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

ERALDO FONSECA DOS SANTOS JUNIOR

ESTUDO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS A CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS EM MODELO DE CALCIFICAÇÃO *IN VITRO* E POSSÍVEIS ALTERNATIVAS DE TRATAMENTO

Recife
2019

ERALDO FONSECA DOS SANTOS JUNIOR

ESTUDO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS A CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS EM MODELO DE CALCIFICAÇÃO *IN VITRO* E POSSÍVEIS ALTERNATIVAS DE TRATAMENTO

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

Orientador: Profº. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Recife

2019

Catalogação na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Santos Junior, Eraldo Fonseca dos

Estudo do padrão de expressão de genes associados a calcificações cerebrais em modelo de calcificação *in vitro* e possíveis alternativas de tratamento / Eraldo Fonseca dos Santos Junior- 2019.

76 folhas: il., fig., tab.
Orientador: João Ricardo Mendes de Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2019.
Inclui referências, apêndices e anexo

1. Calcificação 2. Cérebro 3. Esclerose tuberosa I. Oliveira, João Ricardo Mendes de (orient.) II. Título

572.516 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2019-371

ERALDO FONSECA DOS SANTOS JUNIOR

ESTUDO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS A CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS EM MODELO DE CALCIFICAÇÃO *IN VITRO* E POSSÍVEIS ALTERNATIVAS DE TRATAMENTO

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

Aprovada em: 09/08/2019.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profª. Drª. Paula Sandrin Garcia (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profª. Drª. Dayane Aparecida Gomes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais Eraldo e Luciana, por
acreditarem e me fazer acreditar que a educação
sempre foi e sempre será o melhor caminho.

A minha irmã, Fabíola, por acreditar e ajudar nessa caminhada.

A minha namorada Renata, por todo companheirismo e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que através da minha família e amigos, se fez presente e me ajudou sempre que precisei perseverar nas minhas atividades.

Aos meus pais, por todo amor, dedicação, apoio e ensinamentos. Por abrir mão de tantas coisas para fazer da educação e da dignidade o maior legado para mim e minha irmã.

A minha namorada, Renata, por ser acima de tudo minha companheira de vida. Te amo!

Agradecimento especial ao meu orientador, Prof. João Ricardo, que além de guiar meu desenvolvimento científico, mostrou com palavras e exemplos que a rotina científica na academia pode e deve ser um ambiente leve e de responsabilidade. Obrigado!

Agradeço aos meus colegas de laboratório, que me acompanharam nesses últimos anos e que me ajudaram bastante nessa jornada: Darlene Paiva, Denis Moura, Joana Braga, José Eriton, Laura Ferreira, Maria Aparecida (Cida), Lylyan Pimentel, Rayssa Medeiros, Roberta Lemos e Waydja Lânia. Obrigado pessoal!

Ao Profº Marcelo Cairrão, por ser meu orientador no estágio docência.

As Professoras Belmira Lara e Dayane Gomes, pela solicitude, conselhos e auxílios técnicos no desenvolvimento de alguns experimentos.

A Igor Tchaikovsky e Renata Santos, pelas conversas cotidianas e desabafos científicos!

A Prof. Lene Pedersen e todos do laboratório no Depto de Biologia Molecular e Genética da Universidade de Aarhus: Frederik, Jacob, Nina, Nour e Yuri. Sempre muito solícitos e acolhedores. Me ensinaram bastante. Mange tak til alle!

Ao Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA/UFPE) e a Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde, por todo seu corpo técnico e por fornecerem a estrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Calcificações cerebrais (CC) são um achado comum em neuroimagens de pacientes com desordens metabólicas, genéticas ou doenças mitocondriais. A calcificação cerebral familiar primária (CCFP) é uma doença neurodegenerativa calcificante rara, caracterizada pela presença de depósitos anormais de hidroxiapatita em regiões específicas do cérebro, como o tálamo e os gânglios da base. Até o presente, 5 genes foram associados a CCFP: *SLC20A2, XPR1*, *PDGFβ*, *PDGFRβ* e *MYORG*. Outra desordem que apresenta o fenótipo das CC é a Esclerose Tuberosa (ET), uma síndrome neurocutânea, onde aproximadamente 80% dos casos estão relacionados com a perda da função dos genes *TSC1* ou *TSC2*. Na ET, as CC são relatadas como sendo difusas e sem padrão de simetria ou bilateralidade. Objetivamos então, através de um modelo de calcificação *in vitro*, avaliar o padrão de expressão de genes associados as CC e possíveis alternativas de tratamento. Utilizamos células SaOs-2 e induzimos sua calcificação a partir da administração de ácido ascórbico e β-glicerolfosfato por 14 dias. Avaliamos a expressão dos genes *TSC1* e *TSC2* durante a indução da calcificação e também a partir do tratamento concomitante com o calcitriol, a forma ativa da vitamina D ou o bisfosfonato alendronato. No mesmo modelo experimental, também avaliamos a eficácia do tratamento com o alendronato, sobre a expressão dos genes *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ*. Foi observado que no modelo celular de calcificação, tanto os genes *TSC1* e *TSC2*, quanto o *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ*, tiveram suas expressões diminuídas ao fim dos 14 dias. Quando a cultura foi tratada com calcitriol ou alendronato, os genes *TSC1* e *TSC2*, mantiveram ou aumentaram sua expressão. Em relação aos genes *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ*, quando a cultura foi tratada com alendronato, apenas o *PDGFRβ* não apresentou melhora na expressão, pelo contrário, ficou abaixo do controle. De maneira geral, tanto o calcitriol, quanto o alendronato exerceram um papel positivo na expressão dos genes dentro de um contexto de calcificação, além de diminuir a própria calcificação induzida no modelo celular. Nossos resultados indicam a possibilidade de novos estudos e novas abordagens acerca do tratamento de doenças que tem as CC como um de seus fenótipos.

Palavras-chave: Alendronato. Calcificação cerebral familiar primária. Calcitriol. Esclerose tuberosa. SaOs-2.

ABSTRACT

Brain calcifications (BC) are a common finding in neuroimaging of patients with metabolic, genetic or mitochondrial diseases. Primary Familial Brain Calcification (PFBC) is a rare calcifying neurodegenerative disease, characterized by the presence of abnormal hydroxyapatite deposits in specific brain regions, such as the thalamus and basal ganglia. To date, 5 genes have been associated with PFBC: SLC20A2, XPR1, PDGFβ, PDGFRβ and MYORG. Another disorder that presents the BC phenotype is Tuberous Sclerosis (TS), a neurocutaneous syndrome, where approximately 80% of cases are related to the loss of function of *TSC1* or *TSC2* gene. In TS, BC are reported as diffuse and without symmetry or bilaterality pattern. We aimed then, through an *in vitro* calcification model, to evaluate the pattern of gene expression associated with BC and possible treatment alternatives. We used SaOs-2 cells and induced their calcification by the administration of ascorbic acid and β-glycerolphosphate for 14 days. We evaluated the expression of the *TSC1* and *TSC2* genes during the calcification induction and also from concomitant treatment with calcitriol, the active form of vitamin D or the bisphosphonate alendronate. In the same experimental model, we also evaluated the efficacy of alendronate treatment on the expression of the *SLC20A2*, *PDGFβ* and *PDGFRβ* genes. It was observed that in the cellular model of calcification, both the TSC1 and TSC2 genes, as well as the SLC20A2, PDGFβ and PDGFRβ, had their expressions decreased after 14 days. When the culture was treated with calcitriol or alendronate, the TSC1 and TSC2 genes maintained or increased its expression. Regarding the SLC20A2, PDGFβ and PDGFRβ genes, when the culture was treated with alendronate, only PDGFRβ did not improve expression, conversely, it was below control. Overall, both calcitriol and alendronate, played a positive role in gene expression within a calcification context, in addition to decreasing the induced calcification itself in the cellular model. Our results indicate the possibility of further studies and new approaches to the treatment of diseases that have CC as one of their phenotypes**.**

Keywords: Alendronate. Calcitriol. Primary familial brain calcification. SaOs-2. Tuberous sclerosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Neuroimagens representativas (tomografia computadorizada) de pacientes com calcificações cerebrais de diferentes etiologias 18

Figura 2 – Neuroimagens representativas (tomografia computadorizada) de três pacientes com CCFP 20

Figura 3 – Neuroimagens representativas (tomografia computadorizada) de três pacientes com CCFP com variantes no gene *MYORG* 26

Figura 4 – Via metabólica do mTOR, mTORC1 e mTORC2 27

Figura 5 – Neuroimagens representativas (tomografia computadorizada) de dois pacientes com Esclerose Tuberosa 28

Figura 6 – Estruturas químicas do fosfato inorgânico, pirofosfato inorgânico e estrutura geral dos bisfosfonatos 29

Figura 7 – Via metabólica do Mevalonato para síntese do colesterol e principais alvos dos Bisfosfonatos nitrogenados, especialmente no SNC 30

Figura 8 – Estrutura química do Alendronato 31

Figura 9 – Ensaio de viabilidade (MTT) em células SaOs-2 submetidas a diferentes concentrações de Alendronato, em 24 h, 48 h e 72 h 45

Figura 10 – Fotomicrografia em campo claro de células SaOs-2 controle, sem tratamento 46

Figura 11 – Análise qualitativa da calcificação em células SaOs-2 através da marcação com o corante vermelho de alizarina ao fim de 14 dias 46

Figura 12 – Calcificação em células SaOs-2, durante 7 e 14 dias e expressão de genes envolvidos com a CCFP ao fim de 14 dias do respectivo modelo 47

Figura 13 – Efeito do Alendronato nas doses de 1 µM e 5 µM sobre calcificação em células SaOs-2 48

Figura 14 – Efeito do Alendronato nas doses de 1 µM e 5 µM sobre a expressão de genes envolvidos com a CCFP durante 7 e 14 dias, em modelo experimental de calcificação em células SaOs-2. 49

Figura 15 – Expressão dos genes TSC1 e TSC2 (A) e das suas respectivas proteínas (B) no modelo de calcificação celular em 7 e 14 dias 50

Figura 16 – Efeito do Alendronato nas doses de 1 µM e 5 µM sobre a expressão de genes envolvidos com a ET durante 7 e 14 dias, em modelo experimental de calcificação em células SaOs-2. 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHE	Barreira hematoencefálica
BPs	Bisfosfonatos
CC	Calcificações cerebrais
CCFP	Calcificação Cerebral Familiar Primária
cDNA	DNA complementar
EP	Erro padrão
ET	Esclerose Tuberosa
GB	Gânglios da base
KO	*Knockout*
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
M	Molar
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MTT	*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*
MYORG	*Myogenesis Regulating Glycosidase*
N-BPs	Bisfosfonato nitrogenado
Não-N-BPs	Bisfosfonato não nitrogenado
NaPiTs	Transportadores de Pi dependentes de sódio
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGFβ	*Platelet Derived Growth Factor Subunit β*
PDGFRβ	*Platelet Derived Growth Factor Receptor β*
Pi	Fosfato inorgânico
PiT-1	Transportador de Pi tipo 1
PiT-2	Transportador de Pi tipo 2
PPi	Pirofosfato inorgânico
qPCR	PCR em tempo real
RVD	Receptor de vitamina D
SaOs-2	Linhagem celular imortalizadas de sarcoma osteogênico.
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SLC20A1	*Solute Carrier Family 20 Member 1*

SLC20A2	*Solute Carrier Family 20 Member 2*
SNC	Sistema nervoso central
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1-3- diol
TC	Tomografia computadorizada
TSC1	*Tuberous Sclerosis Complex 1*
TSC2	*Tuberous Sclerosis Complex 2*
VitD	Vitamina D
XPR1	*Xenotropic and Polytropic Retrovirus Receptor 1*
µg	Microgramа
µl	Microlitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

1.1 OBJETIVOS 15

1.1.1 Objetivo geral 15

1.1.2 Objetivos específicos 15

1.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE 16

2 REVISÃO DE LITERATURA 17

2.1 CALCIFICAÇÃO CEREBRAL 17

2.2 CALCIFICAÇÃO CEREBRAL FAMILIAR PRIMÁRIA 18

2.3 GENES ENVOLVIDOS NA CALCIFICAÇÃO CEREBRAL FAMILIAR PRIMÁRIA 21

2.3.1 Gene *SLC20A2* 21

2.3.2 Genes *PDGFβ* e *PDGFRβ* 23

2.3.3 Gene *XPR1* 24

2.3.4 Gene *MYORG* 25

2.4 SÍNDROME DA ESCLEROSE TUBEROSA 26

2.5 BISFOSFONATOS - ALENDRONATO 29

2.6 VITAMINA D 32

3 MATERIAIS E MÉTODOS 35

3.1 CULTURA DE CÉLULAS 35

3.2 INDUÇÃO DA CALCIFICAÇÃO, CITOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO 35

3.3 TRATAMENTOS 36

3.4 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR – TESTE DO MTT 36

3.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA 37

3.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA 37

3.7 WESTERN BLOTTING 37

3.8 PCR EM TEMPO REAL (qPCR) 38

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 39

4 RESULTADOS 40

4.1 PARTE 1 – ARTIGO PUBLICADO - CALCITRIOL REVERSES THE DOWN-REGULATION PATTERN OF TUBEROUS SCLEROSIS COMPLEX GENES IN AN IN VITRO CALCIFICATION MODEL 40

4.2 PARTE 2 – INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ALENDRONATO EM MODELO DE CÉLULAS SaOs-2 CALCIFICADAS E SUA REPERCUSSÃO NOS GENES ENVOLVIDOS NA CCFP E ET 45
4.2.1 Análise da viabilidade celular 45
4.2.2 Indução da calcificação em células SaOs-2 e expressão de genes envolvidos com a CCFP 46
4.2.3 Efeito do alendronato em modelo de células SaOs-2 calcificadas 47
4.2.4 Efeito do alendronato sobre a expressão dos genes SLC20A2, PDGFβ e PDGFRβ em modelo de células SaOs-2 calcificadas 48
4.2.5 Efeito do alendronato sobre a expressão dos genes TSC1 e TSC2 em modelo de células SaOs-2 calcificadas 49
5 DISCUSSÃO 51
6 CONCLUSÕES 55
REFERÊNCIAS 56
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF HUMAN GENETICS 66
APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA SEIZURE:EUROPEAN JOURNAL OF EPILEPSY 67
APÊNDICE C – RESUMO COM COLABORAÇÃO INTERNACIONAL APRESENTADO SOB O FORMATO DE PÔSTER NO *VIII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DIAGNOSTICS AND THERAPEUTICS* (VIII SINATER - 2017) 68
ANEXO A – MANUSCRITO SUBMETIDO AO JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH 69

1 INTRODUÇÃO

A ciência básica experimental possui um papel importante no desenvolvimento e construção do conhecimento, visto que procura mimetizar condições humanas em organismos menos complexos e passíveis de manipulação. Ao longo do tempo, modelos celulares vêm sendo utilizados para investigar a dinâmica de várias doenças, além de, consequentemente, ser uma alternativa ao uso de animais; embora estes ainda sejam peças importantes e necessárias no desenvolvimento do conhecimento.

Nosso trabalho busca, através de um modelo celular experimental, criar um ambiente próximo ao encontrado em humanos e entender o comportamento de genes reconhecidamente envolvidos com a calcificação cerebral. Calcificações em tecidos moles, como o cérebro, costumam causar danos a fisiologia do tecido e consequente prejuízo ao indivíduo, que pode desenvolver sintomas neurológicos e psiquiátricos. Além de entender a dinâmica desses genes em um ambiente de calcificação, buscamos avaliar a eficácia de determinados tratamentos nesse contexto.

Aqui, baseamos nossa pesquisa em duas doenças que tem a calcificação cerebral como elo, a Calcificação Cerebral Familiar Primária e a Esclerose Tuberosa. A primeira possui no fenótipo da calcificação cerebral seu principal achado, uma calcificação muito própria e muito importante para o desenvolvimento de todos os sintomas do paciente. A Esclerose Tuberosa, por ser uma síndrome, acomete o indivíduo de maneira sistêmica, e tem na calcificação cerebral mais um de seus sinais. Ambas possuem um caráter genético importante, então, os diferentes genes envolvidos no contexto da calcificação, serviram como fio condutor da pesquisa.

Não existe tratamento específico para as calcificações cerebrais, evitar sua formação, cessar sua expansão ou diminuir sua área no cérebro ainda são um desafio. Nosso trabalho pretende investigar a interação do calcitriol e do alendronato sobre os genes envolvidos nessas doenças e sobre o próprio fenótipo da calcificação, em um modelo celular. Esperamos através desses experimentos iniciais, de base, suscitar achados inéditos que impactem em novas terapias e que tragam sobretudo uma melhor qualidade de vida para esses pacientes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar, através de um modelo de calcificação *in vitro,* o padrão de expressão de genes associados a calcificação cerebral e possíveis alternativas de tratamento.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão dos genes envolvidos com a Esclerose Tuberosa, *TSC-1* e *TSC-2*, em um modelo de calcificação *in vitro* de células SaOs-2;

- Analisar a repercussão da expressão dos genes *TSC-1* e *TSC-2* em um modelo de calcificação *in vitro*, de células SaOs-2, frente ao tratamento com calcitriol ou alendronato;

- Avaliar a repercussão do tratamento com o alendronato sobre a calcificação induzida em um modelo *in vitro* de células SaOs-2;

- Analisar a repercussão da expressão dos genes *SLC20A2, PDGFβ* e *PDGFRβ* em um modelo de calcificação *in vitro* de células SaOs-2, frente ao tratamento com alendronato.

1.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Calcificações cerebrais são sinais comuns, presente em várias condições raras. Até o momento, diversas alterações genéticas em diferentes genes foram associadas a esse fenótipo, que pode ocorrer com diferentes padrões no cérebro. Por que genes com funções tão diferentes convergem para um mesmo fenótipo? Dentro do fenótipo das CC, por qual motivo algumas áreas calcificam e outras não? Como diminuir ou parar o acúmulo de cristais de cálcio no cérebro? As perguntas são inúmeras e embora os estudos que abordam os mecanismos das CC tenham aumentado considerávelmente nos últimos anos, ainda existe uma lacuna imensa. Nesse cenário, estudos *in vitro* se mostram como uma importante ferramenta para entender essas questões e tentar esclarecer o papel de determinados genes no fenótipo das CC.

Nosso grupo possui vasta experiência no tema, seja em estudos com pacientes, seja com modelos celulares ou animais. Nesse trabalho, de maneira específica, buscávamos através de um modelo celular, elucidar questões básicas, fundamentais, a respeito do comportamento de determinados genes inseridos em um ambiente de calcificação. Para além desse entendimento, procuramos abordar possíveis alternativas de tratamento contra a deposição de cálcio e que possam reestabelecer a expressão dos genes que se apresentam diminuídos nos pacientes com o fenótipo em questão.

Baseado nos dados da literatura, acreditávamos que o calcitriol, bem como o alendronato, poderiam interferir positivamente no comportamento dos genes *TSC1* e *TSC2*, envolvidos com a Esclerose Tuberosa. Esperávamos também que o alendronato fosse capaz de diminuir a calcificação no nosso modelo celular, através da manutenção dos níveis de expressão dos genes *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ*, envolvidos com a CCFP. A partir dos nossos achados, desejamos lançar luz sobre novas perspectivas de tratamentos para pacientes com CC.

.

2 REVISÃO DE LITERAURA

2.1 CALCIFICAÇÃO CEREBRAL

A calcificação ectópica ou ossificação heterotópica, é caracterizada como a biomineralização inadequada de tecidos moles, frequentemente causando danos aos mesmos (LI; UITTO, 2018). São vários os fatores que contribuem para essa condição, como infecções, traumas, alterações metabólicas e genéticas. Dentre os tecidinseriros moles suscetíveis a esse processo, os mais afetados são: coração, vasos, pulmão, rim e cérebro (LEMOS et al., 2013). Essa biomineralização é formada tipicamente por sais de fosfato de cálcio, incluindo a hidroxiapatita ($Ca_{10}[PO_4]_6[OH]_2$) como principal componente, além de possuir também zinco, ferro e magnésio na sua composição (GIACHELLI, 1999). Nas calcificações cerebrais (CC) a deposição de minerais ocorre tanto na parede dos vasos como no parênquima cerebral, causando neurodegeneração e gliose (LEMOS et al., 2013).

Os pacientes afetados por essas calcificações podem apresentar diversos sintomas neurológicos e/ou psiquiátricos como parkinsonismo, distonia, ataxia, convulsões, demência, psicose e transtornos de humor, além de prejuízos motores. Outros pacientes, no entanto, permanecem assintomáticos por toda a vida (LEMOS et al., 2013; MANYAM, 2005; RUSSELL, 2011).

As CC podem ocorrer dentro de um processo considerado fisiológico ou patológico (Figura 1) (OLIVEIRA; BARROS E SILVA; OLIVEIRA, 2013). Numa condição fisiológica, as CC ocorrem de maneira natural, sem relação com processos patológicos e sem causarem prejuízos ao seu portador, em sua maioria, homens (YALCIN et al., 2016). Muitos estudos apontam que CC fisiológicas na glândula pineal e no plexo coroide, por exemplo, podem ocorrer em até 70% dos indivíduos com média de 50 anos de idade (DAGHIGHI et al., 2007; YALCIN et al., 2016). As calcificações são um achado comum em neuroimagens de pacientes com desordens metabólicas como hipoparatireoidismo, pseudohipoparatireoidismo ou doenças mitocondriais. Diversas síndromes como Aicardi-Goutieres, DiGeorge, Down e Esclerose Tuberosa também apresentam tal achado. Entre outras causas, toxicidade por ferro, manganês ou monóxido de carbono, bem como infecções congênitas causadas pelos vírus da Zika ou Rubéola, por exemplo, também podem desencadear um quadro de calcinose no cérebro (CORTES et al., 2018; DENG; ZHENG; JANKOVIC, 2015). De maneira geral, estudos

apontam que as CC podem ser uma manifestação secundária de mais de 50 condições médicas (KOSTIC; PETROVIC, 2017; QUINTANS; OLIVEIRA; SOBRIDO, 2018).

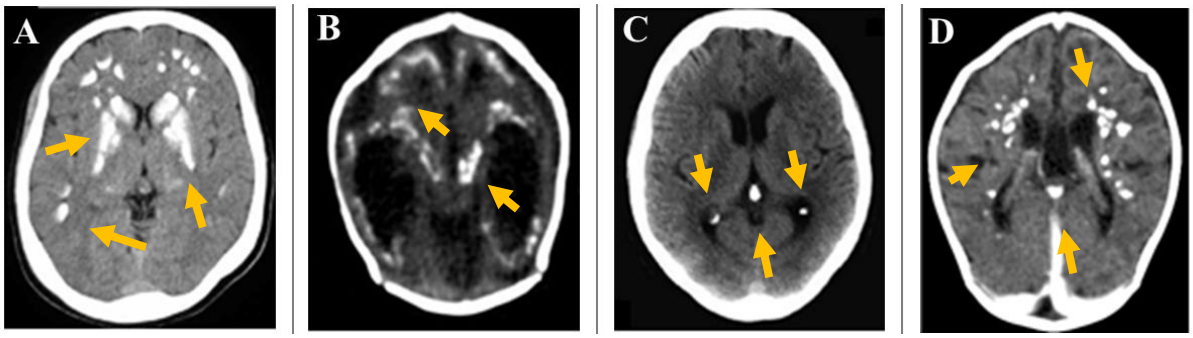

Figura 1. Neuroimagens representativas (tomografia computadorizada) de pacientes com calcificações cerebrais de diferentes etiologias. (A) Pseudo-hipoparatireoidismo (MONTENEGRO et al., 2011). (B) Zika vírus (PETRIBU et al., 2017). (C) Calcificação fisiológica da glândula pineal e plexo coroide (TURGUT et al., 2008). (D) Síndrome de Aicardi-Goutieres (UGGETTI et al., 2009). As calcificações estão indicadas com as setas amarelas.

