooth muscle cells*: As células musculares involuntárias. As células do músculo liso (SMCs) são células musculares involuntárias e não estriadas que revestem o interior de órgãos ocos, como artérias, pulmões, bexiga, sistema digestivo e sistema reprodutivo.

MG – *Microglia*: são as células imunológicas do cérebro. Uma função principal da microglia é inspecionar o microambiente local e responder a lesões pela liberação de moléculas pró-inflamatórias e depuração fagocítica das células apoptóticas

FB - *Vascular fibroblast-like cells*; Um tipo de célula intersticial, conhecido como 'células semelhantes a fibroblastos' por morfologistas, é comum, mas sua função é desconhecida. Essas células são encontradas perto dos terminais dos neurônios motores entéricos, sugerindo que poderiam ter um papel na geração de respostas neurais que ajudam a controlar os movimentos gastrointestinais.

OL – *Oligodendrocytes*: Os oligodendrócitos (ou oligodendróglia) são as células da neuróglia, responsáveis pela formação, e manutenção das bainhas de mielina dos axônios, no SNC (sistema nervoso central), função em que no sistema nervoso periférico é executada pelas células de Schwann (só que apenas um oligodendrócito contribui para formação de mielina em vários neurônios ao contrário da célula de Schwann que mieliniza apenas um axônio). Sem os oligodendrócitos, os neurônios não sobrevivem em meio de cultura. Em suas características físicas os oligodendrócitos mostram-se um corpo celular arredondado e pequeno, com poucos prolongamentos, curtos, finos e pouco ramificados (daí o nome: oligo= pouco; dendro= ramificação). Assim como em diversas células do corpo humano nos oligodendrócitos podem ser geradores neoplasias (tumores), que neste caso são os oligodendrogliomas.

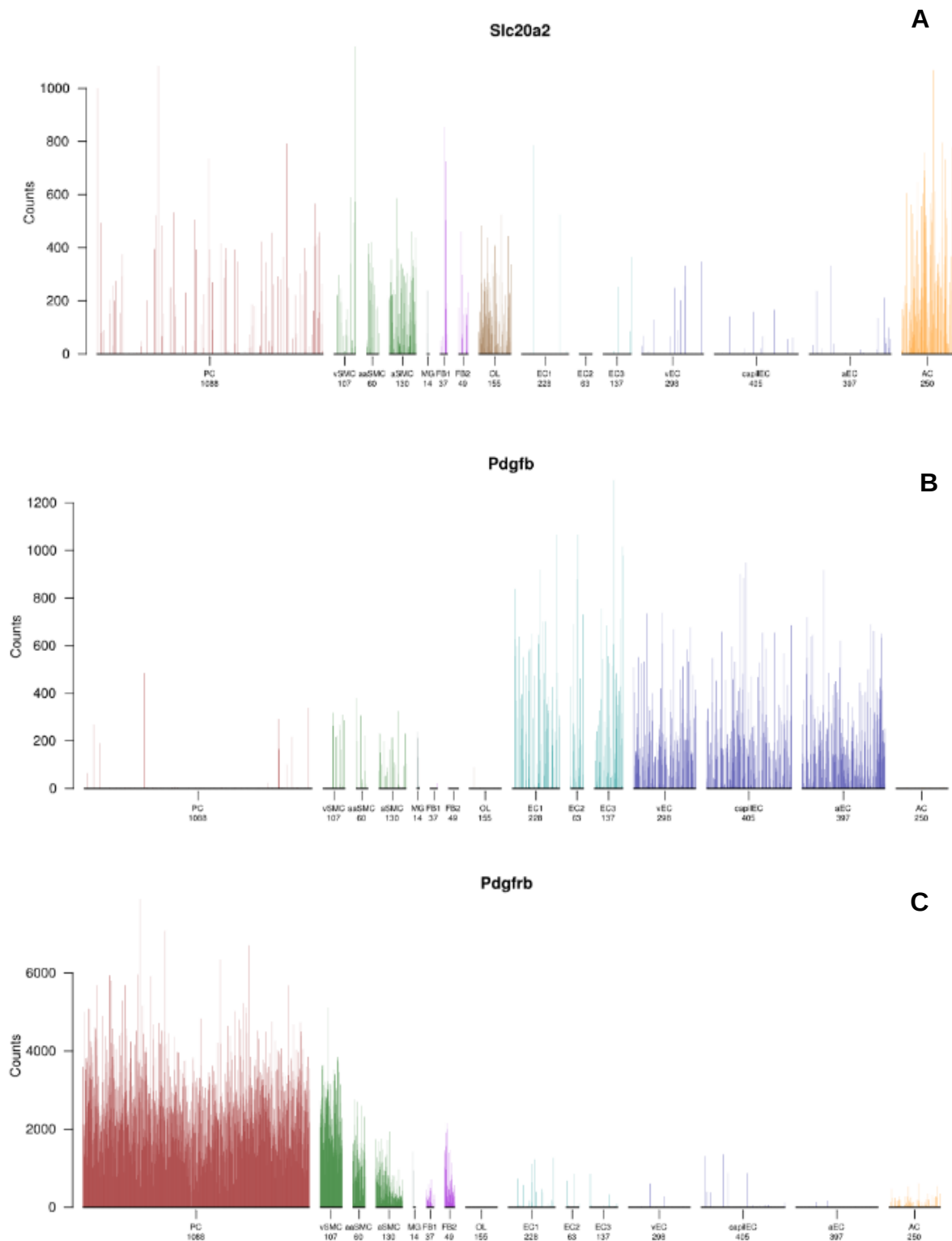
EC - *Endothelial cells*: é um tipo de célula achatada de espessura variável que recobre o interior dos vasos sanguíneos, especialmente os capilares sanguíneos, formando assim parte da sua parede.

