UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

ALINE FACCIOLI BODONI

**Estresse oxidativo mitocondrial e deficiência familiar de
glicocorticoide: caracterização fenotípica e funcional da nova variante
p.G866D no gene *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT)***

Ribeirão Preto

2017

ALINE FACCIOLI BODONI

Estresse oxidativo mitocondrial e deficiência familiar de glicocorticoide: caracterização fenotípica e funcional da nova variante p.G866D no gene *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT)*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Opção: Investigação em Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Catálogo da Publicação
Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Bodoni, Aline Faccioli

Estresse oxidativo mitocondrial e deficiência familiar de glicocorticoide: caracterização fenotípica e funcional da nova variante p.G866D no gene Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT) Ribeirão Preto, 2017 ; Orientador, Antonini, Sonir R – 2017.

89f.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

1. Insuficiência Adrenal. 2. Deficiência Familiar de glicocorticoide. 3. Gene NNT 4. Estresse

Nome: Aline Faccioli Bodoni

Título: Estresse oxidativo mitocondrial e deficiência familiar de glicocorticoide: caracterização fenotípica e funcional da nova variante p.G866D no gene Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT).

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas.

Área de concentração: Saúde da criança
e do adolescente

Opção: Investigação em Saúde da
Criança e do Adolescente

Aprovado em:
Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

*À minha família,
por todo o crescimento
que compartilhamos
nessa jornada.*

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por sempre me proteger e iluminar meus caminhos.

Ao meu pai Paulo por todo incentivo e apoio e por me mostrar que apesar das adversidades da vida temos sempre ir tocando em frente com otimismo. À minha mãe Cibeles por todo amor e dedicação e por estar sempre presente mesmo as vezes estando tão longe.

À minha tia e madrinha Cátia, minha segunda mãe, meu exemplo de dedicação ao trabalho e a vida por sempre me incentivar e nunca me deixar desistir.

Aos meus irmãos Marcos e Lucas, os amores da minha vida, por sempre dividirem tudo comigo, e estarem sempre ao meu lado.

Aos meus avós Antônio, Clarisse, Adhemar e Rosali por todos os ensinamentos e amor dedicado. Em especial a minha avó Edir, por em sua breve trajetória de vida ter deixado exemplos de fé, coragem e bondade que são minhas referências de vida e por sempre proteger, iluminar meus caminhos e me socorrer nas horas difíceis.

À toda minha família, que amo mais do que tudo, por compartilharem comigo os melhores e piores momentos de minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini pela oportunidade, incentivo e contribuição em minha formação profissional e por me ajudar a crescer e me tornar uma pessoa mais forte.

À Dra Fernanda Borchers Coeli-Lacchini por me aceitar como companheira de laboratório e por ter se tornado uma grande amiga. Por toda a orientação, por estar sempre ao meu lado durante todo o desenvolvimento do nosso projeto e principalmente pelas incontáveis horas dedicadas ao meu crescimento profissional e pessoal.

À Prof. Dra Andréia M. Leopoldino pelo entusiasmo, dedicação e por todas as orientações e ensinamentos técnicos que foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

À Tânia Maria Beltramini Trevilato, por ter me orientado na construção do alicerce de minha formação profissional com muito amor e paciência, me ensinado a importância de conhecer e certificar todos os procedimentos e a responsabilidade que essa profissão exige e principalmente por ter acreditado em meu sonho me mostrando que eu era capaz.

Aos meus grandes amigos que compartilharam comigo os melhores e os mais difíceis momentos dessa jornada. Em especial ao Leonardo por sempre melhorar meu dia com um sorriso encantador, me fazer rir e por me lembrar a importância de sonhar. Ao Marcelo pelas incontáveis horas de conversa que com certeza me fizeram evoluir como pessoa e por sempre

ter um abraço apertado. À Renata pelo incentivo, lealdade e por sempre me lembrar a importância da fé.

Aos meus amigos, Ana Tereza, Clarissa, Débora, Danila, Sílvia, Rogério, Wendy, Helen, Letícia, Lívia, Maíra e Vinícius do Laboratório de Endocrinologia – Biologia Molecular HC-FMRP-USP por toda a amizade, ajuda e por estarem sempre ao meu lado nessa caminhada.

Aos alunos Leandro, Renata, Camila, Neto, Laís, Karina, Tálita, Verônica e ao funcionário Lucas do Laboratório de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer - FCFRP-USP pelo companheirismo e por me ajudarem sempre que preciso.

À Dra. Lays M. Sobral por toda colaboração no desenvolvimento do trabalho e por todas as horas dedicadas a me ensinar técnicas de laboratório.

À Dra. Ana Carolina Bueno por me receber tão bem no laboratório, pela amizade e por sempre me socorrer quando precisei.

À Dra. Cristiana Bernadelli Garcia por toda ajuda e atenção e pelo rigor metodológico.

Ao Marcos Paulo S. Muniz e Camila Ruy pela grande amizade que construímos, por todos os momentos de diversão e por toda atenção e suporte que me concederam sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Ayrton Moreira, pelo exemplo de entusiasmo e dedicação e pelos inúmeros ensinamentos.

À Profa. Dra. Margaret de Castro, pelo exemplo de profissionalismo e por todo apoio e incentivo.

À Dra. Paula Elias, pelo exemplo de humildade e por todo incentivo.

Aos funcionários Maria Fernanda, Helen e José Roberto do laboratório de Endocrinologia - Radioimunoensaios do HC-FMRP USP por toda ajuda e ensinamentos.

À Profa Dra. Lucila Elias e ao Prof Dr. José Antunes por disponibilizarem o laboratório e a Milene Mantovani, alunos e funcionários do Laboratório de Fisiologia da FMRP-USP pela solicitude.

À Denise Ferraz pela dedicação e auxílio na utilização do citômetro de fluxo e ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Departamento de Bioquímica e Imunologia FMRP-USP.

À Elizabete Rosa Milani pela dedicação e auxílio no uso do microscópio confocal e ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos.

À Priscila Santos Scheucher pela solicitude e ao Laboratório de Hematologia do HCFMRP-USP.

À Ana Paula por aconselhar nas escolhas e pela ajuda em meu desenvolvimento pessoal.

*O correr da vida embrulha tudo,
a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.*

Guimarães Rosa

Resumo

Bodoni, Aline Faccioli. **Estresse oxidativo mitocondrial e deficiência familiar de glicocorticoide: caracterização fenotípica e funcional da nova variante p.G866D no gene Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT)**. 2017. 89f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introdução: a proteína mitocondrial codificada pelo gene *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT)* regula o processo intramitocondrial de desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Defeitos na homeostase desse sistema (sistema Redox) podem comprometer a esteroidogênese adrenal.

Objetivo: caracterizar o impacto funcional da nova variante missense NNT p.G866D (c.2597G>A) e sua associação com o fenótipo de deficiência familiar de glicocorticoide (DFG).

Indivíduos e Métodos: Caso índice: lactente com DFG diagnosticada aos 18 meses, seus pais e irmão assintomáticos e controles saudáveis. O ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico do caso índice foi submetido a sequenciamento exômico que revelou, entre algumas variantes gênicas-candidatas, a variante (c.2597G> A; p.G866D) em homozigose no exon 17 do gene *NNT*. Avaliou-se a segregação familiar dessa variante com o fenótipo de DFG. A análise funcional *in vitro* dessa variante foi realizada em cultura transitória de células mononucleares sanguíneas do paciente, heterozigotos e controles em condição basal e após a indução do estresse oxidativo com 100µm de H₂O₂ por cinco horas. A expressão do RNAm do gene *NNT* nessas células foi realizada por meio de qPCR. Os parâmetros mitocondriais avaliados foram: a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) detectadas por CMDCFDA, a concentração de glutatona reduzida (GSH) e ATP celular medidos ensaios luminescentes, , além da massa e potencial de membrana mitocondrial avaliados com o *probe* MitoTracker.

Resultados: A análise de segregação familiar confirmou a segregação desta variante em homozigose com o fenótipo de DFG. A expressão do *NNT* RNAm foi semelhante entre paciente, heterozigotos e controles. Em homozigose a variante p.G866D no gene *NNT* causa aumento na produção de EROs, diminuição de GSH e diminuição da massa e potencial de membrana mitocondrial, tanto em condições basais, quanto após a indução de estresse oxidativo. Após a indução de estresse oxidativo as concentrações de ATP foram menores no homozigoto *NNT* p.G866D do que nos controles.

Conclusão: este estudo confirma a associação da variante NNT em homozigose com o fenótipo de DFG Tipo quatro. *In vitro* o mutante homozigoto NNT p.G866D reduz significativamente os mecanismos de defesas antioxidantes, comprometendo o sistema da glutathione redutase, levando ao acúmulo de EROs.

Palavras-chave: Insuficiência Adrenal. Deficiência Familiar de glicocorticoide. Gene *NNT*. Mutação. Estresse oxidativo.

Abstract

Bodoni, Aline Faccioli. **Mitochondrial oxidative stress and glucocorticoid family deficiency: phenotypic and functional characterization of the new variant p.G866D in the gene Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (NNT)**. 2017. 89f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Background: mitochondrial Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (NNT) is essential in the intracellular reactive oxygen species (ROS) detox process. Defects in this system may impair adrenal steroidogenesis by yet not fully understood mechanism.

Aim: we sought to characterize the functional impact of the new NNT p.G866D (c.2597G>A) variant and its association with familial glucocorticoid deficiency (FGD).

Subjects and Methods: evaluated subjects included the index case diagnosed with FGD at the age of 18 months, his asymptomatic parents and young brother and healthy controls. The Index case genomic DNA was evaluated by whole exome sequencing, which revealed several potential candidate variants, including the homozygous NNT p.G866D. We then analyzed the family pedigree to confirm the segregation of this variant with FGD phenotype. To prove the genotype-phenotype association, this new variant was comprehensively evaluated *in vitro*. Transient mononuclear cell cultures from the patient, family members and controls were performed both in basal conditions and after oxidative stress induced by 5-hours treatment with 100µM of H₂O₂. We analyzed NNT mRNA expression by qPCR and mitochondrial parameters including ROS intracellular production by 20, 70-diacetate dichlorodihydrofluorescein, reduced glutathione (GSH) and cellular ATP levels by luminescence, and mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential by Mitotracker Probe system.

Results: family pedigree analysis confirmed the segregation of the homozygous NNT p.G866D variant with FGD. *In vitro*, no differences in mRNA expression were found among patients, heterozygous carriers and healthy controls. Both in basal and under stress conditions, the homozygous p.G866D NNT variant exhibited significantly increased ROS production, decreased GSH levels and decreased mitochondrial parameters. In addition, under H₂O₂ oxidative stress, the homozygous p.G866D NNT also led to decreased ATP intracellular.

Conclusion: this study clearly confirms the association of the homozygous NNT p.G866D variant with the phenotype of FGD. *In vitro*, this variant significantly impairs anti-oxidants

mechanisms and affects the glutathione reductase systems resulting in increased ROS accumulation.

Keywords: Familial Glucocorticoid Deficiency. NNT gene. Mutation. Oxidative stress.

Siglas e Abreviaturas

AAAS: *aladin WD repeat nucleoporin*

ABCD1: *ATP binding cassette subfamily D member 1*

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

AG: ácidos graxos

AIRE: *autoimmune regulator*

ARP : atividade de renina plasmática

cAMP: Monofosfato cíclico de adenosina cíclico

cDNA: DNA complementar

CRH : hormônio liberador da corticotrofina

CYP11B1: *cytochrome P450 family 11 subfamily B member 1*

CYP17A1: *cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1*

CYP17 - 17 α -hidroxilase

CYP21A2: *cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2*

D: ácido aspártico

DFG: deficiência familiar de glicocorticoide

DHEA: deidroepiandrosterona

DHEAS: Sulfato de Deidroepiandrosterona

DNA: ácido desoxirribonucleico

DOC: desoxicortisol

11- DOC: 11-desoxicortisol

EROs : espécies reativas de oxigênio

FITC: comprimento de onda para Fluoresceína

G: glicina

GSH: glutathiona reduzida

GSSG: glutathiona oxidada

GPX: *glutathione peroxidase*

H295: linhagem imortalizada de células adrenocorticais humanas

HEATR5A: *Heat Repeat Containing 5ª*

HC-FMRP-USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HMCN1 : *Hemicentin 1*

H₂O₂ : peróxido de hidrogênio

3β-HSD: 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase

HSD3B1: *hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1*

IA: Insuficiência adrenal

MA-10: linhagem de células tumorais obtidas de tumor de células de Leydig

MCM4: *minichromosome maintenance complex component 4*

MC2R: *melanocortin-2 receptor*

MRAP: *melanocortin-2 receptor accessory protein*

α-MSH: hormônio alfa melanócito-estimulante

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NCOA6: *Nuclear Receptor coactivator 6*

ND: não disponível

NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NNT: *nicotinamide nucleotide transhydrogenase*

NR0B1(DAX-1): *nuclear receptor subfamily 0 group B member 1*

NR5A1(SF-1): *nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1*

pb: pares de base

PCR: reação de polimerase em cadeia

PCRq: reação de polimerase em cadeia quantitativa

PI: iodeto de propídeo

PKA: proteína quinase A

POMC: pró-ópio-melano-cortina

PRDX: peroxiredoxina

PRTG: *Protogenin*

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SODs : superóxido dismutase

SOLiD: *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*

STAR: *steroidogenic acute regulatory protein*

TM: temperature de anelamento

TSPO: *translocator protein*

TXNRD2: *thioredoxin reductase 2*

O₂⁻: ânion superóxido

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

17-OHP: 17-Hidroxiprogesterona

17OHPreg: 17-hidroxipregnenolona

17OHProg: 17α-hidroxiprogesterona

WES: *whole exoma sequencing* / sequenciamento total das regiões codificantes presentes no genoma

WT: *wyld-type* / nativo ou selvagem

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismo de ação e sinalização celular do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no córtex adrenal..	27
Figura 2. Representação esquemática do gene <i>Nicotinamide Nucleotide Transidogenese</i>	28
Figura 3. Modelo tridimensional da proteína NNT: Representação de seus monômeros e domínios de ligação..	29
Figura 4. Mutações na proteína NNT. Mutações já descritas no NNT e a localização dessa nos domínios. Domínio I, em amarelo, em cinza domínio II e em verde domínio III	30
Figura 5. Representação esquemática do transporte de elétrons na membrana mitocondrial, evidenciando o papel da proteína Nicotinamide Nucleotide Transferase (NNT) no sistema de defesa antioxidante	32
Figura 6. Representação esquemática das etapas de análise de bioinformática para a seleção das variantes candidatas.	41
Figura 7. Representativa da intensidade de expressão de NNT em diferentes tecidos	53
Figura 8 . Localização da mutação p.G866D na proteína NNT.	54
Figura 9. Análise molecular e segregação familiar da alteração NNT p.G866D.	55
Figura 10. Expressão relativa do RNAm do gene <i>NNT</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$) por meio de qPCR nos carreadores em homozigose e em heterozigose da variante NNT p.G866D e em controles nativos.	56
Figura 11. Baixo potencial de membrana mitocondrial em células mononucleares sanguíneas do paciente NNT p.G866D homozigoto	57
Figura 12. Avaliação de EROs em células mononucleares obtidas do homozigoto NNT p.G866D.....	58
Figura 13. Determinação de glutathiona reduzida (GSH) em células mononucleares sanguíneas do homozigoto NNT p.G866D	58
Figura 14. Determinação de ATP em células mononucleares sanguíneas	59
Figura 15. Avaliação de Morte celular em células mononucleares. As células foram marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo; as células positivas para PI indicam células mortas..	60