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). A maioria das calcificações no cérebro ocorrem em áreas específicas, conferindo um certo tropismo a essas regiões, característica ainda sem uma razão estabelecida. Dentro de um contexto patológico, estudos mostram que existe uma vulnerabilidade maior a deposição de cristais de hidroxiapatita nos gânglios da base (GB) (BEKIESINSKA-FIGATOWSKA; MIERZEWSKA; JURKIEWICZ, 2013; DENG; ZHENG; JANKOVIC, 2015; OLIVEIRA, 2011).

2.2 CALCIFICAÇÃO CEREBRAL FAMILIAR PRIMÁRIA

Calcificações bilaterais no cérebro foram descritas pela primeira por Delacour, ao realizar uma necropsia em 1850, na França, de um homem com 56 anos (DELACOUR, 1850). Pouco tempo depois, Bamberger, descreveu calcificações nos vasos cerebrais de uma mulher que tinha retardo mental e convulsões (BAMBERG, 1855). Em 1930, o patologista alemão Karl Theodor Fahr descreveu o caso de um paciente epiléptico e com histório de demência, de 81 anos, que apresentava CC difusas (FAHR, 1930). A partir de então, sendo publicado pela primeira vez em 1951, o epônimo “Doença de Fahr” passou a ser utilizado para descrever pacientes com calcificações cerebrais (DECHAUME et al., 1951).

Os GB se notabilizaram inicialmente por serem uma das áreas do cérebro com maior incidência de calcificação, diante disso, adotou-se o nome de “calcificação idiopática dos gânglios da base”, utilizado pela primeira vez em 1974 (CARACENI; BROGGI; AVANZINI, 1974). No entanto, outras regiões como tálamo, núcleo denteado e susbtância branca cortical também se mostraram afetadas com frequência. Posteriormente, outros nomes foram utilizados como “calcinose estrio-pálido-denteada bilateral” e “ferrocalcinose cerebrovascular familiar”, por exemplo (QUINTANS; OLIVEIRA; SOBRIDO, 2018). Diante de tantas terminologias, sem uma que correspondesse de maneira específica a esse grupo de doença, vários outros nomes foram cunhados, criando uma certa confusão em relação as verdadeiras causas e consequências da doença (MANYAM, 2005).

Até então não se sabia qual ou quais mecanismos davam início as calcificações, que aconteciam em indivíduos sem qualquer distúrbio bioquímico. O termo “idiopático”, no entanto, deixou de ser utilizado após a descoberta do primeiro gene associado a doença, quando então se propôs o termo “calcificação cerebral familiar primária” (SOBRIDO et al., 2013). O termo primário significa que a causa das calcificações têm origem genética e não que são decorrentes de distúrbios metabólicos ou qualquer outra condição patológica (LEMOS et al., 2015). Mesmo com o estabelecimento de um nome mais adequado para a doença, ainda é possível observar na literatura e na prática clínica, o termo “Doença de Fahr” (FERREIRA; RICARDO; OLIVEIRA, 2018).

Utilizado desde então, o termo “calcificação cerebral familiar primária” (CCFP) refere-se a uma desordem neuropsiquiátrica rara, caracterizada pela deposição de fosfato de cálcio de maneira bilateral e simétrica, predominantemente nos GB, mas também pode ocorrer no cerebelo, tálamo e/ou tronco cerebral (Figura 2) (QUINTANS; OLIVEIRA; SOBRIDO, 2018).

As características clínicas da CCFP variam desde sintomas neurológicos e/ou psiquiátricos, até pacientes que não desenvolvem sintomalogia alguma, cerca de 42% (RAMOS et al., 2018). Os sinais neurológicos mais comuns e primeiramente detectados são parkinsonismo, distonia, tremor e coreia (QUINTANS; OLIVEIRA; SOBRIDO, 2018). Em relação aos sintomas psiquiátricos, os mais frequentes são psicose, distúrbios de comportamento, transtorno de humor e prejuízos cognitivos (RAMOS et al., 2018). Em alguns casos também, pacientes podem apresentar enxaqueca ou convulsões (QUINTANS; OLIVEIRA; SOBRIDO, 2018). As manifestações sintomáticas são bastante variáveis em relação a idade do paciente, com mediana de 31 anos, mas podendo afetar crianças a partir dos 6 anos de idade até os mais idosos (RAMOS et al., 2018). Até o presente, não existe tratamento

específico para a CCFP, apenas para os sintomas desencadeados pela mesma, que já são tratados na rotina neuropsiquiátrica (OLIVEIRA 2011).

É difícil estabelecer a prevalência da CCFP, visto que não existe uma sintomatologia específica. As calcificações características da CCFP também podem ser sinal de outras doenças, o que dificulta essa estimativa. Nesse sentido, um estudo de Nicolas et al., sugere que as CCFP são subestimadas e subdiagnosticadas (NICOLAS et al., 2018). O diagnóstico da CCFP deve ser feito para diferenciar a doença de outras desordens genéticas e não-genéticas, incluindo doenças mitocondriais, metabólicas, infecciosas, tóxicas, vasculares e neurodegenerativas (QUINTÁNS; OLIVEIRA; SOBRIDO, 2018). No diagóstico, é importante considerar o forte componente genético da doença, onde o histórico familiar de sintomas neurológicos e psiquiátricos são frequentes na CCFP. Quando se exclui causas secundárias para as deposições de cálcio no cérebro, é altamente indicado o estudo genético, a fim de encontrar variantes nos genes descritos ou até em algum gene ainda não relacionado.

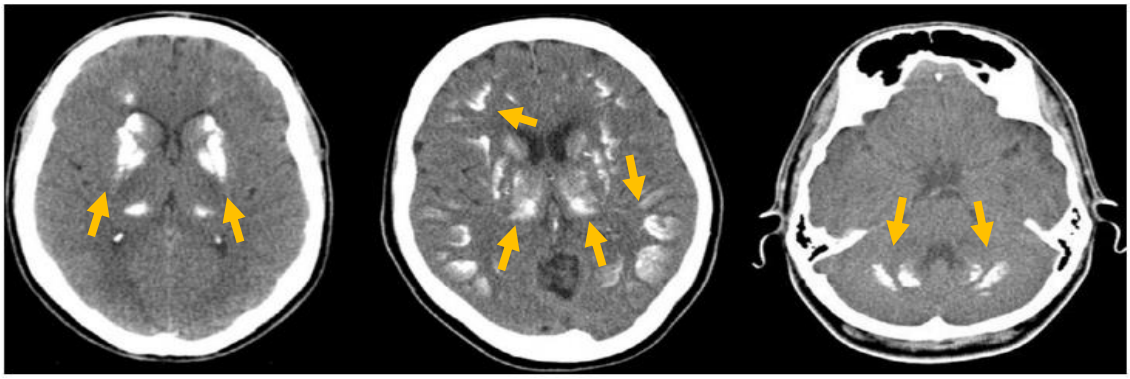

Figura 2. Neuroimagens representativas (tomografia computadorizada) de três pacientes com CCFP. As calcificações estão indicadas com as setas amarelas. (QUINTÁNS; OLIVEIRA; SOBRIDO, 2018).

Até o momento, variantes em cinco diferentes genes foram sucessivamente identificadas como sendo causadoras da CCFP: *SLC20A2* (WANG et al., 2012), *PDGFRβ* (NICOLAS et al., 2013), *PDGFβ* (KELLER et al., 2013) e *XPR1* (LEGATI et al., 2015) que possuem um padrão de herança autossômico dominante e mais recentemente, variantes no *MYORG* foram identificadas (YAO et al., 2018), que diferente dos outros, possui um padrão de herança autossômico recessivo. Dois desses genes são relacionados com a homeostase do fosfato 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. Outros dois estão associados com a integridade da barreira hematoencefálica (BHE) e manutenção dos pericitos, o *PDGFRβ*, o gene que codifica o receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta e o *PDGFβ*, o gene do seu principal ligante. O *MYORG* ainda é pouco estudado e suas funções não são 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).

Pouco antes da primeira publicação que relacionou as variantes do *MYORG* com CCFP, um estudo internacional envolvendo pacientes do Brasil, Italia, França e EUA forneceram um panorama das variantes genéticas encontradas em 177 pacientes (RAMOS et al., 2018). Do total, 16,9% dos pacientes apresentaram variantes no *SLC20A2*; as variantes no *PDGFβ* e *XPR1* apareceram em 3,4% cada e outros 1,7% apresentaram no *PDGFRβ*. Com a descoberta da relação do *MYORG*, a tendência é que esse gene responda pela causa da CCFP em muitos dos indivíduos até então negativos para os outros quatro genes iniciais. Ainda é grande a quantidade de casos de CCFP que não estão relacionadas com os genes até então descritos na literatura.

2.3 GENES ENVOLVIDOS NA CALCIFICAÇÃO CEREBRAL FAMILIAR PRIMÁRIA

2.3.1 Gene *SLC20A2*

SLC20A2 (8q11.21) 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) tipo III (FORSTER et al., 2013). Inicialmente, PiT-1 e PiT-2 foram identificados como receptores retrovirais Glvr-1 (gibbon ape leukemia virus receptor) e Ram-1 (rat amphotropic leukemia virus receptor), respectivamente (HARA et al., 1990; MILLER; MILLER, 1994). Posteriormente, essas duas proteínas foram relatadas como transportadores de Pi acoplados ao Na+, transportando Pi a partir do fluido intersticial, garantindo assim funções celulares normais (KAVANAUGH et al., 1994; OLAH et al., 1994).

Estudos têm demonstrado que ambos, PiT-1 e PiT-2, são amplamente expressos em vários tecidos de mamíferos, como osso, rim, células vasculares de musculatura lisa, glândula paratireóide e cérebro, atuando então na homeostase do Pi por todo o organismo (BØTTGER; PEDERSEN, 2011; FORSTER et al., 2013; VILLA-BELLOSTA et al., 2009; VILLA-BELLOSTA; SORRIBAS, 2009). Especialmente no cérebro, Inden et al., em 2016, mostrou que o PiT-1 e o PiT-2 são os principais NaPiTs, tanto em humanos como em camundongos (INDEN et al., 2016). Ambos 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 CCFP, 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).

Em 2013, foi publicado pela primeira vez os efeitos da perda do PiT-2 em um animal knockout (KO) em homozigose para o gene *SLC20A2* (JENSEN et al., 2013). Os animais KO analisados com 19 semanas, apresentavam agregados calcificados extensos e bilaterais no tálamo e algumas placas calcificadas nos GB e córtex, bem como ao redor dos vasos sanguíneos; achados não observados nos camundongos selvagens com 21 semanas. Em estudo mais recente, o mesmo grupo descreveu que com 8 semanas o cérebro do camundongo KO apresenta nódulos fracamente calcificados, mas que com 15 semanas, os nódulos aumentam em tamanho e número e se apresentam totalmente calcificados (JENSEN et al., 2018). Ao analisar a composição desses nódulos calcificados, os principais minerias encontrados foram o Ca e P, além de Fe, Zn e Al. Outro achado importante observado no modelo animal constatou que as calcificações se iniciam intracelularmente, sobretudo em pericitos e astrócitos.

Além das calcificações cerebrais, outros fenótipos vêm sendo relacionados com a perda da função do gene *SLC20A2*. Inicialmente mostrou-se em camundongos e posteriormente foi mostrado também em humanos, que a deficiência do PiT-2 gera um aumento nas concentrações de Pi no liquido cefalorraquidiano (LCR) (HOZUMI et al., 2018; JENSEN; AUTZEN; PEDERSEN, 2015; PAUCAR et al., 2017; WALLINGFORD et al., 2016). O LCR é produzido no plexo coróide, onde o SLC20A2 é altamente expresso, isso sugere que o PiT-2 é muito importante na manutenção da concentração ideal de Pi no LCR, através da exportação do Pi para o sangue (JENSEN et al., 2018).

Recentemente, mostrou-se que o PiT-2 é determinante também para a qualidade óssea, tanto em camundongos quanto em humanos. Camundongos KO para o gene *SLC20A2* apresentam prejuízo no comprimento e na densidade mineral óssea da coluna vertebral, fêmur e tíbia, além de anormalidades na mandíbula e nos dentes (BECK-CORMIER et al., 2019; YAMADA et al., 2018). Camundongos juvenis apresentam também ossificação endocondral e intramembranosa anormais (BECK-CORMIER et al., 2019). Análises preliminares de pacientes com CCFP, com variante heterozigótica no *SLC20A2*, sugerem redução da massa óssea e mineralização (BECK-CORMIER et al., 2019). Embora o PiT-1 e PiT-2 compartilhem funções, locais de expressão e cerca de 60% de homologia estrutural (LIU et al., 2013), animais com expressão hipomorficas do PiT-1 apresentam mineralização óssea normal (BOURGINE et al., 2013). Diferente do hipomórfico, camundongos KO com deleção completa do PiT-1 são

inviáveis, apresentando morte embrionária (BECK et al., 2010). Tais achado sugerem o PiT-2 como um importante regulador fisiológico da mineralização e o *SLC20A2* também como importante determinante genético da qualidade óssea.

2.3.2 Genes *PDGFβ* e *PDGFRβ*

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês *Platelet-derived growth factor*), foi um dos primeiros fatores de crescimento a ser caracterizado estruturalmente e funcionalmente, ainda na década de 1970. Foi originalmente descrito como uma substância que promove o crescimento de células em cultura de tecidos (HELDIN; WESTERMARK; WASTESON, 1979; ROSS et al., 1974; WESTERMARK; WASTESON, 1976). Os PDGFs incluem uma familia 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) (LEVÉEN et al., 1994; ZHAO et al., 2013).

Atualmente, 4 formas de PDGFs -A, -B, -C, -D são reconhecidas e dois receptores de tirosina quinase (PDGFRα e β), onde PDGFRβ (5q32) foi especialmente implicado na formação de vasos sanguíneos e hematopoiese precoce (VANLANDEWIJCK et al., 2015; ZHAO et al., 2013). O PDGFRα é amplamente expresso em progenitores oligodendrogliais, enquanto a subunidade β é predominantemente expressa em neurônios e regulada positivamente no cérebro de ratos neonatos (HELDIN; OSTMAN; RONNSTRAND, 1998; SMITS et al., 1991).

Em 2013, foi demonstrado que variantes no gene do receptor (*PDGFRβ*) é uma das causas da CCFP (NICOLAS et al., 2013). Ainda em 2013, Keller et al., relataram, pela primeira vez, que variantes no gene que codifica o *PDGFβ* (22q13.1) causa calcificação cerebral tanto em humanos quanto em camundongos (KELLER et al., 2013). No caso do modelo animal, nenhuma diferença foi observada entre machos e fêmeas, e o padrão de calcificação cerebral observado, é semelhante ao encontrado em pacientes com CCFP. Os sinais estão ausentes em camundongos jovens com 2 meses de idade, mas aos 4 meses eles começam a aparecer, dispostos bilateralmente em regiões como tálamo, prosencéfalo basal, mesencéfalo e ponte. Também foi demonstrado que a expressão endotelial de PDGFβ é protetora de calcificações

cerebrais. Além disso, a gravidade da calcificação correlaciona-se com o grau de deficiência de pericitos e a consequente disfunção da BHE (KELLER et al., 2013).

Claramente, 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 (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.

2.3.3 Gene *XPR1*

O gene *XPR1 (xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1)* está localizado no cromossomo 1q25.3 e codifica um receptor retroviral, uma proteína de membrana celular identificada inicialmente como receptor de mamífero do vírus da leucemia murina xenotrópica (X-MLV) (BATTINI; RASKO; MILLER, 1999; TAILOR et al., 1999; YANG et al., 1999). A proteína XPRI está envolvido na homeostase do Pi, tendo o papel de exportar o mesmo do citoplasma para o meio extracelular (GIOVANNINI et al., 2013). O mRNA do XPR1 é amplamente expresso em todo o cérebro de camundongo, sendo o cerebelo e o estriado as regiões com maior expressão (YAO et al., 2017).

Em 2015, Legati et al., publicaram pela primera vez a relação entre variantes no *XPR1* e a CCFP (LEGATI et al., 2015). As variantes, de caráter autossômico recessivo, foram encontradas em famílias com CCFP sem alterações nos genes *SLC20A2, PDGFβ* e *PDGFRβ*. Os indivíduos aparesentavam demência, comprometimento da fala, coreia e marcha instável. Na TC notava-se extensas calcificações nos GB além de córtex ou cerebelo. Estudos funcionais mostraram que variantes no *XPR1* alteravam sua localização na membrana celular e/ou diminuíam significativamente sua função de exportar o Pi (ANHEIM et al., 2016; LEGATI et al., 2015). Com a função de exportação prejudicada, é natural que ocorra o acúmulo de Pi dentro da célula, o que pode contribuir negativamente para a formação de cristais de hidroxiapatita.

Até o momento, pacientes com variantes no *XPR1,* apresentaram maior incidência de disfunção cognitiva e deposição de cálcio cortical, comparado com pacientes com CCFP que possuem variantes em outros genes (BATLA et al., 2017). Ainda de acordo com esses achados, o *XPR1* tem sido associado à uma possível sobreposição biológica entre a CCFP e condições

neurodegenerativas e psiquiátricas, como esquizofrenia, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e demência frontotemporal (MOURA; OLIVEIRA, 2015).

Estudos imunocitoquimicos mostraram em uma linhagem de neuroblastoma (N2A), que o XPR1 co-localiza com o PDGFRB na membrana celular, formando um complexo e uma possível interação entre eles (YAO et al., 2017). Não se sabe ainda quais as consequências dessa possível interação, mas é de grande interesse para o entendimento das CCFP, visto que envolve dois genes diretamente ligados a doença.

2.3.4 Gene *MYORG*

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). A proteína é amplamente expressa em quase todos os tecidos humanos, incluindo o cérebro (YAO et al., 2018). No cérebro de camundongos, o mRNA do MYORG é expresso de forma dispersa, com destaque para o cerebelo (YAO et al., 2018). Ainda de maneira mais específica, Yao et al., (2018) demonstraram que o *MYORG* é expresso no retículo endoplasmático de astrócitos (e não em oligodendrócitos ou pericitos), indicando que o gene pode regular a glicosilação de proteínas por parte dessas células no cérebro.

A ligação do *MYORG* com a CCFP é recente e adicionou novos elementos na discussão sobre o entendimento da doença. A primeira publicação descrevendo a associação desse gene em pacientes com CCFP ocorreu no segundo semestre de 2018, onde foi reportado em seis famílias chinesas (YAO et al., 2018). Até então, todas as variantes de todos os genes associados a CCFP eram heterozigóticas, caracterizando a doença como sendo autossomica dominante. Esse padrão foi quebrado a partir das descobertas da relação do *MYORG*, quando variantes bialélicas do gene, incluíram o aspecto autossômico recessivo na doença. A partir da descoberta desse novo gene, outros vários casos começaram a ser reportados por grupos de todo o mundo.

Além do padrão de localização e disposição das calcificações, observadas nos pacientes com variantes nos outros genes com herança autossômica dominante, os pacientes com variantes no *MYORG* apresentam algumas outras características que aparentam ser exclusivas. Até então, não havia sido relatado calcificações no tronco cerebral de pacientes com PFBC e o que se observou é que, pacientes com variantes no *MYORG* apresentam também esse tipo de calcificação e de maneira extensa, mais especificamente na ponte (Figura 3) (GRANGEON et al., 2019). Os pacientes de maneira geral exibem disartria, síndrome cerebelar (associada com

atrofia de cerebelo), distúrbio de marcha de qualquer origem e sinais piramidais (GRANGEON et al., 2019; 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 CCFP ainda é incerta. Para auxiliar nas investigações, Yao et al., que foram os primeiros autores a identificarem a relação do *MYORG* com a CCFP, desenvolveram um camundongo KO homozigoto para o referido gene e conseguiram com sucesso mimetizar a doença no animal (YAO et al., 2018). O camundongo *KO* começou a apresentar calcificações bilaterais com 9 meses de idade, especialmente no tálamo, diferentemente do camundongo selvagem de mesma idade. 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 para CCFP.

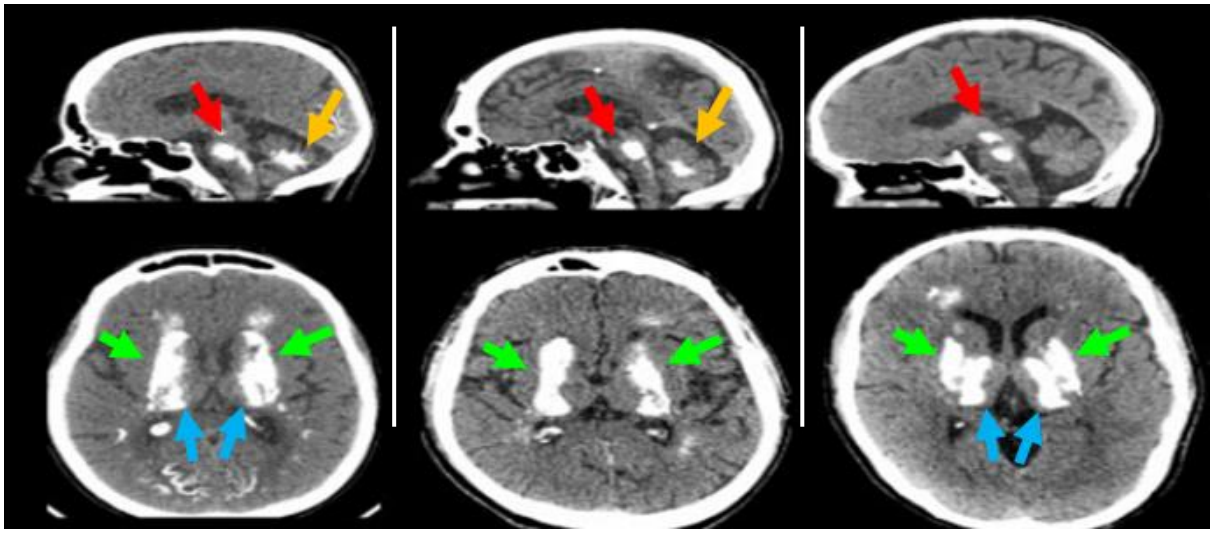

Figura 3. Neuroimagens representativas (tomografia computadorizada) de três pacientes com CCFP com variantes no gene *MYORG* (GRANGEON et al., 2019). As calcificações estão indicadas com as setas, onde cada cor representa uma região: Vermelha, Ponte; Amarela, Cerebelo; Verde, Tálamo e Azul, Ganglios da Base.

2.4 SÍNDROME DA ESCLEROSE TUBEROSA

A síndrome da Esclerose Tuberosa (ET) é uma doença neurocutânea que afeta aproximadamente 1 em 6000 a 9000 indivíduos e pode ocorrer com uma ampla gama de achados clínicos, onde pele, rim, cérebro e coração, são os órgãos mais comumente afetados. Lesões na pele afetam quase que a totalidade dos pacientes. Manchas hipomelanóticas (~90%),

angiofibromas faciais (~70%), lesões em confete (~58 %) e manchas de shagreen (~50%) são as lesões mais frequentes (HENSKE et al., 2016). Hamartomas de retina (30% - 50%), rabdomiomas cardíacos (47% - 67%) e angiolipomas renais (~70%) também são sinais bem característicos. Nos pulmões, a linfangioleiomiomatose é um sinal encontrado principalmente nas mulheres, ocorrendo entre 30% e 40% , podendo passar de 80% em mulheres acima dos 40 anos; em homens esse achado corresponde a ~12% (HENSKE et al., 2016).

A ET apresenta um padrão de herança autossômico dominante, onde aproximadamente 80% dos casos estão relacionados à perda de função dos genes *TSC1* ou, principalmente, do *TSC2*, que codificam as proteínas hamartina e tuberina, respectivamente (HENSKE et al., 2016). Essas proteínas formam um heterodímero TSC1-TSC2 (tuberina-hamartina) que inibe o complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina (mTORC1). O mTORC1 é uma quinase responsável por regular processos celulares como crescimento, proliferação, divisão, autofagia e sobrevivência, síntese de lipídios e proteínas (Figura 4) (LI; KIM; BLENIS, 2014).