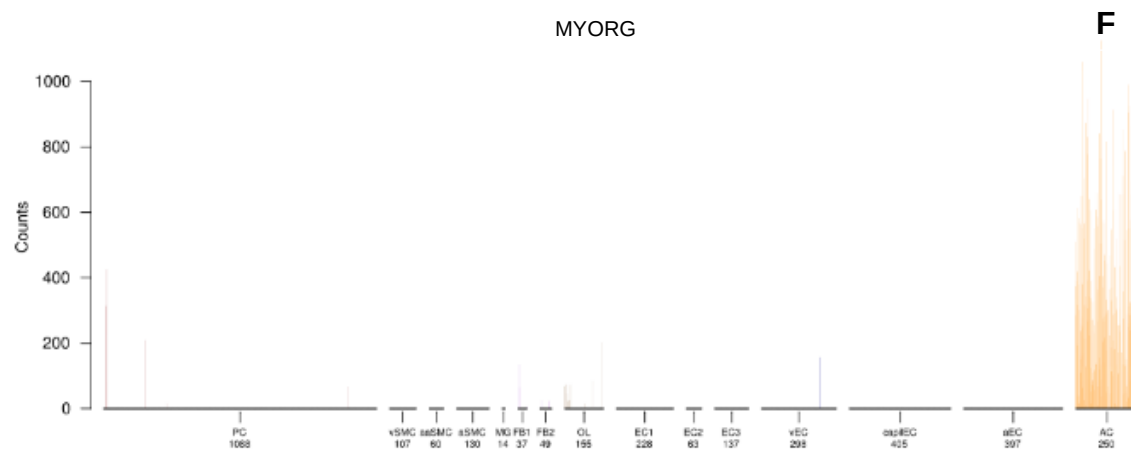
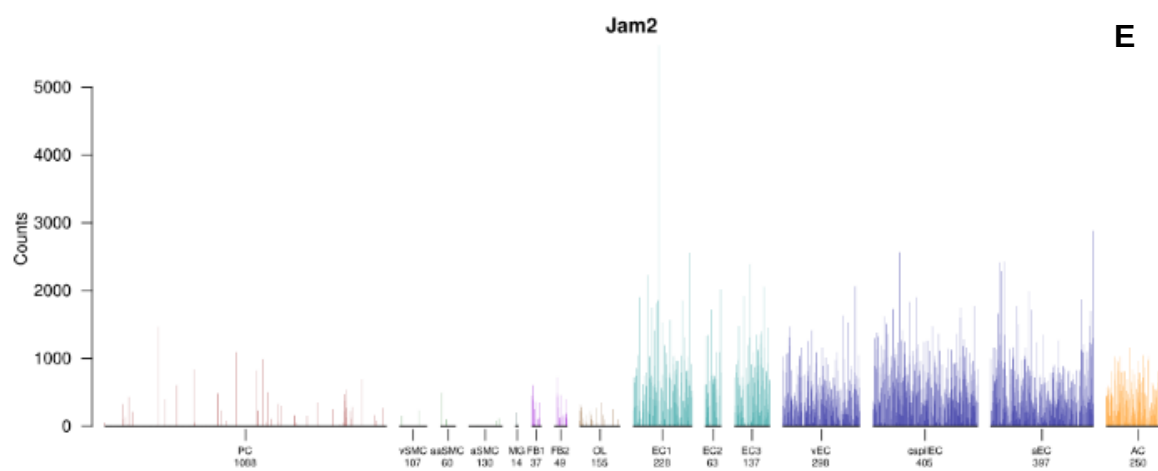
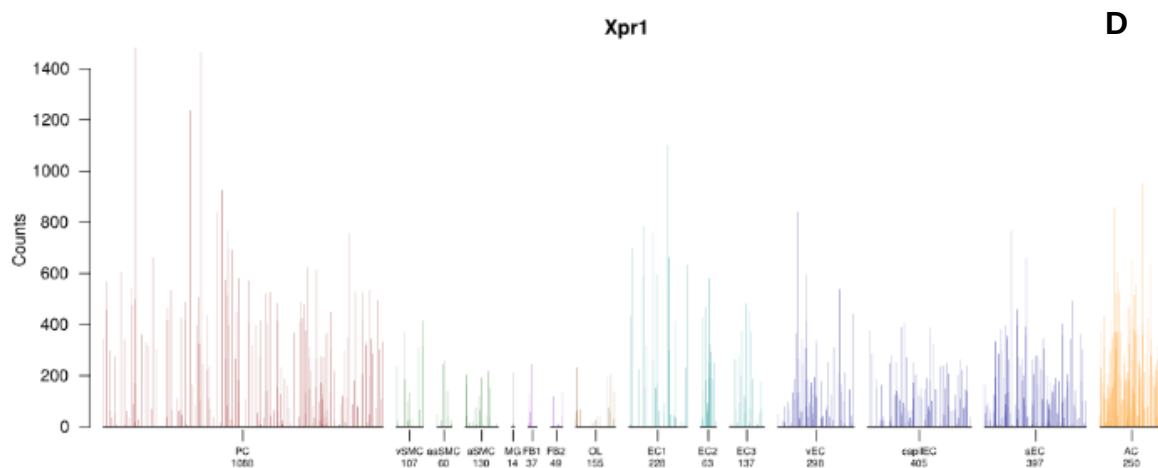
AC – *Astrocytes*: Os astrócitos são células da neuróglia, são as mais abundantes do sistema nervoso central e são as que possuem as maiores dimensões. Levam esse

nome pelo seu formato (astro= estrela, cito= célula). Existem dois tipos de astrócitos: os protoplasmáticos e os fibrosos.

Os dados também foram demonstrados “*Each cluster*”, conforme podemos observar na Figura 12, a expressão vascular-específica de genes que são mutados em indivíduos com doenças neurológicas, especificamente a PFBC, ilustra a importância crítica da vascularização saúde para a função cerebral. A vasculatura do cérebro abriga a barreira hematoencefálica (BHE) - que é necessária para função neuronal, mas representa um obstáculo para o tratamento farmacológico de doenças cerebrais.