Lista de Tabelas

Tabela 1. Causas de insuficiência adrenal primária congênita	25
Tabela 2: Resultados análise laboratorial do caso índice aos 18 meses de idade. Os valores são apresentados em unidade convencional (UC) e unidades internacionais (UI).	38
Tabela 3. Genes candidatos selecionados após análise de bioinformática	43
Tabela 4. Concentrações dos reagentes utilizados na Reação de PCR.....	45
Tabela 5. Oligonucleotídeos e condições da PCR para estudo do gene <i>NNT</i>	45
Tabela 6. Identificação dos ensaios de PCR em tempo real	48
Tabela 7. Conservação do resíduo NNT G866 entre diversas espécies.....	54

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 INSUFICIÊNCIA ADRENAL	22
1.1.1 Insuficiência Adrenal Primária	22
1.1.2 Insuficiência Adrenal Secundária	23
1.2 INSUFICIÊNCIA ADRENAL PRIMÁRIA CONGÊNITA	23
1.2.1 Epidemiologia	23
1.2.3 Quadro Clínico	23
1.2.4 Diagnóstico Laboratorial	24
1.2.5 Etiologia/ Bases Moleculares	24
1.3 DEFICIÊNCIA FAMILIAR DE GLICOCORTICOIDES (DFG)	25
1.3.1 Bases Moleculares	26
1.4 O GENE <i>NNT</i>	28
1.4.1 <i>NNT</i> e o sistema de defesa antioxidante	31
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E A ESTEROIDOGÊNESE	32
2. OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. CASUÍSTICA E MÉTODO	37
3.1 CASUÍSTICA	37
3.1.1 Caracterização Fenotípica: quadro clínico e bioquímico	37
3.2 MÉTODO	39
3.2.1 Caracterização molecular	39
3.2.2.1 Abordagem gene candidato	39
3.2.2.2 Sequenciamento exômico	39
3.2.2.2.1 Verificação das variantes gênicas com maior potencial patogênico	42
3.3 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA VARIANTE P.G866D EM <i>NNT</i>	44
3.4 TRIAGEM MOLECULAR DE <i>NNT</i> E ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO FAMILIAR	44
3.5 SEQUENCIAMENTO DIRETO DO GENE <i>NNT</i>	44
3.5.1 Obtenção das amostras de DNA e Extração de DNA genômico	44
3.5.2 Amplificação e sequenciamento do gene <i>NNT</i>	44
3.6 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA <i>NNT</i> COM A ALTERAÇÃO P.G866D EM CÉLULAS MONONUCLEARES	46
3.6.1 Obtenção de células mononucleares do sangue	46
3.6.2 Análise da expressão gênica a partir do ácido ribonucleico mensageiro (RNA_m)	46
3.6.2.1 Obtenção das amostras de ácido ribonucleico (RNA)	46
3.6.2.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)	47

3.6.2.3 <i>Análise da expressão gênica por Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)</i>	47
3.6.3 <i>Análise da função mitocondrial</i>	48
3.6.3.1 <i>Análise de massa e potencial de membrana mitocondrial</i>	48
3.6.3.2 <i>Análise de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)</i>	49
3.6.3.3 <i>Ensaio para determinação de glutathiona reduzida (GSH)</i>	49
3.6.3.4 <i>Ensaio para determinação de ATP celular</i>	50
3.6.3.5 <i>Ensaio para determinação de morte celular</i>	50
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
3.8 ASPECTOS ÉTICOS	51
4. RESULTADOS	53
4.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA EXPRESSÃO DE <i>NNT</i> E DA MUTAÇÃO P.G866D	53
4.2 TRIAGEM MOLECULAR DE <i>NNT</i> E ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO FAMILIAR	54
4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE <i>NNT</i>	55
4.4 ANÁLISE DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM CÉLULAS COM A VARIANTE <i>NNT</i> P.G866D	56
4.4.1 <i>Análise de massa e potencial de membrana mitocondrial</i>	56
4.4.2 <i>Análise de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)</i>	57
4.4.3 <i>Ensaio para determinação de glutathiona reduzida (GSH)</i>	58
4.4.4 <i>Níveis de ATP em células mononucleares</i>	59
4.4.5 <i>Ensaio para determinação de morte celular</i>	59
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	76
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP APROVADO	76
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES	80
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDOS – FAMILIARES DO SUJEITO DE PESQUISA	82
ANEXO D – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDOS – SUJEITO DE PESQUISA	84
ANEXO E – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDOS – IRMÃO DO SUJEITO DE PESQUISA	86
ANEXO F - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO PARA ESTÍMULO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insuficiência Adrenal

A Insuficiência adrenal (IA) é uma condição clínica causada pela ausência, malformação, destruição ou alteração da função do córtex da glândula adrenal, resultando na ausência ou diminuição da produção ou liberação dos hormônios adrenocorticais (1). A IA Pode ser causada por uma falha direta na glândula adrenal diminuindo a produção de glicocorticoides, mineralocorticoides e androgênios, denominada IA primária, ou por deficiência no eixo hipotálamo-hipófise, interferindo na produção do hormônio liberador da corticotrofina (CRH) e/ou hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), denominada IA secundária ou terciária (2).

O diagnóstico da IA muitas vezes é tardio, devido a seu desenvolvimento lento e por apresentar sintomas e sinais menos específicos como fadiga, anorexia e perda de peso. O diagnóstico inicial é feito após a suspeição clínica e confirmado por exames laboratoriais, sendo frequentemente necessários testes funcionais para sua confirmação (3).

O tratamento utilizado é substitutivo visando repor a deficiência de glicocorticoides e, frequentemente, de mineralocorticoide, para diminuir os sinais e sintomas da doença e garantir qualidade de vida adequada aos pacientes (1).

1.1.1 Insuficiência Adrenal Primária

Descrita inicialmente por Thomas Addison em 1855 em indivíduos que apresentavam quadro clínico de perda de sal e hiperpigmentação cutânea devido à destruição da glândula adrenal (4). Nessa situação há falha primária do córtex adrenal, comprometendo a produção e a liberação dos glicocorticoides, mineralocorticoides e androgênios adrenais. Como consequência, ocorre aumento compensatório da secreção de ACTH pela hipófise e do sistema renina-angiotensina pelo aparelho justa glomerular (5).

A IA primária pode ser congênita ou adquirida. As formas adquiridas são geralmente causadas por doenças autoimunes, doenças infecciosas, hemorragias, infiltração neoplásica,

doenças granulomatosas como sarcoidose ou amiloidose, relacionada ao uso de drogas que interferem na esteroidogênese adrenal ou ainda, por adrenalectomia bilateral. As formas congênitas, mais comuns em crianças, são causadas por defeitos na embriogênese adrenal ou na síntese dos esteroides. O tratamento consiste na reposição de cortisol e, geralmente, de mineralocorticoides (6, 7)

1.1.2 Insuficiência Adrenal Secundária

Relacionada a doenças que comprometem o eixo hipotálamo-hipófise. Neste caso ocorre diminuição na produção de glicocorticoides e dos androgênios adrenais sem afetar a produção de mineralocorticoides. A IA secundária pode ser causada por supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pelo uso de glicocorticoides, por lesões ou doenças infiltrativas no hipotálamo e/ou na hipófise, por trauma crânio encefálico, por deficiência congênita de ACTH associada a deficiência de múltiplos hormônios hipofisários. Mais raramente pode ocorrer por deficiência isolada de ACTH. Nestas situações, o tratamento indicado é a reposição de glicocorticoide (1).

1.2 Insuficiência Adrenal Primária Congênita

1.2.1 Epidemiologia

Grupo de doenças raras, não existindo dados sobre incidências ou prevalência populacional em nosso meio. Sabe-se que a forma mais grave (clássica) da hiperplasia adrenal congênita por deficiência da enzima 21-hidroxilase, que é a causa mais frequente de IA na infância, ocorre em cerca de 1:10.000 a 1:15.000 nascidos vivos (8).

1.2.3 Quadro Clínico

A IA primária leva a deficiência de glicocorticoides, mineralocorticoides e androgênios. Seus sinais e sintomas podem ser pouco específicos no início da doença, dificultando seu diagnóstico precoce em muitos pacientes. Entre as principais alterações estão fadiga, fraqueza, anorexia, perda de peso, tontura, náusea e vômito (6). Em crianças pode ocorrer crescimento deficiente.

A deficiência de mineralocorticoide pode resultar em importantes alterações clínicas como averse excessiva por sal e alimentos salgados, desidratação, hipovolemia e hipotensão postural. As alterações laboratoriais características são hiponatremia, hipercalemia, acidose metabólica e elevação de renina plasmática (6).

O sinal clínico mais específico de IA primária é a hiperpigmentação cutânea ocasionada pela secreção elevada de pró-ópio-melano-cortina (POMC), molécula precursora do ACTH e do hormônio alfa melanócito-estimulante (α -MSH). A hiperpigmentação pode ser observada tanto em áreas expostas como nas áreas não expostas ao sol, incluindo as palmas das mãos, região genital, cicatrizes recentes e mucosa oral. Em pacientes do sexo feminino, a deficiência dos androgênios adrenais pode provocar diminuição da pilificação axilar e pubiana, além de possível redução da libido (1).

A presença da síndrome perdedora de sal ou a presença de ambiguidade genital em neonatos ou em lactentes são comuns na hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase e devem alertar para a possibilidade do diagnóstico de IA (1).

1.2.4 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico de IA primária pode ser confirmado pela presença de concentrações reduzidas de cortisol plasmático (<5 mg/dl) e concentrações elevadas de ACTH (>100 pg/ml). Na maioria dos casos, a avaliação basal destes hormônios confirma o diagnóstico, sendo rara a necessidade de testes dinâmicos. Outras anormalidades laboratoriais incluem anemia normocítica e normocrômica, linfocitose relativa com eosinofilia e discreta acidose metabólica. A deficiência de aldosterona resulta em aumento da atividade da renina plasmática, hiponatremia e hipercalemia (1, 9).

1.2.5 Etiologia/ Bases Moleculares

As causas de IA primária podem ser relacionadas a alterações no desenvolvimento da glândula adrenal, destruição da glândula e/ou desregulação da esteroidogênese (**tabela 1**).

Tabela 1. Causas de insuficiência adrenal primária congênita

DOENÇA	GENE AFETADO	OMIM
Hiperplasia Adrenal Congênita		
Deficiência da 21-hidroxilase	<i>CYP21A2</i>	201910
Deficiência da 11 beta-hidroxilase	<i>CYP11B1</i>	202010
Deficiência da 3 beta-O Heteroidesidrogenase	<i>HSD3B1</i>	109715
17 α Deficiência de hidroxilase	<i>CYP17A1</i>	202110
Hiperplasia Adrenal Lipóide	<i>STAR</i>	201710
Insuficiência Adrenal Congênita, 46 XY sexo reverso, total ou parcial.	<i>CYP11A1</i>	118485
Hipoplasia Adrenal Congênita	<i>NROB1 (DAX-1)</i>	300200
	<i>NR5A1 (SF-1)</i>	300473
Adrenoleucodistrofia	<i>ABCD1</i>	300371
Síndrome do Triplo A	<i>AAAS</i>	202110
Síndrome Autoimune Poliglandular	<i>AIRE</i>	240300
Deficiência Familiar de Glicocorticoide		
	<i>MC2R</i>	202200
	<i>MRAP</i>	607398
	<i>STAR</i>	600617
	<i>MCM4</i>	602638
	<i>TXNRD2</i>	606448
	<i>NNT</i>	607878
	<i>GPX</i>	ND

ND: não disponível.

Por ser objeto do presente estudo, a seguir será abordada em mais detalhes a doença Deficiência Familiar de Glicocorticoides (DFG).

1.3 Deficiência Familiar de Glicocorticoides (DFG)

A DFG é uma doença autossômica rara onde as células da zona fasciculada do córtex adrenal não respondem apropriadamente a estimulação do ACTH para produção de cortisol (10).

Descrita por Shepard em 1959 (11), manifesta-se geralmente a partir do primeiro ano de vida. Crises convulsivas e hipoglicemia são sinais comuns no período neonatal. Entretanto as manifestações clínicas podem surgir também durante a primeira infância (10).

Pacientes com DFG apresentam concentração plasmática baixa de cortisol e elevada de ACTH. Além de hipoglicemia, crises convulsiva e eventual choque circulatório, as manifestações

clínicas incluem desenvolvimento pândero-estatural deficiente, infecções de repetição e hiperpigmentação cutâneo-mucosa. Avanço da idade óssea e ausência de desenvolvimento da adrenarca também podem ser observados em pacientes mais velhos. O tratamento é realizado com a reposição de glicocorticoide (10). De modo geral, diferencia-se de outras causas de IA primária pela ausência de deficiência de aldosterona. Dessa forma, o diagnóstico de DFG deve ser suspeitado em paciente com IA primária sem deficiência mineralocorticoide, após a exclusão de causas mais comuns com a hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21- hidroxilase na forma clássica virilizante simples.

1.3.1 Bases Moleculares

A esteirodogênese adrenal se inicia pela ligação do ACTH ao seu receptor (ACTHR ou MC2R), o qual possui sete domínios transmembranas e é acoplado à proteína Gs. A subunidade alfa da proteína Gs ativa a adenilato ciclase que converte ATP em Monofosfato cíclico de adenosina cíclico (cAMP), o qual faz a fosforilação da proteína quinase A (PKA) ativando a enzima colesterol esterase que gera colesterol e ácidos graxos (AG). O colesterol então é transportado do para a membrana mitocôndria interna com auxílio de proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR). Na mitocôndria ocorre a conversão do colesterol em pregnenolona a partir da ação da enzima 20,22 desmolase (**Figura 1**)(12).

Na via de síntese dos glicocorticoides, que ocorre na zona fasciculada, a pregnenolona sofre desidrogenação na posição 3 β pela ação da enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD), formando progesterona. Tanto a pregnenolona quanto a progesterona são hidroxiladas na posição C17 α pela 17 α -hidroxilase (P450c17, CYP17), formando, respectivamente, a 17-hidroxipregnenolona (17OHPreg) e a 17 α -hidroxiprogesterona (17OHProg). A 17OHProg também pode ser sintetizada a partir da 17OHPreg, pela ação da 3 β -HSD (Fig.1). Em seguida, a 17OHProg é convertida a 11-desoxicortisol (11DOC) pela ação da 21-hidroxilase (P450c21, CYP21A2). O 11-DOC origina, então, o cortisol, por ação da 11 β -hidroxilase (P450c11 β , CYP11B1)(12).

Na via de síntese da aldosterona a progesterona na zona glomerulosa sofre hidroxilação no carbono 21, pela ação da enzima 21-hidroxilase (P450c21, CYP21A2), formando 11-desoxicorticosterona (DOC), que, por sua vez, origina a corticosterona pela ação da aldosterona sintetase (P450c11 β /AS, CYP11B1). Também por meio dessa enzima, a corticosterona é convertida a aldosterona (12).

A 17-hidroxiprogesterona, na zona reticular, sofre clivagem de sua cadeia lateral C20-21, por meio da ação da 17 α -hidroxilase, formando desidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona. No entanto, a maior parte da produção de androstenediona é dependente da conversão de DHEA catalisada pela 3 β HSD. Pela ação da 17-ceto-esteróide-redutase a androstenediona pode ser convertida a testosterona(12).

Figura 1. Mecanismo de ação e sinalização celular do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no córtex adrenal. O ACTH se liga ao seu receptor MC2R que ativa adenilato ciclases, aumentando a expressão de AMP cíclico, o qual faz a fosforilação da proteína quinase A (PKA) estimulando a expressão de enzimas esteroidogênicas e sintetizando colesterol e ácidos graxos. O colesterol é transportado para a membrana interna da mitocôndria com auxílio do cofator STAR onde é convertido a pregnenolona. No retículo endoplasmático, é formada a progesterona, que, na mitocôndria, é convertida a 11-deoxicortisol e depois a cortisol, que é então secretada para a circulação sanguínea.