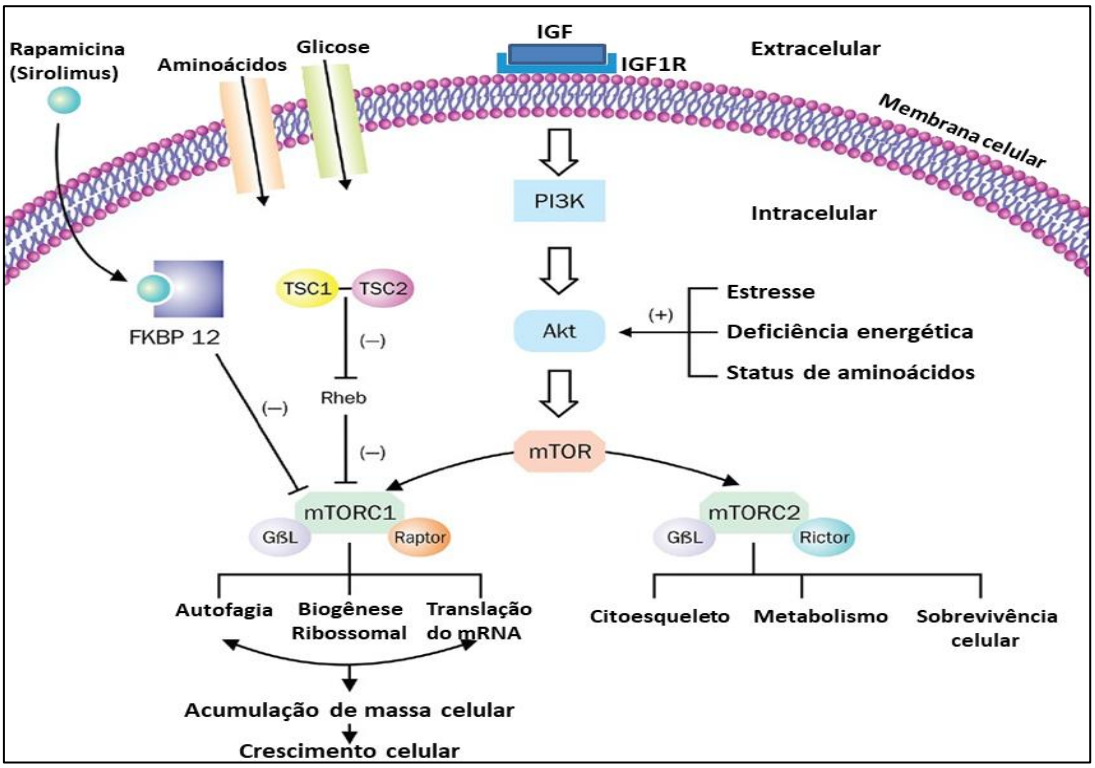

Figura 4. Via metabólica do mTOR, mTORC1 e mTORC2. Os produtos proteicos dos genes *TSC1* e *TSC2*, hamartina e tuberina, inibem a função da via mTORC1 através da proteína Rheb. Variantes nesses genes causam sua inativação e consequente ativação da via mTOR conduzindo à proliferação celular. (-) inibição; (+) estímulo. Adaptado de MADKE, 2013 .

Dentre os vários órgãos afetados pela síndrome, o cérebro é um dos que se destaca, tanto pelos achados patológicos, quanto pela ampla expressão das proteínas hamartina e tuberina (THUL et al., 2017). Os achados patológicos mais frequentes no SNC são nódulos subependimários, onde são relatados em cerca de 80% dos pacientes, onde mais de 80% desses nódulos irão calcificar (UMEOKA et al., 2008). Displasia cortical também é recorrente, sendo relacionado com cerca de 90% dos pacientes. Outros achados, como alterações na substância branca e tumor subependimário de células gigantes (astrocitoma), também são relatados, mas em menor número (HENSKE et al., 2016).

Em associação com os achados patológicos, aproximadamente 90% dos pacientes com ET apresentam transtornos psiquiátricos, incluindo autismo, déficit de atenção, depressão, ansiedade e falta de habilidades sociais (DE VRIES et al., 2015). Epilepsia é um achado importante nessa síndrome, afetando até 90% dos pacientes, presente em qualquer idade e predominantemente no primeiro ano de vida (HENSKE et al., 2016).

As calcificações cerebrais na ET não são muito relatadas na literatura, embora seja um fenótipo importante e com grande possibilidade de serem relacionadas com os sintomas neurológicos tão bem descritos. As calcificações se apresentam como difusas e sem padrão de simetria ou bilateralidade (Figura 5) (NORTHRUP; KOENIG; AU, 2011). Em um estudo retrospectivo, Boronat et al. (2017) descreveu a presença de lesões no cerebelo de 26,4% do total de 220 pacientes estudados; dessas lesões, 86,8% apresentaram calcificação (BORONAT; THIELE; CARUSO, 2017). São extremamente raros os estudos que abordam esse fenótipo e suas implicações, notadamente, mais pesquisas precisam ser direcionadas para esse foco.

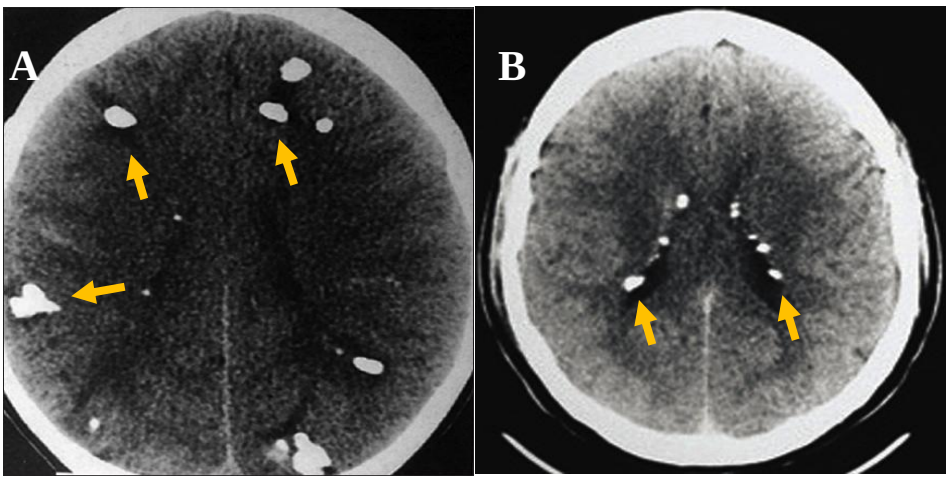

Figura 5. Neuroimagens representativas (tomografia computadorizada) de dois pacientes com Esclerose Tuberosa. **A** (BANO et al., 2011). **B** (KOTA et al., 2013). As calcificações estão indicadas com as setas amarelas.

2.5 BISFOSFONATOS – ALENDRONATO

O pirofosfato inorgânico (PPi) compreende duas moléculas de Pi unidas por um átomo de oxigênio (Figura 6) e na década de 1960 descobriu-se sua capacidade de inibir a biomineralização (ORRISS; ARNETT; RUSSELL, 2016). O PPi é um potente antagonista da formação de cristais de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita (VILLA-BELLOSTA; O'NEILL, 2018). Ele também se liga fortemente a superfície de cristais de hidroxiapatita e bloqueia sua capacidade de se unir a outros cristais, evitando assim seu crescimento (ORRISS; ARNETT; RUSSELL, 2016). Os bisfosfonatos (BPs) são análogos estruturais sintéticos do PPi e agem de maneira semelhante no organismo (RUSSELL, 2011).

Nos BPs, o átomo de oxigênio é substituído por um átomo de carbono (Figura 6), no qual se ligam dois radicais (cadeias laterais) R1 e R2 (ORRISS; ARNETT; RUSSELL, 2016). Diferentes substituições nesses radicais alteram suas características físico-químicas, biológicas e interferem na sua especificidade e potência. Os BPs são classificados como BPs contendo nitrogêgio (N-BPs; Alendronato, Pamidronato, Risedronato e Zolendronato, por exemplo) e não contendo nitrogênio (não-N-BPs; Etidronato, Clodronato e Tiludronato, por exemplo) (ROGERS, 2003). Os N-BPs atuam reduzindo a atividade de reabsorção e induzindo a apoptose dos osteoclastos. Esses efeitos são causados a nível molecular pela inibição da enzima farnesil pirofosfato sintetase, na via do mevalonato da síntese do colesterol (Figura 7) (RESZKA; RODAN, 2004). Já os não-N-BPs, são internalizados pelos osteoclastos e metabolizados em análogos de ATP que inibem sua função e induzem a apoptose (FRITH et al., 2001).

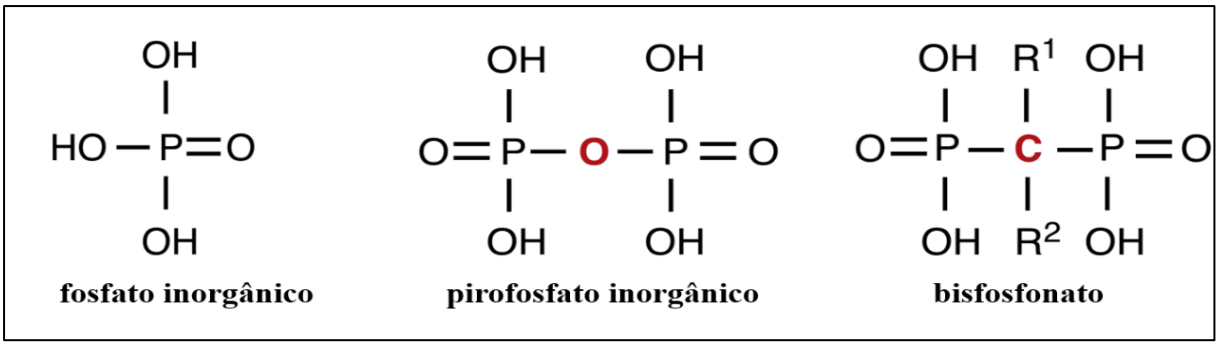

Figura 6. Estruturas químicas do fosfato inorgânico, pirofosfato inorgânico e estrutura geral dos bisfosfonatos. Adaptado de ORRIS; ARNETT; RUSSELL, 2016.

Reconhecidamente, os BPs são utilizados no tratamento de várias doenças como câncer ósseo, calcificação ectópica, doença de Paget, calcificação vascular renal e osteoporose, por

exemplo (RUSSELL, 2011; TRICARICO et al., 2018). Além das doenças relacionadas com reabsorção óssea, os BPs também são usados como parte do tratamento de alguns tipos de câncer. Os BPs inibem vários passos do processo metastático como adesão e proliferação de células tumorais (LIU et al., 2015). O zolendronato, por exemplo, diminuiu em 36% a progressão do câncer de mama e o número de mestastase (GNANT et al., 2009). Em estudos *in vitro*, mostrou-se que os BPs agem diretamente no tumor, induzindo apoptose e inibindo proliferação, adesão e migração (JIANG et al., 2016).

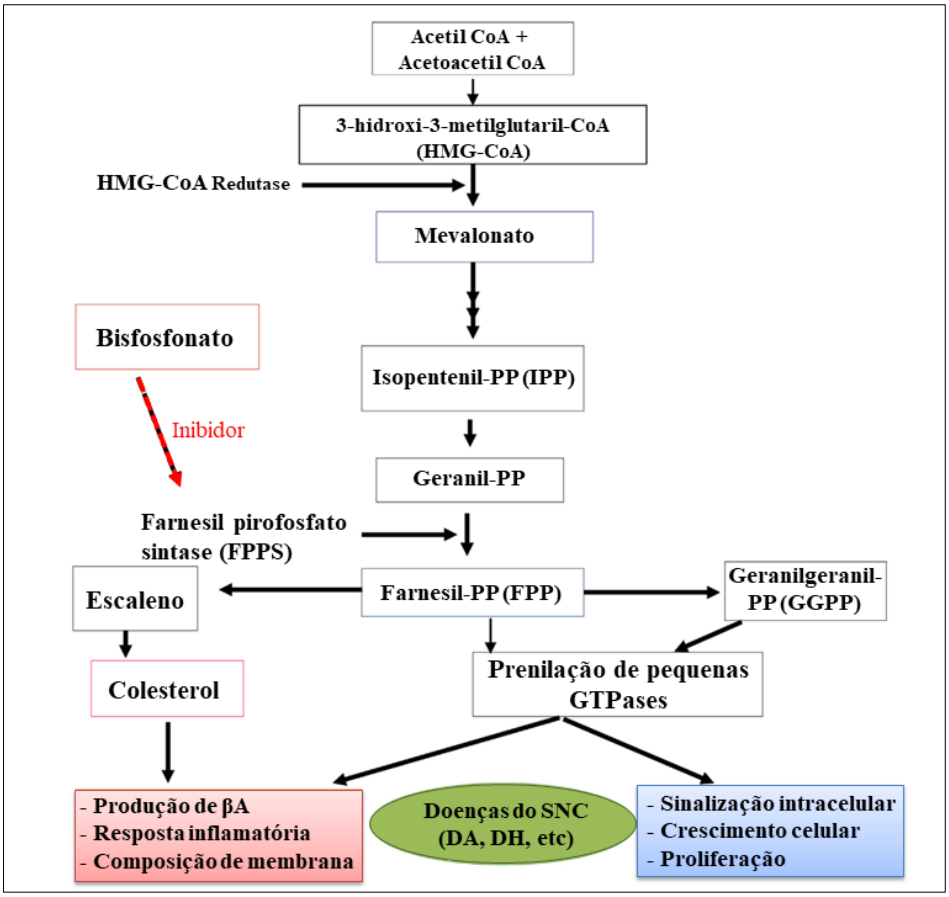

Figura 7. Via metabólica do Mevalonato para síntese do colesterol e principais alvos dos Bisfosfonatos nitrogenados, especialmente no SNC. PP, Pirofosfatase; βA, β-Amilóide; DA, Doença de Alzheimer, DH, Doença de Huntington. Adaptado de ZAMEER et al., 2018

Estudos clínicos e pré-clínicos apontam que os BPs podem ser benéficos em doenças que afetam o SNC (ZAMEER et al., 2018). Em pacientes com osteoporose, que utilizavam BPs, foi evidenciado um menor quadro de demencia, em relação aos que não usavam (CHANG et al., 2014). O ácido zolendronico, por exemplo, atenuou os sintomas patológicos em pacientes com Doença de Huntington (KELLEY, 2015). A melhora sintomática da cefaleia e convulsões

em pacientes com Parkinson foi observada a partir do uso do etidronato de sódio (LOEB et al., 2006). Estudos *in vitro* também demonstraram a eficácia do uso dos BPs. O clodronato reduziu a liberação de substâncias neurotóxicas, como citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico de células da microglia e reduziu o número de células gliais proliferativas em cultura organotípica de hipocampo de ratos (DEHGHANI et al., 2004). O etidronato e o 2,3,3-trifosfonato, foram capazes de reduzir a toxicidade induzida pelo glutamato, a apoptose e a sobrecarga de cálcio em células PC12, comumente utilizadas em estudos mecanísticos de neurogênese (LI et al., 2016b).

O alendronato, que possui em sua cadeia lateral R1 um grupo hidroxila e na cadeia lateral R2 uma amina primária (Figura 8), também possui resultados interessantes relacionados com o SNC. Mostrou-se capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE), que aparece elevada em pacientes com Doença de Alzheimer e contribui para a degradação da acetilcolina, principal neurotransmissor envolvido na doença (CIBICKOVA et al., 2007). Ainda em relação a Doença de Alzheimer, estudos mostram que o aumento na síntese do colesterol está envolvido na sua patogênese, e que agentes modificadores do colesterol, como o Alendronato, tem sido usado como uma terapia segura (CIBICKOVA et al., 2009). Ainda não se sabe os mecanismos exatos, mas já foi relatado que o alendronato pode reduzir as alterações neuroquímicas centrais envolvidas na geração e manutenção da dor do câncer ósseo (SCHWEI et al., 1999). Em modelo animal, impediu significativamente o desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica/térmica induzida por constrição crônica na medula espinhal, bem como a ativação microglial nessa lesão (YAO et al., 2016). Nesse mesmo trabalho, Yao et al., reportou em um estudo *in vitro*, que o alendronato foi capaz também de diminuir a expressão de citocinas inflamatórias em cultura de microglia primária estimulada por lipopolissacarídeos.

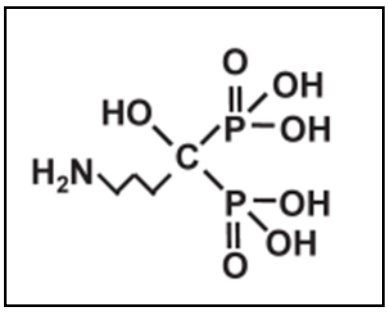

Figura 8. Estrutura química do Alendronato. RESZKA & RODAN, 2004

Em relação a CCFP, ainda não existe um tratamento capaz de evitar ou reduzir as calcificações. Drogas responsáveis por capturar e inativar o cálcio, por exemplo, são possíveis candidatos para um tratamento eficaz, como os BPs. Uma característica que os tornam

inicialmente aptos a isso, é sua capacidade de atravessar a BHE (LOEB et al., 2006). Em 1998, foi relatado um tratamento experimental em um caso de CCFP utilizando etidronato dissódico (LOEB, 1998). Embora a calcificação cerebral não tenha sido alterada, o paciente apresentou melhoras na fala e na marcha, mas não melhorou espasticidade, distona ou ataxia. Em 2016, Oliveira & Oliveira, avaliaram 7 individuos com CCFP que faziam uso do Alendronato. Os autores observaram em alguns pacientes alívio nos sintomas, principalmente os mais jovens e aqueles que estiveram em tratamento por mais tempo (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2016). Embora o resultado tenha sido inconclusivo, abriu-se uma possibilidade de explorar o uso dessa classe de medicamento no controle e tratamento da CCFP em novos estudos. Em ambos os relatos, quando houve a melhora dos sintomas não foi observado a redução da calcificação, sugerindo a influência dos BPs em outras vias.

2.6 VITAMINA D

A vitamina D (VitD) é um hormônio esteroide com muitas funções no corpo, mas sua principal função, juntamente com o seu receptor (RVD), é manter a variação fisiológica dos níveis de cálcio e fosfato no plasma (CHRISTAKOS et al., 2016; KÜHNE et al., 2016). Quando produzida por fungos ou plantas, é chamada ergocalciferol ou vitamina D2, quando sintetizada por animais, é chamada de colecalciferol ou vitamina D3 (MAYNE; BURNE, 2019). Tanto a vitamina D2 quanto a D3 podem ser obtidas através da dieta, mas a principal fonte para o ser humano é a síntese que acontece na pele. A vitamina D3 é fotoquimicamente sintetizada nas camadas mais profundas da pele, após exposição à luz solar, especialmente a radiação ultravioleta (FERNANDES DE ABREU; EYLES; FÉRON, 2009). Tanto o ergocalciferol como o colecalciferol são biologicamente inertes e requerem transformações bioquímicas através das hidroxilases para exercerem sua função no organismo. Essas transformações ocorrem no fígado e no rim, e dão origem a suas respectivas formas ativas: 1,25-di-hidroxivitamina D2 e 1,25-di-hidroxivitamina D3 ou calcitriol, como é mais conhecido (HOLICK, 2007).

Recentemente, Landel et al., sugeriu que neurônios e possivelmente a microglia, também sejam capazes de transformar o colecalciferol inativo em calcitriol, onde a partir daí são transferidos para os astrócitos, onde pode se ligar ao RVD (LANDEL et al., 2018). Previamente já havia sido mostrado que essas duas formas são capazes de atravessar a BHE (PARDRIDGE; SAKIYAMA; COTY, 1985). A relação da VitD com o SNC já é bem documentada na literatura. Estudos clínicos e experimentais descrevem o envolvimento do sistema VitD/RVD na regulação de mecanismos cerebrais normais e patológicos, incluindo

diferenciação e crescimento cerebral (GARCION et al., 2002), neuroproteção (KALUEFF et al., 2004), neuroplasticidade (DELUCA et al., 2013), epilepsia (SIEGEL et al., 1984) e aspectos comportamentais (KALUEFF et al., 2004). Estudos confirmaram que os RVD's estão distribuidos por todo o cérebro em animais e humanos (EYLES et al., 2005; PRUFER et al., 1999). A expressão do RVD foi observada em diferentes regiões do sistema nervoso central. Altas concentrações foram encontradas nos GB, no tronco cerebral, no hipotálamo e no sistema límbico, incluindo o hipocampo e o tálamo (EYLES et al., 2005; WALBERT; JIRIKOWSKI; PRUFER, 2001). RVD's também foram relatados nos núcleos de células de schwann e em neurônios periféricos (PRUFER et al., 1999; WALBERT; JIRIKOWSKI; PRUFER, 2001).

Indivíduos com hipovitaminose D são mais propensos a desenvolver doenças psiquiátricas, se comparados a população em geral com os níveis normais da vitamina (MENKES et al., 2012). Estudos clínicos demonstraram que baixos níveis de VitD contribuem negativamente com distúrbios neurológicos, tais como esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esquizofrenia, autismo e depressão (CUI et al., 2015; RHEAD et al., 2016). Ensaios clínicos utilizando a suplementação de VitD em pacientes com esclerose múltipla mostraram-se benéficos (BHARGAVA et al., 2014).

Em 2006, Kalueff e colaboradores relataram as características de camundongos KO para o RVD, onde a disfunção da VitD com seu receptor causou a formação de calcificações no tálamo desses animais de maneira simétrica (KALUEFF et al., 2006). A calcificação foi observada em animais mais velhos (9 - 14 meses), mas não em jovens (4,5 - 6 meses), padrão não encontrado em animais selvagens da mesma idade. As calcificações observadas nestes animais apresentam aparência laminada, com composição média de 55% de cálcio e 45% de fosfato. Tende a ocorrer perto dos vasos sanguíneos e não desenvolve resposta inflamatória. O grupo de animais KO envelhecidos, mostrou uma concentração plasmática reduzida de cálcio e uma tendência para uma concentração de fosfato ligeiramente elevada. Como no modelo animal, os pacientes com deficiência de VitD, hipocalcemia e hiperparatireoidismo, apresentam CC em áreas como GB, córtex cerebral e cerebelo (DIMARIO; CLANCY, 1989; HARZY et al., 2004).

Animais com essa modificação genética específica fornecem uma ferramenta poderosa para pesquisas sobre o papel da VitD no organismo, especialmente no cérebro. O fenótipo dos camundongos RVD KO é normal ao nascimento, mas com o passar do tempo desenvolvem raquitismo e osteomalácia, hipocalcemia, hipofosfatemia e hiperparatireoidismo (LI et al., 1998; YOSHIZAWA et al., 1997). Esses camundongos também exibem alopecia,

neofobia alimentar, disfunção vestibular e envelhecimento prematuro (KEISALA et al., 2007; LI et al., 1997; MINASYAN et al., 2007, 2009).

