UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

JULIANA LOURENÇO GEBENLIAN

Efeito da MAPK8 sobre o estresse oxidativo e a esteroidogênese em células adrenocorticais com atividade reduzida de NNT

Ribeirão Preto

2022

JULIANA LOURENÇO GEBENLIAN

Efeito da MAPK8 sobre o estresse oxidativo e a esteroidogênese em células adrenocorticais com atividade reduzida de 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

2022

Nome: Juliana Lourenço Gebenlian

Título: Efeito da MAPK8 sobre o estresse oxidativo e a esteroidogênese em células adrenocorticais com atividade reduzida de 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: _____

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 a fonte.

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

Gebenlian, Juliana Lourenço

Efeito da MAPK8 sobre o estresse oxidativo e a esteroidogênese em células adrenocorticais com atividade reduzida de NNT Ribeirão Preto, 2022
72 p. : il. ; 30 cm

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

1. gene NNT. 2. gene MAPK8. 3. esteroidogênese adrenal. 4. EROs. 5. estresse oxidativo.

Agradecimentos

À minha mãe Denize por estar sempre presente como mãe dedicada e professora exigente. Ao meu pai Claudio pelo apoio, carinho e por tudo que me ensinou direta ou indiretamente.

Aos meus amigos Brenda, Gabriel, Gabriela, Matheus, Rahisa e Rick que iniciaram essa jornada comigo e permaneceram sempre alimentando meus sonhos e me ajudando a persegui-los mesmo com a distância. Às minhas amigas Giovanna e Marina por me manterem viva e acreditarem em mim mesmo quando eu não pude. A todos meus amigos por compartilharem comigo os melhores e piores momentos da minha vida.

Às minhas amigas de faculdade Júlia e Juliana que vão para sempre ser parte do meu trio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini pelas oportunidades, incentivos e contribuições em minha formação profissional e pessoal.

À doutoranda Aline Faccioli Bodoni por ter aceitado me acompanhar nessa trajetória de mais de 5 anos pelo laboratório, por todo o tempo dedicado ao meu ensino e ao nosso projeto. Por todas as incontáveis horas que compartilhamos durante o desenvolvimento e discussão dos dados e por todo o imenso aprendizado que tão gentilmente me ofereceu.

À Dra. Fernanda Borchers Coeli-Lacchini por me aceitar como companheira de laboratório. Por toda a orientação, por estar sempre disponível à me ajudar durante todo o desenvolvimento do nosso projeto e pelas incontáveis horas dedicadas ao meu aprendizado acadêmico e para vida.

À Dra. Ana Carolina Bueno por toda a disponibilidade e solicitude, pela amizade e por sempre me socorrer quando precisei.

À Renata Sicchieri Pugliesi e à Wendy Turatti, Funcionárias do Laboratório de Endocrinologia – Biologia Molecular do HC-FMRP-USP por toda ajuda e por sempre oferecerem seu tempo com generosidade.

Às doutorandas Candy More, Márcia E. Costa, Mônica F. Stecchini e Zilda Braid, por me acompanharem nessa caminhada em busca de conhecimento e em direção à ciência.

Ao Prof. Dr. Ayrton Moreira, pelo exemplo de entusiasmo, dedicação e profissionalismo 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.

À Dra. Lívia Mermejo, pelo exemplo de entusiasmo e humildade.

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

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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 – pelo apoio concedido ao presente trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio concedido ao presente trabalho.

Resumo

Resumo

Gebenlian,J.L. Efeito da MAPK8 sobre o estresse oxidativo e a esteroidogênese em células adrenocorticais com atividade reduzida de NNT. Tese (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Introdução: Novos estudos sobre a fisiopatologia adrenal revelaram que a proteína nicotinamida nucleotídeo transidrogenase (NNT) é essencial para os mecanismos de defesa antioxidante do córtex adrenal. Mutações deletérias no gene *NNT* têm sido associadas à deficiência familiar de glicocorticoides (DFG), uma forma hereditária de insuficiência adrenal primária. Modificações no estado redox celular, como observado na deficiência de NNT, levam ao aumento da proteína quinase 8 ativada por mitógeno (MAPK8).

Objetivo: Analisar os efeitos do *crosstalk* entre NNT e MAPK8 na linhagem celular de carcinoma adrenocortical H295R (H295R). Verificar se o aumento da MAPK8 compensa o aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e a redução da produção de cortisol resultantes da deficiência de NNT nas células H295R.

Métodos: O gene *NNT* nas células H295R foi silecido por meio de siRNA. O efeito da deficiência de NNT na expressão da MAPK8 nessas células foi avaliado por meio de qPCR), Western blot (WB) e imunofluorescência. Em situação basal e após estímulo com 10uM de forskolina (FSK), a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células NNT *nontarget* (NT) ou deficientes em NNT (siNNT) foi mensurada utilizando o marcador mitocondrial DCFDA/H2DCDFDA. A viabilidade celular foi avaliada utilizando citometria de fluxo (BD-FACS). A esteroidogêneses adrenal foi avaliada pela dosagem de cortisol do meio celular por radioimunoensaio (RIE).

Resultados: O silenciamento do gene *NNT* reduziu seus níveis de RNAm e proteína em 78% ($p<0,0001$) e 50% ($p=0,001$), respectivamente, sem comprometer a viabilidade das células H295R. Após o silenciamento de NNT houve aumento significativo da expressão gênica ($p=0,01$) e proteica da MAPK8 assim como diminuição da secreção de cortisol ($p=0,004$). Não ocorreram alterações na produção de EROs intracelular dessas células. Quando estas

células deficientes de NNT foram submetidas ao estímulo pela FSK, observouse o aumento significativo na expressão gênica (p=0,03) e proteica da MAPK8 porém houve diminuição da secreção de cortisol (p=0,01). Novamente não houve alteração na produção de EROs intracelular.

Conclusão: As células H295R deficientes em NNT são capazes de manter a homeostase mitocondrial mas apresentam prejuízo na secreção de cortisol em situação basal. A ativação da via da MAPK8 parece ser um potencial mecanismo de compensação nesse processo. Em situação de estresse, as células H295R deficientes para NNT parecem preservar o equilíbrio redox em detrimento da esteroidogênese.

Palavras-chaves: gene *NNT*, gene *MAPK8*, esteroidogênese adrenal, EROs, estresse oxidativo.

Abstract

Abstract

Gebenlian,J.L. Effect of MAPK8 on oxidative stress and steroidogenesis in adrenocortical cells with reduced NNT activity. Thesis (MSc) Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto,2022.

Background: Recent new insights into adrenal pathophysiology revealed that the protein nicotinamide nucleotide transidrogenase (NNT) is essential in the antioxidant defense mechanisms in adrenal cortex. Loss-of-function mutations in *NNT* gene have been associated with familial glucocorticoid deficiency (FGD), a hereditary form of primary adrenal insufficiency. Modifications on the cell redox state, as observed in NNT deficiency, lead to the increase of Mitogen-Activated Protein Kinase 8 (MAPK8).

Aims: To analyze the crosstalk effects between NNT and MAPK8 in the adrenocortical carcinoma cell line H295R (H295R). To ascertain whether the increase of MAPK8 compensates the increase in reactive oxygen species (ROS) formation and reduction of cortisol production resulting from the NNT deficiency in H295R cells.