A DFG foi inicialmente relacionada a defeitos no receptor do ACTH (MC2R) caracterizando a DFG tipo 1 e posteriormente na sua proteína acessória (MRAP) caracterizando a DFG tipo 2 (13, 14) (**Figura 1**). Alterações nos genes *MC2R* e *MRAP* são encontradas em cerca de 40 a 45% dos pacientes com DFG (10).

Alterações genéticas mapeadas no cromossomo 8q11.2-q13.2. foram relacionadas a formas isoladas de deficiência de glicocorticoide (15) e denominadas DFG tipo 3 (OMIM 609197).

Recentemente alterações em outros genes foram relacionadas à DFG. Este grupo inclui genes envolvidos na replicação do DNA, como o *MCM4* (16) e genes relacionados à desregulação dos níveis de oxigênio reativo, *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase* (*NNT*) denominado DFG tipo 4 (17) e Tioredoxinaredutase 2 (*TXNRD2*) (18) (**Tabela 1**). Embora raro, pacientes com mutações no gene *STAR* podem se apresentar com quadro clínico sugestivo de DFG (19). Por ser o alvo do presente estudo, o gene *NNT* será descrito em maiores detalhes a seguir.

1.4 O gene *NNT*

Na espécie humana o gene *NNT* está localizado no cromossomo 5p12, é formado por 22 exons e codifica uma proteína com 1.086 aminoácidos (HGNC: 7863; Entrez Gene: 23530; Ensembl: ENSG00000112992; OMIM: 607878; UniProtKB: Q13423). Até o presente foram descritas 11 isoformas do *NNT*. Seu transcrito principal (ENST00000264663) possui 6.483 pares de base (pb) e sua região traduzida possui 3.261 pb. (**Figura 2**)

Figura 2. Representação esquemática do gene *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase*. A) Localizações do gene no cromossomo 5p12. B) Estrutura do gene com seus 22 exons. C) Estrutura do RNAm com 6.483pb.

A proteína NNT é composta de três domínios: o domínio I ou domínio de ligação do NAD (H) e o domínio III, domínio de ligação ao NADP (H) estão envolvidos na transferência do hidreto entre NAD (H) e NADP (H). Já o domínio II ou domínio transmembrânico, é responsável pela ancoragem de NNT à membrana mitocondrial interna e pela translocação de prótons pelo canal (**Figura 3**) (20).

Figura 3. Modelo tridimensional da proteína NNT: Representação de seus monômeros e domínios de ligação. Domínios I e III localizados na matriz mitocondrial e domínio II no espaço inter membranas. No lado direito é representado o domínio III em verde e em magenta, o local de ligação em direção ao domínio I (em amarelo) que interage com o local de ligação de NAD (H) (em azul). No lado esquerdo é representados em verde o domínio III, e em magenta, o NADP (H) voltado ao local de ligação de NAD (H) (em azul) e na proximidade com domínio II (em cinza). Abaixo a reação de conversão de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que é catalisada pela NNT. Adaptado de Methereil, Guerra-Assunção et al. 2016 (20)

A proteína NNT atua no interior da membrana mitocondrial e tem grande importância no processo de desintoxicação de níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em condições fisiológicas a NNT utiliza a energia do gradiente de prótons mitocondriais para produzir altas concentrações de NADPH. O NADPH é responsável por regenerar a glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada (GSSG) e mantendo alta a taxa GSH/GSSG (17).

Recentemente, pouco antes do início do presente estudo, mutações no gene *NNT* foram descritas em pacientes com fenótipo de insuficiência adrenal, sendo a maior parte deles com DFG (Figura 4).

Figura 4. Mutações na proteína NNT. Mutações já descritas no NNT e a localização dessa nos domínios. Domínio I, em amarelo, em cinza domínio II e em verde domínio III . Adaptado de Metherell, Guerra - Assunção et al. 2016 (20)

Há cerca de quatro anos, Meimaridou e coautores, avaliando pacientes com DFG localizaram uma região candidata no cromossomo 5p13–q12, onde pelo sequenciamento em larga escala, identificaram inicialmente diversas variantes gênicas potencialmente associadas à DFG. Entre estas variantes encontradas, destacou-se a variante p.Ala533Val no gene *NNT* que segregava perfeitamente com o fenótipo de DGF. Foi observada em homozigose no caso índice, em heterozigose em seus genitores e ausente no grupo controle. A seguir utilizaram como modelo a linhagem de células adrenocorticais humanas (H295R) onde por meio da técnica de shRNA silenciaram o gene *NNT*. Desta forma puderam constatar uma diminuição da razão entre as taxas de GSH/GSSG implicando em uma desregulação do potencial redox dessas células.(17).

Posteriormente, Yamaguchi e coautores descreveram a variante NNT p.F215S em homozigose em um paciente com DFG e em heterozigose em seus pais. (21). Análises em linfócitos do carreador dessa mutação mostrou perda significativa da atividade de NNT. Foi demonstrado que a biogênese mitocondrial e a replicação mtDNA (número de cópias) também eram afetados (22).

A variante p.G200S encontrada em um paciente com fenótipo de deficiência de glicocorticoides e mineralocorticoides foi avaliada em fibroblastos humanos, onde se demonstrou aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio, diminuição de ATP e alterações na morfologia mitocondrial (23).

Por outro lado, Bainbridge e coautores identificaram a variante, p.R213fs, e a deleção, c.638_639insT em *NNT* em pacientes com alterações cardiovasculares congênitas, principalmente defeito de compactação do ventrículo esquerdo. Aparentemente esses pacientes não possuem alterações adrenais. Nesse estudo, foi realizada avaliação funcional em embriões do peixe paulistinha (*zebrafish* - *Danio rerio*) por meio do silenciamento gênico do *Nnt*. Nos embriões

desses animais sem a expressão do *Nnt* foram observadas malformações de ventrículo semelhantes às alterações observadas nos seus pacientes com mutação no *NNT* (24).

1.4.1 NNT e o sistema de defesa antioxidante

As espécies reativas de oxigênio podem ser formadas por meio de reduções parciais do oxigênio, dando origem principalmente a radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (**Figura 5**). Estes radicais devem ser mantidos dentro dos limites fisiológicos e, nessas concentrações, funcionam como mediadores da sinalização celular. Porém, em quantidades elevadas, podem causar efeitos celulares deletérios por meio de um processo denominado estresse oxidativo. Neste caso ocorre a oxidação de biomoléculas como proteínas, lipídeos e carboidratos e o rompimento da homeostase celular (25).

Em condições fisiológicas o processo de geração de energia pela mitocôndria produz EROs. O bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna pelos complexos I, III e IV fornece a energia para a síntese de ATP pela ATP sintase (26). Nesse processo de transferência de elétrons pelo complexo I e III uma pequena porcentagem do oxigênio molecular é convertida a ânion superóxido (O_2^-), que é reduzido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por ação da superóxido dismutase (SODs) (27).

Na mitocôndria o H_2O_2 é reduzido por membros dos sistemas da glutathione peroxidase (GPX) e peroxiredoxina (PRDX). O H_2O_2 mitocondrial é convertido à água e oxigênio principalmente por ação de GPX, que recebe elétrons de GSH. Esta é sintetizada a partir de aminoácidos (L-glutamato e L-cisteína) pela ação da C-glutamilcisteína e essa reação requer energia (limitada por ATP). A GSH é oxidada em GSSG, que é regenerada a GSH utilizando NADPH como cofator (28) (**Figura 5**).

Figura 5. Representação esquemática do transporte de elétrons na membrana mitocondrial, evidenciando o papel da proteína Nicotinamide Nucleotide Transferase (NNT) no sistema de defesa antioxidante. Na mitocôndria o fluxo de elétrons por meio dos complexos I, III, IV para a síntese de ATP pela ATP sintase libera oxigênio molecular que é convertido a ânion superóxido (O₂⁻), sendo em seguida protonado para formar peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por ação da superóxido dismutase (SODs). O H₂O₂ é então reduzido principalmente por membros dos sistemas da glutathione peroxidase (GPX) a água e oxigênio. A GSH é oxidada em GSSG consumindo H₂O₂, e é regenerada a GSH utilizando NADPH como cofator essa regeneração exige elevadas concentrações de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) fornecidas por NNT.

1.5 Estresse oxidativo e a esteroidogênese

O sistema de defesa antioxidante possui mecanismos complexos e específicos para cada tipo celular. O córtex adrenal é suprido de altos níveis de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos necessários devido produção de EROs durante a esteroidogênese. Distúrbios na homeostase redox no ambiente adrenocortical podem ter um efeito sobre a esteroidogênese (27).

Há evidências de efeitos de EROs sobre componentes-chave envolvidos no processo de esteroidogênese. A indução de estresse oxidativo em células tumorais obtidas de tumor de células de Leydig (MA-10), resultou em uma clara redução na expressão da proteína intramitocondrial STAR (29), (30) (31) e inibição na síntese de progesterona (31).

Picard e coautores avaliaram camundongos com alterações em proteínas mitocondriais, verificando parâmetros de funções neuroendócrinas. Cada alteração mitocondrial produziu uma

resposta específica ao estresse. Camundongos com alteração em *Nnt* apresentaram redução na concentração de corticosterona e aumento da concentração de ACTH após a indução de estresse oxidativo quando comparados ao nativo (32).

A linhagem de camundongos C57BL6/J é portadora de uma mutação espontânea no gene *Nnt*. Estes animais apresentam desorganização na zona fasciculada e aumento nos níveis de apoptose quando comparadas com o tipo nativo. Não foram observadas alterações na expressão das enzimas CYP11A1 e CYP11B1, porém a concentração de corticosterona plasmática é menor do que em animais nativo (17).

Alterações em genes envolvidos no sistema antioxidante vêm sendo relacionadas a fenótipo de insuficiência adrenal entre eles a síndrome do triplo A, adrenoleucodistrofia e mais recentemente a DFG (27).

JUSTIFICATIVA DO PRESENTE ESTUDO E HIPÓTESE DE TRABALHO

Há poucos anos tivemos a oportunidade de avaliar um lactente com quadro clínico e laboratorial de DFG. Os estudos moleculares descritos a seguir envolvendo sequenciamento de genes candidatos descartaram alterações nos genes mais frequentemente associados a esta doença. Subsequentemente, por meio de sequenciamento genômico em larga escala, detectamos uma variante potencialmente patogênica no gene *NNT* no DNA genômico desse paciente. Na época, havia apenas o estudo original de Meirimadou et al (2012) descrevendo pacientes com mutações nesse gene, mas não havia ainda estudo funcional direto de nenhuma das variantes encontradas em pacientes. Naquele primeiro relato da literatura havia apenas o estudo funcional por meio de shRNA no gene *NNT* em células H295 e a avaliação de camundongos com mutação espontânea em *Nnt* (17). Por essa razão, iniciamos o estudo funcional dessa nova variante gênica, com a hipótese de que ela comprometeria o sistema redox e afetaria a esteroidogênese adrenal.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a relação genótipo–fenótipo em paciente com DFG carreador da nova variante NNT p.G866D.

2.2 Objetivos específicos

- Na cultura primária de células mononucleares sanguíneas do caso índice homozigoto, seus familiares heterozigotos e controles (NNT nativo) avaliar a expressão de RNAm do NNT, a atividade mitocondrial e o estresse oxidativo por meio dos ensaios de determinação de massa e potencial de membrana mitocondrial, EROs, ATP celular, glutatona reduzida e determinação de morte celular.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 Casuística

Dentre os pacientes com DFG acompanhados no ambulatório de Endocrinologia da Criança e do Adolescente do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMRP- USP) estudamos um caso índice carreador de uma nova variação do gene *NNT* em homozigose, bem com em seus familiares heterozigotos (n= 3).

3.1.1 Caracterização Fenotípica: quadro clínico e bioquímico

O caso índice foi atendido inicialmente pela endocrinologista Dra. Renê R. Baccega em Sertãozinho-SP, sendo então encaminhado ao HC-FMRP-USP aos 18 meses de vida, por apresentar episódios de hipoglicemias graves e frequentes há alguns meses. Essas hipoglicemias eram acompanhadas de crises convulsivas. Além disso, o paciente apresentava também hiperpigmentação cutânea, baixo ganho pômdero-estatural e vômitos, que culminaram, finalmente, em episódio de choque circulatório aos 18 meses de idade. Na primeira avaliação bioquímica foi detectada insuficiência adrenal primária, com cortisol plasmático indetectável e ACTH elevado, porém sem sinais de hiperandrogenismo ou insuficiência mineralocorticoide (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados análise laboratorial do caso índice aos 18 meses de idade. Os valores são apresentados em unidade convencional (UC) e unidades internacionais (UI).

Analito	Concentração – UC (Concentração em UI)	Valor de Referência (UC)
Sódio	134 mEq/L	134 – 149 mEq/L
Potássio	5,0 mEq/L	3,6 - 5,5 mEq/L
Glicemia	55 mg/dL (3,05 mmol/L)	75 – 110 mg/dl
17-Hidroxiprogesterona (17-OHP)	< 3,9 ng/dL (<0,11 nmol/L)	< 150 ng/dL
DHEAS	< 3,9 µg/dL (<0,10 µmol/L)	< 150 µg/dL
Androstenediona	< 3,9 ng/dL (<0,13 nmol/L)	< 80 ng/dL
Testosterona	30 ng/dL	< 10 ng/dL
ACTH	> 1.250 pg/mL (>275,25 pmol/L)	10 - 50 pg/mL
Cortisol basal	< 1,2 µg/dL (< 33,10 nmol/L)	5 a 20 µg/dL
Atividade de Renina Plasmática	4,2 ng/mL/h (3,234 pmol/h/L)	Decúbito: 1.24±1.09 ng/mL/h Ortostase: 2,63±1,32 ng/mL/h

Baseado nestes dados clínicos e laboratoriais foi confirmado o diagnóstico de DFG e o tratamento com glicocorticoides foi iniciado. Após o início do tratamento o paciente teve evolução clínico-laboratorial muito satisfatória até o presente. Atualmente o paciente tem 8 anos de idade, tem desenvolvimento pômbero-estatural e neuromotor normais. Coursou o segundo ano do ensino fundamental com excelente rendimento escolar. Após o início do tratamento não apresentou novos episódios de insuficiência adrenal. Mantém seguimento ambulatorial de rotina e ótima adesão ao tratamento. Recentemente, em função de estudo demonstrando mutações no gene *NNT* em pacientes defeitos cárdicos congênitos, principalmente ausência de compactação do ventrículo esquerdo (24), realizamos a investigação do seu sistema cardiocirculatório.

Realizamos eletrocardiograma, ecocardiograma e exame de ressonância nuclear magnética do coração. Nenhuma alteração cardíaca foi detectada.

3.2 Método

3.2.1 Caracterização molecular

3.2.2.1 Abordagem gene candidato

Durante o seguimento ambulatorial realizamos a investigação molecular neste paciente, como descrito a seguir. Como os achados clínicos e bioquímicos indicaram o diagnóstico de DFG, foi realizado o Sequenciamento direto de genes que frequentemente estão alterados nestes casos. Os primeiros candidatos para o sequenciamento foram os genes *MC2R* e *MRAP*, frequentemente alterados em paciente com DFG. Não encontramos variantes patogênicas nesses genes. Outros genes potencialmente envolvidos como *NR5A1 (SF-1)*, *NROB1 (DAX1)*, *GPX* e *ALADIN (AAAS)*, também foram posteriormente sequenciados e não foram encontradas variantes patogênicas.