Em 2016, nosso grupo avaliou a relação entre o calcitriol (agonista do RVD) e a expressão de genes relacionados à CCFP. Foram estudados os genes responsáveis pelo transporte de fosfato intracelular ligado à calcificação (*SLC20A2* e *XPR1*) e outro não relacionado (*SLC20A1*), em um modelo de calcificação *in vitro* (KEASEY et al., 2016). As expressões dos três genes diminuíram significativamente nas células de osteossarcoma humano (SaOs-2) submetidas a um processo de calcificação, mas a administração de calcitriol nas culturas, enquanto mantidas as condições experimentais, foi capaz de reduzir a calcificação. Aliado a isso, manteve altos níveis de expressão de *SLC20A2*, sugerindo que a VitD possui ação reguladora na expressão gênica deste transportador.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE CÉLULAS

Para realização dos experimentos *in vitro,* foram utilizadas linhagens imortalizadas de SaOs-2 (*Sarcoma Osteogenic*), originalmente derivadas de um osteossarcoma que acometeu uma criança branca de 11 anos de idade (RODAN et al., 1987). As células foram obtidas em um banco público de tecidos da Universidade Federal do Rio de Janeiro e cultivadas em garrafas estéreis, com filtro, de 25 cm² (Kasvi), mantidas em incubadora a 37ºC, 95% de humidade e 5% de CO_2 (Panasonic). As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 0,5% de penicilina/streptomicina (Gibco) e 0,5% de glutamina (Gibco). Após atingirem uma confluência de ~ 90%, as células foram destacadas da garrafa com tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) e semeadas em placas de diferentes tamanhos dependendo da especificidade de cada experimento. A concentração utilizada foi de 100.000 células por ml de meio de cultura.

3.2 INDUÇÃO DA CALCIFICAÇÃO, CITOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO

Para indução da calcificação, seguiu-se o protocolo descrito por Keasey et al., (2016). O meio DMEM foi suplementado com 1 mM de β-Glicerolfosfato (*Sigma-Aldrich*) e 250 µM de ácido ascórbico (*Sigma-Aldrich*). O β-Glicerolfosfato foi adicionado a cada 72 h, quando ocorria a troca do meio de cultura, e o ácido ascórbico foi adicionado diariamente. As células foram mantidas sob essa condição por 7 e 14 dias em incubadora a 37ºC, 95% de humidade e 5% de CO_2 (Panasonic).

Para citoquímica e análise da calcificação, as células foram semeadas em placas de 96 poços. Ao fim de 7 e 14 dias, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% (PFA) em PBS e coradas com vermelho de alizarina (*Sigma-Aldrich*) por 20 min. Após a marcação, as células foram lavadas 3 vezes por 5 min com água deionizada. A calcificação foi visualizada em microscópio óptico invertido e quantificada posteriormente após solubilização dos nódulos de calcificação por cloreto de cetilpiridínio (*Sigma-Aldrich*) 5% por 10 min. Após solubilização o conteúdo foi quantificado por fotocolorimetria a 570 nm.

3.3 TRATAMENTOS

Concomitante a indução da calcificação, as células foram tratadas com diferentes drogas e dosagens, dependendo do experimento. O tratamento com o calcitriol 10 nM ou 100 nM ocorreu a cada 72 h, juntamente com a troca do meio de cultura, como descrito por Keasey et al., (2016). O tratamento com o Alendronato (*Tocris Bioscience*) também ocorreu a cada 72 h, concomitante com a indução da calcificação e a dosagem utilizada foi determinada a partir do ensaio de viabilidade celular (MTT).

3.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR – TESTE DO MTT

A análise da viabilidade celular diante do Alendronato foi determinada pelo teste de MTT. Este teste baseia-se na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial converter o sal de tetrazólio solúvel em água e de cor amarela, o MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*), em compostos de cor roxa, denominados cristais de formazan. A quantidade de cristal de formazan formada, portanto, corresponde ao grau de viabilidade celular. A solução de MTT (*Sigma-Aldrich*) foi preparada na concentração de 5 mg/mL em PBS 1X pH 7,4 (*Gibco*).

As células SaOs- 2 foram semeadas em placas de 96 poços (10.000 células por poço / 100 µl de meio) e mantidas em estufa a 37 ºC, 95% de humidade e 5% de CO_2 (Panasonic) com meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Gibco*), 0,5% de penicilina/streptomicina (*Gibco*) e 0,5% de glutamina (*Gibco*). Após 48 h, todo o meio de cultura foi retirado e trocado por meio de cultura acrescido de Alendronato em concentrações que variavam de 1 a 150 µM. As células, plaqueadas em triplicatas, foram analisadas com 24 h, 48 h e 72 h.

Após o término de cada tratamento, foi adicionado 20 µl de MTT por poço e a placa voltou para a incubadora por 3 h. Durante esse período observou-se a formação dos cristais de formazan no microscópio óptico invertido. Após o período de incubação, o meio foi retirado cuidadosamente e foi adicionado 200 µl de DMSO em cada poço, para que os cristais de formazan fossem solubilizados. A placa foi novamente incubada a 37 ºC por 5 min e sua absorbância foi determinada a partir de um comprimento de onda de 570 nm.

3.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para análise das proteínas, as células foram semeadas em placas de 24 poços. Imediatamente após retirar da incubadora, as placas com as células foram colocadas sob gelo, tiveram o meio de cultura removido e as células lavadas com PBS 1X gelado. O *scrapp* foi feito com a adição do tampão Ripa (250 µl por poço, *Sigma-Aldrich*) e coquetel antiprotease (2,5 ul por poço, *Sigma*). O lisado foi transferido para um tubo *eppendorf* para homogeneização das células utilizando um pistilo acoplado a um motor para homogeneizador (*Sigma-Aldrich*) por 20 seg. Após isso, o conteúdo foi colocado em gelo por 20 min e centrifugado a 4ºC por 20 min a 14.499 g. O sobrenadante foi então recolhido e colocado em novos tubos.

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método do Ácido Bicinconínico, seguindo as especificações do kit BCA (*Pierce BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific*), utilizando a albumina sérica bovina como padrão nas concentrações 0, 25,125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL. A quantificação foi realizada por fotocolorimetria, a 562 nm, com amostras e padrões em triplicatas, utilizando uma placa de 96 poços

3.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA

Para análise do RNA, as células foram semeadas em placas de 12 poços. Imediatamente após retirar da incubadora, as placas com as células foram colocadas sob gelo, tiveram o meio de cultura removido e as células lavadas com PBS 1X gelado. O RNA total foi então isolado seguindo as especificações do fornecedor, utilizando o *mirVana miRNA Isolation Kit* (Invitrogen).

A quantificação e avaliação da pureza do RNA total foi realizada através do equipamento *Nanodrop 2000 Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*) e sua integridade foi analisada após eletroforese em gel de agarose 1,5% a 100V por 30 min.

3.7 WESTERN BLOTTING

O volume equivalente a 15 ug de proteínas totais (quantidade de proteína por poço) foram misturadas ao tampão Laemmli (*Laemmli 2X concentrate, Sigma-Aldrich*) na proporção 1:1, desnaturadas por 5 min a 95ºC e colocadas em gelo por 1 min. As proteínas desnaturadas foram então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), numa concentração de 6 % (5ml: 2,6 ml H2O, 1,0 ml acrilamida 30%,

1,3 ml 1.5 M Tris pH 8.8, 0,05 ml SDS 10%, 0,05 ml Persulfato de Amónio 10% e 0,004 ml TEMED). A eletroforese foi realizada no sistema *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (*BioRad*), em tampão de corrida 1x (25 mM Tris, 0,192 M glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) a 100 V e o marcador de peso molecular utilizado foi o *Precision Plus Kaleidoscope Protein Standards* (*Bio-Rad*).

Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF. A membrana foi inicialmente submersa em metanol durante 1 min, seguida de água destilada durante 5 min e, finalmente, foi equilibrada em tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 20% de Metanol, pH entre 8 e 8,3). As proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF em sistema semi-seco *Trans-Blot Turbo Transfer System* (*Bio-Rad*). As condições de transferência foram 15 V, 2,5 A por 30 min, em tampão de transferência.

Após a transferência, as membranas foram lavadas com TBS, 3 vezes por 10 min sob agitação. Posteriormente, foram bloqueadas com uma solução de TBS (500 mM TrisHCl, 1500 mM NaCl, pH 7.4), 0,1% Tween20 e 5% leite Molico desnatado, durante 1 hora. Depois disso, procedeu-se a incubação dos anticorpos primários overnight a 4°C. Realizaram-se 3 lavagens de 10 min em TBS, 0,1% Tween20, 5% leite Molico desnatado e incubaram-se os anticorpos secundários durante 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente 3 vezes durante 10 min em TBS. O sinal foi detectado utilizando o substrato quimioluminescente ECL (*Invitrogen*) e a quimioluminescência foi detectada pelo *ChemiDoc XRS+ System* (*Bio-Rad*). Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-hamartina 1:500 (*mouse monoclonal*, Santa Cruz Biotechnology, sc-136436), anti-tuberina 1:500 (*mouse monoclonal*, Santa Cruz Biotechnology, sc-271314) e anti-GAPDH 1:1000 (*rabbit polyclonal*, Santa Cruz Biotechnology, sc-25778). Como anticorpos secundários utilizou-se os anticorpos *goat anti-mouse* IgG 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005) ou *mouse anti- rabbit* IgG 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology, sc-2357).

3.8 PCR EM TEMPO REAL (QPCR)

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foram utilizados 500 ng do RNA total. Utilizou-se um kit de síntese de cDNA *(RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit, Thermo Fisher Scientific*) e foi seguido o protocolo disponibilizado pelo fabricante, para um volume final de 20 µl por reação. A reação da qPCR foi realizada da seguinte maneira: 1 µl de cDNA, 3.5 µl de H_2O e 5 µl de Master Mix (*TaqMan Gene Expression Master Mix, Thermo Fisher Scientific*) com 0,5 µl de sondas TaqMan 20 X *(× 20 TaqMan Gene Expression, Thermo*

Fisher Scientific) em um volume final de reação de 10 µl. As reações de qPCR foram feitas em triplicatas utilizando o equipamento ViiA 7 Real-Time PCR System (*Thermo Fisher Scientific*). As condições de ciclagem foram 50ºC durante 2 min e 95ºC por 2 min, e este passo inicial foi seguido por 45 ciclos de 95ºC durante 3 segundos e 60ºC durante 30 segundos. Os dados foram analisados utilizando o método ΔΔCt, com valores normalizados para o gene de controle endógeno (*GAPDH*) e valores expressos em relação aos valores de controle biológico. As sondas Taqman utilizadas para análise, foram para os genes: *TSC-1* (*Thermo Fisher Scientific*, Hs01060648), *TSC-2* (*Thermo Fisher Scientific*, Hs01020387), *SLC20A2* (*Thermo Fisher Scientific*, Hs00198840), *PDGFβ* (*Thermo Fisher Scientific*, Hs00966522), *PDGFRβ* (*Thermo Fisher Scientific*, Hs01019589) e *GAPDH* (*Thermo Fisher Scientific*, Hs02758991).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do Graphpad Prism 6.0. Para determinação de normalidade das amostras foram utilizados os testes Kolmogorov Smirnov e Shapiro-Wilk. O teste t-student não-pareado, foi utilizado para comparação entre os grupos controle e experimental (dados paramétricos), onde os dados foram expressos com média $\pm$ erro padrão (EP). Diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PARTE 1 – ARTIGO PUBLICADO

A primeira parte dos resultados foi publicado em dezembro de 2017 na revista *Journal of Molecular Neuroscience.* Fator de Impacto: 2,577

Calcitriol Reverses the Down-Regulation Pattern of Tuberous Sclerosis Complex Genes in an In Vitro Calcification Model.

Eraldo Fonseca dos Santos Junior, Roberta Rodrigues de Lemos Gitirana, Darlene Paiva Bezerra, João Ricardo Mendes de Oliveira

Journal of Molecular Neuroscience (2018) 64:140–143
https://doi.org/10.1007/s12031-017-1004-z

Calcitriol Reverses the Down-Regulation Pattern of Tuberous Sclerosis Complex Genes in an In Vitro Calcification Model

Eraldo Fonseca dos Santos Junior[1] · Roberta Rodrigues de Lemos Gitirana[1] · Darlene Paiva Bezerra[1] · João Ricardo Mendes de Oliveira[2]

Received: 15 December 2016 / Accepted: 23 November 2017 / Published online: 11 December 2017
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2017

Abstract

Tuberous sclerosis complex (TSC) is a neurocutaneous syndrome with autosomal dominant inheritance, and most of the cases are related to loss of function of the TSC1 and TSC2 genes. TSC may occur with a wide range of clinical findings and skin, kidney, brain, and heart are the most commonly affected organs. Brain calcifications in TSC are also described and reported as diffuse and without pattern of symmetry or bilaterality. Recently, a new discovery opened the possibility of using vitamin D (VitD) for treating cerebral calcifications. Calcitriol, the active form of VitD, was able to reduce the calcification in an in vitro model, increasing expression of a gene related to primary familial brain calcification. We show that in the same experimental model, calcitriol was also able to restore and even increase expression of genes related to TSC. This article discusses the use of calcitriol supplementation in patients with TSC, which can be a very interesting strategy due to its low cost and because it is already used in various therapies.

Keywords Brain calcification · Tuberous sclerosis complex · TSC1 · TSC2 · Vitamin D

Tuberous sclerosis complex (TSC) is a neurocutaneous syndrome with autosomal dominant inheritance, and ~80% of TSC cases are related to loss of function of the TSC1 and TSC2 genes, which encode hamartin and tuberine proteins, respectively (Henske et al. 2016). These proteins form a tuberin-hamartin complex, that inhibits mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1), a kinase responsible for regulating cellular processes such as growth, proliferation, division, autophagy and survival, synthesis of lipids, and proteins (Li et al. 2014). TSC affects approximately 1 in 6000 to 9000 individuals and may occur with a wide range of clinical findings, where skin, kidney, brain and heart, are the most commonly affected organs (Henske et al. 2016). Frequent pathological findings in central nervous system (CNS) are subependymal nodules (where more than 80% will latter calcify), white matter changes, cortical dysplasia and subependymal giant cell tumor (astrocytoma) (Vignoli et al. 2015). Brain calcifications in TSC are also described and reported as diffuse and without pattern of symmetry or bilaterality (Northrup et al. 2011). In a retrospective study, Boronat et al. (2017) described the presence of lesions in the cerebellum of 26.4% of the total of 220 patients studied; of these lesions, 86.8% presented calcification (Boronat et al. 2017). In association with the pathological findings, approximately 90% of patients with TSC have some levels of association with psychiatric disorders, including autism, attention deficit, depression, anxiety, and lack of social skills (de Vries et al. 2015).

Patients with psychiatric illnesses are much more likely to be vitamin D (VitD) deficient than the general population (Menkes et al. 2012). Clinical studies have shown that low levels of VitD contributes negatively with neurological disorders such as multiple sclerosis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, schizophrenia, autism and depression (Cui et al. 2015; Rhead et al. 2016). Clinical trials using VitD supplementation in multiple sclerosis patients were proven benefic, and the outcome measures are currently being tested in several randomized, double-blind and placebo-controlled clinical trials (Bhargava et al. 2014). Beneficial effects of supplementation were also seen in children with autism spectrum (Saad et al. 2015). VitD has multiple

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

[1] Keizo Asami Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

[2] Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil

functions in the body related to calcium metabolism. Deficiency causes rickets in juveniles and osteomalacia in the elderly (Deluca et al. 2013). The VitD receptor (VDR) is widely expressed in the brain, including key regions responsible for memory, learning and motor control (Eyles et al. 2005). VitD is involved in the proliferation, differentiation and growth of neurons, and has an important role in neuroplasticity both in the developing and adult brain (Deluca et al. 2013).

Recently, a new perspective on the use of VitD for cerebral diseases was discovered, specifically regarding primary familial brain calcification (PFBC). PFBC is a genetic disease characterized by abnormal, bilateral and symmetric calcium deposits in the brain, specifically in the regions of the basal ganglia, cerebellum and thalamus (Oliveira 2011). Currently, four genes are related to this disease, two of them related to inorganic phosphate transport (*SLC20A2* and *XPR1*) and two associated with blood-brain barrier integrity and pericyte maintenance (*PDGFB* and *PDGFRB*) (Wang et al. 2012; Keller et al. 2013; Legati et al. 2015). Keasey and coworkers observed in an in vitro model of calcification in human bone osteosarcoma (SaOs-2) that two genes related to the disease (*SLC20A2* and *XPR1*) had decreased expression in the presence of calcification (Keasey et al. 2016). The study also demonstrated that calcitriol (active form of VitD) could reduce the calcification in these cells specifically by maintaining enhanced expression of *SLC20A2*. Although this might be an initial study, these results suggest a possible therapy for patients with PFBC based on the administration of calcitriol. In our study, we tested whether calcifying condition is able to regulate TSC1 and TSC2 genes, and after, we determine if calcitriol treatment can restore transcription of these genes in an in vitro model and the expression levels of the hamartin and tuberin proteins.

We used the same lysates from experiments performed by Keasey et al. (2016) with some modifications. Briefly, RNA (500 ng) was reverse transcribed by RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific # K1632 Bio, USA) according to the manufacturer's protocol, to a final volume of 20 μl per reaction. Real-time reactions were performed as follows: 1 μl complementary DNA, 3.5 μl H_2O and 5 μl TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, # 4369510, Foster City, CA) with 0.5 μl of × 20 TaqMan Gene Expression Assay (GAPDH # Hs02758991_g1; TSC1 # Hs01060648_m1; TSC2 # Hs01020387_m1; from Applied Biosystems) in a 10 μl reaction. Real-time PCR reactions were run in triplicate using the ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Data were analyzed using the ΔΔCt method with values normalized to an endogenous housekeeping gene (GAPDH) and values expressed relative to biological control values. To perform the Western blot, protein lysate of three independent cell cultures, for each group, was isolated using RIPA buffer and prepared for protein quantification by the BCA protein assay (Pierce) to standardize 15 μg of protein product in each well. Proteins were subjected to electrophoresis in a 6% SDS-PAGE gel and then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Afterwards, these membranes were blocked and incubated with primary antibodies: mouse monoclonal anti-hamartin (1:500, Santa Cruz Biotechnology, SC-136436), mouse monoclonal anti-tuberin (1:500, Santa Cruz Biotechnology, SC-271314) and rabbit polyclonal anti-GAPDH (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, SC-25778). Appropriate secondary antibodies were used and signal was developed using ECL substrate (Invitrogen). The statistics was performed using GraphPad Prism (version 6.1) software using a Student's *t* test. Significant differences were set at $p \leq 0.05$ ($^{*}p \leq 0.05$, $^{**}p \leq 0.01$).

As seen in Keasey et al. (2016), a decrease in the transcription of TSC1 and TSC2 genes in an in vitro calcification model using SaOs-2 cells was observed at 14 days ($n = 3$, $p \leq 0.05$, Fig. 1a). In our model, VitD (calcitriol) reduced calcification. Inversely, TSC2 (7 days, $p \leq 0.05$, Fig. 1b) and the TSC1 (14 days, $p \leq 0.01$, Fig. 1c) were increased relative to vehicle treated controls. Following the reduction in the transcription of the genes, the levels of proteins also decreased at 14 days of calcification without treatment ($n = 3$, $p \leq 0.05$, Fig. 1f). No observed changes in protein levels were found after the start of calcitriol treatment by 7 days, regardless of dose ($n = 3$, Fig. 1g), but an increase of hamartin (TSC1) was observed at 14 days using 100 nM calcitriol ($n = 3$, $p \leq 0.01$ Fig. 1h). The in vitro calcification model in SaOs-2 cells, using ascorbic acid and β-glycerophosphate as the calcification agents, was able to mimic the downregulation of the TSC1 and TSC2 genes found in ~ 80% of the patients who develop TSC.

Previous studies have shown that VitD is able to inhibit the mTORC1 signaling pathway through the activation of DNA damage-inducible transcript 4 (DDIT4), also known as regulated in development and DNA damage response 1 (REDD1), which is in turn active the TSC1-TSC2 complex (Lisse and Hewison 2011). The loss of function of genes involved in TSC and consequent impairment in the hamartin and tuberin proteins lead to activation of mTORC1 (for lack of inhibition), altering cellular processes and resulting in classic signs of disease such as nodules, tubers and hamartomas. Recently, Wang et al. (2016), using an animal model of diabetes, induced by streptozotocin, observed an increased phosphorylated TSC2 in the kidney of animals treated with VitD (Wang et al. 2016). A case report has shown positive effects of VitD administration in a patient (41 years old) with TSC, which showed low levels of VitD in conjunction with cerebral calcifications, while only improvements in biochemical markers and osteomalacia have been reported (Rado and Haris 1993).

Taken together, the improvement in the quality of life of patients with psychiatric disorders and the reestablishment of related genes with brain calcification in an in vitro calcification model, shows us a possibility in the use of VitD as a

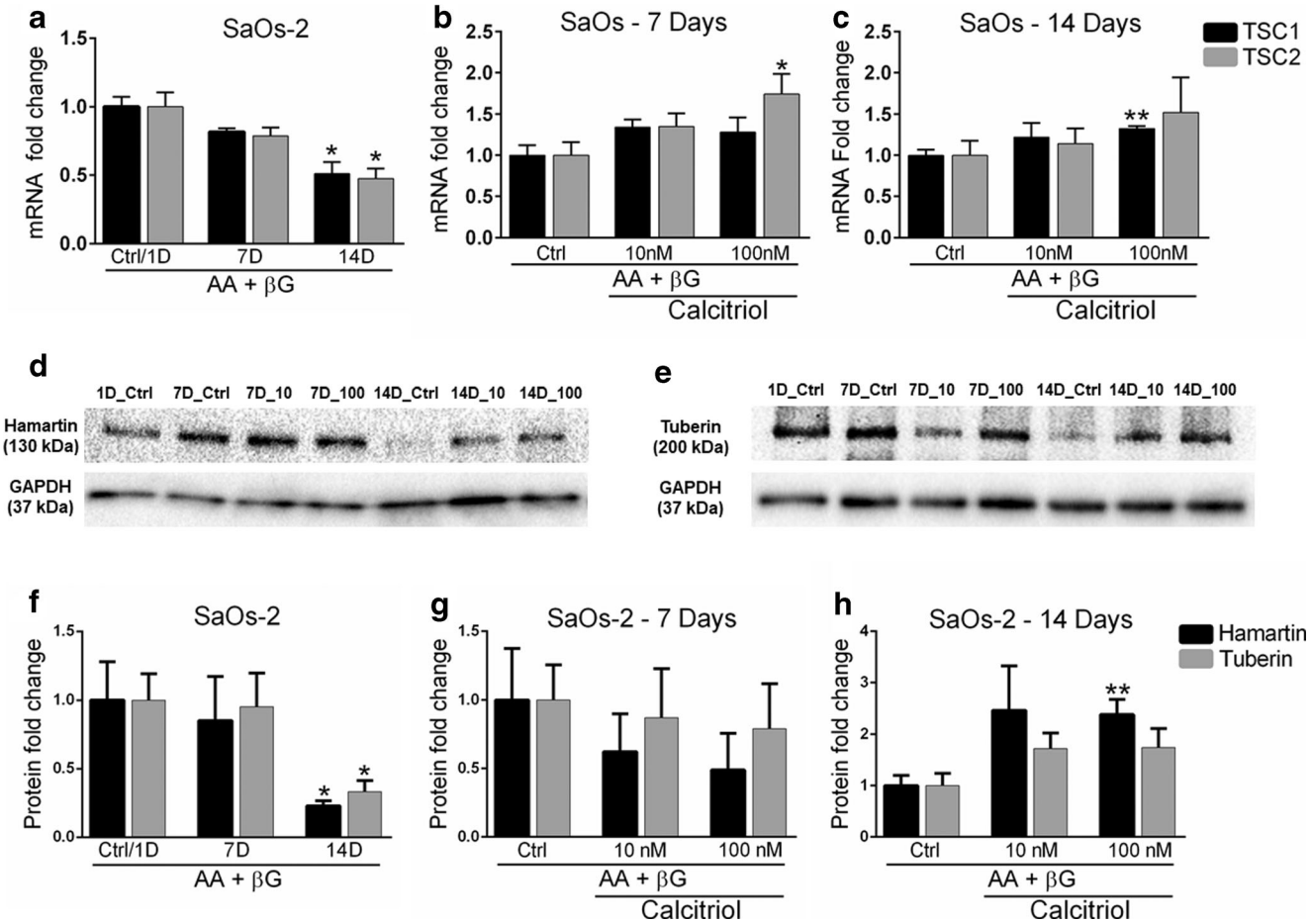

Fig. 1 In vitro calcification reduces transcription of genes and expression of proteins linked to tuberous sclerosis syndrome in SaOs-2 cells, but calcitriol can increase levels. RNA and protein were isolated from SaOs-2 cells treated with ascorbic acid (AA) and β-glycerophosphate (βG) for 7 or 14 days. **a** mRNA transcription of TSC1 and TSC2 was not affected at 7 days but was significantly decreased at 14 days. TSC1 and TSC2 transcription was assessed by RT-qPCR in AA + βG-treated SaOs-2 cells co-incubated with calcitriol. **b** TSC2 mRNA transcription was significantly higher in cells co-incubated with 100 nM of calcitriol at 7 days but not with 10 nM; the TSC1 transcription was not changed. **c** TSC1 mRNA transcription was significantly higher in cells co-incubated with 100 nM of calcitriol at 14 days but not with 10 nM; the TSC2 transcription was not changed. **d**, **e** Representative Western blot for hamartin (encoded by TSC1) and tuberin (encoded by TSC2), respectively. The loading control was GAPDH, and the images shown are representative of three independent experiments. **f** Levels of expression of hamartin and tuberin proteins were not affected at 7 days but decreased at 14 days of protocol for calcification. **g** Levels of expression of hamartin and tuberin proteins were not altered with 7 days of calcitriol treatment, regardless of the dose used, when compared to the 7-day control without treatment. **h** Hamartin expression was significantly increased in cells treated with 100 nM of calcitriol at 14 days, but not with 10 nM, while tuberin expression was not affected. Bars represent means of three independent experiments ± SEM. Statistical differences between the experimental and control samples were determined using Student's *t* test (*$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$)

beneficial agent in the treatment of TSC. The prophylactic use of calcitriol in children with TSC treated with anticonvulsants was suggested back in the 1970s (Addy 1976). The use in patients with cerebral calcifications still requires further study. It is still unknown if supplementation of VitD could decrease brain calcification in patients, but for now, we have an initial data to support this idea. In conclusion, we have shown that the administration of calcitriol can reverse the low expression of genes and proteins associated with TSC, albeit in a calcification condition in vitro. It is important to note that, after initiating treatment with calcitriol, the levels of the genes and the proteins did not decrease in relation to the control, which we can consider a positive finding. The use of VitD along with the drugs already used in the conventional treatment could be an effective therapeutic strategy. Moreover, VitD is inexpensive and accessible and can have important implications for public health.