Methods: NNT knockdown was performed in H295R cells using small interfering RNA (siRNA). The effect of NNT deficiency on MAPK8 expression in these cells was evaluated by (qPCR), Eestern blot (WB) and immunofluorescence. Under basal and after 10uM forskolin (FSK) stimulation, the production of intracellular ROS by NNT nontarget (NT) or NNT deficient H295R (siNNT) cells was measured using DCFDA/H2DCDFDA mitochondrial marker. Cell viability was evaluated by BD-FACS flow cytometry. Adrenal steroidogenesis was evaluated by measuring cortisol production (RIA).

Results: NNT siRNA knockdown in the H295R cells resulted in 78% ($p<0.001$) and 50% ($p=0.001$) reduction of mRNA and protein NNT levels, respectively, without decrease of cell viability. Under basal condition, NNT knockdown there increased MAPK8 gene and protein expression ($p=0.01$) . As well as a decrease of cortisol secretion ($p=0.004$). There were no changes in the production of intracelular ROS in these cells. When NNT deficient H295R cells were challenged with FSK, MAPK8 mRNA and protein levels increased ($p=0.03$), however, cortisol

secretion was decreased (p=0.01) but no change in the production of intracelular ROS was observed.

Conclusion: NNT deficient H295R cells are able to maintain the mitochondrial homeostasis but have impaired cortisol secretion at baseline. The activation of MAPK8 pathway appears to be a potential compensation mechanism in this process. Under stress, NNT-deficient H295R cells seem to preserve the redox balance maintenance at the expense of steroidogenesis decrease.

Keywords: *NNT* gene, *MAPK8* gene, adrenal steroidogeneses, ROS, oxidative stress.

Siglas e Abreviaturas

Siglas e Abreviaturas

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

ACTHR: receptor de ACTH

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina cíclico

ATP: adenosina trifosfato

BMK1: ERK/big MAP quinase 1

cDNA: DNA complementar

***CYP11A1*:** gene citocromo P450 11A1

CYP11A1: enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol

***CYP11B1*:** gene citocromo P450 família 11 subfamília B membro 1

CYP11B1: enzima citocromo P450 11B1

Dapi: marcador nuclear 4,6-diamidino-2-feninlidol

DFG: deficiência familiar de glicocorticoide

DHEA: desidroepiandrosterona

DHEA-S: sulfato de DHEA

DNA: ácido desoxirribonucleico

11- DOC: 11-desoxicortisol

ERK: proteínas quinases reguladas por sinal extracelular

EROs: espécies reativas de oxigênio

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FITC: comprimento de onda para Fluoresceína

FSK: forskolina

GAP: junções comunicantes

GSH: glutationa reduzida

GSSG: glutationa oxidada

GPX: glutationa peroxidase

H295R: linhagem celular de carcinoma adrenocortical humano

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

H_2O_2: peróxido de hidrogênio

JNKs: proteínas quinases ativadas por estresse

MAPK: proteína-quinases ativadas por mitógenos

MAPK8: proteína quinase 8 ativada por mitógeno

MA-10: linhagem celular de tumor de células de Leydig

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

***NNT*:** nicotinamida nucleotídeo transidrogenase

NT: células NNT *nontarget*

pb: pares de base

PCR: reação de polimerase em cadeia

PKA: proteína quinase A

PRDX: peroxiredoxina

qPCR: reação de polimerase em cadeia quantitativa

RIE: radioimunoensaio

RNA: ácido ribonucleico

RNAi: RNA de interferência

RNAm: RNA mensageiro

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

siNNT: células deficientes em NNT

siRNA: RNA de silenciamento

SODs: superóxido dismutase

STAR: proteína reguladora aguda esteroidogênica

TACs: tumores adrenocorticais

TM: temperatura de *melting*

TNFα: fator de necrose tumoral alfa

O_2^-: ânion superóxido

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

WB: western blot

YAP1: *yes-associated protein-1*

3βHSD1: 3-beta hidroxiesteroide desidrogenase 1

3BHSD2: 3-beta hidroxiesteroide desidrogenase 2

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da divisão histológica e funcional da glândula adrenal. 28
Figura 2. Desenho esquemático da síntese de cortisol na zona fasciculada das glândulas adrenais 29
Figura 3. Desenho esquemático da esteroidogênese adrenal e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs). 30
Figura 4. Representação esquemática do papel da proteína *Nicotinamide Nucleotide Transferase* (NNT) nos mecanismos de defesa antioxidante e na síntese de NADPH na mitocôndria 31
Figura 5. Esquema representativo da intensidade de expressão de *Nicotinamide Nucleotide Transferase* (*NNT*) em diferentes tecidos humanos..... 32
Figura 6. *Mecanismo de ativação da proteíno-quinase ativada por mitógenos-8 (MAPK8) por estímulo de acumulo de EROs* 34
Figura 7. Microscopia de campo claro da linhagem celular H295R. 42
Figura 8. Imagem representativa da análise do sequenciamento direto de fragmento do éxon 2 do gene *Nicotinamide Nucleotide Transferase* (*NNT*). ... 54
Figura 9. Expressão gênica e proteica de Nicotinamide Nucleotide Transferase (NNT) e a viabilidade celular na linhagem H295R após silenciamento do gene *NNT* 55
Figura 10. Gráfico representativo da média da intensidade de fluorescência (MIF) do marcador de EROs, CMDCFDA, na linhagem H295R silenciada para o gene N*icotinamide Nucleotide Transferase* (*NNT*). 56
Figura 11. Avaliação da massa e da marcação mitocondrial *em células da linhagem H295R suficientes (NT) e insuficientes (siNNT) em Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT), sem e com estímulo da forskolina (FSK)*.. 57
Figura 12. Expressão relativa dos principais genes mitocondriais da esteroidogênese adrenal na linhagem H295R. 58
Figura 13. Gráfico representativo da secreção de cortisol *em células da linhagem H295R suficientes (NT) e insuficientes (siNNT) em Nicotinamide*

Nucleotide Transidrogenase (NNT) 59
Figura 14. Expressão de MAPK8 após silenciamento do gene N*icotinamide Nucleotide Transferase* (*NNT*). 60
Figura 15. Resposta da linhagem H295R após estímulo com forskolina. 61
Figura 16. Avaliação do impacto do estímulo com forskolina (FSK) *em células da linhagem H295R suficientes (NT) e insuficientes (siNNT) em Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT), sem e com estímulo da forskolina (FSK)*... 61
Figura 17. Gráfico representativo da intensidade de fluorescência média (MIF) do marcador CMDCFDA *em células da linhagem H295R suficientes (NT) e insuficientes (siNNT) em Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT), sem e com estímulo da forskolina (FSK)*..... 62
Figura 18. Avaliação da massa e da marcação mitocondrial *em células da linhagem H295R suficientes (NT) e insuficientes (siNNT) em Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT), sem e com estímulo da forskolina (FSK)*.. 63
Figura 19. Expressão relativa dos principais genes da etapa mitocondrial da esteroidogênese na linhagem H295R em situação basal ou após estímulo com com forskolina (FSK)**.** 64
Figura 20. Gráfico representativo da secreção de cortisol na linhagem H295R silenciada para o gene N*icotinamide Nucleotide Transferase* (*NNT*). 65
Figura 21. Análise da expressão *do gene* MAPK8 *na linhagem H295R com ou sem deficiência de Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT) em situaçõa basal e após estímulo com* (*FSK*).. 66

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1. Concentrações dos reagentes utilizados na Reação de PCR. 44