Figura 12. Detailed expression in each cell. Genes SLC20A2 (A), PDGFB (B), PDGFRB (C), XPR1 (D), JAM2 (E) e MYORG (F). Observamos uma maior expressão do gene *SLC20A2*, *XPR1* e *MYORG* nos astrócitos, *PDGFRB* nas células endoteliais subtipo 3, do *PDGFB* nos pericitos, do *JAM2* nos capilares das células endoteliais.





Enquanto a especialização das células vasculares endoteliais é conhecida por ser uma característica fundamental do BHE, a contribuição de células murais vasculares (pericitos e células de músculo liso (SMCs)) e tipos de células associadas a vasos, como astrócitos, é menos claro. A vasculatura cerebral exibe uma hierarquia arteriovenosa semelhante aos de outros leitos vasculares. Diferenças no fluxo sanguíneo, pressão e a composição química são paralelos ao longo do eixo arteriovenoso por diferenças morfológicas e funcionais, como junção estrutura e permeabilidade.

Não existem base molecular de especialização arteriovenosa vascular, apenas marcadores de arteriovenosos endoteliais foram identificados, em várias espécies, órgãos e estágios de desenvolvimento. A diferenciação arteriovenosa mural envolve distintas morfologias celulares que variam desde os revestimentos SMC de múltiplas camadas de grandes artérias aos pericitos singulares, orientados longitudinalmente ou estrelados de capilares e vênulas.

Considerando que a contratilidade dos SMCs vasculares é crucial para a regulação da pressão sanguínea e do fluxo, o papel fisiológico dos pericitos é pouco claro. Considerando a vasta importância médica e farmacológica da vasculatura do cérebro e a falta de compreensão molecular de seus tipos de celulares constituintes, Vanlandewijck et al, 2008, estabeleceram o perfil transcricional dos principais tipos de células da vasculatura cerebral usando o sequenciamento de RNA de uma única célula (scRNA-seq).

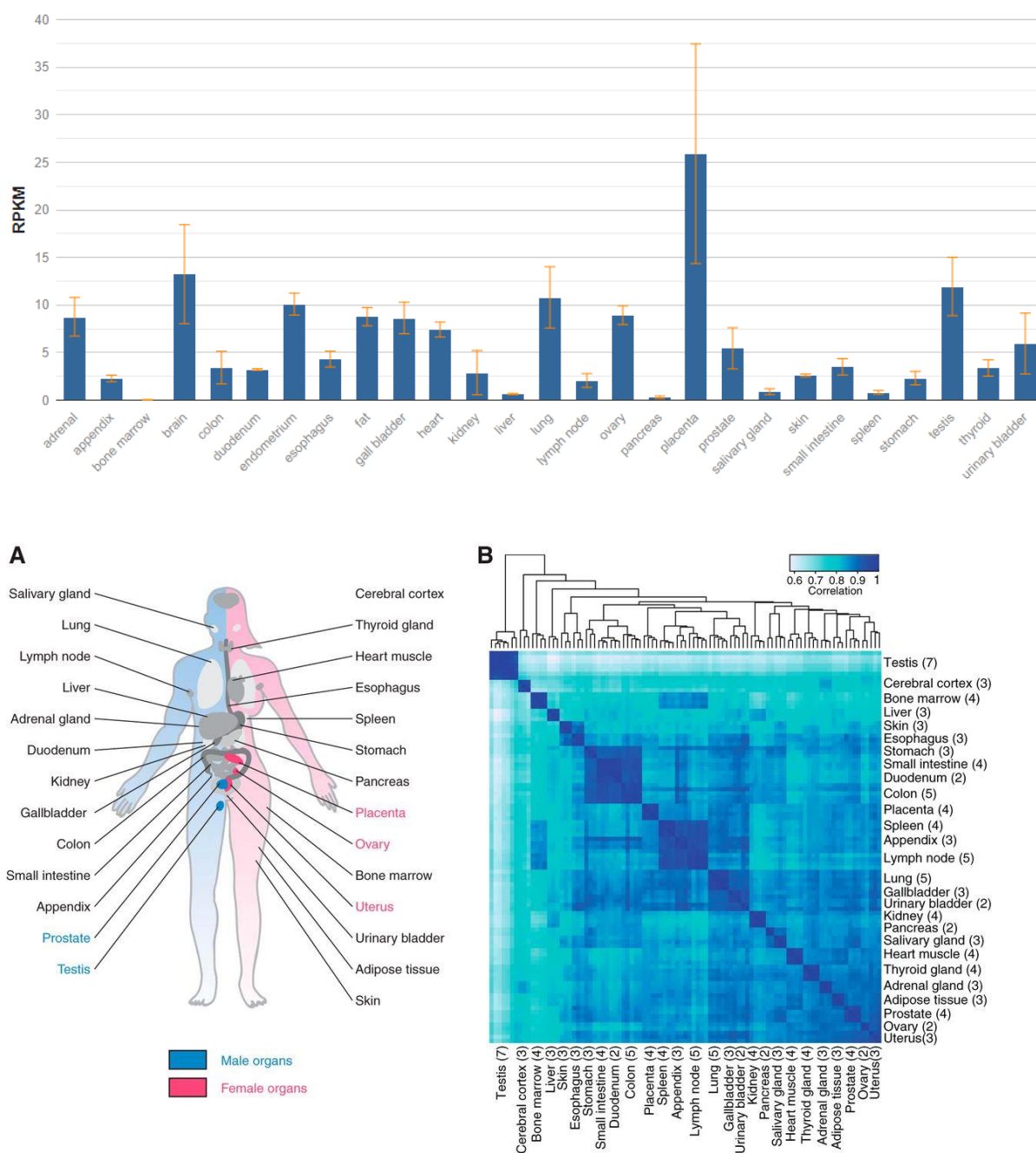
Expressão do JAM 2 no The Human Protein Atlas <<http://www.proteinatlas.org/>>

Este gene pertence à superfamília da imunoglobulina e à família da molécula de adesão juncional (JAM). A proteína codificada por esse gene é uma proteína de membrana do tipo I localizada nas junções estreitas das células epiteliais e endoteliais. Ele atua como um ligante adesivo para interagir com uma variedade de tipos de células imunes e pode desempenhar um papel na localização de linfócitos nos órgãos linfóides secundários. É também conhecido como: JAMB; CD322; JAM-B;

VEJAM; PRO245; VE-JAM; C21orf43. Apresenta ampla expressão na placenta (RPKM 25.9), cérebro (RPKM 13.2) e 20 outros tecidos.