3.2.2.2 Sequenciamento exômico

Prosseguindo na investigação da causa de DFG neste paciente, a análise exploratória de todas as regiões codificantes presentes no genoma, foi realizada por meio de Sequenciamento exômico em larga escala na plataforma *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection* Applied Biosystems (SOLiD – Life Technologies Foster City, CA, Estados Unidos). As bibliotecas foram construídas com o auxílio do kit TargetSeq™ Exome (Applied Biosystems - Life Technologies, Foster City, CA, Estados Unidos) e a reação de Sequenciamento pelo método de ligação de sondas fluorescentes com o auxílio do kit 5500/5500xl *Sequencing Reagents* (Applied Biosystems, Life Technologies Foster City, CA, Estados Unidos) conforme instruções do fabricante. O Sequenciamento foi realizado em equipamento 5500 Series SOLiD™ Systems (Applied Biosystems, Life Technologies Foster City, CA, Estados Unidos) no Laboratório de Endocrinologia Molecular do HC-FMRP-USP.

A análise de bioinformática (**Figura 6**) foi realizada em conjunto com o bioinformata Jorge Estefano S. de Souza, no Hemocentro de Ribeirão Preto. As leituras de sequências foram alinhadas com a sequência do genoma humano (Hg19) utilizando o software Lifescope (LifeScope™ GenomicAnalysis Software v2. 5.1). Em passo adicional foi realizada a exclusão das sequências de *primers*/adaptadores e as sequências foram pareadas. A chamada de variantes foi realizada seguindo o protocolo do GATK (<https://www.broadinstitute.org/gatk/guide/best-practices?bpm=DNaseq>). A anotação das variantes foi realizada com o auxílio do software SnpEffversion 3.5d (build 2014-03-05) e um *script in house*, alinhando as variantes descobertas com os bancos públicos: dbNSFPversion 2.4; COSMIC v69; 1000genomes; ESP version ESP6500SI-V2; HapMap; dbSNPversion 138. Ao término da primeira etapa foram selecionadas 25 variantes candidatas. Foi então realizada a análise de dano proteico utilizando as ferramentas *online*: SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), MutationAssessor (<http://mutationassessor.org/>), FATHMM (<http://fathmm.biocompute.org.uk/inherited.html>), (MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>), RadialSVM (Xiaoming Liu, 2014), LR (Xiaoming Liu, 2014).

A análise de predição de dano proteico com ferramentas de predição de dano encontrou cinco variantes gênicas com escore de dano alto em pelo menos três ferramentas e potencialmente relacionados ao fenótipo em questão.

Figura 6. Representação esquemática das etapas de análise de bioinformática para a seleção das variantes candidatas.

As etapas de investigação descritas acima foram realizadas principalmente pelo orientador (SRA) e pela colaboradora Dra. Fernanda Borchers Coeli-Lacchini. Todas as etapas a seguir foram concebidas e realizadas diretamente durante o desenvolvimento desse projeto de mestrado.

3.2.2.2.1 Verificação das variantes gênicas com maior potencial patogênico

As cinco variantes gênicas com maior plausibilidade biológica identificadas após a análise de bioinformática correspondem a variantes nos genes *HMCN1*, *HEATR5A*, *PRTG*, *NCOAS* e *NNT*. Na **tabela 3** estão listados os fenótipos associados a variantes descritas nesses genes, bem como a função das respectivas proteínas de acordo com dados disponíveis em bancos de dados genômicos. Essa verificação foi realizada utilizando os banco de dados públicos, GeneCards disponível para acesso em <http://www.genecards.org/>, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) disponível para acesso em <https://www.omim.org/> e National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponível para acesso em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Após a verificação da função das proteínas selecionamos como candidata principal a ser analisada a troca de uma guanina por uma adenosina em homozigose no gene *NNT* na posição nucleotídica c.2597 a partir do ATG (ENST00000264663) no caso índice. Esta alteração no exon 17 do *NNT* resulta na troca do aminoácido glicina (G) pelo aminoácido ácido aspártico (D) na posição 866 da proteína *NNT*.

Tabela 3. Genes candidatos selecionados após análise de bioinformática

	Sigla	OMIM	Localização no cromossomo	Expressão em tecido adrenal	Fenótipos associados	Função da proteína
<i>Hemicentin 1</i>	<i>HMCN1</i>	*608548	1q31	Expresso	Degeneração macular relacionada à idade (33)	Codifica uma série de proteínas de ligação ao cálcio na epiderme, previsto como fator de crescimento.(33)
<i>Heat Repeat Containing 5ª</i>	<i>HEATR5A</i>	ND	14q12	Expresso	ND	ND
<i>Protogenin</i>	<i>PRTG</i>	* 613261	15q21	Expresso	Déficit de Atenção / Hiperatividade (34)	codifica um membro da superfamília das imunoglobulinas, associado com o desenvolvimento de vários tecidos, em especial a neurogênese.(34)
<i>Nuclear Receptor coactivator 6</i>	<i>NCOA6</i>	*605299	20q11	Expresso	Melanoma (35)	um co-ativador transcricional que pode interagir com receptores hormonais nucleares. Envolvida na co-inativação dependente de receptores hormonais incluindo receptores de esteroides. (36)
<i>Nicotinamide Nucleotide Transidogenese</i>	<i>NNT</i>	*607878	5p12	Expresso	Deficiência Familiar de glicocorticoides (37)	desintoxicação de níveis de espécies reativas de oxigênio.(17)

3.3 Análise *in silico* da variante p.G866D em *NNT*

A expressão de *NNT* em tecidos humanos foi verificada nos bancos de dados: The Human Protein Atlas disponível para acesso em [https:// www.proteinatlas.org/](https://www.proteinatlas.org/) e GeneCards disponível para acesso em <http://www.genecards.org/>.

A conservação do resíduo *NNT* G866 entre diversas espécies foi verificada por meio da ferramenta online de análise de dano proteico utilizando as ferramentas online Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>),

3.4 Triagem molecular de *NNT* e análise de segregação familiar

Toda a região do exon 17 de *NNT* foi analisada por sequenciamento direto no caso índice para a confirmação da variante *NNT* p.G866D encontrado no sequenciamento exômico. Este exon foi avaliado também no DNA genômico dos pais e do irmão do caso índice para análise de segregação familiar. Além disso, avaliou-se a presença dessa nova variante em 120 alelos de indivíduos brasileiros não aparentados e sem DFG.

No caso índice carreador da variação p.G866D no gene *NNT* em homozigose, familiares heterozigotos e nos três indivíduos utilizados como controle nos experimentos funcionais foi realizada a triagem molecular de todos 22 exons do gene *NNT*.

Os sequenciamentos foram realizados conforme descrito abaixo no item Sequenciamento do gene *NNT*.

3.5 Sequenciamento direto do gene *NNT*

3.5.1 Obtenção das amostras de DNA e Extração de DNA genômico

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de sangue total periférico colhido com EDTA com o auxílio do kit QIAmp Dna blood mini kit (Qiagen, CA, Estados Unidos) segundo protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras de DNA genômico obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA).

3.5.2 Amplificação e sequenciamento do gene *NNT*

O DNA genômico foi amplificado por reação de PCR, utilizando os pares específicos de *primers* para a região promotora e para cada exon considerando as regiões de transição introns-exons do gene *NNT* (Tabela 5). Em todas as reações foi incluído um controle branco. Os

produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE, Tris- acetato 0,004M; EDTA 0,001M; pH 8,0 e revelados com brometo de etídio. O tamanho do fragmento foi confirmado por comparação ao marcador de peso molecular (Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos) e as imagens dos géis foram obtidas com o auxílio do ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad, CA, Estados Unidos).

Tabela 4. Concentrações dos reagentes utilizados na Reação de PCR

Reagentes	Concentração Final
Tampão	1X (1.5mM MgCl ₂)
GoTaq® DNA Polymerase (Promega Madison, WI, Estados Unidos).	0,05 U
Nucleotídeos	0.2mM (cada Dntp)
Primers	0,6µM (cada primer)
DNA	<0.5µg/50µl
Água	q.s.p 25µl

Tabela 5. Oligonucleotídeos e condições da PCR para estudo do gene *NNT*.

Exon	Primer F 5'→3'	Primer R 5'→3'	Fragmento (pb)	Tm °C
2	ATTCTTTATAGATGTCTACATGTAA	CTATTACCTTGTCTTCTCTGTTAG	550	50
3	AGCAGCTTGCATGTGTGGTATATT	ATGAAGAATATGACGACATGCAGTCAT	516	55
4	AGATGGTATACCTCTGTGTGTGC	ACAGTGTGTTCTCATACAAATAAT	685	55
5	CTTCATTGATGACTTATGATGATATGT	TGAGTGATACATAGGATTGAAGGATC	754	55
6	TGATCATCATTATCACCATCTG	TAATATGCCCCTGAAACAAAA	283	55
7	AAGTACGAAATCAAAGGGACTGTTGAC	CACAAAAGGGCTAGGCGTGGTA	831	55
8-9	CTTTGCTGCTCACACTCATCA	TTGAAAGCAGATAAGTGGGGGGAATG	1099	50
10	CATTCCCCCACTTATCTGCTTTCAA	CTGAAAAACCAAGTCTGTCAGGCCCG	1040	63
11	GCCACTTCTCAACTGTCAAATGTCT	TCTGCACTGCTTGAAATGGGAGC	562	55
12	ATGAGGGTGTAAAGAAAGCTG	TGGGATAAGGCAAAAGACTAAAAT	601	55
13	TAGGTGATAAAGATGTGCTTAAAC	TTATAAATCCACCGCAATCTAGC	582	50
14	TTGTGCATGATAGCAAATCCAGA	GGTCTATGAAGCAGAATCTTTGG	725	55
15	TTTTGAGTGCTGACATGACATCA	AGTGCTATACGAATACTCTTCAC	976	55
16	TTCCCCTTTATTGATACTTAGTAAG	TGTTCTTCCTACACTCTTCTATG	590	55
17	TTATGTTATTAATTTTGAAGTCTGA	AATATACAACACGATCAGACA	843	50
18	GAAGTGATTTTCAGAAACCAGC	TATAGAATTTCCATGTGATCTCCA	528	55
19	GAATCATCAGATGGTTGTTGAAGC	CATTAGTAGGTAAGTTTTTGGAGAG	786	55
20	GTGGTTAAAGTTGAATGTGAAG	TACAAGTTCTTTTTCATCTGACTA	683	50
21	GCAAGATCATTTTGAGATCATAAAAG	CTTACTCCTGGCCTCCTAGAAG	549	55
22	CTCTAATGGATATAAGAATAAGGG	CCCTTGAAATATAGACTCTGAA	937	50

Tm: temperatura de anelamento.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o kit ABI Prism® Big Dy™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para a purificação da reação de sequenciamento foi utilizado álcool isopropílico (Merck

Millipore Corporation, DA, Alemanha) 65% e álcool etílico (Merck Millipore Corporation, DA, Alemanha) 60%. A amostra purificada foi adicionada a formamida (Merck Millipore Corporation, DA, Alemanha) e a eletroforese capilar foi realizada no equipamento ABI Prism 3130 Genetic Analyser, PE Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os dados obtidos por meio do sequenciamento foram alinhados com a sequência referência do gene (NCBI NG_032869.1) e analisados com o auxílio do software Codon Code Aligner (CodonCode Corporation, MA, Estados Unidos).

3.6 Avaliação funcional da proteína NNT com a alteração p.G866D em células mononucleares

3.6.1 Obtenção de células mononucleares do sangue

As células mononucleares do paciente, seus familiares e controles foram isolados a partir de 10 a 20 ml de sangue total colhido por punção venosa em tubo heparinizado e a separação foi realizada por Histopaque 1077 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, Estados Unidos). Para essa, o sangue foi adicionado cuidadosamente ao histopaque e centrifugado por 30 minutos a 650g. Após a centrifugação houve a formação de um halo de células brancas, esse foi isolado e purificado com solução salina a 0,9%. Para a purificação foram realizadas duas centrifugações durante 15 minutos a 650g. Depois de isoladas, as células foram colocadas em condições de proliferação em cultura com meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 640) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) enriquecido com 10% soro bovino fetal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), 1% antibiótico penicilina + estreptomicina (Gibco - Life Technologies Carls ad, CA, Estados Unidos) e a cultura incubada por 48 horas a 37°C e 5% CO₂. Esta foi utilizada para análise da expressão gênica de *NNT*, para avaliação de massa e potencial de membrana mitocondrial, EROs, GSH, ATP e morte celular em condições basais e após estímulo com 100 µM de peróxido de hidrogênio por cinco horas para indução de estresse oxidativo.

3.6.2 Análise da expressão gênica a partir do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm)

3.6.2.1 Obtenção das amostras de ácido ribonucleico (RNA)

Para extração de RNA total a cultura foi centrifugada e ao *pellet* de células foi adicionado TRIzol Reagente (Invitrogen – Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos) na proporção de 1,0 mL/1x10⁷ células. O protocolo utilizado foi o recomendado pelo fabricante. Nas amostras com TRIzol foi adicionado clorofórmio (Merck Millipore Corporation, DA, Alemanha). As amostras

foram agitadas vigorosamente, incubadas em temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000g por quinze minutos a 4°C. Após a centrifugação houve a formação de três fases, sendo que o sobrenadante foi isolado, adicionou-se glicogênio (Merck Millipore Corporation, DA, Alemanha) e 2- Propanol (Merck Millipore Corporation, DA, Alemanha) e as amostras foram incubadas a - 80°C por 24 horas. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C, sendo retirado o 2 - Propanol e adicionado Etanol 70% (Merck Millipore Corporation, DA, Alemanha). As amostras foram centrifugadas a 7500g por 15 minutos a 4°C e o etanol descartado. O *pellet* formado foi mantido a temperatura ambiente até estar completamente seco e depois ressuspensionado em *Nuclease-free water* (Ambion, Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos). A quantificação do RNA obtido em solução aquosa foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, Estados Unidos), em comprimento de onda de 260 nm. A qualidade das amostras foi avaliada pelo cálculo da razão entre as absorbâncias em 260 e 280 nm, sendo considerada uma razão ideal na faixa entre 1,6 e 1,8. A integridade do RNA foi verificada pela visualização das bandas de RNA ribossômico em gel de agarose 1,2% evidenciadas pela solução de brometo de etídeo 0,5%. O RNA total extraído das amostras de cultura foi diluído em uma concentração final de 100 ng/μL e utilizado para síntese da fita complementar.

3.6.2.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA diluídas a 100 ng/μL foram utilizadas na reação de transcrição reversa realizada com o auxílio do kit High-Capacity cDNA Transcriptase reversa (Applied Biosystems- Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos), conforme recomendações do fabricante.

3.6.2.3 Análise da expressão gênica por Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

A seguir foram realizados os ensaios TaqMan® (Life Technologies, CA, Estados Unidos) para avaliar a expressão do RNAm do gene *NNT* e de genes utilizados como controles endógenos (**Tabela 6**). O protocolo seguido foi o sugerido pelo fabricante. A seguir as curvas de amplificação foram processadas pelo software ABI Prism® 7500, a linha de base (*Baseline*) e o limiar de detecção de fluorescência (*Threshold*) estabelecido em 0.2.

Tabela 6. Identificação dos ensaios de PCR em tempo real

Gene	ID ensaio comercial
<i>NNT</i>	Hs00966097_m1
<i>TBP1</i>	4310891E
<i>GUSB</i>	4326320E

A expressão relativa do RNAm foi calculada por meio do método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrita por Livak (38).