Tabela 2. Oligonucleotídeos e condições da PCR para estudo do gene *NNT* 44

Tabela 3. Transfecção do gene *NNT* 46

Tabela 4. Identificação dos ensaios de PCR em tempo real 48

Sumário

Sumário

1. Introdução **26**
1.1 Esteroidogênese adrenal 27
1.2 Resposta ao estresse oxidativo em células esteroidogênicas 29
1.3 Mecanismos celulares de defesa antioxidante 30
1.4 *NNT* 31
1.5 Impacto do comprometimento de *NNT* 33
1.6 Estresse oxidativo e ativação da via MAPK8 34
2. Hipótese de estudo **37**
3. Objetivos **39**
3.1 Objetivo geral 40
3.2 Objetivos específicos 40
4. Materiais e métodos **41**
4.1 Linhagem celular H295R 42
4.2 Sequenciamento do gene *NNT* 43
4.2.1 Obtenção e extração das amostras de DNA genômico 43
4.2.2 Amplificação e sequenciamento do gene *NNT* 43
4.3 Silenciamento do gene *NNT* 45
4.4 Estímulo da esteroidogênese 46
4.5 Análise da expressão gênica (qPCR) 47
4.6 Análise da expressão proteica (WB) 48
4.7 Radioimunoensaio 49
4.8 Análise da viabilidade celular 49
4.9 Análise de parâmetros mitocondriais 50
4.9.1 Análise da formação de EROs e estresse oxidativo 50
4.9.2 Marcação Mitocondrial 50
4.10 Imunofluorescência 50
4.11 Análise Estatística dos dados 51
5. Aspectos éticos e financiamento **51**
6. Resultados **53**
6.1 Sequenciamento do gene *NNT* na linhagem H295R 54
6.2 Validação do silenciamento de *NNT* 54

6.3 Avaliação de parâmetros mitocondriais 56
6.3.1 Avaliação da formação de EROs após silenciamento de *NNT* 56
6.3.2 Avaliação da massa e da marcação mitocondrial 56
6.4 Avaliação da esteroidogênese 57
6.4.1 Expressão gênica 57
6.4.2 Produção de cortisol 58
6.5 Análise da expressão de MAPK8 59
6.6 Estímulo da esteroidogênese na linhagem H295R 61
6.7 Avaliação de parâmetros mitocondriais após estímulo com FSK 62
6.7.1 Formação de EROs 62
6.7.2 Avaliação da massa e da marcação mitocondrial.....62
6.8 Avaliação da esteroidogênese após estímulo com FSK 64
6.8.1 Expressão gênica 64
6.8.2 Produção de cortisol.....65
6.8.3 Análise da expressão de MAPK8 65
7. Discussão.....**67**
8. Conclusão **73**
9. Referências.....**75**

Introdução

1. Introdução

1.1 Esteroidogênese adrenal

As glândulas adrenais são órgãos endócrinos localizados acima e adjacentes aos rins. São órgãos encapsulados com clara divisão entre córtex e medula, sendo o córtex responsável pela produção e secreção de glicocorticoides, mineralocorticóides e androgênios, enquanto que a medula, secreta adrenalina e noradrenalina [1].

O córtex é dividido em três zonas com células, morfologia e secreção hormonal próprias (Figura 1). A zona glomerulosa, é formada por células piramidais especializadas na produção e secreção de mineralocorticoides. Deste, o mais abundante é a aldosterona a qual tem papel fundamental na regulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A zona fasciculada é a maior das zonas sendo composta por células poliédricas dispostas em cordões e tem como função a secreção dos glicocorticoides, em especial o cortisol. Por fim a zona reticular é formada por células dispostas em cordões irregulares que secretam androgênios, principalmente a desidroepiandrosterona (DHEA) e o sulfato de DHEA (DHEA-S) [2].

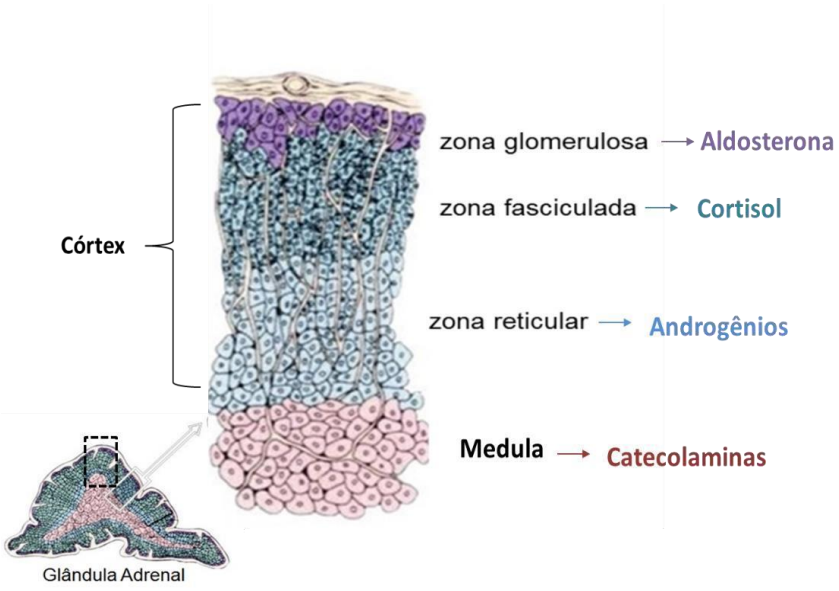

Figura 1. Representação esquemática da divisão histológica e funcional da glândula adrenal[3].

A produção dos hormônios adrenais resulta de um processo denominado esteroidogênese adrenal. Esse processo, regulado principalmente pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) por meio de sua ligação ao receptor de ACTH (ACTHR), se inicia com o transporte de colesterol do citoplasma para o interior da membrana mitocondrial, por meio da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StaR), onde será convertido em pregnenolona pela enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (CYP11A1), codificada pelo gene citocromo P450 11A1 (*CYP11A1*). No retículo endoplasmático, as enzimas 3beta hidroxiesteroide desidrogenase 1 e 2 (3ßHSD1 e 3ßHSD2) transformam a pregnenolona em progesterona. Esta retorna a mitocôndria e é convertida a 11desoxicortisol (11-DOC) e depois a cortisol, pela enzima citocromo P450 11B1 (CYP11B1), que é secretado pelas células do córtex da adrenal para a circulação sanguínea [2] **(Figura 2)**.

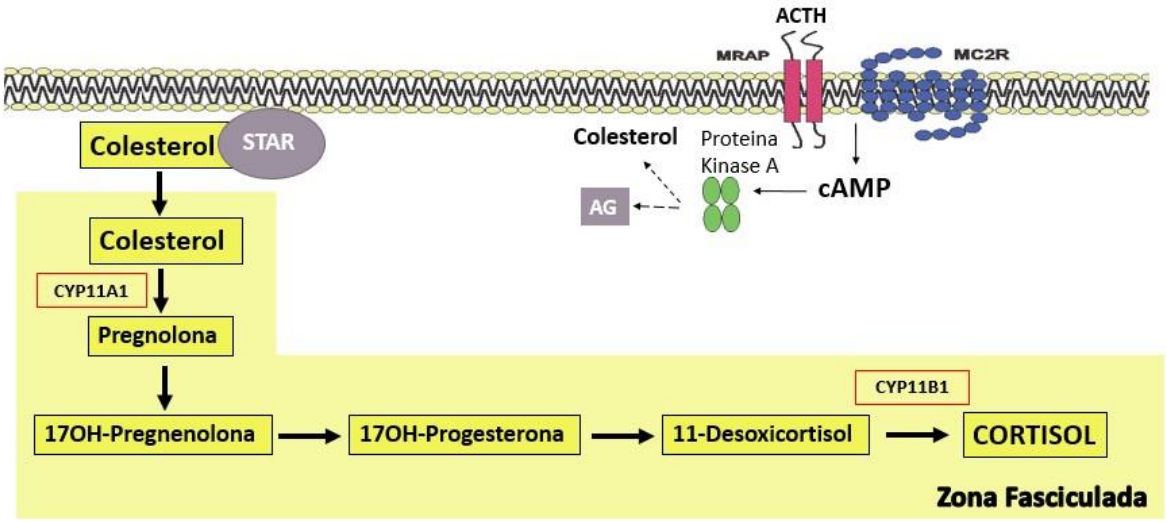

Figura 2. Desenho esquemático da síntese de cortisol na zona fasciculada das glândulas adrenais [4].