Acknowledgements We are highly thankful to Dra. Belmira Andrade da Costa and Dra. Dayane Gomes (Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil) for the help with the experiments and analyzes of Western blotting.

Funding Information This study was funded by grants from the following Brazilian funding agencies and academic bureaus: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant number 470781/2014-9 and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Addy DP (1976) Rickets associated with anticonvulsant therapy in children with tuberous sclerosis. Arch Dis Child 51(12):972–974. https://doi.org/10.1136/adc.51.12.972

Bhargava P, Cassard S, Steele SU, Azevedo C, Pelletier D, Sugar EA, Waubant E, Mowry EM (2014) The Vitamin D to Ameliorate Multiple Sclerosis (VIDAMS) trial: study design for a multicenter, randomized, double-blind controlled trial of vitamin D in multiple sclerosis. Contemp Clin Trials 39(2):288–293. https://doi.org/10.1016/j.cct.2014.10.004

Boronat S, Thiele EA, Caruso P (2017) Cerebellar lesions are associated with TSC2 mutations in tuberous sclerosis complex: a retrospective record review study. Dev Med Child Neurol 59(10):1071–1076. https://doi.org/10.1111/dmcn.13499

Cui X, Gooch H, Groves NJ, Sah P, Burne TH, Eyles DW, McGrath JJ (2015) Vitamin D and the brain: key questions for future research. J Steroid Biochem Mol Biol 148:305–309. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.004

de Vries PJ, Whittemore VH, Leclezio L, Byars AW, Dunn D, Ess KC, Hook D, King BH, Sahin M, Jansen A (2015) Tuberous sclerosis associated neuropsychiatric disorders (TAND) and the TAND Checklist. Pediatr Neurol 52(1):25–35. https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.10.004

Deluca GC, Kimball SM, Kolasinski J et al (2013) Review: the role of vitamin D in nervous system health and disease. Neuropathol Appl Neurobiol 39(5):458–484. https://doi.org/10.1111/nan.12020

Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ (2005) Distribution of the vitamin D receptor and 1α-hydroxylase in human brain. J Chem Neuroanat 29(1):21–30. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.08.006

Henske EP, Jóźwiak S, Kingswood JC, Sampson JR, Thiele EA (2016) Tuberous sclerosis complex. Nat Rev Dis Prim 2:16035. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.35

Keasey MP, Lemos RR, Hagg T, Oliveira JRM (2016) Vitamin-D receptor agonist calcitriol reduces calcification in vitro through selective upregulation of SLC20A2 but not SLC20A1 or XPR1. Sci Rep 6(1):25802. https://doi.org/10.1038/srep25802

Keller A, Westenberger A, Sobrido MJ, García-Murias M, Domingo A, Sears RL, Lemos RR, Ordoñez-Ugalde A, Nicolas G, da Cunha JEG, Rushing EJ, Hugelshofer M, Wurnig MC, Kaech A, Reimann R, Lohmann K, Dobričić V, Carracedo A, Petrović I, Miyasaki JM, Abakumova I, Mäe MA, Raschperger E, Zatz M, Zschiedrich K, Klepper J, Spiteri E, Prieto JM, Navas I, Preuss M, Dering C, Janković M, Paucar M, Svenningsson P, Saliminejad K, Khorshid HRK, Novaković I, Aguzzi A, Boss A, le Ber I, Defer G, Hannequin D, Kostić VS, Campion D, Geschwind DH, Coppola G, Betsholtz C, Klein C, Oliveira JRM (2013) Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. Nat Genet 45(9):1077–1082. https://doi.org/10.1038/ng.2723

Legati A, Giovannini D, Nicolas G, López-Sánchez U, Quintáns B, Oliveira JRM, Sears RL, Ramos EM, Spiteri E, Sobrido MJ, Carracedo Á, Castro-Fernández C, Cubizolle S, Fogel BL, Goizet C, Jen JC, Kirdlarp S, Lang AE, Miedzybrodzka Z, Mitarnun W, Paucar M, Paulson H, Pariente J, Richard AC, Salins NS, Simpson SA, Striano P, Svenningsson P, Tison F, Unni VK, Vanakker O, Wessels MW, Wetchaphanphesat S, Yang M, Boller F, Campion D, Hannequin D, Sitbon M, Geschwind DH, Battini JL, Coppola G (2015) Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. Nat Genet 47(6):579–581. https://doi.org/10.1038/ng.3289

Li J, Kim SG, Blenis J (2014) Perspective rapamycin: one drug, many effects. Cell Metab 19(3):373–379. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.001

Lisse TS, Hewison M (2011) Vitamin D: a new player in the world of mTOR signaling. Cell Cycle 10(12):1888–1889. https://doi.org/10.4161/cc.10.12.15620

Menkes DB, Lancaster K, Grant M, Marsh RW, Dean P, du Toit SA (2012) Vitamin D status of psychiatric inpatients in New Zealand's Waikato region. BMC Psychiatry 12(1):68. https://doi.org/10.1186/1471-244X-12-68

Northrup H, Koenig MK, Au K-S (2011) Tuberous sclerosis complex. Gene Reviwes, Seattle

Oliveira JRM (2011) Managing idiopathic basal ganglia calcification ("Fahr's disease"). Nova Science Publishers, Nova York

Rado JP, Haris A (1993) Metabolic bone disease (anticonvulsant osteomalacia) and renal tubular acidosis in tuberous sclerosis. Intern Med 32(7):574–579. https://doi.org/10.2169/internalmedicine.32.574

Rhead B, Baarnhielm M, Gianfrancesco M et al (2016) Mendelian randomization shows a causal effect of low vitamin D on multiple sclerosis risk. Neurol Genet 2(5):e97. https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000097

Saad K, Abdel-Rahman AA, Elserogy YM et al (2015) Vitamin D status in autism spectrum disorders and the efficacy of vitamin D supplementation in autistic children. Nutr Neurosci 19(8):346–351. https://doi.org/10.1179/1476830515Y.0000000019

Vignoli A, Lesma E, Alfano RM, Peron A, Scornavacca GF, Massimino M, Schiavello E, Ancona S, Cerati M, Bulfamante G, Gorio A, Canevini MP (2015) Glioblastoma multiforme in a child with tuberous sclerosis complex. Am J Med Genet Part A n/a-n/a 167(10):2388–2393. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37158

Wang C, Li Y, Shi L, Ren J, Patti M, Wang T, de Oliveira JRM, Sobrido MJ, Quintáns B, Baquero M, Cui X, Zhang XY, Wang L, Xu H, Wang J, Yao J, Dai X, Liu J, Zhang L, Ma H, Gao Y, Ma X, Feng S, Liu M, Wang QK, Forster IC, Zhang X, Liu JY (2012) Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. Nat Genet 44(3):254–256. https://doi.org/10.1038/ng.1077

Wang H, Wang J, Qu H, Wei H, ji B, Yang Z, Wu J, He Q, Luo Y, Liu D, Duan Y, Liu F, Deng H (2016) In vitro and in vivo inhibition of mTOR by 1,25-dihydroxyvitamin D3 to improve early diabetic nephropathy via the DDIT4/TSC2/mTOR pathway. Endocrine 54(2):0–1. https://doi.org/10.1007/s12020-016-0999-1

4.2 PARTE 2 – INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ALENDRONATO EM MODELO DE CÉLULAS SAOS-2 CALCIFICADAS E SUA REPERCUSSÃO NOS GENES ENVOLVIDOS NA CCFP E ET.

4.2.1 Análise da viabilidade celular

A Figura 9 mostra a viabilidade das células SaOs-2 expostas a concentrações crescentes de Alendronato por 72h. Nas primeiras 24h não se verificou toxicidade por parte da droga, observamos inclusive um aumento na quantidade de células quando submetidas as doses de 50, 100 e/ou 150 µM. Com 48h o comportamento muda e percebemos uma tendência de toxicidade a partir da concentração de 30 µM, tendência que se confirma e se acentua com 72h. Decidimos então, utilizar a dosagem de 10 µM como sendo a máxima. Ao iniciarmos o experimento da indução da calcificação, juntamente com a administração do alendronato, percebemos que a dosagem de 10 µM se apresentou como tóxica, diante da alta quantidade de células mortas, inviabilizando seu uso. Diante disso, passamos a utilizar duas concentrações, 1 µM e 5 µM, que embora não tenha sido uma dosagem específica utilizada no ensaio do MTT, estava em um intervalo confiável e se mostrou eficaz com o curso do experimento.

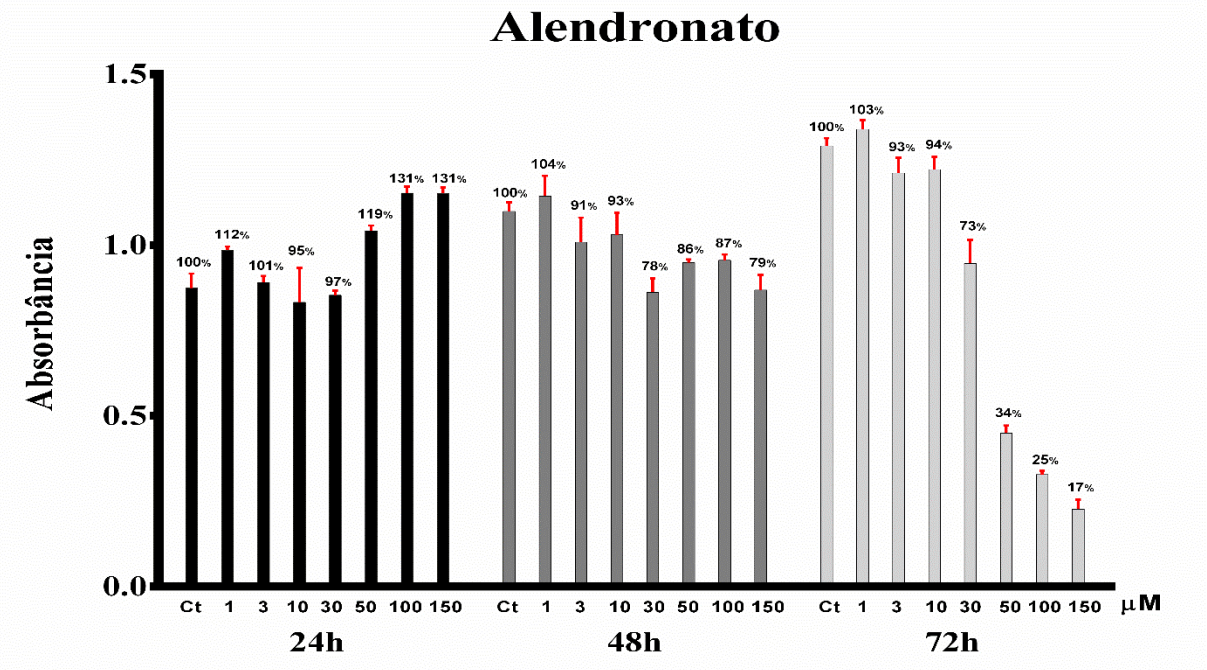

Figura 9. Ensaio de viabilidade (MTT) em células SaOs-2 submetidas a diferentes concentrações de Alendronato, em 24 h, 48 h e 72 h. As concentrações utilizadas foram 1, 3, 10, 50, 100 e 150 µM e o grupo controle (Ct) não recebeu tratamento. Os gráficos representam a média das absorbâncias obtidas em triplicatas com a barra erro padrão. Acima de cada barra consta a porcentagem de células viáveis em relação ao Ct.

4.2.2 Indução da calcificação em células saos-2 e expressão de genes envolvidos com a CCFP

Células SaOs-2 quando mantidas em cultura a longo prazo, juntamente com ácido ascórbico, formam uma matriz de colágeno que, quando suplementada com um doador de fosfato como o β-glicerolfosfato, começam a mineralizar, formando cristais semelhantes a hidroxiapatita (MCQUILLAN; RICHARDSON; BATEMAN, 1995). Após 14 dias do protocolo de indução da calcificação, verificamos de maneira qualitativa, a formação de nódulos calcificados corados pelo vermelho de alizarina (Figura 11).

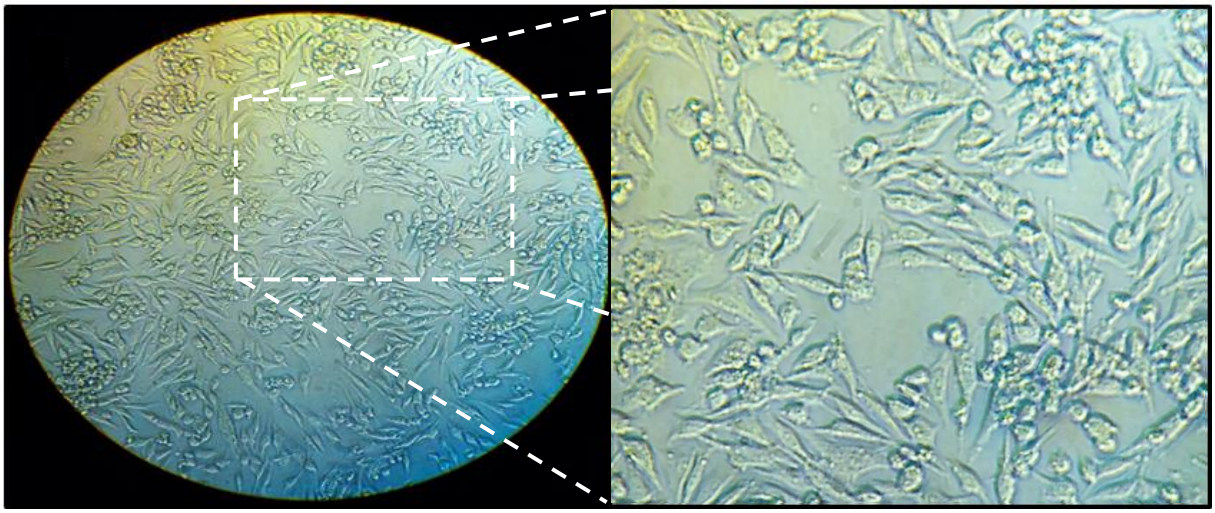

Figura 10. Fotomicrografia em campo claro de células SaOs-2 controle, sem tratamento.

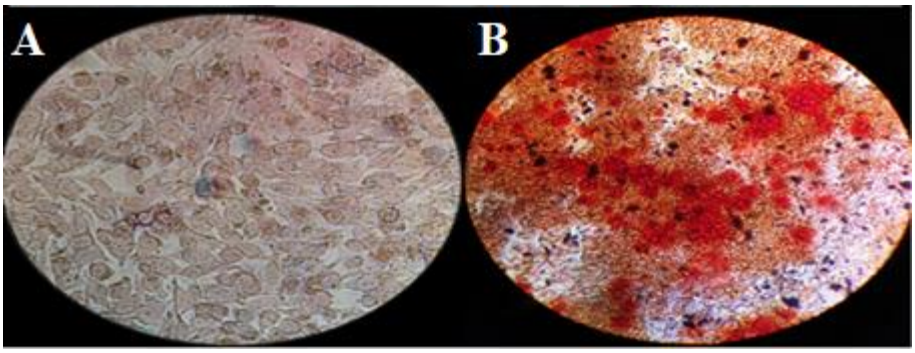

Figura 11. Análise qualitativa da calcificação em células SaOs-2 através da marcação com o corante vermelho de alizarina ao fim de 14 dias. Fotomicrografia de células SaOs-2 (A) controle e (B) com tratamento de indução da calcificação.

Para além da observação da calcificação, é interessante notar a mudança na morfologia da célula SaOs-2 após 14 dias, em condição controle, sem tratamento. No início do cultivo, a célula apresenta uma morfologia mais delgada e fusiforme (Figura 10) diferente da sua forma com 14 dias, mais globosa e com o núcleo ocupando boa parte da célula como um todo (Figura

11 C). Após confirmação visual, e obtenção das imagens, prosseguimos com quantificação da calcificação, onde, acompanhando o resultado qualitativo, a calcificação foi confirmada ao fim dos 14 dias (Figura 12 A).

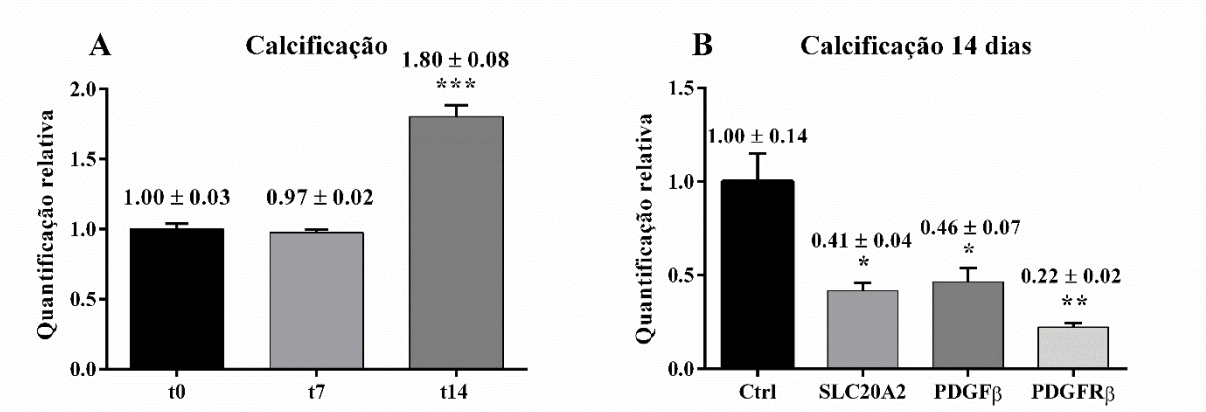

Figura 12. Calcificação em células SaOs-2, durante 7 e 14 dias e expressão de genes envolvidos com a CCFP ao fim de 14 dias do respectivo modelo. (A) Quantificação relativa em relação ao controle, do nível de intensidade da marcação com vermelho de alizarina em células SaOs-2, submetidas ao processo de calcificação no início do tratamento (t0, controle), no sétimo dia (t7) e no décimo-quarto dia (t14). (B) Quantificação relativa dos genes *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ*, mensurada por qPCR em relação ao grupo controle (Ctrl), sem tratamento e com mesmo tempo de cultivo. As barras representam as médias de 03 culturas independentes ± EP. Teste T de student; *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.0001.

Os níveis de mRNA do *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ* foram analisados ao fim do tratamento, 14 dias, quando foi observada a calcificação (Figura 12 B). Quando o grupo submetido a calcificação foi comparado com o grupo controle, que tem o mesmo tempo de cultivo, mas que não recebeu a indução da calcificação, observamos que os três genes analisados tiveram suas expressões diminuídas, condição que mimetiza a condição dos pacientes com CCFP.

4.2.3 Efeito do Alendronato em modelo de células SaOs-2 calcificadas

Avaliamos a influência do Alendronato no nosso modelo de calcificação *in vitro*, através da marcação com vermelho de alizarina (Figura 13). Ao fim do experimento, com 14 dias, notamos que ambas as concentrações de Alendronato foram capazes de atenuar a calcificação observada no grupo controle sem tratamento.

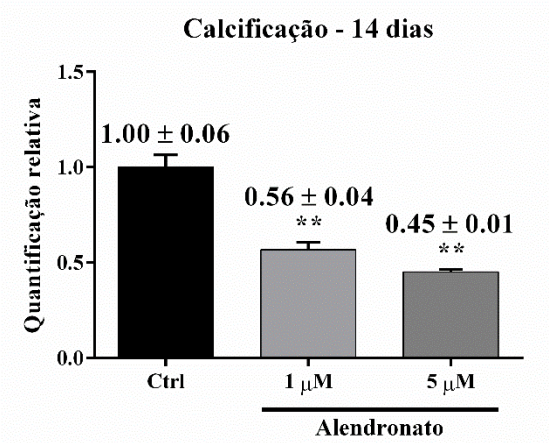

Figura 13. Efeito do Alendronato nas doses de 1 µM e 5 µM sobre calcificação em células SaOs-2. O nível de intensidade da marcação com vermelho de alizarina foi avaliado com 14 dias, em relação ao grupo controle (Ctrl) com mesmo tempo de cultivo, mas sem o tratamento com o Alendronato. As barras representam as médias de 03 culturas independentes ± EP. Teste T de student; **p ≤ 0.01.

4.2.4 Efeito do Alendronato sobre a expressão dos genes *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ* em modelo de células SaOs-2 calcificadas

Após a comprovação da eficácia do modelo experimental e após verificar que o tratamento com Alendronato é capaz de diminuir a calcificação, partimos para a análise da expressão dos genes *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ* frente a esse tratamento. Independente da concentração de Alendronato, foi constatado que no modelo de calcificação *in vitro*, os níveis de expressão do *SLC20A2* se apresentaram elevados em relação ao controle, tanto em 7 dias (Figura 14 A), quanto em 14 dias (Figura 14 D), quando a concentração de 5 µM teve um maior destaque. Um comportamento parecido pode ser observado em relação ao gene PDGFβ, quando em 7 dias (Figura 14 B) houve um aumento da expressão am ambas as doses de Alendronato, mas com destaque para a maior concentração de 5 µM. Com 14 dias (Figura 14 E), a dosagem de 5 µM manteve o nível do *PDGFβ* elevado, tendência não observada na dosagem menor de 1 µM. Em relação a expressão do *PDGFRβ*, seu comportamento no geral foi diferente dos outros dois genes analisados. Com 7 dias (Figura 14 C), independente da dose de Alendronato utilizada, percebemos que sua expressão se apresentou diminuída. Em relação a concentração de 5 µM, a tendência se manteve com 14 dias (Figura 14 F), mas foi observado um comportamento contrário com a concentração de 1 µM, quando a expressão do gene teve aumento considerável.