3.6.3 Análise da função mitocondrial

As análises de parâmetros mitocondriais descritas abaixo foram realizados pela pós-graduanda em colaboração com a Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.6.3.1 Análise de massa e potencial de membrana mitocondrial

O ensaio foi realizado por meio da coloração com Mitotracker deep - Red (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos), segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Este é um marcador que se acumula em mitocôndrias ativas. Foram semeadas 3×10^5 células/poço com volume final de um ml, em triplicata, em placas de cultura de 24 poços para células em suspensão e mantidas *overnight* em incubadora a 37°C. Foi realizada ou não a incubação das células com 100 μ M de H₂O₂ por cinco horas. Após este período, as células foram incubadas com Mitotracker (250 nM) e com o marcador nuclear Hoechst (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) por 30 minutos. Em seguida essas células foram fixadas em uma lâmina com formol a 4%, sendo adicionado Mounting Media (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos). As imagens foram obtidas por microscopia confocal no equipamento Confocal Leica SP5 (Leica Microsystems, HE, Germany) no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) da FMRP-USP. A aquisição da imagem de 1024 pixels foi realizada por meio do software LAS AF versão 2.7.3.9723 (Leica Microsystems, HE, Germany) com as linhas de laser de excitação e emissão a 644/665 nm para o mitotracker e 365/405nm para o Hoechst. A média da intensidade de fluorescência foi quantificada com o software *Image processing and analysis in java* (ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA), disponível para aquisição em <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>. Foram analisados 10 campos independentes de cada amostra, com uma media de 20 células por campo.

3.6.3.2 Análise de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

A detecção de EROs foi avaliada utilizando oCMDCFDA (Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos) conforme instruções do fabricante. O ensaio foi realizado como descrito a seguir: foram semeadas 3×10^5 células por poço com volume final de 1 mL, em triplicata, em placas de cultura de 24 poços para células em suspensão e mantidas *overnight* em incubadora a 37°C. Foi realizada ou não a incubação das células com 100 μM de H_2O_2 por 5 horas. As células foram mantidas em incubadora a 37°C, sendo a seguir lavadas com PBS 1x e então incubadas com a sonda CMDCFDA (Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos) diluída em meio de cultura (5 μM) por 30 min a 37°C. Após a incubação as células foram lavadas com PBS 1x, ressuspensas em PBS 1x e a leitura feita no citômetro de fluxo BD-FACS Canto (Becton Dickinson, NJ, Estados Unidos) em comprimento de onda para Fluoresceína (FITC) com excitação a 495nm e emissão a 527nm. Os dados obtidos pela citometria de fluxo foram analisados com o auxílio do software BD - FACSDiva Version 6.1.3 (Becton Dickinson, NJ, Estados Unidos). Foram analisadas 68.000 células em dois experimentos independentes.

3.6.3.3 Ensaio para determinação de glutathiona reduzida (GSH)

Para a quantificação dos níveis de glutathiona reduzida foi utilizando o kit da GSH-Glo™ Glutathione Assay (Promega Corporation, WI, Estados Unidos). O ensaio foi realizado segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Foram plaqueadas 3×10^5 células/poço com volume final de 1 ml em triplicata em placas de cultura de 24 poços para células em suspensão e mantidas *overnight* em incubadora a 37°C. Foi realizada ou não a incubação das células com 100 μM de H_2O_2 por 5 horas. O H_2O_2 foi removido por centrifugação e as células foram transferidas para placa de 96 poços de fundo branco. Em seguida foram incubadas com o reagente GSH-Glo™ por 30 minutos, foi adicionado luciferina e incubado por mais 15 minutos ao abrigo da luz. A leitura foi realizada no SpectraMaxLuminômetro (Molecular Devices, CA, Estados Unidos). Uma curva padrão de glutathiona 0 a 5 μM foi feita para determinar a concentração de glutathiona reduzida nas amostras.

3.6.3.4 Ensaio para determinação de ATP celular

O nível de ATP celular foi determinado pelo *ATP bioluminescent assay kit* (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) baseado no *firefly luciferin-luciferase system* conforme instruções do fabricante. O ensaio foi realizado como descrito a seguir. Foram plaqueadas 3×10^5 células por ml em garrafas de cultura de 25 cm² e mantidas *overnight* em incubadora a 37°C. Foi realizada ou não a incubação das células com 100 µM de H₂O₂ por 5 horas, as células foram mantidas em incubadora a 37°C. O meio foi retirado e adicionado tampão de lise CellLytic (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) com coquetel de inibidores de proteases, (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) e aquecido a 99°C por 10 min para inativação total de ATPases. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x *g* por 10 min, e o sobrenadante transferido para um tubo novo. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método Bradford e foram utilizados 10 µg de proteína para determinação de ATP. O volume da amostra correspondente foi transferido para poços da placa de 96 poços e adicionado água destilada estéril q.s.p. 100 µL. A placa contendo as amostras foi colocada no leitor de luminescência SpectraMax Luminômetro (Molecular Devices, CA, Estados Unidos) e em cada poço adicionado 100 µL do mix de ATP do ensaio de bioluminescência (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). Uma curva padrão de ATP 1×10^{-5} a 5×10^{-8} M (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) foi feita para determinar a concentração de ATP nas amostras.

3.6.3.5 Ensaio para determinação de morte celular

A viabilidade das células foi determinada por iodeto de propídeo (PI) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) após análise em citometria de fluxo. Essa substância se liga às cadeias do DNA quando a integridade da membrana celular esta prejudicada caracterizando apoptose tardia e necrose. Para a realização do ensaio foram semeadas 3×10^5 células/poço com volume final de 1 ml em triplicata em placas de cultura de 24 poços para células em suspensão e mantidas *overnight* em incubadora a 37°C. Foi realizado o tratamento com 100 µM de H₂O₂ por cinco horas para uma das condições, as células foram mantidas em incubadora a 37°C e a seguir lavadas e ressuspendidas em PBS 1x, marcadas com iodeto de propídeo (2 µg/ml) e a leitura feita imediatamente no citômetro de fluxo BD-FACS Canto (Becton Dickinson, NJ, Estados Unidos) em comprimento de onda com excitação a 535nm e emissão a 617nm. Os dados obtidos pela citometria de fluxo foram analisados com o auxílio do software BD - FACSDiva Version 6.1.3 (Becton Dickinson, NJ, Estados Unidos). Foram analisadas 60.000 células de cada indivíduo.

3.7 Análise Estatística

A análise da expressão gênica por meio da qPCR foi analisada pelo teste de Anova com pós-teste de Tukey's. As análises envolvendo a quantificação da EROs, determinação de ATP, observação da atividade mitocondrial e determinação de morte celular foram analisadas pelo teste t não pareado. A determinação de GSH foi analisada pelo teste de Anova com pós-teste de Tukey's.

O software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA) foi utilizado para as análises citadas anteriormente. O limite de significância para todos os testes foi de 95% ($p < 0,05$).

3.8 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa e o termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram aprovados pelo Comitê de Ética do HC-FMRP-USP (Parecer # 1.428.432/2016). (Anexo A).

3.9 Financiamento

Este projeto foi financiado com recursos públicos da agência fomentadora FAPESP, principalmente pelo projeto vinculado ao processo #2011/13807-4.

A aluna teve bolsa de estudos de Mestrado da CAPES, distribuídos pelo Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da FMRP-USP.

Resultados

4. Resultados

4.1 Análise *in silico* da expressão de NNT e da mutação p.G866D

Segundo os bancos de dados *The Human Protein Atlas* e *Genebank* a proteína NNT é expressa na maioria dos tecidos. Ela é expressa em tecidos endócrinos, entre eles a adrenal, tecido de interesse do estudo. (Figura 7)

Figura 7. Representativa da intensidade de expressão de NNT em diferentes tecidos. Destaca-se a expressão dessa proteína em tecidos endócrinos. Adaptado de *The Human Protein Atlas* disponível em <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000112992-NNT/tissue>

A variante p.G866D está localizada na alfa-hélice número 14 do domínio transmembrânico de NNT (figura 8). A última hélice TM14 completa a estrutura hexagonal do canal de translocação do próton. Estudos *in vitro* demonstraram que alterações nos resíduos Gli862, Gli866, e Gli869 (Gli245, Gli249, e Gli252 em *E. coli*, respectivamente) reduziram a função do NNT. Em particular mutação no resíduo Gli 249 do gene NNT em *E.coli*, que

corresponde ao resíduo Gly866 do seu ortólogo humano, reduziu 40% da atividade de transidogenação e resultou em reversão de 70% das atividades de translocação de prótons. (20, 39).

Figura 8 . Localização da mutação p.G866D na proteína NNT. Representação esquemática da proteína NNT e localização da variante missense p.G866D na alfa-hélice número 14 no domínio transmembrânico (verde).

A análise *in silico* confirmou a provável importância funcional do resíduo Gli866. Em todas as espécies avaliadas (**Tabela 7**) esse resíduo é conservado.

Tabela 7. Conservação do resíduo NNT G866 entre diversas espécies

Espécies	Sequência de aminoácido
<i>H. sapiens</i>	NNLLTIVGALIGSSGAILS ^y
<i>P. troglodytes</i>	NNLLTIVGALIGSSGAILS ^y
<i>M. mulatta</i>	NNLLTIVGALIGSSGAILS ^y
<i>G. gallus</i>	NNLLTIVGALIGSSGAILS ^y
<i>C. elegans</i>	NNLLTIVGALIGSSGAILSH
<i>R. norvegicus</i>	NNLLTIVGALIGSSGAILS ^y

4.2 Triagem molecular de *NNT* e análise de segregação familiar

Por meio de Sequenciamento direto do gene *NNT* confirmamos a ocorrência da variante NNT p.G866D em homozigose no caso índice (**Figura 9 B**) e em heterozigose em seus pais e em seu irmão, estes carreadores assintomáticos. Confirmou-se assim a segregação desta variante em homozigose com o fenótipo de DFG, sendo seus pais e irmão heterozigotos assintomáticos.

Figura 9. Análise molecular e segregação familiar da alteração NNT p.G866D.

A) Sequência nativa GGC do códon 866 do gene NNT em controle; B) Nova variante do gene NNT identificada em paciente com DFG por sequenciamento direto do exon 17 do gene NNT mostrando a variante em homozigose no caso índice, com troca de uma guanina por uma adenosina na posição nucleotídica c.2597 (ENST00000264663 - p.G866D) C) heterozigose nos seus pais e irmão assintomáticos. D) Heredograma da família mostrando a segregação da variante p.G866D em homozigose com o quadro clínico de DFG.

Não foram encontradas variantes ao sequenciarmos 120 alelos de indivíduos brasileiros sem DFG (controles) e não aparentados entre si, confirmando que se trata de alelo raro. A triagem molecular do gene *NNT* nos indivíduos normais utilizados como controles no estudo funcional também não encontrou alterações potencialmente danosas. Essa variante gênica também não foi encontrada em nenhuma base de dados genéticos disponíveis *online*, incluindo Ensemble e 1000genomes.

4.3 Análise da expressão gênica do gene *NNT*

A análise da expressão gênica realizada por meio de qPCR, utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, inicialmente confirmou a expressão de *NNT* em células mononucleares sanguíneas de humanos. Esses dados deram suporte aos estudos funcionais que foram realizados em células mononucleares sanguíneas. Adicionalmente, demonstrou-se que a variante NNT p.G886D não resulta em redução da expressão do RNAm, pois não houve diferença significativa nos níveis de

RNA_m do gene *NNT* entre o homozigoto, os heterozigotos e os controles (nativos *NNT* p.G866; **Figura 10**).

Figura 10. Expressão relativa do RNA_m do gene *NNT* ($2^{-\Delta\Delta CT}$) por meio de qPCR nos carreadores em homozigose e em heterozigose da variante *NNT* p.G866D e em controles nativos.

4.4 Análise da função mitocondrial em células com a variante *NNT* p.G866D

4.4.1 Análise de massa e potencial de membrana mitocondrial

Em células mononucleares sanguíneas do indivíduo homozigoto foi observada uma redução na massa e potencial de membrana mitocondrial em condições basais comparado ao controle ($p=0,01$; **Figura 11B**). Essa redução é acentuada após a indução de estresse oxidativo com 100 μ M de H_2O_2 por cinco horas ($p=0,001$; **Figura 11D**). Os gráficos apresentados são referentes a um experimento e os dados foram normalizados pelo controle.

Figura 11. Baixo potencial de membrana mitocondrial em células mononucleares sanguíneas do paciente NNT p.G866D homozigoto. A) Imagens representativas de linfócitos obtidos do indivíduo controle e do paciente homozigoto NNT p.G866D respectivamente em condições basais marcadas com Mitotracker-deep red (vermelho; mitocôndrias) e Hoechst (azul; núcleo). B) Em condição basal o homozigoto apresenta menor marcação com o probe Mitotracker sugerindo menor massa e potencial de membrana quando comparado ao controle. C) Imagens representativas de linfócitos do controle e do homozigotos respectivamente estimulados com 100 μM de H₂O₂ durante 5h marcadas com Mitotracker-deep red (vermelho) e Hoechst (azul). D) Menor marcação com Mitotracker sugerindo menor atividade mitocondrial após cinco horas de estímulo oxidativo com 100 μM de H₂O₂ no homozigoto NNT p.G866D. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, aumento 63X e a fluorescência quantificada pelo programa *Image processing and analysis in java* (ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA).

4.4.2 Análise de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Em células mononucleares sanguíneas do homozigoto foi observado um aumento de EROs em condições basais comparado ao controle ($p=0,02$; **Figura 12A**). Após a indução de estresse oxidativo com 100 μM de H₂O₂ por cinco horas essa diferença é acentuada e o homozigoto apresenta um importante aumento ($p=0,0001$) de EROs quando comparado ao controle (**Figura 12B**). Os gráficos apresentados são representativos de dois experimentos independentes nos quais os dados foram normalizados pelo controle de cada ensaio.

Figura 12. Avaliação de EROs em células mononucleares obtidas do homozigoto NNT p.G866D. A) Em condição basal o homozigoto NNT p.G866D apresenta um aumento de EROs em relação ao controle. B) Após cinco horas de estímulo com 100 µM de H₂O₂ há aumento de EROs no homozigoto comparado ao controle.

4.4.3 Ensaio para determinação de glutathiona reduzida (GSH)

Em células mononucleares do homozigoto foi observado uma redução nos níveis de GSH em condições basais comparado ao controle e aos heterozigotos ($p < 0.01$; **Figura 13A**). Após a indução de estresse oxidativo com 100 µM de H₂O₂ por cinco horas o heterozigoto apresentou uma redução nos níveis de GSH quando comparado ao controle ($p < 0.05$). O homozigoto apresentou uma redução nos níveis de GSH quando comparado ao heterozigoto ($p < 0.01$) e ao controle ($p < 0.001$; **Figura 13B**). Os gráficos apresentados são representativos de dois experimentos independentes nos quais os dados foram normalizados pelo controle de cada ensaio.

Figura 13. Determinação de glutathiona reduzida (GSH) em células mononucleares sanguíneas do homozigoto NNT p.G866D. A) Em condição basal mostrando que o homozigoto NNT p.G866D apresenta uma redução nos níveis de GSH quando comparado ao controle; B) O Estímulo oxidativo com 100 µM

de H_2O_2 durante cinco horas resulta em redução significativa dos níveis de GSH tanto no indivíduo homozigoto quanto do heterozigoto em relação ao controle.

4.4.4 Níveis de ATP em células mononucleares

Nas células mononucleares do paciente homozigoto não foi observada alteração no nível de ATP celular em condições basais quando comparado ao controle (**Figura 14A**). Entretanto, após a indução de estresse oxidativo com 100 μM de H_2O_2 por cinco horas há diminuição significativa no nível de ATP celular do homozigoto NNT p.G866D quando comparado ao controle ($p < 0,0001$; **Figura 14B**). Os gráficos apresentados são referentes a um experimento e os dados foram normalizados pelo controle.

Figura 14. Determinação de ATP em células mononucleares sanguíneas. A) Em condição basal não há diferença significativa nos níveis de ATP entre controle e homozigoto NNT p.G866D B) O estímulo oxidativo com 100 μM de H_2O_2 durante cinco horas nas células do indivíduo homozigoto resulta em significativa redução nos níveis de ATP quando comparado ao controle ($p < 0,0001$).