Esse gene se localiza no 21q21.3 cromossômico, na Figura 13 podemos observar os tecidos e órgãos humanos analisados pela análise transcriptômica, sendo estes dados expostos em RPKM (*Reads Per Kilobase Million*).

Figura 13. Especificidade do tecido do RNA. Gráfico de barras: Resultados mostrando as relações entre os 27 tecidos e órgãos diferentes, maior expressão na placenta (aproximadamente 26 RPKM), seguida pelo cérebro (aproximadamente 14 RPKM). **A** - localização de todos os 27 tecidos analisados e órgãos no corpo humano. **B** - a relação entre os tecidos. Resultados de agrupamento hierárquico mostrando as relações entre os 27 tecidos e órgãos diferentes baseados em um mapa de calor mostrando a correlação de *Spearman* em pares. Os números entre parênteses mostram o número de amostras replicadas para cada tecido.



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas baseadas na análise de bancos de dados existentes são hoje um importante impulso para o desenvolvimento científico, pois possuem baixo custo para sua utilização e os dados obtidos podem auxiliar no processo produtivo e, consequentemente, levar a novas descobertas. Os mecanismos pelos quais variantes em diferentes genes causam o mesmo padrão de calcificação em áreas específicas, ainda não estão completamente estabelecidos, assim como a base celular da associação do MYORG com a CCFP ainda é incerta.

De forma quantitativa, os dados extraídos de forma milimétrica, por medida indireta, demonstram uma maior expressão do gene SLC20A2, XPR1 e MYORG nos astrócitos, PDGFRB nas células endoteliais subtipo 3, do PDGFB nos pericitos, do JAM2 nos capilares das células endoteliais. A expressão vascular específica de genes que são mutados em indivíduos com doenças neurológicas ilustram a importância crítica da vascularização saúde para a função cerebral. Enquanto especialização do endotélio vascular é conhecida por ser uma característica fundamental da BHE, a contribuição de células vasculares murinas (pericitos e células de músculo liso (SMCs)) e tipos de células associadas a vasos, como astrócitos, é menos claro. Entender os fundamentos moleculares dessas diferenças e caracterizá-los torna possível um alvo terapêutico no futuro.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J., RÖNNBÄCK, L., & HANSSON, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7, 41–53.

ALLT, G., & LAWRENSON, J. G. (2001). Pericytes: Cell biology and pathology. *Cells, Tissues, Organs*, 169, 1–11.

ANDRES VILLABONA-RUEDA^{1†}, CLARA ERICE^{1†}, CARLOS A. PARDO² AND MONIQUE F. STINS^{1*} The Evolving Concept of the Blood Brain Barrier (BBB): From a Single Static Barrier to a Heterogeneous and Dynamic Relay Center Front. *Cell. Neurosci.*, 20 September 2019 | <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00405>

ANHEIM, M. et al. XPR1 mutations are a rare cause of primary familial brain calcification. *Journal of Neurology*, v. 263, n. 8, p. 1559–1564, 2016.

ARMULIK, A., GENOVÉ, G., MÄE, M., NISANCIOGLU, M. H., WALLGARD, E., NIAUDET, C., HE, L., NORLIN, J., LINDBLOM, P., STRITTMATTER, K., et al. (2010). Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature*, 468, 557–561.

BALCK A, SCHAAKE S, KUHNKE NS, DOMINGO A, MADDOEV H, MARGOLESKY J, DOBRICIC V, ALVAREZ-FISCHER D, LAABS BH, KASTEN M, LUO W, NICOLAS G, MARRAS C, LOHMANN K, KLEIN C, WESTENBERGER A. Genotype-Phenotype Relations in Primary Familial Brain Calcification: Systematic MDSGene Review. *Mov Disord*. 2021 Aug 25. doi: 10.1002/mds.28753.

BAMBERG, H. Beobachtungen und bemerkungen uber hirnkrankheiten. *Verh Andl Phys Med Ges*, v. 6, p. 325–328, 1855.

BATLA A, TAI XY, SCHOTTLAENDER L, ERRO R, BALINT B, BHATIA KP. Deconstructing Fahr's disease/syndrome of brain calcification in the era of new genes. *Parkinsonism Relat Disord* 2017; 37: 1– 10.

BELL, R. D., WINKLER, E. A., SAGARE, A. P., SINGH, I., LARUE, B., DEANE, R., & ZLOKOVIC, B. V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*, 68, 409–427.

BETSHOLTZ C. et al. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature*. 2018 Feb 22;554(7693):475-480.

BIRBRAIR, A., ZHANG, T., WANG, Z.-M., MESSI, M. L., MINTZ, A., & DELBONO, O. (2015). Pericytes at the intersection between tissue regeneration and pathology. *Clinical Science*, 128, 81–93.

CEN Z., CHEN Y., CHEN S., WANG H., YANG D., ZHANG H., WU H., WANG L., TANG S., YE J. Biallelic loss-of-function mutations in JAM2 cause primary familial brain calcification. *Brain*. 2020;143:491–502.

CHOW BW, GU C. The molecular constituents of the blood–brain barrier. **Trends Neurosci.** v. 38, p. 598–608, 2015.

COATTI GC, CAVAÇANA N, ZATZ M. The Role of Pericytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Adv Exp Med Biol.** 2019;1147:137-146.

DANEMAN R, ZHOU L, KEBEDE AA, BARRES BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. **Nature.** 2010;468(7323):562-6. 21.