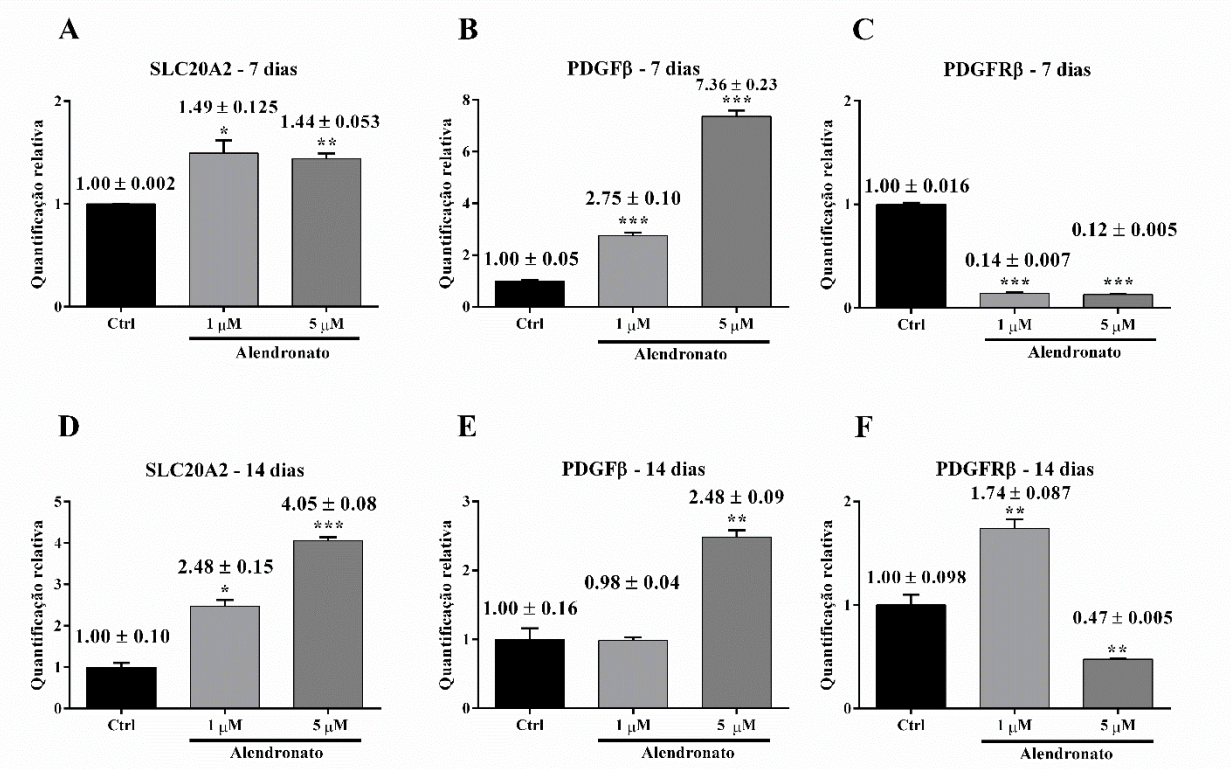

Figura 14. Efeito do Alendronato nas doses de 1 µM e 5 µM sobre a expressão de genes envolvidos com a CCFP durante 7 e 14 dias, em modelo experimental de calcificação em células SaOs-2. Expressão dos genes *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ* com 7 dias de tratamento (A – C) e com 14 dias de tratamento (D – F), em relação ao grupo controle (Ctrl) com mesmo tempo de cultivo, mas sem o tratamento com o Alendronato. As barras representam as médias de 03 culturas independentes ± EP. Teste T de student; *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001.

4.2.5 Efeito do Alendronato sobre a expressão dos genes *TSC1* e *TSC2* em modelo de células SaOs-2 calcificadas

Em resultados anteriores já publicados (resultados parte 1), foi observado que no modelo de calcificação induzida em células SaOs-2, tanto a expressão dos genes *TSC1* e *TSC2*, quanto suas respectivas proteínas, Hamartina e Tuberina, se apresentaram reduzidas aos 14 dias (Figura 15). Dentro dessa perspectiva, resolvemos analisar a influência do Alendronato sobre esses genes. De maneira global, observamos nitidamente uma resposta positiva dos genes a partir do tratamento com o Alendronato (Figura 16). Com 7 dias de tratamento, com a concentração de 1 µM de Alendronato, a expressão do *TSC1* se manteve igual ao controle sem tratamento e de mesma idade, sendo a única condição em que não houve um aumento.

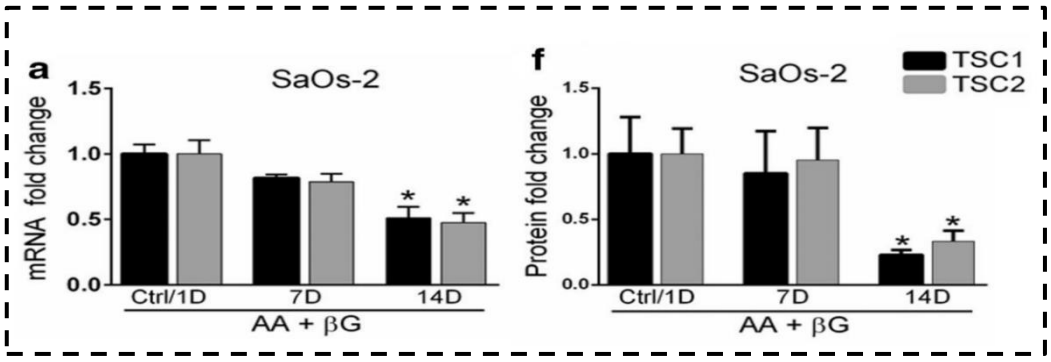

Figura 15. Expressão dos genes *TSC1* e *TSC2* (A) e das suas respectivas proteínas (B) no modelo de calcificação celular em 7 e 14 dias. Resultados parte 1.

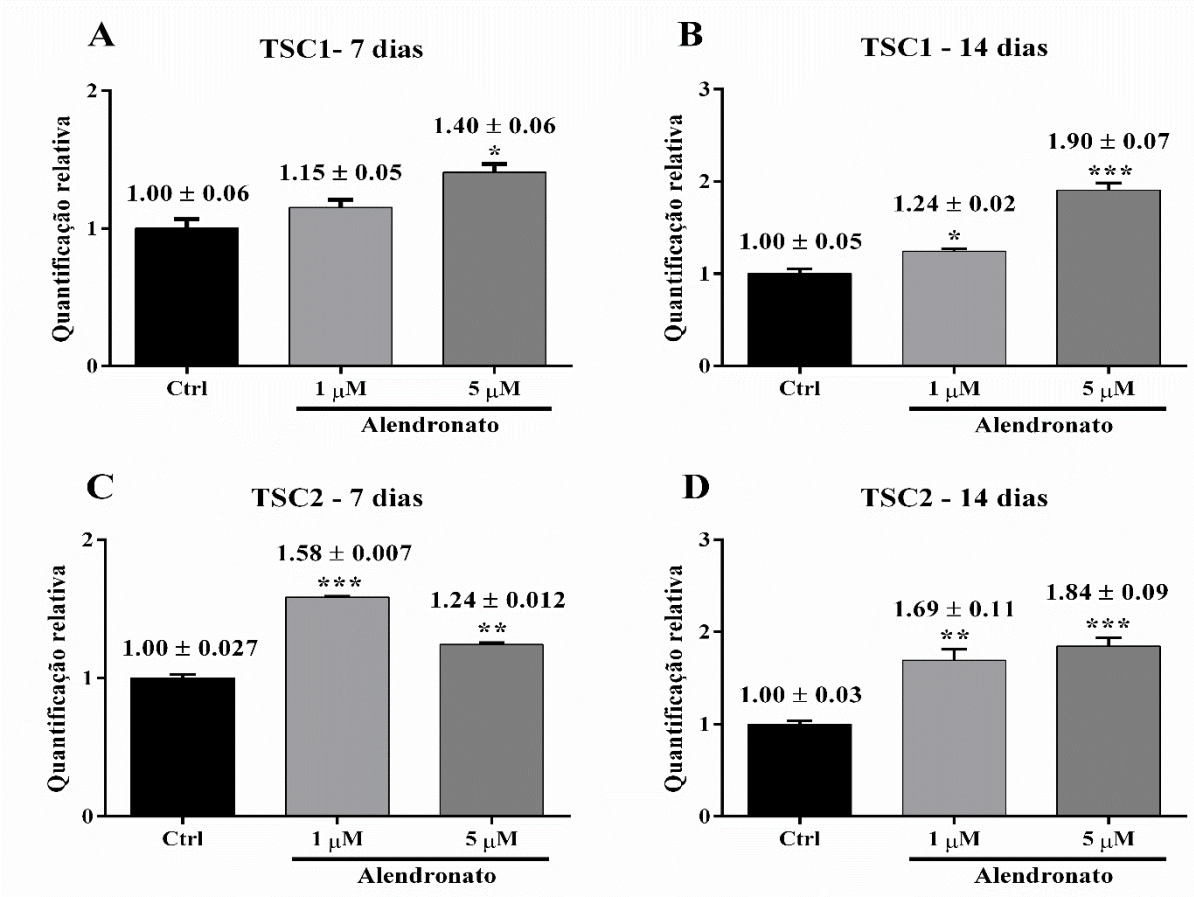

Figura 16. Efeito do Alendronato nas doses de 1 µM e 5 µM sobre a expressão de genes envolvidos com a ET durante 7 e 14 dias, em modelo experimental de calcificação em células SaOs-2. Expressão dos genes *TSC1* e *TSC2* com 7 dias de tratamento (A e C) e com 14 dias de tratamento (B e D), em relação ao grupo controle (Ctrl) com mesmo tempo de cultivo, mas sem o tratamento com o Alendronato. As barras representam as médias de 03 culturas independentes ± EP. Teste T de student; *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001.

5 DISCUSSÃO

Os mecanismos responsáveis pelas CC ainda não estão claros, principalmente por se tratar de um fenótipo que pode se apresentar com diferentes padrões e por ser característico de várias doenças, com diferentes etiologias. Estudos *in vitro* e *in vivo* se apresentam como uma ferramenta necessária para buscar conhecimento a respeito dessas questões. Dentro desse cenário, nosso trabalho buscou estudar em um modelo de calcificação *in vitro*, utilizando células SaOs-2, mimetizar um ambiente que nos permitisse avaliar a expressão de genes de interesse, sabidamente envolvidos com CC e testar possíveis alternativas de tratamento.

Estudos prévios do nosso laboratório já mostraram o sucesso do modelo experimental em relação aos genes envolvidos com a CCFP (KEASEY et al., 2016). O presente trabalho mostrou que, em relação a ET, esse modelo também serve como ferramenta para desenvolvimento de pesquisa básica dessa doença, visto que conseguimos estabelecer a diminuição dos genes *TSC1* e *TSC2*, através da indução da calcificação (SANTOS-JUNIOR et al., 2018). Assunto recorrente em debates científicos, as limitações dos modelos experimentais, de maneira geral, são motivos naturais de questionamentos. Nosso modelo celular, embora não seja constituído de células do sistema nervoso, tem se mostrado útil, principalmente pelo fato de ainda não ter encontrado na literatura modelo de calcificação *in vitro* utilizando neurônios ou células da glia. A condição genética e fenotípica está presente em nosso modelo e nos permite estabelecer projeções e propor novos rumos de estudo.

Em uma primeira linha de investigação, buscamos entender o comportamento dos genes *TSC1* e *TSC2* associados com a ET, no nosso modelo celular. Diante de uma baixa expressão causada pela calcificação, o calcitriol conseguiu regular positivamente o nível desses genes e das proteínas associadas. São poucos os estudos que abordam o fenótipo da CC na ET, sobretudo seus mecanismos. Conseguimos demonstrar que o calcitriol tem potencial para ser um possível aliado no tratamento dos pacientes com ET. Certamente, muitas outras abordagens precisam ser realizadas para que sua eficácia seja comprovada. Embora nosso estudo tenha avaliado o efeito positivo do calcitriol sobre do fenótipo da calcificação, o reestabelecimento dos níveis dos genes e das proteínas associadas, tendem a impactar os outros sinais e sintomas da doença.

Numa segunda linha de investigação, buscamos avaliar a influência do Alendronato no nosso modelo de calcificação *in vitro*, tanto em relação a formação da calcificação em si, quanto na expressão dos genes *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ*, os principais e mais estudados no

contexto da CCFP. Embora a relevância do gene *MYORG* tenha crescido consideravelmente nos últimos meses, sua descoberta é muito recente, de modo que não fez parte do nosso planejamento inicial, mas certamente será abordado em próximos estudos, bem como o gene *XPR1*.

Inicialmente, determinamos um intervalo de concentração do Alendronato que seriam viáveis para o desenvolvimento do estudo. Realizamos o ensaio de viabilidade celular, utilizando o método do MTT, nos tempos de 24h, 48h e 72h; com doses variando de 1 até 150 µM. Verificamos ao fim do teste que a dosagem máxima seria de 10 µM, que manteve uma viabilidade de aproximadamente 94%. No entanto, com o decorrer do experimento, percebemos que a administração do Alendronato a 10 µM, juntamente com o protocolo de calcificação, tornou o microambiente tóxico para as células. Com mais alguns testes, chegamos as concentrações ideais de 1 µM e 5 µM.

Nosso modelo experimental, assim como reportado por Keasey, et al (2016), apresentou calcificação ao fim do tratamento de indução com β-Glicerolfosfato e ácido ascórbico, além de redução na expressão dos genes *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ.* A partir da validação do nosso modelo, analisamos a influência do Alendronato nas concentrações de 1 µM e 5 µM, sobre a calcificação em si. Independente da concentração, o Alendronato foi capaz de reduzir a calcificação em aproximadamente 50% quando comparado com o controle. Embora seja um dado inédito, tal comportamento do Alendronato era esperado, por ele ser um análogo sintético do pirofosfato inorgânico, um potente fator de anti-mineralização endógeno (VILLA-BELLOSTA; O'NEILL, 2018). Em experimento semelhante, induzindo mineralização em modelo celular de fibroblasto a partir da adição de Pi no meio de cultura, foi demonstrado que a administração de Alendronato foi capaz de inibir de maneira abrupta o processo de calcificação (LI et al., 2016a).

O passo seguinte da nossa pesquisa foi dado no intuito de entender se, para além da calcificação, o Alendronato também estaria modulando de alguma maneira a expressão dos genes *SLC20A2*, *PDGFβ* e *PDGFRβ.* Identificamos inicialmente que a expressão do gene *SLC20A2*, prejudicada pela calcificação, teve seu comportamento revertido pelo Alendronato, independente da concentração e do tempo analisado. O que foi constatado é que quanto maior o tempo de tratamento e a concentração da droga, maior foi a expressão. É digno de nota que, no trabalho de Oliveira & Oliveira (2016), onde são descritos 7 pacientes com PFBC que fazem uso do Alendronato, 3 são identificados com variações no *SLC20A2*; desses, dois são os que apresentam as melhoras mais significativas, em relação a diminuição de sinais e sintomas

causados pela doença. Embora sejam dados preliminares, podemos afirmar que existe uma relação positiva entre o Alendronato e o *SLC20A2*.

O *PDGFβ* apresentou um comportamento parecido com o *SLC20A2*, com 7 dias de tratamento, ambas as concentrações de Alendronato foram capazes de aumentar a expressão do gene, tendo a concentração de 5 µM exercido um maior efeito. Com 14 dias, a concentração de 5 µM manteve o nível de expressão do *PDGFβ* alto, mas, curiosamente, a concentração de 1 µM não manteve a tendência. Aparentemente, a concentração de 1 µM de Alendronato não foi suficiente para manter os níveis de expressão do gene numa condição de insulto crônico. De maneira global, o que se nota é que a resposta do Alendronato na expressão do *PDGFβ* é diminuída com 14 dias. Com 7 dias, a expressão do gene era 2,5 vezes maior que o controle na concentração de 1 µM e 7,5 vezes na concentração de 5 µM; com 14 dias, a expressão é diminuída para o nível do controle na concentração de 1 µM e 2,5 vezes na concentração de 5 µM.

Quando avaliamos a expressão do gene que codifica o receptor do *PDGFβ*, o *PDGFRβ*, encontramos um cenário bem diferente em relação as primeiras análises. Com 7 dias, o tratamento com o Alendronato, independente da concentração, diminui a expressão do *PDGFRβ* em aproximadamente 85%. Com 14 dias, a concentração de 5 µM de Alendronato continua influenciando negativamente a expressão do gene, no entando, a concentração de 1 µM age de maneira positiva, aumentando a expressão do *PDGFRβ*.

A partir de uma compreensão geral do comportamento dos genes *PDGFβ* e *PDGFRβ* nas condições analisadas, os dados sugerem um mecanismo de compensação entre o ligante e o receptor. Quando os genes do ligante estão sendo mais expressos, os genes do receptor consequentemente diminuem sua expressão, buscando manter o balanço fisiológico. No contexto estudado, o comportamento do *PDGFRβ* parece depender exclusivamente do *PDGFβ*, pois o tempo de tratamento com Alendronato e as diferentes concentrações parecem não influenciar. Estudos com animais ou células KO para um dos genes poderiam fundamentar melhor essa questão e trazer mais respostas relacionadas a dinâmica ligante-receptor.

Como já havíamos publicado, nesse mesmo modelo de calcificação *in vitro*, os genes *TSC1* e *TSC2* tiveram sua expressão diminuída ao fim de 14 dias (SANTOS-JUNIOR et al., 2018). Essa condição mimetiza a situação de pelo menos 80% dos pacientes que desenvolvem a ET (HENSKE et al., 2016). Ao tratar essas células com Alendronato, independente da concentração utilizada, percebemos uma reversão da condição anterior, os níveis de expressão

dos dois genes se apresentaram acima do controle não tratado. As proteínas Hamartina e Tuberina, codificadas pelos genes em questão, formam um complexo que inibe o mTORC1, uma quinase responsável por regular inúmeros processos celulares (LI; KIM; BLENIS, 2014). Dentre os vários processos, o mTORC1 regula o crescimento e a proliferação celular, na ET, pela falta da inibição exercida pelo complexo Hamartina-Tuberina, que caracteriza molecularmente a síndrome, a dinâmica celular se encontra prejudicada.

A partir dessa dinâmica celular desajustada, percebemos que uma característica comum dentre os sinais da ET são as formações tumorais em diversos órgãos como coração, pele, rim, pulmão e cérebro (HENSKE et al., 2016). Indo de encontro com esses achados, já é descrito na literatura que alguns BPs agem também como inibidores da proliferação celular em tumores de diversas origens: mama, pulmão, próstata, célula da glia, etc (JIANG et al., 2016; LIU et al., 2015). Dentro desse contexto, já foi reportado que o bloqueio da via do mevalonato, mecanismo de ação dos N-BPs, como o Alendronato, aumenta a eficácia dos inibidores da via mTOR em modelo de carcinoma renal (HAGIWARA et al., 2018).

A proliferação celular é um processo de alta demanda energética e recentemente foi mostrado que a via do mevalonato não só suporta a proliferação celular, como promove a captação de glicose e aminoácidos (GONG et al., 2019). Ainda nesse sentido, também foi demonstrado que a atividade de suplementação do mevalonato ativa o receptor do IGF1 (BEKKERING et al., 2018). O IGF1 é reconhecidamente o principal ativador da via mTOR, que consequentemente ativa o mTORC1. Com mais esse contexto, a relação entre o Alendronato, como inibidor da via do mevalonato e o TSC1 e TSC2, como inibidores do mTORC1, ganha ainda mais evidência.

Diante de todos esses achados, nossos dados sugerem que o tratamento com o Alendronato não só poderia beneficiar um paciente com ET no que se refere a sua calcificação cerebral, como também poderia ajudar na inibição da proliferação celular, desordenada de maneira sistêmica nessa condição. Como produto final da via do mevalonato, e principal componente da membrana celular, o colesterol também é um fator importante para a proliferação celular. Células tumorais necessitam do colesterol em alta disponibilidade para crescimento e sobrevivência, e a diminuição da biossíntese pode ser considerada como uma estratégia antitumoral promissora (MULLEN et al., 2016).

6 CONCLUSÕES

Nosso trabalho trouxe contribuições interessantes na busca de novas alternativas para tratamento de pacientes com calcificações cerebrais. Até então, não existe uma terapia específica que aja diretamente sobre o fenótipo dessa calcificação, sinal comum em tantas enfermidades. Uma grande sequência de novos e mais complexos estudos precisam ser feitos para determinar a real eficácia dos tratamentos com Alendronato e Calcitriol nesses pacientes, mas estabelecemos aqui um início promissor.

Os dados obtidos *in vitro* encontram suporte na literatura, o que ajuda a corroborar nossos achados. A relação da Vitamina D com o SNC já é algo bem documentado, e mostramos aqui que a adequação de seus níveis tem um efeito específico e positivos sobre os genes relacionados com a ET, o que possivelmente teria um efeito positivo nos pacientes. O uso do Alendronato como possível alternativa de tratamento para a ET também aparenta ser um bom alvo para investimentos terapêuticos. Os dados na literatura que relacionam diretamente o Alendronato e a ET são praticamente inexistentes, mas de acordo com os nossos resultados e com o conhecimento das vias bioquímicas e moleculares envolvidas nos processos, temos convicção da importância do achado.

Embora não sejam muitos, existem trabalhos que relacionam o Alendronato ou os Bisfosfonatos de uma maneira geral, com a CCFP. Uma parte dos resultados relatados na literatura são inconclusivos, outra parte relata um certo efeito positivo. O que evidenciamos aqui, é que o Alendronato tem sim um grande potencial para entrar na lista de possíveis alternativas terapêuticas.

Dentro da nossa própria linha de pesquisa, outras abordagens podem ser adotadas, como aumento do número de experimentos, estudos com outros genes relacionados e avaliação da expressão das proteínas codificadas pelos genes de interesse. Como já frisado, outros experimentos mais complexos precisam ser feitos, mas outras abordagens mais simples também podem ser utilizadas, como estudos retrospectivos. Verificar o comportamento dos sinais e sintomas da ET ou CCFP em pacientes que por algum outro motivo utilizam o alendronato ou a suplementação de Vitamina D pode fornecer dados interessantes.

REFERÊNCIAS

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, ago. 2016.

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

BANO, S. et al. **Neuroimaging in epilepsyJournal of Pediatric Neurosciences**India, 2011.

BATLA, A. et al. Deconstructing Fahr's disease/syndrome of brain calcification in the era of new genes. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 37, p. 1–10, 2017.

BATTINI, J. L.; RASKO, J. E.; MILLER, A. D. A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: possible role in G protein-coupled signal transduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 4, p. 1385–1390, fev. 1999.

BECK-CORMIER, S. et al. Slc20a2, encoding the phosphate transporter PiT2, is an important genetic determinant of bone quality and strength. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, fev. 2019.

BECK, L. et al. The Phosphate Transporter PiT1 (SLC20A1) Revealed As a New Essential Gene for Mouse Liver Development. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9148, 2010.

BEKIESINSKA-FIGATOWSKA, M.; MIERZEWSKA, H.; JURKIEWICZ, E. Basal ganglia lesions in children and adults. **European Journal of Radiology**, v. 82, p. 837–849, 2013.

BEKKERING, S. et al. Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway. **Cell**, v. 172, n. 1–2, p. 135- 146.e9, jan. 2018.

BETSHOLTZ, C.; KELLER, A. PDGF, pericytes and the pathogenesis of idiopathic basal ganglia calcification (IBGC). **Brain Pathology**, v. 24, n. 4, p. 387–395, 2014.