1.2 Resposta ao estresse oxidativo em células esteroidogênicas

A produção do cortisol, que ocorre parcialmente no interior da mitocôndria, resulta na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que devem ser ativamente eliminadas para a manutenção da homeostase no meio intramitocondrial **(Figura 3)**. Por esta razão, as células do córtex adrenal são supridas por níveis altos de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para a manutenção da homeostase redox. Distúrbios na homeostase redox do meio intramitocondrial, das células adrenais, podem ter efeito deletério sobre a esteroidogênese [5].

A indução de estresse oxidativo em linhagem celular obtida de tumor de células de Leydig (MA-10), que também são capazes de secretar hormônios esteroides, resultou em redução da expressão da proteína intramitocondrial STAR [6;7] e inibição na síntese de progesterona [7].

Já existem estudos demonstrando os efeitos do estresse oxidativo ou acúmulo de EROs na esteroidogênese, porém, os mecanismos envolvidos nessa relação ainda não foram elucidados.

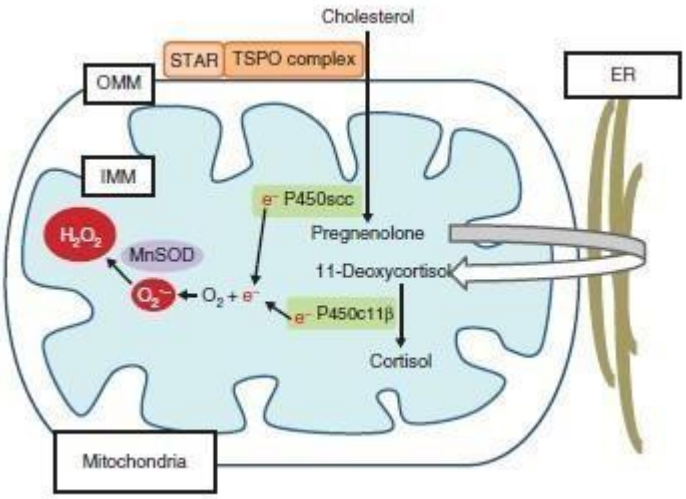

Figura 3. Desenho esquemático da esteroidogênese adrenal e liberação de EROs. Nas etapas mitocondriais da esteroidogênese, na qual ocorrem a conversão do colesterol em pregnenolona e 11-DOC em cortisol, são liberadas EROs que deverão ser degradas por mecanismos dos sistemas antioxidantes[5].

1.3 Mecanismos celulares de defesa antioxidante

O sistema de defesa antioxidante possui mecanismos complexos e específicos para cada tipo celular[5]. Tecidos de maior consumo energético como, por exemplo o fígado, cérebro e os tecidos esteroidogênicos como a adrenal, testículos e ovários são supridos por altos níveis de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos necessários para a desintoxicação de EROs [5].

As EROs podem ser formadas por meio de reduções parciais do oxigênio, dando origem principalmente a radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil. Estes radicais devem ser mantidos dentro dos limites fisiológicos e, nessas concentrações, funcionam como mediadores da sinalização celular.

As células possuem mecanismos de defesa contra a toxicidade das EROs, as enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SODs), glutationa redutase, glutationa peroxidase (GPX) e catalase [8].

O bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna para a síntese de adenosina trifosfato (ATP) gera EROs [9]. Nesse processo de transferência de elétrons uma porcentagem do oxigênio molecular é convertida a ânion superóxido (O_2^-), que é reduzido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por ação das SODs [5]. O H_2O_2 é reduzido por membros dos sistemas da GPX e

peroxiredoxina (PRDX) [10]. Estes sistemas são dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) sintetizado no meio intramitocondrial pela enzima NNT **(Figura 4)**.

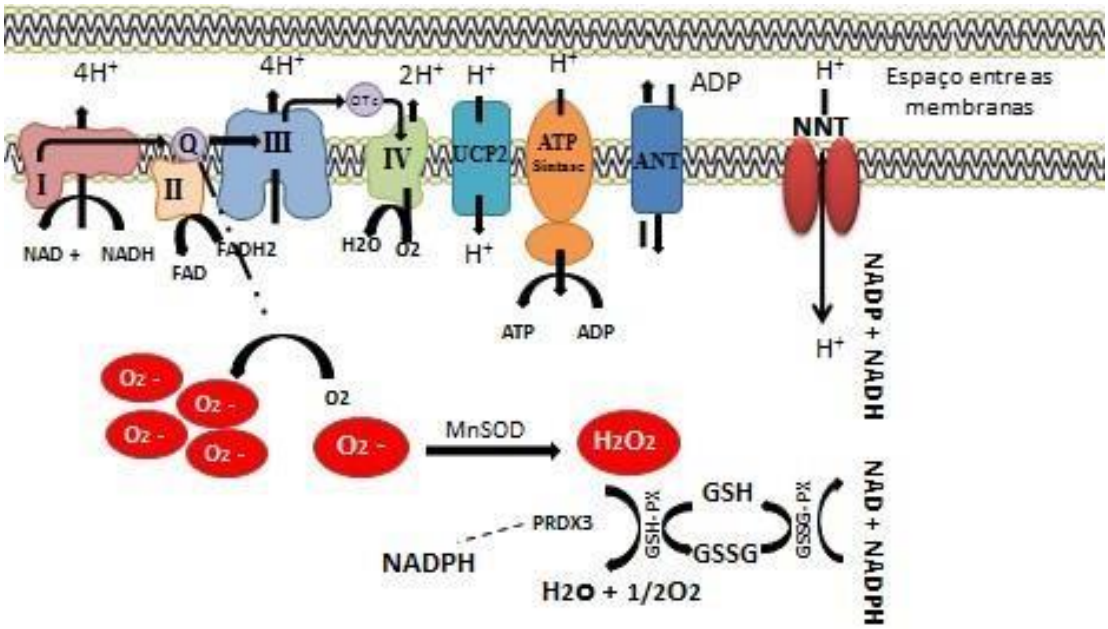

Figura 4. Representação esquemática do papel da proteína NNT nos mecanismos de defesa antioxidante e na síntese de NADPH na mitocôndria [4].

Alterações nos mecanismos de defesa antioxidante podem levar ao acúmulo de EROs. A perturbação do equilíbrio dessas espécies leva ao processo denominado estresse oxidativo que pode ter efeito deletério sobre proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, comprometer as funções celulares e resultar em dano e morte celular [9].