DATTA, K.; GUAN, T.; GERACE, L. NET37, a nuclear envelope transmembrane protein with glycosidase homology, is involved in myoblast differentiation. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 43, p. 29666–29676, out. 2009.

DENG, H.; ZHENG, W.; JANKOVIC, J. Genetics and molecular biology of brain calcification. **Ageing Research Reviews**, v. 22, p. 20–38, 2015.

GIACHELLI, C. M. Ectopic Calcification. **American Journal of Pathology**, v. 154, n. 3, p. 671–675, 1999.

HASELOFF RF, DITHMER S, WINKLER L, WOLBURG H, BLASIG IE. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood–brain barrier: structural and functional aspects. **Semin Cell Dev Biol.** v. 38, p. 16–25, 2015.

LACHLAN S. BROWN†, CATHERINE G. FOSTER†, JO-MAREE COURTNEY, NATALIE E. KING, DAVID W. HOWELLS AND BRAD A. SUTHERLAND* Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain Front. Cell. **Neurosci.**, 28 June 2019 | <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00282>

LEGATI, A.; GIOVANNINI, D.; NICOLAS, G.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, U.; QUINTÁNS, B.; OLIVEIRA, J. R. M.; et al. Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. **Nature genetics**, v. 47, n. 6, p. 579–81, jun. 2015.

LEMOS, R. R. et al. An Update on Primary Familial Brain Calcification. In: **International review of neurobiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 110p. 349– 371.

LEMOS, R. R. et al. Update and Mutational Analysis of *SLC20A2* : A Major Cause of Primary Familial Brain Calcification. **Human Mutation**, v. 36, n. 5, p. 489–495, 2015.

LI, Q.; UITTO, J. Zebrafish Models of Ectopic Mineralization — The Paradigm of Pseudoxanthoma Elasticum. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 11, p. 2301–2304, 2018.

MALHEIRO, A. et al . Doença de Fahr: Um Caso Clínico Inesperado. Medicina Interna, Lisboa , v. 24, n. 1, p. 33-35, mar. 2017. Disponível em <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0872-671X2017000100009&lng=pt&nrm=iso>. acesso em 16 mai. 2019.

MCARTHUR, S., LOIOLA, R.A., MAGGIOLI, E. et al. The restorative role of annexin A1 at the blood–brain barrier. **Fluids Barriers CNS** 13, 17, 2016.

MIYAZAKI, K., OHTA, Y., NAGAI, M., MORIMOTO, N., KURATA, T., TAKEHISA, Y., IKEDA, Y., MATSUURA, T., & ABE, K. (2011). Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neuroscience Research**, 89, 718–728.

MOCHIDA G.H., GANESH V.S., FELIE J.M., GLEASON D., HILL R.S., CLAPHAM K.R., RAKIEC D., TAN W.-H., AKAWI N., AL-SAFFAR M. A homozygous mutation in the tight-junction protein JAM3 causes hemorrhagic destruction of the brain, subependymal calcification, and congenital cataracts. **Am. J. Hum. Genet.** 2010;87:882–889.

NAKAMURA, K.; ARIMURA, K.; NISHIMURA, A. Possible involvement of basic FGF in the upregulation of PDGFR β in pericytes after ischemic stroke. **Brain Research**, v. 1630, p. 98–108, 2016.

OBERMEIER B, DANEMAN R, RANSOHOFF RM. Development, maintenance and disruption of the blood–brain barrier. **Nat Med.** v. 19, p. 1584–96, 2013.

QUINTÁNS, B.; OLIVEIRA, J.; SOBRIDO, M. J. **Primary familial brain calcifications**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 147

RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates: The first 40 years. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 2–19, 2011.

SCANNAPIECO S, PICILLO M, DEL GAUDIO L, BARONE P, ERRO R. A novel phenotype associated with CaSR-related familial brain calcifications. **Mov Disord Clin Pract** 2020;7:701–703.

SCHOTTLAENDER LV, ABETI R, JAUNMUKTANE Z, ET AL. Bi-allelic Jam2 variants lead to early-onset recessive primary familial brain calcification. **Am J Hum Genet.** 2020;106(3):412-421. doi:10.1016/j.ajhg.2020.02.007

SOBRIDO, M. et al. **Familial Idiopathic Basal Ganglia Calcification**. Seattle: University of Washington, 2013.

TADIC V, WESTENBERGER A, DOMINGO A, ALVAREZ-FISCHER D, KLEIN C, KASTEN M. Primary Familial Brain Calcification With Known Gene Mutations: A Systematic Review and Challenges of Phenotypic Characterization. **JAMA Neurol.** 2015;72(4):460–467.

TAGLIA I., BONIFATI V., MIGNARRI A., DOTTI M.T., FEDERICO A. Primary familial brain calcification: update on molecular genetics. **Neurol. Sci.** 2015;36:787–794.

TAKANO H, KATO M, INAGAKI A, WATANABE K, KASHIMA H. O curso temporal das mudanças no fluxo sanguíneo cerebral após terapia eletroconvulsiva em pacientes depressivos - medido em três momentos usando a tomografia

computadorizada de emissão de fóton único. **Keio J Med** v. 55, n. 4, p. 153-60, 2006.

THANABALASUNDARAM G, PIEPER C, LISCHPER M, GALLA HJ. Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. **Brain Res.** 2010;1347:1-10

TIETZ S, ENGELHARDT B. Brain barriers: crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. **J Cell Biol.** v. 209, p. 493–506, 2015.

TIETZ S., PÉRINAT T., GREENE G., ENZMANN G., DEUTSCH U., ADAMS R., IMHOF B., AURRAND-LIONS M., Engelhardt B. Lack of junctional adhesion molecule (JAM)-B ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain Behav. Immun.** 2018; 73:3–20..