BHARGAVA, P. et al. The Vitamin D to Ameliorate Multiple Sclerosis (VIDAMS) trial: Study design for a multicenter, randomized, double-blind controlled trial of vitamin D in multiple sclerosis. **Contemporary Clinical Trials**, v. 39, n. 2, p. 288–293, 2014.

BORONAT, S.; THIELE, E. A.; CARUSO, P. Cerebellar lesions are associated with TSC2 mutations in tuberous sclerosis complex: a retrospective record review study. **Developmental medicine and child neurology**, v. 59, n. 10, p. 1071–1076, out. 2017.

BØTTGER, P.; PEDERSEN, L. Mapping of the minimal inorganic phosphate transporting unit of human PiT2 suggests a structure universal to PiT-related proteins from all kingdoms of life. **BMC biochemistry**, v. 12, n. 1, p. 21, 2011.

BOURGINE, A. et al. Mice with Hypomorphic Expression of the Sodium-Phosphate Cotransporter PiT1/Slc20a1 Have an Unexpected Normal Bone Mineralization. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–10, 2013.

CARACENI, T.; BROGGI, G.; AVANZINI, G. Familial idiopathic basal ganglia calcification exhibiting “dystonia musculorum deformans” features. **European neurology**, v. 12, n. 5–6, p. 351–359, 1974.

CHANG, K. H. et al. Increased risk of dementia in patients with osteoporosis: A population-based retrospective cohort analysis. **Age**, v. 36, n. 2, p. 967–975, 2014.

CHRISTAKOS, S. et al. **Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic EffectsPhysiological Reviews**Bethesda, MD, jan. 2016.

CIBICKOVA, L. et al. Differential effects of statins and alendronate on cholinesterases in serum and brain of rats. **Physiological research**, v. 56, n. 6, p. 765–770, 2007.

CIBICKOVA, L. et al. Alendronate lowers cholesterol synthesis in the central nervous system of rats - a preliminary study. **Physiological research**, v. 58, n. 3, p. 455–458, 2009.

CORTES, M. S. et al. Clinical assessment and brain findings in a cohort of mothers, fetuses and infants infected with ZIKA virus. **The American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 218, n. 4, p. 440.e1-440.e36, 2018.

CUI, X. et al. Vitamin D and the brain: Key questions for future research. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 148, p. 305–309, 2015.

DAGHIGHI, M. H. et al. Intracranial physiological calcifications in adults on computed tomography in Tabriz , Iran. **Folia Morphologica**, v. 66, n. 2, p. 115–119, 2007.

DE VRIES, P. J. et al. Tuberous sclerosis associated neuropsychiatric disorders (TAND) and the TAND Checklist. **Pediatric neurology**, v. 52, n. 1, p. 25–35, jan. 2015.

DECHAUME, J. et al. [Fahr’s disease; vascular intracerebral, idiopathic non-arteriosclerotic calcifications]. **Journal de medecine de Lyon**, v. 32, n. 764, p. 963–979, nov. 1951.

DEHGHANI, F. et al. Clodronate inhibits the secretion of proinflammatory cytokines and NO by isolated microglial cells and reduces the number of proliferating glial cells in excitotoxically injured organotypic hippocampal slice cultures. **Experimental Neurology**, v. 189, p. 241–251, 2004.

DELACOUR, A. Ossification des capillaires du cerveau. **Annales médico-psychologiques**, v. 2, p. 458–461, 1850.

DELUCA, G. C. et al. Review: The role of vitamin D in nervous system health and disease. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 39, n. 5, p. 458–484, 2013.

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

DIMARIO, F. J. J.; CLANCY, R. Symmetrical thalamic degeneration with calcifications of infancy. **American journal of diseases of children (1960)**, v. 143, n. 9, p. 1056–1060, set. 1989.

EYLES, D. W. et al. Distribution of the Vitamin D receptor and 1??-hydroxylase in human brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 29, n. 1, p. 21–30, 2005.

FAHR, K. T. Idiopathipathische verkalking der hirume fasse. **Zbl Allf Path**, v. 50, p. 129–133, 1930.

FERNANDES DE ABREU, D. A.; EYLES, D.; FÉRON, F. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: Implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. SUPPL. 1, 2009.

FERREIRA, L. D.; RICARDO, J.; OLIVEIRA, M. DE. The Need for Consensus on Primary Familial Brain Calci fi cation Nomenclature. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, 2018.

FORSTER, I. C. et al. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 2–3, p. 386–95, 2013.

FRITH, J. C. et al. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. **Arthritis and rheumatism**, v. 44, n. 9, p. 2201–2210, set. 2001.

GARCION, E. et al. New clues about vitamin D functions in the nervous system. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 13, n. 3, p. 100–105, abr. 2002.

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

GIOVANNINI, D. et al. Inorganic Phosphate Export by the Retrovirus Receptor XPR1 in Metazoans. **CellReports**, v. 3, n. 6, p. 1866–1873, 2013.

GNANT, M. et al. Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 7, p. 679–691, fev. 2009.

GONG, L. et al. The mevalonate coordinates energy input and cell proliferation. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 4, 2019.

GRANGEON, L. et al. Biallelic MYORG mutation carriers exhibit primary brain calcification with a distinct phenotype. **Brain**, v. 142, n. 6, p. 1–14, 2019.

HAGIWARA, N. et al. Mevalonate pathway blockage enhances the efficacy of mTOR inhibitors with the activation of retinoblastoma protein in renal cell carcinoma. **Cancer letters**, v. 431, p. 182–189, set. 2018.

HARA, O. et al. Characterization of a Human Gene Conferring Sensitivity to Infection by Gibbon Ape Leukemia Virus. **Cell Growth & Differenciation**, v. 1, n. 3, p. 119–127, 1990.

HARZY, T. et al. Idiopathic hypoparathyroidism and adhesive capsulitis of the shoulder in two first-degree relatives. **Joint, bone, spine : revue du rhumatisme**, v. 71, n. 3, p. 234–236, maio 2004.

HELDIN, C. H.; OSTMAN, A.; RONNSTRAND, L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1378, n. 1, p. F79-113, ago. 1998.

HELDIN, C. H.; WESTERMARK, B.; WASTESON, A. **Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, ago. 1979.

HENSKE, E. P. et al. Tuberous sclerosis complex. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. May, p. 16035, 2016.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **The New England journal of medicine**, v. 357, n. 3, p. 266–281, jul. 2007.

HOZUMI, I. et al. Inorganic phosphorus (Pi) in CSF is a biomarker for SLC20A2-associated idiopathic basal ganglia calcification (IBGC1). **Journal of the Neurological Sciences**, v. 388, p. 150–154, 2018.

HSU, S. C. et al. Mutations in SLC20A2 are a major cause of familial idiopathic basal ganglia calcification. **Neurogenetics**, v. 14, n. 1, p. 11–22, fev. 2013.

INDEN, M. et al. The type III transporters (PiT-1 and PiT-2) are the major sodium-dependent phosphate transporters in the mice and human brains. **Brain Research**, v. 1637, p. 128–136, 2016.

JENSEN, N. et al. Loss of function of Slc20a2 associated with familial idiopathic basal ganglia calcification in humans causes brain calcifications in mice. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 51, n. 3, p. 994–999, 2013.

JENSEN, N. et al. Mice knocked out for the primary brain calcification associated gene Slc20a2 show unimpaired pre-natal survival but retarded growth and nodules in the brain that grow and calcify over time. **The American journal of pathology**, maio 2018.

JENSEN, N.; AUTZEN, J. K.; PEDERSEN, L. Slc20a2 is critical for maintaining a physiologic inorganic phosphate level in cerebrospinal fluid. **Neurogenetics**, v. 17, n. 2, p. 125–130, 2015.

JIANG, P. et al. Anti-cancer effects of nitrogen-containing bisphosphonates on human cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 36, 2016.

KALUEFF, A. et al. Thalamic calcification in vitamin D receptor knockout mice. **NeuroReport**, v. 17, n. 7, p. 717–721, 2006.

KALUEFF, A. V et al. Impaired motor performance in mice lacking neurosteroid vitamin D receptors. **Brain research bulletin**, v. 64, n. 1, p. 25–29, jul. 2004.

KAVANAUGH, M. P. et al. Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 15, p. 7071–7075, 1994.

KEASEY, M. P. et al. Vitamin-D receptor agonist calcitriol reduces calcification in vitro through selective upregulation of SLC20A2 but not SLC20A1 or XPR1. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 25802, 2016.

KEISALA, T. et al. Aberrant nest building and prolactin secretion in vitamin D receptor mutant mice. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 104, n. 3–5, p. 269–273, maio 2007.

KELLER, A. et al. Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. **Nature genetics**, v. 45, n. 9, p. 1077–82, 2013.

KELLEY, L. K. **Effectiveness of Statin and Bisphosphonate Treatment in a 3NP model of Huntington's Disease**. [s.l.] University of New Orleans, 2015.

KOSTIC, V. S.; PETROVIC, I. N. Brain Calcification and Movement Disorders. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 17, n. 2, p. 1–10, 2017.

KOTA, S. K. et al. Endocrinopathy complicating a case of Tuberous sclerosis. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 17, n. 1, p. 182–184, 2013.

KÜHNE, H. et al. Vitamin D receptor knockout mice exhibit elongated intestinal microvilli and increased ezrin expression. **Nutrition Research**, v. 36, n. 2, p. 184–192, 2016.

LANDEL, V. et al. Differential expression of vitamin D-associated enzymes and receptors in brain cell subtypes. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 177, p. 129–134, 2018.

LEGATI, A. et al. Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. **Nature genetics**, v. 47, n. 6, p. 579–81, 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.

LEVÉEN, P. et al. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. **Genes and Development**, v. 8, n. 16, p. 1875–1887, 1994.

LI, J.; KIM, S. G.; BLENIS, J. Perspective Rapamycin : One Drug , Many Effects. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 373–379, 2014.

LI, Q. et al. Etidronate prevents, but does not reverse, ectopic mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum (Abcc6-/-). **Oncotarget**, v. 1, 2016a.

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.

LI, W. et al. Neuroprotective Effects of Etidronate and 2 , 3 , 3-Trisphosphonate Against Glutamate-Induced Toxicity in PC12 Cells. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 4, p. 844–854, 2016b.

LI, Y. C. et al. Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 18, p. 9831–5, 1997.

LI, Y. C. et al. Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4391–4396, out. 1998.

LIU, J. et al. Bisphosphonates in the treatment of patients with metastatic breast, lung, and prostate cancer a meta-analysis. **Medicine (United States)**, v. 94, n. 46, p. e2014, 2015.

LIU, L. et al. Mice lacking the sodium-dependent phosphate import protein, PiT1 (SLC20A1), have a severe defect in terminal erythroid differentiation and early B cell development. **Experimental hematology**, v. 41, n. 5, p. 432– 43.e7, maio 2013.

LOEB, J. A. Functional Improvement in a Patient With Cerebral Calcinosis Using a Bisphosphonate. **Movement Disorders**, v. 13, n. 2, p. 345–349, 1998.

LOEB, J. A. et al. Brain calcifications induce neurological dysfunction that can be reversed by a bone drug. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 243, p. 77–81, 2006.

MADKE, B. Topical rapamycin (sirolimus) for facial angiofibromas. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 4, n. 1, p. 54–57, 1 jan. 2013.

MANYAM, B. V. What is and what is not ‘ Fahr ’s disease ’. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 11, p. 73–80, 2005.

MAYNE, P. E.; BURNE, T. H. J. Vitamin D in Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Neuropsychiatric Illness. **Trends in Neurosciences**, p. 1–14, 2019.

MENKES, D. B. et al. Vitamin D status of psychiatric inpatients in New Zealand’s Waikato region. **BMC psychiatry**, v. 12, n. 1, p. 68, 2012.

MILLER, D. G.; MILLER, A. D. A family of retroviruses that utilize related phosphate transporters for cell entry. **Journal of virology**, v. 68, n. 12, p. 8270–6, 1994.

MINASYAN, A. et al. Neophobia, sensory and cognitive functions, and hedonic responses in vitamin D receptor mutant mice. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 104, n. 3–5, p. 274–280, maio 2007.

MINASYAN, A. et al. Vestibular dysfunction in vitamin D receptor mutant mice. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 114, n. 3–5, p. 161–166, abr. 2009.

MONTENEGRO, A. C. et al. First description of pseudohypoparathyroidism with frontal lobe calcification and normal serum calcium at the initial manifestation in an otherwise healthy seven-year-old girl. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 5, p. 349–352, jun. 2011.

MOURA, D. A. P.; OLIVEIRA, J. R. M. XPR1: a Gene Linked to Primary Familial Brain Calcification Might Help Explain a Spectrum of Neuropsychiatric Disorders. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 57, n. 4, p. 519–521, 1 dez. 2015.

MULLEN, P. J. et al. **The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancerNature Reviews Cancer**Nature Publishing Group, , 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.76>

NICOLAS, G. et al. Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. **Neurology**, v. 80, n. 2, p. 181–187, jan. 2013.

NICOLAS, G. et al. Estimation of minimal disease prevalence from population genomic data: Application to primary familial brain calcification. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 177, n. 1, p. 68–74, 2018.

NORTHRUP, H.; KOENIG, M. K.; AU, K.-S. **Tuberous Sclerosis Complex**. Seattle: Gene Reviwes, 2011.

OLAH, Z. et al. The Cellular Receptor for Gibbon Ape Leukemia Virus Is a Novel High Affinity Sodium-dependent Phosphate Transporter. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 41, p. 25426–25431, 1994.

OLIVEIRA, J. R. M. **Managing Idiopathic Basal Ganglis Calcification ("Fahr's Disease")**. New York: Nova Science Publishers, 2011.

OLIVEIRA, J. R. M.; OLIVEIRA, M. F. Primary brain calcification in patients undergoing treatment with the biphosphanate alendronate. **Scientific reports**, v. 6, n. August 2015, p. 22961, 2016.

OLIVEIRA, M. F.; BARROS E SILVA, E.; OLIVEIRA, J. R. M. Prevalence of brain calcifications in a Brazilian cohort. **Dement Dementia & Neuropsychologia**, v. 7, n. 2, p. 210–215, 2013.

ORRISS, I. R.; ARNETT, T. R.; RUSSELL, R. G. Pyrophosphate : a key inhibitor of mineralisation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 28, p. 57–68, 2016.

PARDRIDGE, W. M.; SAKIYAMA, R.; COTY, W. A. Restricted Transport of Vitamin D and A Derivatives Through the Rat Blood-Brain Barrier. **Journal of Neurochemistry**, v. 44, n. 4, p. 1138–1141, 1 abr. 1985.

PAUCAR, M. et al. **A SLC20A2 gene mutation carrier displaying ataxia and increased levels of cerebrospinal fluid phosphate.Journal of the neurological sciences**Netherlands, abr. 2017.

PETRIBU, N. C. DE L. et al. Follow-up brain imaging of 37 children with congenital Zika syndrome: case series study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 359, p. j4188, out. 2017.

PRUFER, K. et al. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 16, n. 2, p. 135–145, fev. 1999.
QUINTANS, B.; OLIVEIRA, J.; SOBRIDO, M.-J. Primary familial brain calcifications. In: **Handbook of clinical neurology**. Netherlands: [s.n.]. v. 147p. 307–317.

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

RAMOS, E. M. et al. Primary brain calcification: an international study reporting novel variants and associated phenotypes. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 26, n. 10, p. 1462–1477, out. 2018.

RESZKA, A. A.; RODAN, G. A. Nitrogen-Containing Bisphosphonate Mechanism of Action. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 711–719, 2004.

RHEAD, B. et al. Mendelian randomization shows a causal effect of low vitamin D on multiple sclerosis risk. **Neurology Genetics**, v. 0, 2016.

RODAN, S. B. et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. **Cancer research**, v. 47, n. 18, p. 4961–4966, set. 1987.

ROGERS, M. J. New Insights Into the Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. **Current pharmaceutical design**, v. 9, p. 2643–2658, 2003.

ROSS, R. et al. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 4, p. 1207–1210, abr. 1974.

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

SANTOS-JUNIOR, E. F. DOS et al. Calcitriol Reverses the Down-Regulation Pattern of Tuberous Sclerosis Complex Genes in an In Vitro Calcification Model. **Journal of molecular neuroscience : MN**, v. 64, n. 1, p. 140–143, jan. 2018.

SCHWEI, M. J. et al. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 24, p. 10886–10897, dez. 1999.

SIEGEL, A. et al. Administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 results in the elevation of hippocampal seizure threshold levels in rats. **Brain research**, v. 298, n. 1, p. 125–129, abr. 1984.

SMITS, A. et al. Neurotrophic activity of platelet-derived growth factor (PDGF): Rat neuronal cells possess functional PDGF beta-type receptors and respond to PDGF. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 18, p. 8159–8163, set. 1991.

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

TAILOR, C. S. et al. Cloning and characterization of a cell surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 3, p. 927–932, fev. 1999.

THUL, P. J. et al. A subcellular map of the human proteome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 356, n. 6340, maio 2017.

TRICARICO, P. M. et al. Alendronate treatment induces IL-1B expression and apoptosis in glioblastoma cell line. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 285–290, 2018.

TURGUT, A. T. et al. Age-related changes in the incidence of pineal gland calcification in Turkey: A prospective multicenter CT study. **Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology**, v. 15, n. 1, p. 41–48, jun. 2008.

UGGETTI, C. et al. Aicardi-Goutieres syndrome: neuroradiologic findings and follow-up. **AJNR. American journal of neuroradiology**, v. 30, n. 10, p. 1971–1976, nov. 2009.

UMEOKA, S. et al. Pictorial review of tuberous sclerosis in various organs. **Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc**, v. 28, n. 7, p. e32, 2008.

VANLANDEWIJCK, M. et al. Functional Characterization of Germline Mutations in PDGFB and PDGFRB in Primary Familial Brain Calcification. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0143407, 2015.

VILLA-BELLOSTA, R. et al. The Na+-Pi cotransporter PiT-2 (SLC20A2) is expressed in the apical membrane of rat renal proximal tubules and regulated by dietary Pi. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 296, n. 4, p. F691-9, abr. 2009.

VILLA-BELLOSTA, R.; O'NEILL, W. C. Pyrophosphate de ficiency in vascular calcification. **Kidney iIternational**, v. 93, n. 6, p. 1293–1297, 2018.

VILLA-BELLOSTA, R.; SORRIBAS, V. Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 5, p. 761–6, maio 2009.

WALBERT, T.; JIRIKOWSKI, G. F.; PRUFER, K. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the limbic system of the rat. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme**, v. 33, n. 9, p. 525–531, set. 2001.

WALLINGFORD, M. et al. SLC20A2 Deficiency in Mice Leads to Elevated Phosphate Levels in Cerbrospinal Fluid and Glymphatic Pathway- Associated Arteriolar Calcification , and Recapitulates Human Idiopathic Basal Ganglia Calcification. **Brain pathology**, v. 3, n. 28, p. 28–30, 2016.

WANG, C. et al. Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. **Nature genetics**, v. 44, n. 3, p. 254–256, mar. 2012.

WESTERMARK, B.; WASTESON, A. A platelet factor stimulating human normal glial cells. **Experimental cell research**, v. 98, n. 1, p. 170–174, mar. 1976.

YALCIN, A. et al. Age and gender related prevalence of intracranial calcifications in CT imaging ; data from 12,000 healthy subjects. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 78, p. 20–24, 2016.

YAMADA, S. et al. Loss of PiT-2 Results in Abnormal Bone Development and Decreased Bone Mineral Density and Length in Mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 553–559, 2018.

YANG, Y. L. et al. Receptors for polytropic and xenotropic mouse leukaemia viruses encoded by a single gene at Rmc1. **Nature genetics**, v. 21, n. 2, p. 216–219, fev. 1999.

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.

YAO, X. et al. Analysis of gene expression and functional characterization of XPR1 : a pathogenic gene for primary familial brain calcification. **Cell Tissue Research**, v. 370, n. 2, p. 267–273, 2017.

YAO, Y. et al. Alendronate Attenuates Spinal Microglial Activation and Neuropathic Pain. **Journal of Pain**, v. 17, n. 8, p. 889–903, 2016.

YOSHIZAWA, T. et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. **Nature genetics**, v. 16, n. 4, p. 391–396, ago. 1997.

ZAMEER, S. et al. Bisphosphonates : Future perspective for neurological disorders. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 5, p. 900–907, 2018.

ZHAO, J. et al. Changes in Otx2 and parvalbumin immunoreactivity in the superior colliculus in the platelet-derived growth factor receptor-beta knockout mice. **BioMed research international**, p. 1–17, 2013.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF HUMAN GENETICS

Journal of Human Genetics
https://doi.org/10.1038/s10038-018-0475-2

COMMENT

A commentary on a case of new *PCDH12* gene variants presented as dyskinetic cerebral palsy with epilepsy

Eraldo Fonseca dos Santos-Junior[1] · João Ricardo Mendes de Oliveira[2]

Received: 30 April 2018 / Revised: 4 May 2018 / Accepted: 16 May 2018
© The Author(s) under exclusive licence to The Japan Society of Human Genetics 2018

In the last 2 years, literature data have shown that variations in protocadherin 12 (*PCDH12*) gene are related to neurological outcomes. Located at chromosome 5q31, this gene encodes the PCDH12 protein, wich is part of the cadherin superfamily and it is a calcium-dependent cell-adhesion protein. The role of PCDH12 is not yet fully understood in the brain, but evidence shows the importance of non-clustered protocadherins for the normal development of the central nervous system [1].

In a recent publication in this journal, Suzuki-Muromoto et al. reported a case of a Japanese patient with dyskinetic cerebral palsy, intellectual disability and epilepsy, born to non-consanguineous parents, with two heterozygous variations in the *PCDH12* gene, a different pattern from the other cases already described [2]. The first work that showed a relation of a variation in the *PCDH12* gene with neurological outcomes was published by Aran et al., where Palestinian patients from consanguineous families, developed pre- and postnatal damages, with a pseudo-TORCH pattern, from a single homozygous nonsense variation [3]. The homozygous variation described, occurred in the cytoplasmic domain of the PCDH12 protein, while the double heterozygous variation occurred in the extracellular domain (Fig. 1).

Knockout mice for the *PCDH12* gene are alive and fertile, but, present alterations in the placenta in relation to their morphogenesis, vascularization and transcriptional levels of 2289 genes, contributing to a reduced embryo size and abnormal lens morphology [4]. Different from that reported in humans, in mice, only the homozygous variation is able to develop phenotypes harmful to the animal, heterozygous variation did not cause any harmful consequences.

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

[1] Keizo Asami Laboratory - Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

[2] Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

Published online: 14 June 2018

In humans, the condition of two heterozygous variations did not result in intrauterine growth retardation, microcephaly and visual impairment, clinical findings of patients with homozygous variation. Other neurological findings are shared among patients with variations in the *PCDH12* gene, regardless of the mutation pattern, such as cerebral calcification and epilepsy. Spot calcifications in perithalamic regions are found in some patients already reported, but other areas, particularly in each patient described, also had a spot calcification, such as subcortical regions and posterior limb of internal capsule [5]. Figure 1 also shows heterozygous variants, with no clear causative role, found in some elder subjects with primary brain calcification, presenting with late and variable manifestations such as dementia and gait impairment.

The brain has a very low expression of *PCDH12* [6], therefore, the amount of negative effects that happens when this gene is mutated calls attention. Although there are few cases reporting variations of this gene, what is perceived is that the mutation pattern seems to influence the expression of certain phenotypes and consequent severity of the patient. As already discussed here and as can be seen in table 1 of the article by Suzuki-Muromoto et al. (2018), in general, homozygous variation seems to be more damaging to the patient, especially in relation to the development and onset of seizures.

The evaluation of transcript expression of *PCDH12* would bring more data to increase discussion and knowledge of the impact of two heterozygous variants in the described patient. The patient is the fourth child of healthy parents, and for a better description of the finding, a family segregation analysis would be an important contribution to the study of the variations of this gene. Beyond the mutation pattern, environmental factors should also be considered for future analysis of the differences between the phenotypes developed by the patients.