4.4.5 Ensaio para determinação de morte celular

Nas células mononucleares do homozigoto NNT p.G866D em condições basais não foi observada diferença no número de células em apoptose tardia e necrose quando comparado ao controle (**Figura 15A**). Após a indução de estresse oxidativo com 100 μM de H_2O_2 por cinco horas houve aumento no número de células em apoptose tardia e necrose no homozigoto quando comparado ao controle ($p < 0,0009$; **Figura 15B**). Os gráficos apresentados são referentes a um experimento.

Figura 15. Avaliação de Morte celular em células mononucleares. As células foram marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo; as células positivas para PI indicam células mortas. A) Em condição basal não há diferença na taxa de morte celular entre controle e o homozigoto NNT p.G866D. B) O estímulo oxidativo com 100 µM de H₂O₂ durante cinco horas induziu morte celular em células mononucleares do paciente homozigoto NNT p.G866D quando comparado ao controle ($p < 0,009$).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Recentemente a possibilidade da complementação do diagnóstico clínico e bioquímico com o sequenciamento total das regiões codificantes presentes no genoma por meio do WES, tem permitido uma ampliação do conhecimento das bases moleculares de doenças genéticas (40). Um exemplo disso é o resultado do WES do caso índice, aqui avaliado, que evidenciou o envolvimento de uma nova variante potencialmente patogênica do gene *NNT* em paciente com DFG porém sem diagnóstico genético confirmado.

Entretanto, essa nova tecnologia de estudo genético traz consigo novos desafios. Inicialmente há a necessidade de ferramentas potentes e cuidados de bioinformática. Vencida essas etapas, há a possibilidade de encontrar uma ou várias variantes gênicas candidatas, muitas vezes em genes ainda pouco conhecidos. Sabe-se atualmente que inúmeras variantes gênicas ainda não descritas em bancos de dados genéticos, mesmo que aparentemente patogênicas, podem ser na verdade variantes sem significado patológico (41, 42),

Nesses casos a confirmação definitiva da relação causal entre determinada variante e o fenótipo em questão dependerá em última instância de estudos funcionais *in vitro* em modelos celulares ou *in vivo* em modelos animais.

Esse foi o propósito do presente estudo ao realizar uma análise *in vitro* em grande profundidade e confirmar que a nova variante *NNT* p.G866D é a causadora da DGF nesse paciente. Demonstramos que essa variante resulta em aumento na produção de EROs, diminuição de GSH, diminuição na massa e potencial de membrana mitocondrial, redução nas concentrações de ATP e aumento da taxa de morte celular.

Ao iniciarmos esse projeto havia apenas dois estudos publicados demonstrando mutações no gene *NNT* como causa de DFG. O estudo pioneiro do grupo inglês liderado pela Dra. Louise Metherell havia avaliado um grande número de pacientes com DFG tipo 4 e encontrado mutações no gene *NNT* em um pequeno número desses pacientes. Porém, eles não haviam realizado o estudo funcional com nenhuma dessas variantes encontradas. A evidência *in vitro* apresentada naquele trabalho original foi feita por meio do silenciamento do gene *NNT* por shRNA em células adrenais H295 e pelo estudo de uma linhagem de camundongos com uma variante natural nesse gene (17). No ano seguinte (2013) um grupo de pesquisa japonês havia publicado o relato de um caso de paciente com mutação no gene *NNT*, porém nessa publicação não foi apresentado nenhum estudo funcional (17, 21).

Em nossa análise por meio do WES, entre diversas variantes gênicas com potencial patogênico, encontramos a variante p.G866D em homozigose no gene *NNT*. Decidimos priorizar o estudo dessa variante, em detrimento das outras quatro candidatas em função da plausibilidade biológica e pelo relato recente de pacientes com DFG causados por defeitos nesse gene.

A nova variante encontrada consiste na troca do nucleotídeo guanina pela adenina na posição 2.597 do cDNA do *NNT* (c.2597G>A). Essa mudança resulta na troca do aminoácido glicina pelo ácido aspártico na posição 866 da proteína (p.G866D). A análise de segregação familiar confirmou a segregação dessa variante em homozigose com o fenótipo de DFG, enquanto que os pais e o irmão mais jovem, todos assintomáticos, são heterozigotos. A anamnese revelou que os pais são consanguíneos, sendo primos em segundo grau. Aparentemente não há outros semelhantes na família. O paciente e sua família residem em cidade próxima ao HC-FMRP-USP porém os demais familiares residem na região norte do estado de Minas Gerais e não foi possível investiga-los.

A proteína *NNT* tem grande importância na desintoxicação de níveis de EROs (17, 27). Esse fato foi comprovado no presente estudo ao demonstrarmos aumento significativo de EROs no homozigoto mutante *NNT* p.G866D quando comparado ao nativo. Essa diferença foi observada tanto no estado basal como após a indução de estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio. Dados semelhantes já haviam sido apresentados por Meirimadou *et al* que observaram um aumento em EROs na linhagem tumoral adrenocortical H295 após silenciamento do gene *NNT* (17, 23) e Weinberg-Shukron *et al* que observaram um aumento de EROs em fibroblastos obtidos de paciente com a variante p.G200S em *NNT* (Weinberg-Shukron *et al.*, 2015). Este acúmulo de EROs observados nesses três estudos independentes confirma a redução no potencial redox em células com mutações inativadoras ou com KO do gene *NNT*. Esse comprometimento funcional incluindo o aumento de EROs e os demais parâmetros discutidos a seguir não se deve à redução na quantidade de RNAm do mutante *NNT* p.G866D. Como demonstrado pelos experimentos de qPCR, não houve diferença no perfil de expressão gênica entre o gene mutante e o gene nativo.

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial mostrou que este é significativamente menor no mutante *NNT* p.G866D em homozigose do que àquele observado no controle normal. Essa redução foi observada tanto no estado basal quanto após indução de estresse oxidativo com H₂O₂.

A proteína NNT é responsável por transportar o íon H^+ para o interior da mitocôndria, sendo esse íon essencial para a síntese de NADPH. Dessa forma, a alteração dessa função pode prejudicar diretamente a razão da concentração de GSH/GSSG. No presente estudo também avaliamos a atividade da GSH no controle, nos heterozigotos e no homozigoto para a variante. Em condições basais, observamos que nas células do homozigoto a produção de GSH foi significativamente menor que no controle e no heterozigoto. Porém, entre esses últimos essa diferença não foi observada. Por outro lado, quando submetidas a estresse oxidativo, também as células dos heterozigotos apresentavam GSH significativamente menor que nos controles. Aparentemente, não há significado clínico nessa diferença entre heterozigotos e controle pois tanto os pais quanto o irmão são clinicamente assintomáticos. Meirimadou e colaboradores mostraram uma redução na relação GSH/GSSG em células adrenais H295 após silenciamento de *NNT* (17). Este dados demonstram que o acúmulo de EROs ocorre por ineficiência do sistema da glutathiona.

Em condição basal, as concentrações de ATP das células mononucleares com a alteração p.G866D em homozigose foram semelhantes às nativas. Porém, quando submetidas a estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio verificou-se redução acentuada no mutante. *Weinberg-Shukron et al* relataram uma diminuição de 25% nos níveis de ATP em fibroblastos com a alteração p.G200S em condições basais. É interessante ressaltar que o paciente portador da alteração p.G200S apresenta deficiência tanto de mineralocorticoide quanto de glicocorticoide. Uma explicação possível para essa diferença clínica entre esse paciente e o paciente do presente estudo reside no fato de que a mutação NNT p.G200S ocorre no domínio NADPH e, provavelmente, resulte num quadro mais severo de insuficiência adrenal. Já a alteração p.G866D esta localizada em um dos domínios transmembrana, o que talvez resulte em comprometimento funcional um pouco mais brando.

Em síntese, os dados obtidos na análise de células mononucleares sanguíneas com a variante p.G866D demonstram claramente uma diminuição na função da proteína NNT, o que resultaria no comprometimento da função mitocondrial com consequente deficiência do sistema antioxidante. O processo de geração de energia em forma de ATP e processos de alto consumo metabólico, como ocorre no processo de esteroidogênese adrenal geram grandes quantidades de EROs (27). Quando a taxa de produção de EROs na célula excede significativamente a sua taxa de neutralização pelos sistemas antioxidantes, a célula sofre

estresse oxidativo. Se Prolongado, o estresse oxidativo pode levar ao comprometimento de funções celulares e à morte celular (43).

Para avaliar a capacidade de resposta dessas células a situações onde ocorre a produção de maiores quantidades de EROs, mimetizamos uma situação de estresse oxidativo, pela adição de 100 μ M de H₂O₂ à cultura das células mononucleares durante cinco horas. A análise da atividade mitocondrial após a indução desse estresse oxidativo mostrou redução importante da atividade mitocondrial do caso índice portador da variante NNT p.G866D em homozigose, redução esta maior do que a observada em situação basal. A concentração de EROs também aumentou ainda mais do que havia sido observado em situações basais pois as células do caso índice homozigoto da p.G866D quando submetido a este estresse tiveram aumento ainda mais significativo de EROs quando comparado ao nativo.

A indução de um quadro de estresse oxidativo por adição de 100 μ M de H₂O₂ por cinco horas às células mononucleadas sanguíneas com a variante p.G866D mostra que o homozigoto tem a resposta ao estresse mais comprometida quando comparado ao controle e ao heterozigoto. Para realizar a degradação do peróxido intramitocondrial, gerado naturalmente durante determinadas funções celulares, a GSH é oxidada e transformada em GSSG, a qual que é subsequentemente regenerada em GSH utilizando NADPH como cofator (28). A razão adequada entre GSH/GSSG tem que ser mantida para se garantir o equilíbrio homeostático do sistema redox. Para manter o equilíbrio homeostático uma nova síntese do tripeptídeo GSH é recrutada e este mecanismo demanda gasto de energia, ou seja, de ATP. Nossos resultados indicam aumento do consumo de GSH por provável ineficiência da regeneração da GSH em GSSG, caracterizando uma falha no sistema antioxidante. A redução do ATP ao induzirmos o estresse oxidativo, observada no presente estudo, confirma a deficiência no sistema redox. Nosso experimento avaliando a morte celular por apoptose demonstram que as células do homozigoto parecem sofrer exaustão desse sistema quando o estresse oxidativo é induzido, provocando aumento no número de células em apoptose tardia e necrose quando comparado ao nativo.

Do ponto de vista clínico, o caso índice também foi avaliado quanto ao possível comprometimento do seu sistema cardiovascular pois Bainbridge et al descreveram a associação da variante c.638_639insT no gene *NNT* com alterações cardíacas em alguns de seus pacientes, notadamente defeitos de compactação ventricular. Naquele estudo essa associação foi confirmada em modelo animal com peixe paulistinha (*Zebrafish*). Os dados mostraram

que a proteína NNT está relacionada com a proliferação de cardiomiócitos e sua haploinsuficiência resultou em mal formação ventricular (24). Entretanto, no presente estudo o caso índice não apresentou comprometimento cardiovascular. Uma possível explicação para essa diferença fenotípica em relação ao sistema cardiovascular entre nosso paciente e o paciente descrito por Bainbridge *et al* reside no tipo de defeito gênico. A variante do nosso paciente, NNT p.G866D resulta na troca de apenas um aminoácido, enquanto que a descrita por Bainbridge *et al*. causa um erro no quadro de leitura gênica pela inserção de uma timina, com comprometimento funcional provavelmente total. É interessante observar que o paciente descrito por Bainbridge *et al* não apresentava fenótipo adrenal significativo. Pelo menos não há descrição desse dado. Da mesma forma, até o presente, em nenhum dos pacientes com fenótipo de DGF foi descrita com alteração cardíaca (44). As razões dessa variabilidade fenotípica ainda precisa ser esclarecida.

Outro fenótipo associado a alterações na proteína NNT é a presença de restos adrenais nos testículos e puberdade precoce. O paciente que apresentou esta alteração tinha 20 anos na época desse achado e era carreador da variante NNT p.Y388S (45). Em nosso estudo, o caso índice não apresenta vestígios tumorais porém ainda se encontra na fase pré-puberal. Esse é mais um dos cuidados clínicos prospectivos que deverá ser tomado durante o seu seguimento clínico. Uma questão que emerge é como será o funcionamento gonadal em nosso paciente. É possível que o processo de esteroidogênese testicular também gera estresse oxidativo e, ao entrar na puberdade esse processo de dano celular observado nas adrenais também aconteça. Ainda não há resposta para essa pergunta. O estudo *in vitro* dessa variante em linhagens celulares adrenais poderia ser útil e pode ser pensado para etapas futura. Entretanto, sabemos que na vida intrauterina as gônadas masculinas estão em intensa atividade esteroidogênica e secretam quantidades importantes de testosterona. Podemos inferir que esse processo não foi afetado durante esse fase de mini-puberdade em nosso paciente, pois o mesmo apresenta genitais externos masculinos sem ambiguidade genital ou micropênis, o que poderia ter acontecido no caso de deficiência testicular importante.

Ainda, dado ponto de vista adrenal também existem várias interrogações que precisam ser esclarecidas em estudo futuros. Acreditamos que a observação longitudinal de nosso paciente pode contribuir. Uma primeira dúvida é sobre o comprometimento ou não da camada reticular pela deficiência do sistema antioxidante causada por mutação no *NNT*. A observação

laboratorial seriada das concentrações de DHEA-S no nosso pacientes será bem informativa sobre o fenômeno da adrenarca e função reticular.

Outro ponto de interrogação é por que, na grande maioria dos pacientes, a camada glomerulosa e, conseqüentemente, a secreção de aldosterona não é comprometida. Em nosso paciente, embora algumas medidas da atividade de renina plasmática estivessem ligeiramente acima do limite da normalidade não houve progressão e atualmente as concentrações de renina plasmáticas estão dentro da normalidade, sugerindo função normal da zona glomerulosa. No futuro, planejamos conseguir um modelo com células adrenais humanas carreadora da mutações em ponto no gene *NNT* para avaliar a função dessa proteína sobre a esteroidogênese adrenal de modo mais abrangente.

A proteína NNT é expressa na membrana interna da mitocôndria e está presente em diferentes tecidos, como pode se perceber na análise do painel tecidual de expressão do gene NNT em diferentes tecidos humanos (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NNT>). Baseado nesses dados é realmente intrigante que um defeito funcional no NNT tão importante como o que comprovamos nos nossos estudos *in vitro* apresente com fenótipo restrito a um determinado tecido, no caso a adrenal. Além do presente estudo, dois outros grupos realizaram estudos funcionais dos mutante, seja em fibroblastos (23) ou em linfócitos como no presente estudo (22). É interessante notar que, mesmo havendo comprometimento da função antioxidante nos linfócitos esse paciente não apresenta anormalidade no sistema imune. É possível, como discutido anteriormente, apenas em tecidos com grande produção de EROs, como ocorre durante a esteroidogênese adrenal, essa falha se torne evidente. Por outro lado, também é possível que em outros tecidos exista um sistema de redundância funcional complementar, o que não existiria no córtex adrenal. Uma forma de avaliar melhor esse ponto seria a geração de animais transgênicos com a mutação observada em nosso paciente e/ou nos demais poucos pacientes relatados até o momento.

Em síntese, nossos dados demonstram claramente a segregação da nova variante p.G866D do *NNT* em homozigose com o fenótipo de DFG, sendo que os heterozigotos avaliados são assintomáticos. A expressão do *NNT* RNAm foi semelhante entre paciente, heterozigotos e controles em células mononucleadas. Esses dados demonstram que as alterações observadas no paciente e no estudo *in vitro* descrito a seguir não se devem redução quantitativa do RNAm do *NNT*. *In vitro*, a variante homozigótica NNT p.G866D causa aumento na produção de EROs, diminuição de GSH e diminuição da atividade mitocondrial, tanto em condições basais, quanto

após a indução de estresse oxidativo. Além disso, sob condições de estresse oxidativo aumentado, as concentrações de ATP estão reduzidas no homozigoto. O mutante homozigoto NNT p.G866D reduz significativamente os mecanismos de defesas antioxidantes, comprometendo o sistema da glutathione redutase, levando ao acúmulo de EROs e a consequente redução da síntese de cortisol pela camada fasciculada adrenal. Portanto, este estudo confirma a associação da variante NNT p.G866D em homozigose com o fenótipo de DFG Tipo 4.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

A relação Genótipo-Fenótipo da variante NNT p.G866D foi confirmada. O fenótipo de DFG segrega com esse variante em homozigose. Portadores em heterozigose não apresentam alterações clínicas ou bioquímicas da doença.