O estresse oxidativo está relacionado a uma infinidade de condições patológicas, incluindo distúrbios neurodegenerativos, *diabetes mellitus*, doenças cardiovasculares, envelhecimento e alterações na síntese de hormônios pelas glândulas adrenais.

1.4 *NNT*

O gene *NNT* (OMIM 607878), mapeado no cromossomo 5p12, possui 22 éxons e é responsável por codificar uma proteína de mesmo nome com 1.086 aminoácidos. Apresenta 11 variantes naturais, tendo seu transcrito principal

6.483 pares de base e sua região traduzida 3.261 pares de base (ENSG00000112992).

A NNT é uma proteína transmembrana abundantemente expressa na maioria dos tecidos humanos **(Figura 5)**.

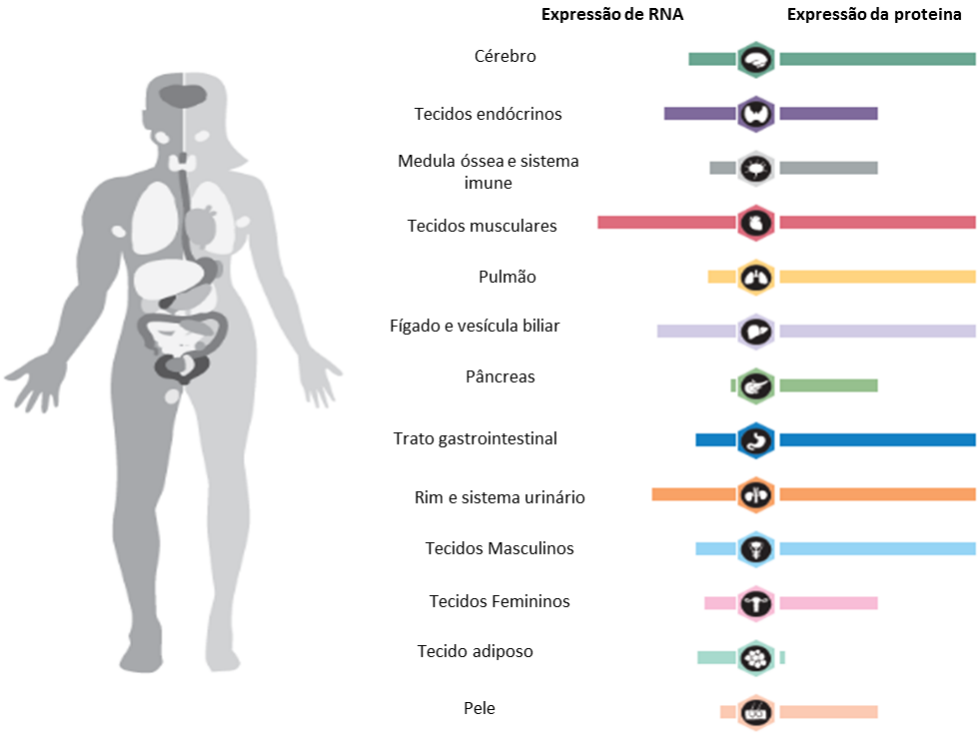

Figura 5. Esquema representativo da intensidade de expressão de NNT em diferentes tecidos humanos[11].

A proteína NNT é de grande importância na eliminação das EROs e na manutenção da homeostase celular. A NNT utiliza a energia do gradiente de prótons mitocondriais para produzir altas concentrações de NADPH. O NADPH é responsável por regenerar a glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG) mantendo alta a razão GSH/GSSG [12].

Mutações no gene *NNT* que resultam em perda de função da NNT foram descritas em pacientes com fenótipo de insuficiência adrenal, sendo a maior parte delas associadas ao fenótipo de deficiência familiar de glicocorticoide (DFG) [10;13].

1.5 Impacto do comprometimento de NNT

O silenciamento do gene *NNT* na linhagem de células de carcinoma adrenocortical humano (H295R) reduziu a razão GSH/GSSG e promoveu aumento nas concentrações de O_2-. Tais efeitos demonstram a desregulação do potencial redox dessas células [12].

Fibroblastos carreadores da variante genética *NNT* p.G200S, encontrada em um paciente com fenótipo de DFG, porém com deficiência parcial de aldosterona, apresentaram aumento nos níveis de EROs, diminuição de ATP e alterações na morfologia mitocondrial [14]. Células mononucleares sanguíneas carreadoras da variante NNT p.G866D apresentaram aumento na produção de EROs, diminuição de GSH e diminuição da massa marcação mitocondrial [4].

Um estudo realizado no nosso laboratório, utilizando células H295R, desenvolveu um modelo *knockout* para o *NNT* utilizando a tecnologia do CRISPR/Cas9. Nesse estudo observou-se que o comprometimento do *NNT* resultou no aumento da produção de EROs, diminuição na marcação mitocondrial e diminuição do tamanho e densidade de gotículas de colesterol. Também se observou redução na secreção de cortisol e aldosterona. Esses dados indicam que a abolição do NNT gera um estado de estresse oxidativo aumentado, além de inibir a esteroidogênese das células afetadas [15].

Em estudo utilizando camundongos da linhagem C57BL6/J, naturalmente deficientes da NNT, observou-se o impacto do comprometimento desta proteína sobre a organização da zona fasciculada das glândulas adrenais desses animais. Notou-se também a redução da secreção de corticosterona e da expressão do gene *CYP11A1* que participa da etapa mitocondrial da esteroidogênese adrenal [12;16;17]. Adicionalmente, camundongos *knockout* para o gene *NNT*, quando submetidos à situação de estresse, apresentaram prejuízo no aumento estimulado da secreção de corticosterona e maior secreção de ACTH em relação aos animais-controle. Notou-se também aumento dos concentrações plasmáticas de neurotransmissores como noraepinefrina e dopamina [18].

1.6 Estresse oxidativo e ativação da via MAPK8

As respostas celulares aos estímulos externos ao ambiente celular são mediadas por diversas via de sinalização intracelular, sendo uma delas a via da proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Essas proteínas atuam na resposta à diversos estímulos extracelulares e são divididas em quatro subgrupos: *quinases reguladas por sinal extracelular* (ERKs); proteínas quinases ativadas por estresse (JNKs); *ERK/big MAP kinase 1* (BMK1); e proteínas cinases do grupo p38[19].

A proteína MAPK8/JNK1 é uma quinase serina/treonina, do subgrupo das JNKs, envolvida em vários processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, migração e transformação além da apoptose [20]. O estresse oxidativo estimula a via de sinalização da c-Jun N-terminal (JNK/SAP). Nesta cascata, duas quinases de especificidade dupla MAP2K4/MKK4 e MAP2K7/MKK7 fosforilam e ativam a MAPK8/JNK1 **(Figura 6)**.