In conclusion, the identification of a new mutation pattern of the *PCDH12* gene, brings to light new clinical findings that may help better understanding the role of this gene in the central nervous system. His role is still intriguing, mainly because it is related to distinct brain areas and the development of diverse clinical findings. The use of animal models presents

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA SEIZURE:EUROPEAN JOURNAL OF EPILEPSY

Seizure: European Journal of Epilepsy 61 (2018) 199

Contents lists available at ScienceDirect

Seizure: European Journal of Epilepsy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/seizure

Letter to the Editor

The importance of the study of brain calcifications in patients with tuberous sclerosis complex

It was with great interest that we read the recent publication of Meng-Na Zhang et al. in this periodical, reporting the pharmacoresistant epilepsy in patients (aged 3 months to 10 years old) with tuberous sclerosis complex (TSC) presenting calcification in the cerebral parenchyma [1]. The authors concluded that calcification in the epileptic foci is one of the main reasons for this pharmacoresistance to anti-epilepsy drugs and rapamycin, an inhibitor of the mTOR signaling pathway (often overactivated in TSC).

TSC is an autosomal dominant disorder, caused by loss of function of the *TSC1* or *TSC2* gene. TSC affects various organs of the body, including mainly brain, heart, kidney, skin and lung. Recently, we have reported that calcitriol, the active form of vitamin D, was able to restore and even increase expression of genes related to TSC, otherwise decreased in an *in vitro* calcification model [2]. In addition to the gene expression results, calcitriol also decreased calcification in the cellular model studied. In another *in vitro* study, using rat mesangial cells, vitamin D3 was able to inhibit the mTOR pathway [3].

As discussed in the article, in general, about 90% of patients with TSC have epilepsy, of which, the majority is pharmacoresistant. Of the 108 patients with TSC and epilepsy, analyzed by Meng-Na Zhang et al., 55 are pharmacoresistant. These data show the importance of studying these aspects, which will certainly impact on a better quality of life for patients. Around 30% (33 of 108) of the analyzed patients had cerebral parenchyma calcification. The authors reported yet that, 15 of 17 patients with calcified epileptic foci are pharmacoresistant to treatments. It is notable that the calcification in the epileptic foci is a risk factor that impairs the pharmacological treatment of these patients. An attempt to decrease calcification or prevent its increase, may be a good strategy to improve the action of anti-epilepsy drugs, with a potential role for vitamin D. In addition to decreasing calcification, vitamin D may have a synergistic effect, improving the action of these drugs, especially if the patient has vitamin deficiency. Everolimus, an mTOR inhibitor (analogue of rapamycin), when used in conjunction with vitamin D3, had their effect potentiated in *in vivo* and *in vitro* models [4]. There is still no data to show the benefit of the combined action of vitamin D with anti-epilepsy drugs, but there is enough data to support the idea of new experimental strategies testing the benefit of vitamin D.

It is also important to study other patients that do not display pharmacoresistant epilepsy. What makes these patients different from the others? Are there unidentified genetic components? Altered metabolic pathways? We think that these patients deserve special attention, because they can provide valuable information in the search for understanding these issues. Being a syndrome with diverse clinical manifestations in various organs, some signs and symptoms have been better explored in the literature than others. Here we call attention to a closer look at cerebral calcifications, because there are few studies that address these findings. Cerebral calcifications in patients with TSC may indicate the epileptic foci, as well as confer on the patient a pharmacoresistance to treatment. A better understanding of the role of calcification can contribute greatly to the diagnosis and treatment of the patient.

Declarations of interest

None.

References

[1] Zhang M-N, Zou L-P, Wang Y-Y, Pang L-Y, Ma S-F, Huang L-L, et al. Calcification in cerebral parenchyma affects pharmacoresistant epilepsy in tuberous sclerosis. Seizure 2018;60:86–90.
[2] Dos Santos Junior EF, de Lemos Gitirana RR, Bezerra DP, de Oliveira JRM. Calcitriol reverses the down-regulation pattern of tuberous sclerosis complex genes in an in vitro calcification model. J Mol Neurosci 2018;64:140–3.
[3] Wang H, Wang J, Qu H, Wei H, Yang Z. In vitro and in vivo inhibition of mTOR by 1,25-dihydroxyvitamin D3 to improve early diabetic nephropathy via the DDIT4/TSC2/mTOR pathway. Endocrine 2016;54:348–59.
[4] Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Ni L, Koeffler HP, Yokoyama A. Inhibition of mTORC1 by RAD001 (everolimus) potentiates the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to induce growth arrest and differentiation of AML cells in vitro and in vivo. Exp Hematol 2010;38:666–76.

Eraldo Fonseca dos Santos-Junior
Keizo Asami Laboratory - Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

João Ricardo Mendes de Oliveira*
Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil
E-mail address: joao.ricardo@ufpe.br (J.R.M. de Oliveira)

* Corresponding author at: Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP 50670-901, Brazil.

https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.08.023
Received 21 August 2018
1059-1311/ © 2018 British Epilepsy Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

APÊNDICE C – RESUMO COM COLABORAÇÃO INTERNACIONAL APRESENTADO SOB O FORMATO DE PÔSTER NO *VIII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DIAGNOSTICS AND THERAPEUTICS* (VIII SINATER - 2017)

Area: Diagnostic

TITLE: *In vitro* study of pericytes and expression of Pit1 in the brain of animal model for PFBC

Santos-Junior, E.F.[1], Jensen, N. [2,3], Katsumata, Y.[3], Pedersen, L.[3], Oliveira, J.R.M.[1]

1 - Laboratory of Immunopathology Keizo Asami/LIKA – UFPE.
2 - Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute.
3 - Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University.

INTRODUCTION: Primary familial brain calcification (PFBC) is a rare condition characterized by the presence of calcification in specific brain areas such as the basal ganglia, cerebellum and others. Mutations in the SlC20A2 gene, that encoding the inorganic phosphate (Pi) transporter (Pit2), is the main responsible for PFBC. As the Pit2, there is another phosphate transporter in the brain, encoded by the SLC20A1 gene (Pit1). Both are highly related, but little is known about the relationship between them. The knockout (KO) mice for Pit2 is an excellent model for PFBC, mimicking the findings found in patients. Changes in the expression of Pit1 have not yet been reported in patients or KO mice for PFBC, understanding the nature of this gene, in this context, is fundamental. **OBJECTIVE**: Quantify in the midbrain and in the cerebellum of the KO mice for Pit2, the expression of the Pit1 protein, as well as analyse *in vitro* apoptosis of the pericytes of these animals when submitted to a high condition of Pi. **METHODOLOGY:** The adult homozygous Slc20a2 KO mice and the wildtype were used in the experiment. To evaluate the Pit1 protein, brain homogenates was obtained for western blot analysis. Primary culture of pericytes were evaluated at 2, 10 and 20 days under normal conditions and under supplementation of Pi in the culture media. Apoptotic pericytes were detected by TUNEL staining. **RESULTS**: No difference in Pit1 expression was found in the investigated areas. Regarding pericytes, initially had an increased death of those from the wildtype animal when challenged with Pi. However, chronically, this condition is reversed, with the increased death of the pericytes from the KO mice. **CONCLUSION**: The Pit1 does not seem to take the lead in relation to phosphate transport in pit2 deficiency, at least in the brain areas investigated. In a chronic *in vitro* condition of high Pi, a condition present in the cerebrospinal fluid of the KO animal, the pericytes from this animal are shown to be more vulnerable, indicating that Pit2 deficiency may influence the physiology of the BBB, opening new perspectives of investigation regarding the causes of PFBC.

KEYWORDS: brain calcification; PFBC; phosphate transport; SLC20A1; SLC20A2

FINANCIAL SUPPORT: FACEPE, CAPES, CNPq

ANEXO A – MANUSCRITO SUBMETIDO AO JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH

Journal of Bone and Mineral Research

Why there is no PiT1/SLC20A1 pathogenic variants yet linked to primary familial brain calcification?

Journal:	*Journal of Bone and Mineral Research*
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Letter to the Editor
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Santos-Junior, Eraldo; Federal University of Pernambuco, Keizo Asami Laboratory Oliveira, João; Federal University of Pernambuco,
Keywords:	GENETIC RESEARCH, DISORDERS OF CALCIUM/PHOSPHATE METABOLISM, Bone-brain-nervous system interactions < SYSTEMS BIOLOGY - BONE INTERACTORS
Abstract:	

SCHOLARONE™
Manuscripts

Why there is no PiT1/SLC20A1 pathogenic variants yet linked to primary familial brain calcification?

Authors:

Eraldo Fonseca dos Santos-Junior [1]; MSc

João Ricardo Mendes de Oliveira [2] *; MD, PhD

Affiliations:

[1]Keizo Asami Laboratory - Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

[2]Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

*Corresponding author:

Dr João Ricardo Mendes de Oliveira, MD, PhD

Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Brazil

Cell phone: 55-81-87819856

E-mail: joao.ricardo@ufpe.br

Grants:

Eraldo Fonseca dos Santos Junior has received a PhD grant from brazilian funding agency, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Disclosure statement:

The authors declare that they have no conflict of interest.

Confidential - For Review Only

Dear editor,

We read with interested the article by Couasnay et al., reporting a new role for PiT1 protein, independent of its inorganic phosphate (Pi) transport function, in the regulation and homeostasis of the endoplasmic reticulum (ER) in chondrocytes [1]. The authors showed that PiT1 is necessary for the maintenance, differentiation and survival of chondrocytes, in the growth plate during endochondral ossification. PiT1 protein is encoded by *SLC20A1* gene, that, together with PiT2, encoded by *SLC20A2*, comprises the type-III family of sodium-dependent inorganic phosphate transporters, a branch of the solute carrier (SLC) superfamily [2]. Initially, PiT1 and PiT2 were identified as retroviral receptors, later, these two proteins were reported as Na-Pi co-transporters [3,4].

According to the PubMed database, as of 2012, there has been an increase in the number of published articles involving these two transporters. The increase occurs from the first publication showing the relationship of the SLC20A2 gene to Primary Familial Brain Calcification (PFBC) [5]. Variants in *SLC20A2* are the main responsible for causing PFBC, a rare neuropsychiatric disease, characterized by the presence of abnormal calcium deposits in the brain, with bilateral pattern and symmetric, in areas such as the basal ganglia and thalamus [5,6]. Beyond *SLC20A2*, so far, variants in other four different genes have been identified as causing PFBC: *PDGFRβ* [7], *PDGFβ* [8], *XPR1* [9] and *MYORG* [10].

PiT1 and PiT2 have similar distribution in the brains of humans and mice, share the function of importing Pi into the cell and have approximately 60% amino acid homology [11,12]. In view of this, it is intriguing to note that has not yet been reported any variants of *SLC20A1* in patients with PFBC. Until now, no research group reported families with PFBC was linked to *SLC20A1*, including ours, despite active screening in patients excluded for the five previous genes (unpublished data).

Although not detected for the PFBC phenotype, recent studies have identified that variants in *SLC20A1* represent a potential risk for other quite distinct diseases, such as vertebral fractures (independent of low bone density) [13], bladder-exstrophy-epispadias complex [14] and combined pituitary hormone deficiency [15]. In all of these cases, no brain calcification has been reported in the patients. In a human HeLa cancer cell line, PiT1, unlike PiT2, was able to activate NFκB. In this same cellular model, the silencing of PiT1 made these cells more susceptible to apoptosis [16]. Also in this line,

For Review Only
Confidential

Koumakis et al., showed in an *in vitro* model of murine bone marrow-derived macrophages, that the expression of PiT1 was increased after induction of inflammation with lipopolysaccharides and that this expression was decreased when an NFκB inhibitor was used [17].

In general, PiT1 has been shown to be critical for the maintenance of adhesion and cell proliferation [18]. The inviability of the complete KO mouse to *SLC20A1* shows the importance of this gene for cell maintenance [19]. However, *SLC20A1* hypomorphic mice model presents normal bone mineralization without the presence of brain calcifications [20]. In addition to that already discussed, PiT1 is involved in several other functions as erythropoiesis, increased insulin signaling, decreased hepatic lipogenesis and regulation of apoptosis induced by TNFα, as is discussed by Couasnay et al., (2019) in his work.

Couasnay et al., (2019) shows that, in chondrocytes, PiT1 expression is regulated by ATF4, a transcription factor related to the cytoprotection response performed by the ER. In this same work, the authors further suggest that the regulation of PiT1 by ATF4 may reveal roles in other physiological mechanisms. Previous studies have shown that ER stress contributes to the pathogenesis of vascular calcification and ATF4 plays an important role in this process [21]. *In vitro* studies using VSMC (vascular smooth muscle cells), showed that the *knockdown* of ATF4 was responsible for the decrease of mRNA levels of PiT1 and PiT2 [22]. In the brain, ATF4 plays important roles in the regulation of learning and memory and survival and neuronal death [23]. The relevance of ATF4 and PiT1 in the brain is remarkable, as has already been pointed out, but it is not yet clear what role they play together, especially in relation to cerebral vascular calcifications.

Immunohistochemically, PiT1 and PiT2 were detected in neurons, glial cells and endothelial vascular cells of human and mouse brains [12]. Thus, it is necessary to understand if the results obtained in non-neural cells, would be replicable in models involving cells of the central nervous system. It is known that in osteoblastic cellular models (MC3T3-E1), the inactivation of PiT1 or PiT2 does not impair the uptake of Pi by the cell, there is a mechanism of compensation by the transporter that remained activated. The uptake of Pi is only impaired when there is the inactivation of the two at the same time [24]. Would this pattern of compensation also happen in brain cells? Evidence shows that PiT1 and PIT2 have differentiated functions in the brain, which

Confidential: For Review Only

still need to be better explored. As discussed by Couasnay and colleagues (2019), PiT1 has shown to be a protein with functions beyond the Na-Pi co-transporter. Many of its already described functions, dependent and independent of the Pi-transport, are not shared with the PiT2. More experiments involving the differences between these two proteins in the cerebral environment, would be very useful to understand the relationship of PiT2 and not PiT1 with PFBC.

Acknowledgments

Authors' roles: Study design: EFS-J and JRMO. Study conduct: EFS-J. Data collection: EFS-J. Data analysis: EFS-J and JRMO. Data interpretation: EFS-J and JRMO. Drafting manuscript: EFS-J. Revising manuscript content: JRMO. Approving final version of manuscript: EFS-J and JRMO. EFS-J and JRMO takes responsibility for the integrity of the data analysis.

References

1. Couasnay G, Bon N, Devignes CS, Sourice S, Bianchi A, Véziers J, Weiss P, Elefteriou F, Provot S, Guicheux J, Beck-Cormier S, Beck L. PiT1/Slc20a1 Is Required for Endoplasmic Reticulum Homeostasis, Chondrocyte Survival, and Skeletal Development. J. Bone Miner. Res. 2019;34(2):387–98.
2. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. Mol. Aspects Med. 2013;34(2–3):386–95.
3. Olah Z, Lehels C, Anderson B, Eideng MW, Wilson CA. The Cellular Receptor for Gibbon Ape Leukemia Virus Is a Novel High Affinity Sodium-dependent Phosphate Transporter. J. Biol. Chem. 1994;269(41):25426–31.
4. Kavanaugh MP, Millerti DG, Zhang W, Lawt W, Kozak SL, Kabat D, Ii ADM. Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994;91(15):7071–5.
5. Wang C, Li Y, Shi L, Ren J, Patti M, Wang T, de Oliveira JRM, Sobrido M-J, Quintans B, Baquero M, Cui X, Zhang X-Y, Wang L, Xu H, Wang J, Yao J, Dai X, Liu J, Zhang L, Ma H, Gao Y, Ma X, Feng S, Liu M, Wang QK, Forster IC, Zhang X, Liu J-Y. Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. Nat. Genet. United States; 2012 Mar;44(3):254–6.
6. Quintáns B, Oliveira J, Sobrido MJ. Primary familial brain calcifications

Confidential - For Review Only

[Internet]. 1st ed. Handb. Clin. Neurol. Elsevier B.V.; 2018. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00020-8

7. Nicolas G, Pottier C, Maltete D, Coutant S, Rovelet-Lecrux A, Legallic S, Rousseau S, Vaschalde Y, Guyant-Marechal L, Augustin J, Martinaud O, Defebvre L, Krystkowiak P, Pariente J, Clanet M, Labauge P, Ayrignac X, Lefaucheur R, Le Ber I, Frebourg T, Hannequin D, Campion D. Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. Neurology. United States; 2013 Jan;80(2):181–7.

8. Keller A, Westenberger A, Sobrido MJ, García-Murias M, Domingo A, Sears RL, Lemos RR, Ordoñez-Ugalde A, Nicolas G, da Cunha JEG, Rushing EJ, Hugelshofer M, Wurnig MC, Kaech A, Reimann R, Lohmann K, Dobričić V, Carracedo A, Petrović I, Miyasaki JM, Abakumova I, Mäe MA, Raschperger E, Zatz M, Zschiedrich K, Klepper J, Spiteri E, Prieto JM, Navas I, Preuss M, Dering C, Janković M, Paucar M, Svenningsson P, Saliminejad K, Khorshid HRK, Novaković I, Aguzzi A, Boss A, Le Ber I, Defer G, Hannequin D, Kostić VS, Campion D, Geschwind DH, Coppola G, Betsholtz C, Klein C, Oliveira JRM. Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. Nat. Genet. [Internet]. 2013;45(9):1077–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23913003

9. Legati A, Giovannini D, Nicolas G, López-Sánchez U, Quintáns B, Oliveira JRM, Sears RL, Ramos EM, Spiteri E, Sobrido M-J, Carracedo Á, Castro-Fernández C, Cubizolle S, Fogel BL, Goizet C, Jen JC, Kirdlarp S, Lang AE, Miedzybrodzka Z, Mitarnun W, Paucar M, Paulson H, Pariente J, Richard A-C, Salins NS, Simpson SA, Striano P, Svenningsson P, Tison F, Unni VK, Vanakker O, Wessels MW, Wetchaphanphesat S, Yang M, Boller F, Campion D, Hannequin D, Sitbon M, Geschwind DH, Battini J-L, Coppola G. Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. Nat. Genet. [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;47(6):579–81. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25938945

10. Yao X-P, Cheng X, Wang C, Zhao M, Guo X-X, Su H-Z, Lai L-L, Zou X-H, Chen X-J, Zhao Y, Dong E-L, Lu Y-Q, Wu S, Li X, Fan G, Yu H, Xu J, Wang N, Xiong Z-Q, Chen W-J. Biallelic Mutations in MYORG Cause Autosomal Recessive Primary Familial Brain Calcification. Neuron. United States; 2018 Jun;98(6):1116–1123.e5.

11. Bøttger P, Pedersen L. Mapping of the minimal inorganic phosphate transporting unit of human PiT2 suggests a structure universal to PiT-related proteins from all kingdoms of life. BMC Biochem. [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;12(1):21. Available from: http://www.biomedcentral.com/1471-2091/12/21

12. Inden M, Iriyama M, Zennami M, Sekine S, Hara A, Yamada M, Hozumi I. The type III transporters (PiT-1 and PiT-2) are the major sodium-dependent phosphate transporters in the mice and human brains. Brain Res. [Internet]. Elsevier; 2016;1637:128–36. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899316300919

13. Alonso N, Estrada K, Albagha OME, Herrera L, Reppe S, Olstad OK, Gautvik KM, Ryan NM, Evans KL, Nielson CM, Hsu YH, Kiel DP, Markozannes G,

For Peer Review Only

Ntzani EE, Evangelou E, Feenstra B, Liu X, Melbye M, Masi L, Brandi ML, Riches P, Daroszewska A, Olmos JM, Valero C, Castillo J, Riancho JA, Husted LB, Langdahl BL, Brown MA, Duncan EL, Kaptoge S, Khaw KT, Usategui-Martín R, Del Pino-Montes J, González-Sarmiento R, Lewis JR, Prince RL, D'Amelio P, García-Giralt N, Nogués X, Mencej-Bedrac S, Marc J, Wolstein O, Eisman JA, Oei L, Medina-Gómez C, Schraut KE, Navarro P, Wilson JF, Davies G, Starr J, Deary I, Tanaka T, Ferrucci L, Gianfrancesco F, Gennari L, Lucas G, Elosua R, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Ralston SH. Identification of a novel locus on chromosome 2q13, which predisposes to clinical vertebral fractures independently of bone density. Ann. Rheum. Dis. 2018;77(3):378–85.

14. Reutter H, Keppler-Noreuil K, E. Keegan C, Thiele H, Yamada G, Ludwig M. Genetics of Bladder-Exstrophy-Epispadias Complex (BEEC): Systematic Elucidation of Mendelian and Multifactorial Phenotypes. Curr. Genomics. 2016;17(1):4–13.

15. Simm F, Griesbeck A, Choukair D, Weiß B, Paramasivam N, Klammt J, Schlesner M, Wiemann S, Martinez C, Hoffmann GF, Pfäffle RW, Bettendorf M, Rappold GA. Identification of SLC20A1 and SLC15A4 among other genes as potential risk factors for combined pituitary hormone deficiency. Genet. Med. [Internet]. 2017;00(February). Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/gim.2017.165

16. Salaun C, Leroy C, Rousseau A, Boitez V, Beck L, Friedlander G. Identification of a Novel Transport-independent Function of PiT1 / SLC20A1 in the Regulation of TNF-induced Apoptosis. J. Biol. Chem. 2010;285(45):34408–18.

17. Koumakis E, Millet-Botti J, Benna J El, Leroy C, Boitez V, Codogno P, Friedlander G, Forand A. Novel function of PiT1/SLC20A1 in LPS-related inflammation and wound healing. Sci. Rep. 2019;9(1):1–15.

18. Beck L, Leroy C, Salaün C, Margall-Ducos G, Desdouets C, Friedlander G. Identification of a Novel Function of PiT1 Critical for Cell Proliferation and Independent of Its Phosphate Transport Activity. J. Biol. Chem. 2009;284(45):31363–74.

19. Beck L, Leroy C, Beck-cormier S, Forand A, Salau C, Ollero M, Prie D, Bernier A, Uren P. The Phosphate Transporter PiT1 (SLC20A1) Revealed As a New Essential Gene for Mouse Liver Development. PLoS One. 2010;5(2):e9148.

20. Bourgine A, Pilet P, Diouani S, Sourice S, Lesoeur J, Beck-Cormier S, Khoshniat S, Weiss P, Friedlander G, Guicheux J, Beck L. Mice with Hypomorphic Expression of the Sodium-Phosphate Cotransporter PiT1/Slc20a1 Have an Unexpected Normal Bone Mineralization. PLoS One. 2013;8(6):1–10.

21. Masuda M, Miyazaki-Anzai S, Keenan AL, Shiozaki Y, Okamura K, Chick WS, Williams K, Zhao X, Rahman SM, Tintut Y, Adams CM, Miyazaki M. Activating transcription factor-4 promotes mineralization in vascular smooth muscle cells. JCI Insight. 2016;1(18):1–14.

22. Masuda M, Ting TC, Levi M, Saunders SJ, Miyazaki-Anzai S, Miyazaki M. Activating transcription factor 4 regulates stearate-induced vascular calcification. J. Lipid Res. 2012;53(8):1543–52.

For Peer Review Only

23. Liu J, Amar F, Corona C, So RWL, Andrews SJ, Nagy PL, Shelanski ML, Greene LA. Brain-Derived Neurotrophic Factor Elevates Activating Transcription Factor 4 (ATF4) in Neurons and Promotes ATF4-Dependent Induction of Sesn2. Front. Mol. Neurosci. 2018;11(March):1–13.

24. Bon N, Couasnay G, Bourgine A, Sourice S, Beck-Cormier S, Guicheux J, Beck L. Phosphate (Pi)-regulated heterodimerization of the highaffinity sodium-dependent Pi transporters PiT1/Slc20a1 and PiT2/Slc20a2 underlies extracellular Pi sensing independently of Pi uptake. J. Biol. Chem. 2018;293(6):2102–14.

Confidential - For Review Only