In vitro, a variante NNT p.G866D compromete a resposta ao estresse oxidativo na mitocôndria: na cultura primária de células mononucleares sanguíneas do caso índice homozigoto a avaliação dos parâmetros mitocondriais evidenciou a redução na atividade mitocondrial, redução nos níveis de GSH e aumento de EROs em condições basais em células com a alteração mutação p.G866D. Após a indução de estresse oxidativo as células portadoras dessa variante apresentaram ainda uma importante redução nos níveis de ATP e um aumento na taxa de células em morte celular.

Referências

7. REFERÊNCIAS

1. Antonini SRR, Gomes DC. Insuficiência Adrenal: Diagnóstico e Tratamento
In: Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia - Editora Pleno SEMCAD/SESCAD APL, editor. Proendócrino
2013. p. 9.
2. Arlt W, Allolio B. Adrenal insufficiency. *Lancet*. 2003 May 31;361(9372):1881-93.
3. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer GD, et al. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015 2016/02/01;101(2):364-89.
4. Løvås K, Husebye ES. Addison's disease. *The Lancet*. 2005;365(9476):2058-61.
5. Castro M, Elias LL. Insuficiência adrenal crônica e aguda. *Medicina (Ribeirao Preto Online)*. 2003;36(2/4):375-9.
6. do Carmo Silva R. Insuficiência adrenal primária no adulto: 150 anos depois de Addison. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004;48(5).
7. Uçar A, Baş F, Saka N. Diagnosis and management of pediatric adrenal insufficiency. *World Journal of Pediatrics*. 2016 2016//;12(3):261-74.
8. Webb EA, Krone N. Current and novel approaches to children and young people with congenital adrenal hyperplasia and adrenal insufficiency. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015;29(3):449-68.
9. Park J, Didi M, Blair J. The diagnosis and treatment of adrenal insufficiency during childhood and adolescence. *Archives of Disease in Childhood*. 2016 April 15, 2016.
10. Chan LF, Clark AJL, Metherell LA. Familial Glucocorticoid Deficiency: Advances in the Molecular Understanding of ACTH Action. *Hormone Research in Paediatrics*. 2008;69(2):75-82.
11. SHEPARD TH, LANDING BH, MASON DG. Familial Addison's disease: case reports of two sisters with corticoid deficiency unassociated with hypoaldosteronism. *AMA journal of diseases of children*. 1959;97(2):154-62.
12. Miller WL, Auchus RJ. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*. 2011;32(1):81-151.
13. Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Ruschendorf F, et al. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet*. [10.1038/ng1501]. 2005;37(2):166-70.
14. Collares CVA, Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, Franca SN, Pereira LA, Soares MMS, et al. Heterogeneity in the molecular basis of ACTH resistance syndrome. *European Journal of Endocrinology*. 2008 July 1, 2008;159(1):61-8.
15. Génin E, Huebner A, Jaillard C, Faure A, Halaby G, Saka N, et al. Linkage of one gene for familial glucocorticoid deficiency type 2 (FGD2) to chromosome 8q and further evidence of heterogeneity. *Human Genetics*. [journal article]. 2002;111(4):428-34.
16. Meimaridou E, Hughes CR, Kowalczyk J, Guasti L, Chapple JP, King PJ, et al. Familial glucocorticoid deficiency: New genes and mechanisms. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013;371(1-2):195-200.
17. Meimaridou E, Kowalczyk J, Guasti L, Hughes CR, Wagner F, Frommolt P, et al. Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nat Genet*. [10.1038/ng.2299]. 2012;44(7):740-2.

18. Rathil Prasad LFC, Claire R. Hughes , Juan P. Kaski , Julia C. Kowalczyk , Martin O. Savage , Catherine J. Peters , Nisha Nathwani , Adrian J. L. Clark , Helen L. Storr , and Louise A. Metherell Thioredoxin Reductase 2 (TXNRD2) Mutation Associated With Familial Glucocorticoid Deficiency (FGD). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(8):E1556-E63.
19. Louise A. Metherell DN, George Halaby, Martine Begeot, Angela Huebner, Gudrun Nürnberg, Peter Nürnberg, Jane Green, Jeremy W. Tomlinson, Nils P. Krone, Lin Lin, Michael Racine, Dan M. Berney, John C. Achermann, Wiebke Arlt, and Adrian J. L. Clark. Nonclassic Lipoid Congenital Adrenal Hyperplasia Masquerading as Familial Glucocorticoid Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(10):3865-71.
20. Metherell LA, Guerra-Assunção JA, Sternberg MJ, David A. Three-Dimensional Model of Human Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (NNT) and Sequence-Structure Analysis of its Disease-Causing Variations. *Human Mutation*. 2016;37(10):1074-84.
21. Yamaguchi R, Kato F, Hasegawa T, Katsumata N, Fukami M, Matsui T, et al. A novel homozygous mutation of the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene in a Japanese patient with familial glucocorticoid deficiency. *Endocrine Journal*. 2013;60(7):855-9.
22. Fujisawa Y, Napoli E, Wong S, Song G, Yamaguchi R, Matsui T, et al. Impact of a novel homozygous mutation in nicotinamide nucleotide transhydrogenase on mitochondrial DNA integrity in a case of familial glucocorticoid deficiency. *BBA Clinical*. 2015;3:70-8.
23. Weinberg-Shukron A, Abu-Libdeh A, Zhadeh F, Carmel L, Kogot-Levin A, Kamal L, et al. Combined mineralocorticoid and glucocorticoid deficiency is caused by a novel founder nicotinamide nucleotide transhydrogenase mutation that alters mitochondrial morphology and increases oxidative stress. *Journal of Medical Genetics*. 2015 June 12, 2015.
24. Bainbridge MN, Davis EE, Choi W-Y, Dickson A, Martinez HR, Wang M, et al. Loss of Function Mutations in NNT Are Associated with Left Ventricular Noncompaction. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2015 May 29, 2015.
25. Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular Signalling*. 2002;14(11):879-97.
26. Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Artemed, editor 2011.
27. Prasad R, Kowalczyk JC, Meimaridou E, Storr HL, Metherell LA. Oxidative stress and adrenocortical insufficiency. *The Journal of Endocrinology*. 2014;221(3):R63-R73.
28. Haddad JJ. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;316(4):969-77.
29. Diemer T, Allen JA, Hales KH, Hales DB. Reactive Oxygen Disrupts Mitochondria in MA-10 Tumor Leydig Cells and Inhibits Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Protein and Steroidogenesis. *Endocrinology*. 2003;144(7):2882-91.
30. Zhao Y, Ao H, Chen L, Sottas CM, Ge R-s, Li L, et al. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate affects the steroidogenesis in rat Leydig cells through provoking ROS perturbation. *Toxicology in Vitro*. 2012;26(6):950-5.
31. Hales DB, Allen JA, Shankara T, Janus P, Buck S, Diemer T, et al. Mitochondrial Function in Leydig Cell Steroidogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1061(1):120-34.
32. Picard M, McManus MJ, Gray JD, Nasca C, Moffat C, Kopinski PK, et al. Mitochondrial functions modulate neuroendocrine, metabolic, inflammatory, and transcriptional responses to acute psychological stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015 December 1, 2015;112(48):E6614-E23.
33. Schultz DW, Klein ML, Humpert AJ, Luzier CW, Persun V, Schain M, et al. Analysis of the ARMD1 locus: evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related

- macular degeneration in a large family. *Human Molecular Genetics*. 2003 December 15, 2003;12(24):3315-23.
34. Wigg KG, Feng Y, Crosbie J, Tannock R, Kennedy JL, Ickowicz A, et al. Association of ADHD and the Protogenin gene in the chromosome 15q21.3 reading disabilities linkage region. *Genes, Brain and Behavior*. 2008;7(8):877-86.
 35. Wu L, Goldstein AM, Yu K, Yang XR, Rabe KG, Arslan AA, et al. Variants Associated with Susceptibility to Pancreatic Cancer and Melanoma Do Not Reciprocally Affect Risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2014;23(6):1121-4.
 36. Mahajan MA, Samuels HH. Nuclear receptor coactivator/coregulator NCoA6(NRC) is a pleiotropic coregulator involved in transcription, cell survival, growth and development. *Nuclear Receptor Signaling*. 2008;6:e002.
 37. Meimaridou E, Kowalczyk J, Guasti L, Hughes CR, Wagner F, Frommolt P, et al. Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nat Genet*. 2012 Jul;44(7):740-2.
 38. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*. 2001;25(4):402-8.
 39. Yamaguchi M, Stout CD. Essential glycine in the proton channel of *Escherichia coli* transhydrogenase. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14;278(46):45333-9.
 40. de Bruin C, Dauber A. Insights from exome sequencing for endocrine disorders. *Nat Rev Endocrinol*. [Review]. 2015;11(8):455-64.
 41. Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD, Fu W, Kenny EE, Gravel S, et al. Evolution and Functional Impact of Rare Coding Variation from Deep Sequencing of Human Exomes. *Science (New York, NY)*. 2012;337(6090):64-9.
 42. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*. [10.1038/nrg3031]. 2011;12(11):745-55.
 43. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:1245049.
 44. Roucher-Boulez F, Mallet-Motak D, Samara-Boustani D, Jilani H, Ladjouze A, Souchon P-F, et al. NNT mutations: a cause of primary adrenal insufficiency, oxidative stress and extra-adrenal defects. *European Journal of Endocrinology*. 2016 July 1, 2016;175(1):73-84.
 45. Hershkovitz E, Arafat M, Loewenthal N, Haim A, Parvari R. Combined adrenal failure and testicular adrenal rest tumor in a patient with nicotinamide nucleotide transhydrogenase deficiency. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2015. p. 1187.

Anexas

ANEXOS

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP Aprovado

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização Fenotípica e Funcional da Nova Mutação p.G866D na Proteína Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT) em paciente com Deficiência Familiar de Glicocorticoide

Pesquisador: Aline Faccioli Bodoni

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46833115.4.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.428.432

Apresentação do Projeto:

CONTEXTO: Entre as causas de insuficiência adrenal primária congênita que ocorrem em crianças está a deficiência familiar de glicocorticoide (DFG). Nesta condição há deficiência importante na produção de glicocorticoides (cortisol) na zona fasciculada adrenal, porém a função da zona glomerulosa produção (aldosterona) não é afetada. Pacientes com DFG tipicamente apresentam episódios de hipoglicemia grave, hipotensão arterial e choque nos primeiros meses ou anos de vida. A DFG pode ser causada por mutações no genes MC2R, MRAP e recentemente foram descritos alguns pacientes com mutações nos genes MCM4, TXNRD2 e NNT.

OBJETIVOS, INDIVÍDUOS E MÉTODOS: confirmar a relação genótipo-fenótipo por meio da caracterização funcional da nova variante p.G866D

(c.2597G>A) do gene Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT), detectada por meio de Sequenciamento exômico em um menino com DFG clássica diagnosticado aos 18 meses de vida. Além do paciente, carreador em homozigose, avaliaremos seus pais e irmão, heterozigotos para esta variante. O gene nuclear NNT codifica uma proteína integral que se localiza no interior da membrana mitocondrial e é de importância fundamental na regulação dos níveis de oxigênio reativo. Avaliaremos a atividade da proteína NNT mutante inicialmente em culturas transitórias de leucócitos obtidos do paciente, carreadores e controles não-carreadores. Recriaremos in vitro, em

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.428.432

modelo de transfecção permanente da variante NNT p.G866D em células adrenais humanas imortalizadas (H295) por meio do sistema CRISP/CAS 9 de edição de DNA. Nestes dois modelos avaliaremos o efeito desta variante sobre a expressão gênica (qPCR) e proteica (western blot), a atividade mitocondrial e estresse oxidativo por análise das espécies reativas de oxigênio (EROs), ATP celular, da glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG).

IMPORTÂNCIA DO ESTUDO: confirmar a relação genótipo-fenótipo no paciente afetado e avaliar de forma inédita a atividade da proteína NNT mutada por meio de estudos em leucócitos de pacientes e por avaliação funcional em células H295R.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a relação genótipo – fenótipo em paciente com DFG carreador da nova variante NNT p.G866D .

Objetivo Secundário:

Na cultura primária de linfócitos do caso índice homozigoto, seus familiares heterozigotos e controles (NNT nativo) avaliar a atividade mitocondrial e o estresse oxidativo por ensaios de EROs, ATP celular, glutatona e glutatona oxidada e a expressão de RNAm e proteica do NNT.

Construir um modelo knockout do gene NNT na linhagem H295R.

Efetuar o processo de mutagênese, inserindo a mutação p.G866D na linhagem H295R NNT- knockout (H295R KO) utilizando a nova ferramenta CRISPR-Cas9.

Avaliar a expressão de RNAm, a expressão proteica, a atividade mitocondrial e o estresse oxidativo por ensaios de EROs, ATP celular, glutatona e glutatona oxidada e a capacidade de produção de esteroides adrenais na linhagem celular H295R NNT KO, H295R NNT KO transfectada com pFN21A+WT e H295R NNT KO transfectada com pFN21A + p.G866D.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos para os pacientes estão relacionados ao procedimento de coleta de sangue periférico total que poderá causar um leve desconforto (dor) e raramente hematomas no local da punção, pois se trata de um procedimento realizado rotineiramente em nosso serviço. Outros problemas eventuais decorrentes deste procedimento, como infecção no local da coleta são muito raros.

Benefícios: O estudo visa esclarecer a causa biológica da deficiência na produção de glicocorticoides (cortisol) pela zona fasciculada adrenal e sua relação com a mutação p.G866D. No futuro, este estudo poderá ajudar a melhorar o tratamento de pacientes com Deficiência Familiar

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 1.428.432

de Glicocorticóide.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa que pretende avaliar a atividade da proteína NNT mutante, em culturas transitórias de leucócitos obtidos do paciente, carreadores e controles não-carreadores. De acordo com os pesquisadores responsáveis: "Neste avaliaremos o efeito da variante NNT p.G866D sobre a expressão gênica (qPCR), expressão proteica (western blot), a atividade mitocondrial e estresse oxidativo por meio da análise das espécies reativas de oxigênio (EROs) e mensuração do conteúdo de ATP celular, de glutatona reduzida (GSH) e de glutatona oxidada (GSSG). Em linhagem celular imortalizada H295 será realizado o nocaute do gene NNT, será inserido um vetor contendo o gene NNT com a mutação p.G866D e nesse modelo será avaliado a expressão gênica (qPCR), expressão proteica (western blot), a atividade mitocondrial e estresse oxidativo por meio da análise das espécies reativas de oxigênio (EROs) e mensuração do conteúdo de ATP celular, de glutatona reduzida (GSH) e de glutatona oxidada (GSSG)."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Presente projeto de pesquisa foi anteriormente analisado e considerado em pendência de acordo com o parecer anterior, emitido em 05/08/2015. Em 24/11/2015 os pesquisadores reencaminharam os documentos para análise com as alterações necessárias.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 2 13/11/15; assim como o Termo de Consentimento pais do paciente-versão 1 de 13/11/15; o Termo de Consentimento Controles-versão 1 de 13/11/15; o Termo de Assentimento paciente-versão 1 de 13/11/15; e o Termo de Assentimento para Irmão do paciente-versão 1 de 13/11/15, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.428.432

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_479015.pdf	24/11/2015 15:51:33		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	SAR_Projeto_NNT-versao_2_.docx	24/11/2015 14:48:50	Aline Faccioli Bodoni	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	13/11/2015 09:59:48	Aline Faccioli Bodoni	Aceito
Outros	Resposta_CEP_Nov_2015.docx	13/11/2015 09:56:27	Aline Faccioli Bodoni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SRA_Termo_de_consentimento_pais.docx	13/11/2015 09:55:30	Aline Faccioli Bodoni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SRA_Termo_de_consentimento_controles.docx	13/11/2015 09:55:09	Aline Faccioli Bodoni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SRA_Termo_de_Assentimento_PACIENTE.docx	13/11/2015 09:54:54	Aline Faccioli Bodoni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SRA_Termo_de_Assentimento_IRMAO_do_paciente.docx	13/11/2015 09:54:38	Aline Faccioli Bodoni	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 29 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador)

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido – Controles
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: Caracterização Fenotípica e Funcional da Nova Mutação p.G866D na Proteína *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase* (NNT) em paciente com Deficiência Familiar de Glicocorticoide.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini e Aline Faccioli Bodoni.
Departamento de Puericultura e Pediatria – FMRP-USP

INFORMAÇÕES AOS INDIVÍDUOS DA PESQUISA:

Essa pesquisa busca entender se uma alteração no DNA pode causar deficiência na produção de hormônios em uma glândula chamada adrenal.