VANLANDEWIJCK, MICHAEL; HE, LIQUN; MÄE, MAARJA ANDALOUSSI; ANDRAE, JOHANNA; ANDO, KOJI; DEL GAUDIO, FRANCESCA; NAHAR, KHAYRUN; LEBOUVIER, THIBAUD; LAVIÑA, BÀRBARA; GOUVEIA, LEONOR; SUN, YING; RASCHPERGER, ELISABETH; RÄSÄNEN, MARKUS; ZARB, YVETTE; MOCHIZUKI, NAOKI; KELLER, ANNIKA; LENDAHL, URBAN; BETSHOLTZ, CHRISTER (2018). A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. **Nature**, (), -. doi:10.1038/nature25739

WINKLER, E. A., BELL, R. D., & ZLOKOVIC, B. V. (2011). Central nervous system pericytes in health and disease. **Nature Neuroscience**, 14, 1398.

YAMADERA, M., FUJIMURA, H., INOUE, K., TOYOOKA, K., MORI, C., HIRANO, H., & SAKODA, S. (2015). Microvascular disturbance with decreased pericyte coverage is prominent in the ventral horn of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, 16, 393–401.

YAO, X.-P. et al. Biallelic Mutations in MYORG Cause Autosomal Recessive Primary Familial Brain Calcification. **Neuron**, v. 98, n. 6, p. 1116–1123.e5, jun. 2018.

ZARB Y, FRANZOSO FD, KELLER A. PERICYTES in Primary Familial Brain Calcification. **Adv Exp Med Biol.** 2019;1147:247-264. doi: 10.1007/978-3-030-16908-4_11. PMID: 31147881.

APÊNDICES



JAM2: A New Culprit at the Pathophysiology of Primary Familial Brain Calcification

Waydja L. V. A. Marinho¹ · João Ricardo M. de Oliveira^{1,2}

Received: 24 October 2020 / Accepted: 15 February 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC part of Springer Nature 2021

Abstract

Primary familial brain calcification (PFBC) is an uncommon degenerative neurological disease that can be hereditary or sporadic, and manifests equally in both sexes and at any age. Several studies initially identified variants in four different genes as the cause of the disorder, all with an autosomal dominant inheritance pattern: *SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB* and *XPR1*. However, there have been reports of the involvement of additional genes in the autosomal recessive inheritance pattern, such as *MYORG* and more recently *JAM2*, suggesting that the deregulation of the neurovascular unit (NVU) is important in the pathogenesis of PFBC. The recent study by Schottlaender and collaborators (2020) has added new data to foster these analyses and to enable a better understanding of this underdiagnosed and intriguing neuropsychiatric condition. A great challenge now is to design a model that explains how different pathways might lead to similar neuroimaging findings but with variable clinical outcome, and with marked severity in cases linked to *MYORG* and *JAM2*. Currently available databases of detailed gene expression in different vascular cell types from the mouse brain could be used to explore a possible integrative model.

Keywords Primary familial brain calcification · *JAM2* · Neurovascular unit · Neurogenetics

Primary familial brain calcification (PFBC) is an underdiagnosed degenerative neurological disease that can be hereditary or sporadic. It manifests equally in both sexes and at any age, and it is characterized by the presence of abnormal calcium phosphate deposits in the brain (Quintáns et al. 2018).

Its clinical picture is quite variable. PFBC can present as an asymptomatic condition or as a combination of several neurological symptoms. Additionally, and even though the distribution pattern and the way the calcifications appear are diverse, these lesions generally occur bilaterally and are usually identified in the basal ganglia, cerebellum, thalamus and brainstem (Deng et al. 2015).

Several studies originally identified variants in four different genes as the cause of this disorder, all with an autosomal dominant inheritance pattern: *SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB* and *XPR1*. However, there have been reports of the

involvement of additional genes with an autosomal recessive inheritance pattern, such as *MYORG* and more recently *JAM2* (Yao et al. 2018).

Of the four genes linked to an autosomal dominant inheritance pattern, two are related to inorganic phosphate (Pi) homeostasis. Those genes are *SLC20A2*, which encodes a transmembrane Pi importer, and *XPR1*, which encodes a protein that exports Pi out of the cells. *PDGFRB* and *PDGFB*, on the other hand, are associated with the integrity of the blood–brain barrier (BBB) and maintenance of pericytes, and there is still not a clearly defined mechanism to explain how pathogenic variations lead to brain calcifications.

The connection of *MYORG* with PFBC is extremely recent and still poorly studied, and its functions are less clear, but *MYORG* is known to encode a transmembrane protein of the nuclear envelope that is involved in the differentiation of myoblasts. Additionally, it seems to regulate protein glycosylation in the endoplasmic reticulum of astrocytes (Yao et al. 2018).

More recently, Schottlaender et al. (2020) reported additional patients linked to *JAM2*, in addition to an animal model showing brain findings and a severe clinical manifestation that mimics some of the findings observed in humans. So far, that is the fourth knockout mouse model of

✉ João Ricardo M. de Oliveira
joao.ricardo@ufpe.br

¹ Keizo Asami Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

² Neuropsychiatry Department, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE 50670-901, Brazil

PFBC, with the other ones linked to *SLC20A2*, *PDGFB* and *MYORG*. The authors also mentioned that extensive genetic, metabolic and mitochondrial investigations were carried out in all families, which excluded the acquired and other inherited causes of cerebral calcification.

Junctional adhesion molecules (JAM) are a family of proteins that play an important role in regulating cell polarity, in the permeability of the endothelium and leukocyte migration, and in the function of the BBB. In addition to *JAM2*, recessive variants in *JAM3* and *OCN* have been linked to complex neurological disorders that present with calcification in the brain (Mochida et al. 2010), suggesting that the deregulation of the neurovascular unit (NVU) is important in the pathogenesis of PFBC.

The BBB is a part of the so-called NVU, which surrounds the perivascular astroglial and microglial cells and intervening neuronal terminals (Obermeier et al. 2013). Pericytes act in the physical stabilization of vessels, in the regulation of microcirculation and in capillary blood flow. They affect blood clotting and immune function, and can regulate lymphocyte activation, participating in angiogenesis (Birbaier et al. 2015).