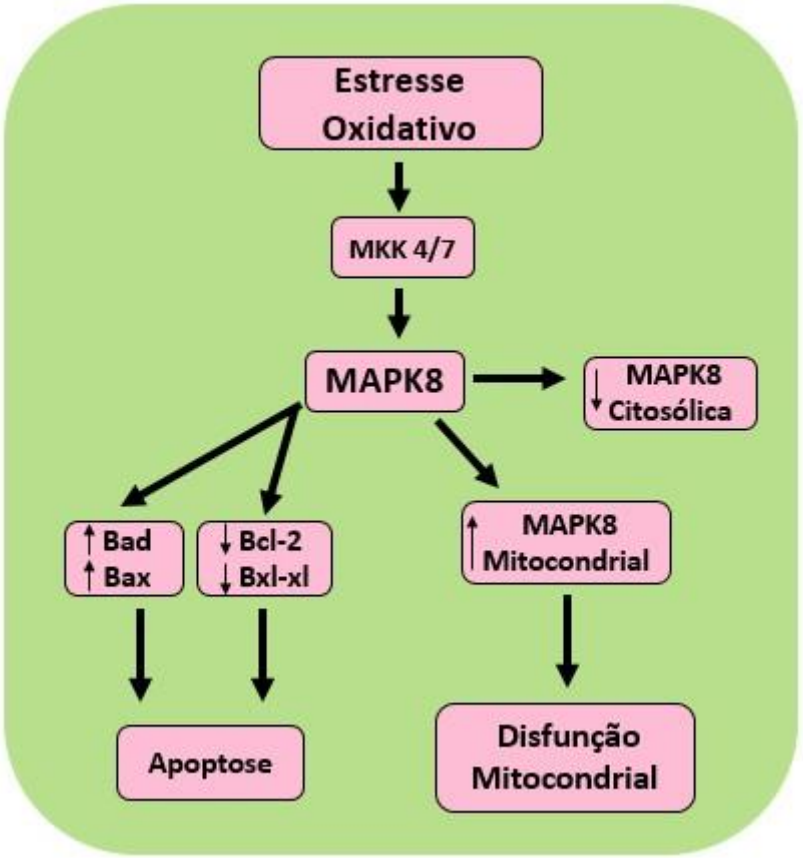

Figura 6. Mecanismo de ativação da proteína-quinase ativada por mitógenos-8 (MAPK8) por estímulo de acumulo de EROs[5].

O acúmulo de EROs no ambiente intracelular ocasiona diversas alterações, em sua maioria deletérias, ao funcionamento celular. Uma das mais importantes alterações é a iniciação do processo de apoptose. A apoptose pode ocorrer por meio da ativação da via extrínseca ou intrínseca, sendo esta a preferida em situações de estresse oxidativo. A via da apoptose intrínseca é acionada perante a presença excessiva de EROs no ambiente intracelular, a qual aumenta a expressão do fator de necrose tumoral alfa(TNFα) acionando os seus receptores da membrana externa celular, os quais ativam a via da MAPK8 [21].

A MAPK8 promove, em resposta ao estresse oxidativo, a apoptose celular mediada pela fosforilação dos seus principais fatores reguladores, incluindo as proteínas P53 e *yes-associated protein-1* (YAP1) [22]. Nessa situação ocorre o aumento da ativação da proteína MAPK8 localizada no citosol e sua translocação para a membrana interna mitocondrial. Esse mecanismo sugere uma interligação entre o citosol e a mitocôndria para a manutenção do equilíbrio redox.

No ambiente interno mitocondrial, a MAPK8 promove o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, aumento da expressão de caspase 9 e de proteínas proapoptóticas como BAX além da inibição da expressão de proteínas antiapoptóticas como BCL-2 [23;24].

Mermejo e colaboradores em seu estudo sobre a expressão gênica das vias não canônicas da beta-catenina, Wnt/PCP e Wnt/Ca, e sua relação com mutações nos genes *TP53* e *CTNNB1* em tumores adrenocorticais (TACs) de pacientes adultos e pediátricos, observaram alterações importantes no gene *MAPK8*. Foi observado, nas amostras de TAC pediátrico, que a expressão aumentada de *MAPK8* estava associada ao pior prognóstico dos pacientes. Em amostras de TAC de pacientes adultos não se observou alteração na expressão gênica da *MAPK8* [25].

Um estudo, utilizando células imortalizadas de adrenais de camundongo (Y1-BS1), mostrou os efeitos do estresse oxidativo na redução da produção de cortisol e sua relação com a via das MAPKs. Os autores observaram que perante indução de estresse oxidativo por meio do tratamento com H_2O_2, ocorre a inibição da esteroidogênese causada pelo excesso de oxidantes e mediada por proteínas do grupo p38 MAPK [26].

O silenciamento do *NNT* por meio de RNA de interferência (RNAi), em células de feocromocitoma adrenal (linhagem PC12), reduziu os níveis de NADPH intracelulares, reduziu a relação GSH/GSSG e aumentou os níveis de H_2O_2, culminando em aumento do estado oxidativo. A redução da expressão de *NNT* nessas células resultou também no aumento da expressão de MAPK8 fosforilada [23]. Esses estudos demonstram o papel importante da MAPK8, principalmente em células adrenocorticais e levantam o questionamento sobre sua atuação na manutenção do estado redox celular e um possível *crosstalk* com a enzima NNT.

O impacto causado pelo comprometimento da enzima NNT na formação de EROs, na massa e na marcação mitocondrial, bem como na produção de cortisol e a expressão da proteína MAPK8 em linhagem de células adrenocorticais ainda não foi avaliado.

Hipótese de Estudo

2. Hipótese de estudo

A MAPK8 pode atuar como reguladora da homeostase oxidativa na ausência de NNT. Esse equilíbrio na formação de EROs mantem a viabilidade celular, porém pode não consegue manter o funcionamento normal da esteroidogênese em células de carcinoma adrenocortical.

Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Analisar o impacto causado pelo comprometimento da enzima NNT na formação de EROs, massa e marcação mitocondrial, produção de cortisol e a expressão da proteína MAPK8 em linhagem de células adrenocorticais.

3.2. Objetivos específicos

Na linhagem celular adrenocortical imortalizada esteroidogênica H295R em situação basal e após o estímulo da esteroidogênese com FSK:

- Reduzir a expressão do gene *NNT* por silenciamento com RNAi.
- Validar o silenciamento por avaliação da expressão do RNAm e expressão proteica de NNT.
- Avaliar o impacto deste silenciamento na viabilidade celular.
- Avaliar os parâmetros mitocondriais e o estresse oxidativo por meio de ensaios de formação de EROs e análise de morfologia e marcação mitocondrial.
- Avaliar a esteroidogênese por meio da análise da capacidade de produção de cortisol e a expressão gênica de *CYP11A1* e *CYP11B1*.
- Avaliar a expressão gênica e proteica da MAPK8.

Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1 Linhagem celular H295R

A linhagem de carcinoma adrenocortical humana imortalizada NCI-H295R é derivada de um carcinoma adrenocortical invasivo e secretor de androgênios e cortisol[27] **(Figura 7)**. Essas células mantêm as características do tumor original e são capazes de produzir a maioria dos esteroides característicos do córtex adrenal. As células foram compradas do *American Type Culture Collection* (ATCC).

A cultura celular foi mantida em meio *Ham's F12 medium* e *Dulbecco's modified Eagle's medium* (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos) com 20mM de HEPS (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos) e suplementado com 2,5% de *Nu-serum* (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos), 1% de penicilina + estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos) e 1% de *ITS* + *Premix* (Corning, NY, Estados Unidos) à 37ºC e 5% de CO_2.