Pedimos sua autorização para participar desta pesquisa.

O objetivo de nosso trabalho é esclarecer a causa biológica de uma alteração hormonal, para tanto precisamos de uma amostra sua de sangue periférico total. A partir desta amostra separaremos os leucócitos (células brancas do sangue) e então analisaremos o funcionamento de estruturas celulares chamadas mitocôndrias.

O procedimento de coleta de sangue periférico total poderá causar um leve desconforto (dor) e raramente hematomas no local da punção, pois se trata de um procedimento realizado rotineiramente em nosso serviço. Outros problemas eventuais decorrentes deste procedimento, como infecção no local da coleta são muito raros.

Se você aceitar participar, todas as dúvidas sobre a pesquisa serão respondidas. Caso você não queira participar ou queira desistir durante a pesquisa, não haverá nenhum problema. Você não terá nenhum gasto com essa pesquisa, tendo garantido o sigilo dos dados pessoais utilizados. Você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas por você e o pesquisador responsável. Os resultados obtidos neste estudo serão publicados para ajudar outros pacientes no futuro. No futuro, este estudo poderá ajudar a melhorar o tratamento de pacientes com Deficiência Familiar de Glicocorticoide.

Meu telefone é (16) 3602-2936 e celular é (14) 997685624 e você poderá me ligar a qualquer hora para tirar suas dúvidas.

O contato do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é (16) 3602-2228 e você poderá entrar em contato para dúvidas éticas.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Abaixo assinado, tendo sido esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “Caracterização Fenotípica e Funcional da Nova Mutação p.G866D na Proteína *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase* (NNT) em paciente com Deficiência Familiar de Glicocorticoide”, que tem como pesquisadores responsáveis Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini, registro no CREMESP nº 71.837 e CPF: 517665660-49 e Aline Faccioli Bodoni e registro no CRF nº 66829 e CPF: 368888518-00 declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida durante a realização do estudo;
- A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
- O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, mesmo que essa possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
- O compromisso de que serei devidamente acompanhado durante todo o período de minha participação no projeto e após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

ASSINATURAS

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido (ou se ele tiver sido explicado para você) e tiver entendido a informação, e concorda voluntariamente em participar deste estudo, por favor assine abaixo:

Data

Nome do Paciente: _____

Assinatura: _____

Data

Nome do Pesquisador _____

Assinatura _____

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecidos – Familiares do sujeito de pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: Caracterização Fenotípica e Funcional da Nova Mutação p.G866D na Proteína *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase* (NNT) em paciente com Deficiência Familiar de Glicocorticoide.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini e Aline Faccioli Bodoni
Departamento de Puericultura e Pediatria – FMRP-USP

INFORMAÇÕES AOS INDIVÍDUOS DA PESQUISA:

Seu filho tem uma alteração na produção de hormônios em uma glândula chamada adrenal. Esta alteração pode ser causada por uma modificação no DNA.

Pedimos sua autorização para participar desta pesquisa.

O objetivo de nosso trabalho é esclarecer a causa biológica da alteração hormonal que ele possui, para tanto precisamos de uma amostra sua de sangue periférico total. A partir desta amostra separaremos os leucócitos (células brancas do sangue) e então analisaremos o funcionamento de estruturas celulares chamadas mitocôndrias.

O procedimento de coleta de sangue periférico total poderá causar um leve desconforto (dor) e raramente hematomas no local da punção, pois se trata de um procedimento realizado rotineiramente em nosso serviço. Outros problemas eventuais decorrentes deste procedimento, como infecção no local da coleta são muito raros.

Se você aceitar participar, todas as dúvidas sobre a pesquisa serão respondidas. Caso você não queira participar ou queira desistir durante a pesquisa, não haverá nenhum problema no acompanhamento e tratamento de seu filho, este continuará da mesma forma, no nosso serviço, sem prejuízo ao seu cuidado. Você não terá nenhum gasto com essa pesquisa, tendo garantido o sigilo dos dados pessoais utilizados. Você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas por você e o pesquisador responsável. Os resultados obtidos neste estudo serão publicados para ajudar outros pacientes no futuro. Os resultados desta pesquisa não mudarão o acompanhamento do caso de seu filho. Entretanto, no futuro, este estudo poderá ajudar a melhorar o tratamento de pacientes com Deficiência Familiar de Glicocorticoide.

Meu telefone é (16) 3602-2936 e celular é (14) 997685624 e você poderá me ligar a qualquer hora para tirar suas dúvidas.

O contato do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é (16) 3602-2228 e você poderá entrar em contato para dúvidas éticas.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Abaixo assinado, tendo sido esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “Caracterização Fenotípica e Funcional da Nova Mutação p.G866D na Proteína *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase* (NNT) em paciente com Deficiência Familiar de Glicocorticoide”, que tem como pesquisadores responsáveis Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini, registro no CREMESP nº 71.837 e CPF: 517665660-49 e Aline Faccioli Bodoni e registro no CRF nº 66829 e CPF: 368888518-00 declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida durante a realização do estudo;
- A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
- O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, mesmo que essa possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
- O compromisso de que serei devidamente acompanhado durante todo o período de minha participação no projeto e após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

ASSINATURAS

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido (ou se ele tiver sido explicado para você) e tiver entendido a informação, e concorda voluntariamente em participar deste estudo, por favor assine abaixo:

Data

Nome do Paciente: _____

Assinatura: _____

Data

Nome do Pesquisador _____

Assinatura _____

ANEXO D – Termo de assentimento livre e esclarecidos – Sujeito de pesquisa.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

NOME DA PESQUISA: Caracterização Fenotípica e Funcional da Nova Mutação p.G866D na Proteína *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase* (NNT) em paciente com Deficiência Familiar de Glicocorticoide.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini e Aline Faccioli Bodoni.
Departamento de Puericultura e Pediatria – FMRP-USP

INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA 8 ANOS**O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU RESOLVER PARTICIPAR DO ESTUDO?**

Seu medico irá examinar você.

Você precisará colher sangue e vai sentir apenas o desconforto da picadinha da agulha, que é bem rápido. Seu braço poderá ficar roxo e dolorido, mas isso é difícil de acontecer.

O QUE ACONTECERÁ DEPOIS?

Você tem uma alteração na produção de hormônios em uma glândula chamada Adrenal que fica dentro da sua barriga, perto do seu rim. Esta alteração pode ser causada por uma modificação em seu DNA. Se você concordar com o estudo, seu sangue será utilizado para fazer pesquisas que poderão ajudar outras crianças com o mesmo problema.

Você esta sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é pesquisar alterações no seu gene (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas) que pode estar envolvido na produção de hormônios. A participação neste é voluntaria (não obrigatória) e o seu tratamento será realizado mesmo que você ou seus responsáveis legais decidam não participar da pesquisa. Seus pais não terão nenhum gasto com essa pesquisa, sigilo dos dados pessoais esta garantido. Você receberá uma via deste termo, assinado e rubricado em todas as páginas. Meu telefone é (16) 3602-2936 e meu celular (14) 99685624 e você poderá me ligar a qualquer hora para tirar suas dúvidas. O contato do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é (16) 3602-2228 e você poderá entrar em contato para dúvidas éticas.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

_____, abaixo assinado, tendo sido esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “Caracterização Fenotípica e Funcional da Nova Mutação p.G866D na Proteína *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase* (NNT) em paciente com Deficiência Familiar de Glicocorticoide”, que tem como pesquisadores responsáveis Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini, registro no CREMESP nº 71.837 e CPF: 517665660-49 e Aline Faccioli Bodoni e registro no CRF nº 66829 e CPF: 368888518-00 declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida durante a realização do estudo;
- A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade;
- O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, mesmo que essa possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
- O compromisso de que serei devidamente acompanhado durante todo o período de minha participação no projeto e após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

ASSINATURAS

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido (ou se ele tiver sido explicado para você) e tiver entendido a informação, e concorda voluntariamente em participar deste estudo, por favor assine abaixo:

Data

Nome do Paciente: _____

Assinatura: _____

Data

Nome do Responsável : _____

Assinatura: _____

Data

Nome do Pesquisador _____

Assinatura _____

ANEXO E – Termo de assentimento livre e esclarecidos – Irmão do sujeito de pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: Caracterização Fenotípica e Funcional da Nova Mutação p.G866D na Proteína *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase* (NNT) em paciente com Deficiência Familiar de Glicocorticoide.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini e Aline Faccioli Bodoni.
Departamento de Puericultura e Pediatria – FMRP-USP

INFORMAÇÕES AO IRMÃO DO SUJEITO DE PESQUISA 6 ANOS

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU RESOLVER PARTICIPAR DO ESTUDO?

O medico irá examinar você.

Você precisará colher sangue e vai sentir apenas o desconforto da picadinha da agulha, que é bem rápido. Seu braço poderá ficar roxo e dolorido, mas isso é difícil de acontecer.

O QUE ACONTECERÁ DEPOIS?

Seu irmão tem uma alteração na produção de hormônios em uma glândula chamada Adrenal que fica dentro da barriga, perto do rim. Esta alteração pode ser causada por uma modificação no DNA. Se você concordar com o estudo, seu sangue será utilizado para fazer pesquisas que poderão ajudar outras crianças com o mesmo problema.

Você esta sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é pesquisar alterações no seu gene (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas) que pode estar envolvido na produção de hormônios. A participação neste é voluntaria (não obrigatória) e o seu tratamento será realizado mesmo que você ou seus responsáveis legais decidam não participar da pesquisa. Seus pais não terão nenhum gasto com essa pesquisa, sigilo dos dados pessoais esta garantido. Você receberá uma via deste termo, assinado e rubricado em todas as páginas. Meu telefone é (16) 3602-2936 e meu celular (14) 99685624 e você poderá me ligar a qualquer hora para tirar suas dúvidas. O contato do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é (16) 3602-2228 e você poderá entrar em contato para dúvidas éticas.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

_____, abaixo assinado, tendo sido esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “Caracterização Fenotípica e Funcional da Nova Mutação p.G866D na Proteína *Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase* (NNT) em paciente com Deficiência Familiar de Glicocorticoide”, que tem como pesquisadores responsáveis Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini, registro no CREMESP nº 71.837 e CPF: 517665660-49 e Aline Faccioli Bodoni e registro no CRF nº 66829 e CPF: 368888518-00 declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida durante a realização do estudo;
- A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade;
- O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, mesmo que essa possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
- O compromisso de que serei devidamente acompanhado durante todo o período de minha participação no projeto e após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

ASSINATURAS

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido (ou se ele tiver sido explicado para você) e tiver entendido a informação, e concorda voluntariamente em participar deste estudo, por favor assine abaixo:

Data

Nome do Participante: _____

Assinatura: _____

Data

Nome do Responsável : _____

Assinatura: _____

Data

Nome do Pesquisador _____

Assinatura _____

ANEXO F - Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio para estímulo das células mononucleares do sangue

O efeito do estímulo do peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade das células mononucleares foi determinado por meio de ensaio de viabilidade celular utilizando Trypan Blue Stain (Gibco – Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos). As células foram separadas seguindo o protocolo descrito no item 4.2.1. Após 24 horas foram adicionadas 10^5 células por ml em placas de 24 poços. Ao meio foi adicionado peróxido de hidrogênio nas concentrações de 50 uM, 100uM, 500 uM e 800 uM. O experimento foi realizado em duplicata. Vinte quatro horas após o estímulo foi realizado o testes de viabilidade, para este foi realizado uma diluição 1:2 Trypan Blue Stain (Gibco – Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos), sendo essa a solução homogeneizada e adicionada à câmara de Neubauer. As células foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer fornecendo assim a relação de células viáveis e não viáveis.

A viabilidade foi calculada segundo a formula abaixo.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{nº de células vivas}}{\text{células vivas + células mortas}} \cdot 100$$

O ensaio de viabilidade por coloração com azul de Tripan fornece a relação de células viáveis e não viáveis. Foram consideradas viáveis as células translúcidas e sem alteração de morfologia, já as células que absorveram a coloração azul ou apresentavam morfologia alterada foram consideradas inviáveis.

Tabela Viabilidade de células mononucleares após estímulo com H_2O_2 .

Concentração de $\text{H}_2\text{O}_2(\mu\text{M})$	Viabilidade
Sem estímulo	78.20%
50	63.40%
100	62.60%
500	35%
800	49%

A concentração de peróxido mais adequada foi a de 100 uM por ser capaz de manter mais de 50% da viabilidade celular (**Tabela 5**) e foi determinadas para induzir o estresses oxidativo nos leucócitos.

Determinação do tempo de estímulo com peróxido de hidrogênio das células mononucleares do sangue

A determinação do tempo ideal de estímulo com H_2O_2 foi realizado por detecção das EROs utilizando o 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CMDCFDA- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos) em células estimuladas com 100 μM peróxido de hidrogênio por 5 e 24 horas e em células sem estímulo, seguindo o seguinte protocolo. 1º dia: as células foram semeadas em placas de 24 poços, 3×10^5 células/poço em duplicata; foi realizado o tratamento de 100uM de peróxido de hidrogênio por 24h para uma das condições. 2º dia: foi realizado o tratamento de 100uM de peróxido de hidrogênio por 5h para outra condição, as células foram mantidas em incubadora a 37°C e a seguir lavadas com PBS 1x e então incubadas com a sonda (DCF-DA) diluída em meio de cultura (5 μM) por 30 min a 37°C. Após a incubação as células foram lavadas com PBS 1x, ressuspensas em PBS 1x e a leitura feita no citômetro de fluxo BD-FACS Canto (Becton Dickinson, NJ, Estados Unidos) em comprimento de onda para Fluoresceína (FITC). Os dados obtidos pela citometria de fluxo foram analisados com o auxílio do software FlowJo v10.0.7 (FlowJo is Copyright © Trustees of Leland Stanford Jr. University).

Figura Análise de Espécies Reativas de Oxigênio em linfócitos. A) Em condições basais B) Após estímulo de 100uM de H_2O_2 por 5 horas. C) Após estímulo de 100uM de H_2O_2 por 24 horas.

Essa análise mostrou que o tempo de 5h de estímulo com 100uM de H_2O_2 é o ideal para quantificar a produção de EROs em linfócitos pois é capaz de induzir estresse oxidativo de maneira homogênea mantendo o picos de intensidade de fluorescência. Esses dados podem observados no gráfico das células sem estímulo (**Figura 1**), o que não ocorre no tempo de 24 horas.