The NVU probably represents a potential therapeutic target in this group of disorders, and the six genes reported so far have helped to clarify most suspected PFBC cases reported in the literature by the main research groups devoted to this topic.

A great challenge now is to design a new model that explains how different pathways might lead to similar neuroimaging findings but with variable clinical outcomes, with marked severity in cases linked to *MYORG* and *JAM2*.

Currently available databases of detailed gene expression in different vascular cell types from the mouse brain could be used to explore a possible integrative model. One example of this approach was highlighted in the first *MYORG* study, where the authors used publicly available data from the Betsholtz group to compare the differences between the gene expression of different cell types of the brain vasculature in mice (Vanlandewijck et al. 2018; Yao et al. 2018). Previous analyses, for example, show that some genes present similar patterns of expression in specific cells, such as oligodendrocytes, but more diverse expression in others, such as pericytes.

Additional analyses will also help explain the heterogeneous clinical outcome of this condition, which sometimes is extremely variable even between siblings carrying the same pathogenic variant. Single-cell analysis in the vasculature can also point to the reasons for the similar pattern of calcifications caused by different genes, as well as to why some brain regions are more prone to repeated calcification.

Funding W.L.V.A.M. received a fellowship from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE; IBPG-0235-4.08/17).

Declarations

Ethical Approval The authors declare that ethics approval was not necessary for this manuscript, since it involves the discussion of theoretical aspects of data already published and available online.

Consent for Publication The authors have provided consent for publication of the article.

Data Availability The data and material discussed here are available in the references listed.

Competing Interests The authors declare that they have no competing interests or conflict, and no specific funding was used for the preparation of this text.

Author Contribution Both authors contributed equally, and they acknowledge the support of two main Brazilian agencies: CNPq and FACEPE (IBPG-0234-4.08/17).

References

- Birbaier A, Zhang T, Wang Z-M, Messi ML, Mintz A, Delbono O (2015) Pericytes at the intersection between tissue regeneration and pathology. *Clin Sci* 128:81–93
- Deng H, Zheng W, Jankovic J (2015) Genetics and molecular biology of brain calcification. *Ageing Res Rev* 22:20–38
- Mochida GH, Ganesh VS, Felle JM, Gleason D, Hill RS, Clapham KR, Rakic D, Tan W-H, Akawi N, Al-Saffar M (2010) A homozygous mutation in the tight-junction protein *JAM3* causes hemorrhagic destruction of the brain, subependymal calcification, and congenital cataracts. *Am J Hum Genet* 87:882–889
- Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM (2013) Development, maintenance and disruption of the blood–brain barrier. *Nat Med* 19:1584–1596
- Quintás B, Oliveira J, Sobrido MJ (2018) Primary familial brain calcifications. *Handb Clin Neurol* 147:307–317
- Schottlaender LV, Abeti R, Jaumukhtane Z et al (2020) Bi-allelic *JAM2* variants lead to early-onset recessive primary familial brain calcification. *Am J Hum Genet* 106(3):412–421. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.02.007>
- Vanlandewijck M, He L, Mäe M et al (2018) A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature* 554:475–480
- Yao X-P et al (2018) Biallelic Mutations in *MYORG* Cause Autosomal Recessive Primary Familial Brain Calcification. *Neuron* 98(6):1116–1123.e5

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

APÊNDICE B – SUMÁRIO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

2018

- Primeiras interações em língua francesa.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.



Certificado

Certificamos que **WAYDJA LANIA VIRGINIA DE ARAUJO MARINHO** concluiu o curso Chegando na universidade: primeiras interações em língua francesa nível A2, com carga horária de 16 horas, Número do Registro 499525, com nota 7.00, oferecido pelo Núcleo de Línguas da UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO no âmbito do Programa Idiomas sem Fronteiras - Francês no período de 30/04/2018 a 29/05/2018.



Denise Martins de Abreu e Lima
Presidente do Programa IsF

Utilize um leitor de QR Code no código acima para validar este certificado ou use o código validador 0A354472 em <http://isfaluno.mec.gov.br/validador>



Ministério da
Educação

- **Produção Oral em Inglês: interações acadêmicas.**

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.



Certificado

Certificamos que **WAYDJA LANIA VIRGINIA DE ARAUJO MARINHO** concluiu o curso Produção Oral: interações acadêmicas nível A2, com carga horária de 32 horas, Número do Registro 550778, com nota 9.85, oferecido pelo Núcleo de Línguas da UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO no âmbito do Programa Idiomas sem Fronteiras - Inglês no período de 13/08/2018 a 04/10/2018.



Denise Martins de Abreu e Lima
Presidente do Programa IsF

Utilize um leitor de QR Code no código acima para validar este certificado ou use o código validador **CED75215** em <http://isfaluno.mec.gov.br/validador>



Ministério da
Educação

- **Ouvinte**

Interface cérebro-máquina: interação entre o tecido nervoso e eletrodos de registro intracortical. 2018. (Seminário).

- **Parecerista Ad Hoc**

Parecerista Ad Hoc - IV Enexc UFPE 2018. 2018.



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Waydja Lânia Virgínia de Araújo Marinho**, CPF n° 014.002.084-59, foi selecionado(a) na Chamada Pública para Parecerista *Ad Hoc* dos trabalhos inscritos no IV Enexc UFPE 2018 - Encontro de Extensão e Cultura da Universidade Federal de Pernambuco, analisando 5 (cinco) Resumos inscritos na Área Temática de Extensão: Saúde.

Recife, 30 de outubro de 2018.


Demócrito José Rodrigues da Silva
Coordenador de Gestão da Extensão
PROExC/UFPE
SIAPE n° 1134144

- **Participante**

II CONGRESSO UFPE EM DEBATE. Saúde mental e o lattes: uma nuvem nebulosa. 2018. (Congresso).