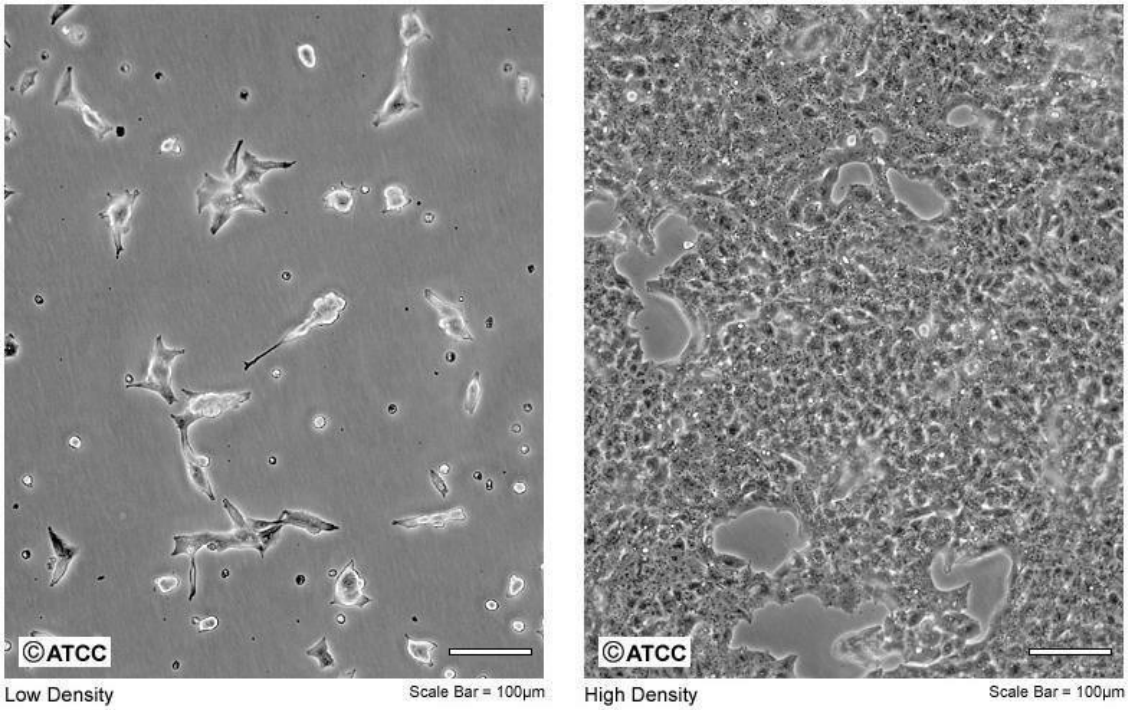

Figura 7. Microscopia de campo claro da linhagem celular H295R em baixa e alta confluência, respectivamente, no aumento de 100µm[28].

4.2 Sequenciamento do gene *NNT*

Foi realizada a pesquisa de variantes nos 22 exons do gene *NNT* na linhagem H295R por meio de sequenciamento direto. Foi utilizada metodologia padronizada previamente no Laboratório de Endocrinologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) e descrita na dissertação de mestrado "Bodoni, A.F., *Estresse oxidativo mitocondrial e deficiência familiar de glicocorticoide: caracterização fenotípica e funcional da nova variante pG866D no gene Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT).* Dissertação de Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017.".

4.2.1 Obtenção e extração das amostras de DNA genômico

As amostras de DNA genômico foram obtidas do lisado de células 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).

4.2.2 Amplificação e sequenciamento do gene *NNT*

O DNA genômico foi amplificado por reação de polimerase em cadeia (PCR) **(Tabela 1)**, utilizando-se os pares específicos de *primers* para a região promotora e para cada éxon considerando as regiões de transição introns-exons do gene *NNT* **(Tabela 2)**. Em todas as reações foi incluído um controle branco. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE (Tris- acetato 0,004M; EDTA 0,001M; pH 8,0) marcado com *GelRed Nucleic Acid Stain 10000X Water* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). O tamanho do fragmento foi confirmado por comparação ao marcador de peso molecular (Thermo Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos) e as imagens dos géis foram obtidas como o auxílio do *ChemiDoc™ MP System* (BioRad, CA, Estados Unidos).

Tabela 1. Concentrações dos reagentes utilizados na Reação de PCR.

Reagentes	Concentração Final
Tampão	1X (1.5mM MgCl2)
GoTaq® DNA Polymerase (Promega Madison, WI, Unidos).	0,05 U Estados
Nucleotídeos	0.2mM (cada Dntp)
Primers	0,6µM
DNA	<0.5µg/50µl
Água	q.s.p 25µl

Tabela 2. Oligonucleotídeos e condições da PCR para estudo do gene NNT

Exon	Primer F 5'→3'	Primer R 5'→3'	Fragmento (pb)	Tm °C
2	ATTCTTTATAGATGTCTA CATGTAA	CTATTACCTTGTCTTCTCT GTTAG	550	50
3	AGCAGCTTGCATGTGTG GTATATT	ATGAAGAATATGACGACAT GCAGTCAT	516	55
4	AGATGGTATACCTCTGT GTGTGC	ACAGTGTGTTCCTCATACA AATAAT	685	55
5	CTTCATTGATGACTTAT GATGATATGT	TGAGTGTACATAGGATTGA AGGATC	754	55
6	TGATCATCATTATCACC ATCTG	TAATATGCCCCTGAAACAA AA	283	55
7	AAGTACGAAATCAAAGG GACTGTTGAC	CACAAAAGGGCTAGGCGT GGTA	831	55
8-9	CTTTGCTGCTCACACTC ATCA	TTGAAAGCAGATAAGTGG GGGGAATG	1099	50
10	CATTCCCCCCACTTATC TGCTTTCAA	CTGAAAAACCAAGTCTGTC AGGCCCG	1040	63
11	GCCACTTCTCAACTGTC AAATGTCT	TCTGCACTGCTTGAAATGG GAGC	562	55
12	ATGAGGGTGTAAGAAA GCTG	TGGGATAAGGCAAAAGAC TAAAAT	601	55
13	TAGGTGATAAAGATGTG CTTAAAAC	TTATAAATCCACCGCAATC TAGC	582	50
14	TTGTGCATGATAGCAAA TCCAGA	GGTCTATGAAGCAGAATCT TTGG	725	55
15	TTTTGAGTGCTGACATG ACATCA	AGTGCTATACGAATACTCT TCAC	976	55
16	TTCCCCTTTATTGATACT TAGTAAG	TGTTCTTCCTACACTCTTC TATG	590	55
17	TTATGTTATTAATTTTGA GTTCTGA	AATATACAACACGATCAGA CA	843	50
18	GAAGTGATTTTCAGAAA CCAGC	TATAGAATTTCCATGTGAT CTCCA	528	55

19	GAATCATCAGATGGTTG TTGAAGC	CATTAGTAGGTAAGTTTTT GGAGAG	786	55
20	GTGGTTAAAGTTGAATG TGAAG	TACAAGTTCTTTTTCATCT GACTA	683	50
21	GCAAGATCATTTTGAGA TCATAAAAG	CTTACTCCTGGCCTCCTAG AAG	549	55
22	CTCTAATGGATATAAGA ATAAGGG	CCCTTGAAATATAGACTCT GAA	937	50

Tm: temperatura de *melting*

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o *ABI Prism® Big DyTM·Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos). Para a purificação da reação de sequenciamento foi utilizado isopropanol 65% e etanol 60%. Na amostra purificada foi adicionada à formamida e a eletroforese capilar foi realizada no equipamento *ABI Prism 3130 Genetic Analyser, PE Aplied 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).