Livro: Memórias do Congresso UFPE em debate. Universidade de ideias e ideias de universidade. Saúde mental e o lattes: uma nuvem nebulosa. 2018. (Artigo de opinião). ISBN: 978-85-60323-64-7

Saúde Mental e o LATTES uma Nuvem Nebulosa

Waydja Lânia Virgínia de Araújo Marinho (UFPE)

waydjaa@gmail.com

Silêncio na academia, clamor sem ajuda, lutas internas, problemas de saúde mental... Com o passar dos anos vem surgindo um crescente pedido de ajuda silencioso dos estudantes que precisam “engordar” o currículo Lattes. Soa clichê falar que “a vida não cabe no Lattes”. Como estudante de pós-graduação, posso dizer que o falar difere do pensar e agir.

Vários estudos acerca do tema vêm sendo publicados ao redor do mundo (EVANS, T. M. et al. Evidence for a mental health crisis in graduate education, *Nature Biotechnology*. v. 36, p. 282– 284, 2018), demonstrando uma crescente necessidade de diagnosticar e tratar essa população. Estudantes da linha stricto sensu são reportados como os mais susceptíveis a crises de ansiedade e depressão, com taxas relatadas na literatura de aproximadamente seis vezes quando comparados ao público em geral.

Mas de onde surgem esses problemas? Tal qual uma nuvem nebulosa, a poeira de enfrentar rotinas pesadas e cobranças de desempenho exacerbadas, ausência de treinamento em administração do tempo pessoal e formas de lidar com o estresse muitas vezes imposto. Além de tudo isso, ainda existem outros fatores associados, como o fato de sair de casa em busca do seu sonho, do seu crescimento profissional, a busca pelo perfeccionismo imposta desempenho exacerbadas, ausência de treinamento em administração do tempo pessoal e formas de lidar com o estresse muitas vezes imposto. Além de tudo isso, ainda existem outros fatores associados, como o fato de sair de casa em busca do seu sonho, do seu crescimento profissional, a busca pelo perfeccionismo imposta por nós mesmos.

Além das cobranças dos (des)orientadores, há brigas de egos entre a classe docente que terminam respingando em cobranças excessivas ao aluno, a busca por essa aceitação associada a aprovação dos colegas de laboratório, a competição pelo reconheci-

to, a comparação de currículos, contando quem publica ou publicou mais artigos em determinado intervalo de tempo, a qualidade e fator de impacto da revista, os exames de qualificação, melhores notas e todas as etapas de execução de um projeto de pesquisa.

Muitos de nós acha estar sozinho nessa rotina devastadora, mas se empaticamente olharmos para o lado, veremos que nosso colega provavelmente também está na mesma situação. A bolsa incompatível com o custo de vida e que por vezes atrasa, condições precárias de sobrevivência a uma pós-graduação, por outro lado, a requisição de dedicação exclusiva, experimentos que teimam em colega provavelmente também está na mesma situação. A bolsa incompatível com o custo de vida e que por vezes atrasa, condições precárias de sobrevivência a uma pós-graduação, por outro lado, a requisição de dedicação exclusiva, experimentos que teimam em não dar certo e as incansáveis crises de choro noturnas (<<https://www1.folha.uol.com.br/ciencia/2017/12/1943862-estudantes-de-mestrado-e-doutorado-relatam-suas-dores-na-pos-graduacao.shtml>> Acesso em 29 de Outubro de 2018).

Nesse meio não há meio termo: “Faz-se perfeito ou não se faz”. Com isso, demonstra-se uma necessidade grave de educar professores sobre o impacto da educação de pós-graduação na saúde mental de estudantes de pós-graduação. Muitos acadêmicos têm falado sobre suas próprias doenças mentais e o estigma que enfrentam dentro da comunidade acadêmica: o receio de não ganhar estabilidade ou julgamentos por colegas é apenas uma das principais preocupações enfrentadas por aqueles que sofrem de distúrbios mentais. Fundamentalmente, há uma necessidade de uma mudança na cultura dentro das universidades para eliminar o estigma e garantir que os alunos não relutem em se comunicar abertamente com seus orientadores.

Ainda não há um diagnóstico real desse problema em nosso país. Talvez pelo estigma associado de ter uma doença mental, há um costume de se questionar a divulgação dos problemas de saúde mental, o que deveria acontecer em forma de aconselhamento, pois dessa forma, poderia se expor aos seus (hipotéticos) conselheiros. Estudos sugerem aos pós-graduados que conversem abertamente com um conselheiro universitário designado, sobre o que pode ser obtido com a confidencialidade e que nível de deta-

lhe é apropriado. “Se um pós-graduado sente que algum nível de revelação ajudaria seu orientador a entender seu comportamento recente, pode ser suficiente dizer simplesmente: ‘Eu tenho tido problemas e estou recebendo ajuda para isso’”.

Para ter sucesso, as pessoas devem cuidar de si mesmas. Ainda concordo com estudiosos que argumentam: “Conseguir ajuda é um sinal de força, não fraqueza”.

- **Participante**

X International Symposium on Diagnostics and Therapeutics (SINATER), V International Symposium on Rare Diseases (RDIS) and XIV LIKA Scientific Journey



- **Publicação**

- Apresentação de resumo

Expression pattern of JAM2 in mouse brain vasculature on the betsholtzlab* database: understanding a new gene linked to brain calcification. X International Symposium on Diagnostics and Therapeutics (SINATER), V International Symposium on Rare Diseases (RDIS) and XIV LIKA Scientific Journey

Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=IPT7kIJwt_0>



- EXPRESSÃO PARA O GENE MYORG PELO ALLEN MOUSE BRAIN ATLAS NA
CALCIFICAÇÃO CEREBRAL. 1º Encontro de Biociências da UFPE



- **Palestra realizada**

- Sexismo hemisférico: uma visão da neurociência. III JORNADA DE INOVAÇÃO E PESQUISA DA FOCCA E UNISÃO MIGUEL.



- **Conselho Editorial**

ISSN 2674 5860 - ANAIS DA JORNADA DE INOVAÇÃO E PESQUISA, Vol.3, 3ªediç.,
Ano 2019. Disponível em
<https://www.unisaomiguel.edu.br/anaisjornada/edicoes/atual>