4.3 Silenciamento do gene *NNT*

O sistema utilizado para o silenciamento do gene *NNT* foi o RNA de interferência (RNAi) *SMARTpool* (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos). Este sistema é direcionado para quatro regiões do RNA mensageiro (RNAm), o que melhora a eficiência de silenciamento eficaz e reduz os falsos negativos. A introdução das sequências de RNAi, identifica o RNAm do gene alvo interferindo em sua transcrição e, consequentemente, provoca prejuízo na tradução da proteína.

Para a realização dos experimentos as células foram semeadas em placas de culturas de 6, 24 ou 96 poços, em meio completo sem antibiótico. Após 24 horas, essas células foram transfectadas com 8uM de RNA de interferência, em meio de cultura *Opti-MEM* (*Opti-MEM reduced serum médium*, GE Healthcare Dharmacon, MA, Estados Unidos) para *NNT* (siNNT; L-009809-00-0005) ou controle negativo do silenciador (siNonTargeting, siNT; D-001206-13-05) (ambos

ONTARGETplus SiRNA, GE Healthcare Dharmacon, MA, Estados Unidos), utilizando o reagente de transfecção DharmaFECT 1 (GE Healthcare Dharmacon, MA, Estados Unidos) **(Tabela 3)**.

Tabela 3. Condições utilizadas para a transfecção do gene NNT

	Tubo 1: diluição do siRNA (µl/poço)		Tubo 2: diluição do DharmaFECT1 (µl/poço)		
Placas	**Volume de siRNA (µl) à 8µM**	**Opti-MEM (µl)**	**Volume de DharmaFECT1 (µl)**	**Opti-MEM (µl)**	**Meio de cultura completo (µl/poço)**
6	10	190	5	194,9	2000
24	2,5	47,5	1	49	500
96	0,5	9,5	0,2	9,8	100

Após 24 horas da transfecção, o meio foi trocado por meio completo novo e 72 horas depois da transfecção foram realizados o ensaio de viabilidade celular, a coleta de RNA, proteína e meio de cultura celular, além da preparação para a quantificação de EROs, marcação mitocondrial e imunofluorescência.

A eficiência do silenciamento foi avaliada por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) **(Item 4.5)** e quantificação proteica por meio de *Western Blot* (WB) **(Item 4.6)**.

4.4 Estímulo da esteroidogênese

Para estímulo da esteroidogênese adrenal, as células H295R NT e NNT, foram tratadas com o ativador de AMP cíclico forskolina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) ou com DMSO. Após 48 horas da transfecção com o RNAi, foi adicionado as células 10uM de FSK, suspesna em DMSO, diluída em meio de cultura completo por 24 horas, como padronizado por meio de avaliação da sua curva dose-resposta.

4.5 Análise da expressão gênica (qPCR)

Para extração de RNA total a cultura foi centrifugada e ao resíduo (*pellet*) de células foi adicionado TRIzol Reagente (Invitrogen – Thermo Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos) na proporção de 1,0ml/1x10^7 células. O protocolo utilizado foi o recomendado pelo fabricante. 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 (razão ideal entre 1,6 e 1,8) e sua integridade verificada pela visualização das bandas de RNA ribossômico em gel de agarose 1,2% corado com solução de brometo de etídeo 0,5%. O RNA total extraído das amostras de cultura foi diluído a uma concentração final de 100 ng/µL e utilizado para síntese da fita de DNA complementar (cDNA).

A reação de transcrição reversa foi realizada com o auxílio do kit *HighCapacity cDNA Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos). A seguir foram realizadas as reações de qPCR utilizando os ensaios TaqMan® (Thermo Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos) para avaliar a expressão do RNAm dos genes propostos e dos controles endógenos **(Tabela 4).** O protocolo seguido foi o sugerido pelo fabricante. A seguir as curvas de amplificação foram processadas no *software ABI Prism® 7500* no qual a linha de base (*Baseline*) e o limiar de detecção de fluorescência (*Threshold*) foram estabelecidos. Nos experimentos realizados foram utilizados dois controles endógenos para a linhagem H295R (*ACTB* e *GUSB*). A expressão relativa do RNAm foi calculada por meio do cálculo de 2-ΔΔCt descrita por Livak [29].

Tabela 4.Identificação dos ensaios de PCR em tempo real

Gene ID	Ensaio comercial
NNT (humano)	Hs00966097_m1
GUSB (humano)	4326320E
ACTB (humano)	4326315E
MAPK8 (humano)	Hs00177083_m1
CYP11B1 (humano)	HS01596404
CYP11A1 (humano)	Hs00897320_m1

4.6 Análise da expressão proteica (WB)

As amostras da linhagem celular H295R, NT ou siNNT, foram homogeneizadas em tampão *CelLytic M* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), com o objetivo de lizar as células, juntamente com inibidores de proteases e de fosfatases. Os lizados centrifugados a 12000g por 5 minutos a 4°C, permitindo a obtenção das proteínas no sobrenadante que foi utilizado para as análises de *Western Blot*. A concentração proteica foi determinada utilizando o kit *Qubit™ Protein Assay Kit* no equipamento Qubit™ 2.0.

O extrato proteico (50ug) foi diluído em tampão (Laemmli) e as amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e em seguidas aplicadas no gel juntamente com o marcador de peso molecular *Dual Color Biorad* (BioRadiations Life Science Research, Hercules, Cánada). Após a eletroforese, o gel foi colocado em contato com a membrana de nitrocelulose (Hybond™-C, AmershamBiosciences, GE Healthcare, Reino Unido) e foi realizada a transferência das amostras a 150V por 30 minutos. A membrana contendo as amostras foi bloqueada com tampão (Tris 1M; NaCl 5M; Tween 20 + Blotting-Grade Blocker 5%(170-6404)) por 30 min e incubada com o 1º anticorpo (Anti-NNT (diluição: 1:200; HPA004829, Sigma) ou *AntiGAPDH* (dilution: 1:1000, sc-47724; Santa Cruz Biotechnology) utilizado como controle endógeno, previamente diluídos, em tampão (Tris 1M; NaCl 5M;

Tween 20 + Blotting-Grade Blocker 5%(170-6404)) por 12 horas em a 4 C sob agitação. Após esse período, a membrana foi lavada com tampão (Tris 1M; NaCl 5M; Tween 20). Posteriormente foi realizada a incubação com o 2º anticorpo HRP conjugado *anti-mouse* (diluição: 1:4000; #sc-2005; Santa Cruz Biotechnology) ou *anti-rabbit* (diluição: 1:3000; sc2357; Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora. A detecção das amostras foi feita por quimiluminescência (Kit ECL Western Blotting Detection Reagentscod RPN2109; GE HealthCare) no sistema ChemiDoc™ XRS (BioRad®). Foi realizado um experimento em triplicata.

4.7 Radioimunoensaio

Para a avaliação das concentrações de cortisol nas amostras, foi recolhido o meio de cultura das placas de 6 poços ($1x10^6$cel/ml) das quais foram retiradas as proteínas para realização de WB. As dosagens de cortisol foram realizadas pelo método de radioimunoensaio, padronizado no Laboratório de Endocrinologia do HC-FMRP-USP conforme descrito previamente[30].

As concentrações de cortisol em ng/dL obtidas por radioimunoensaio foram normalizadas pela concentração de proteína (ug) em cada poço. Foram realizados três experimentos em triplicatas biológicas.

4.8 Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada por colorimetria se utilizando do kit *Cell Titer 96 Aqueous* (Promega Corporation, WI, Estados Unidos), o qual afere a viabilidade por meio da bioredução do MTS (tetrazolium) em formazan, com formação de cor, que é diretamente proporcional ao número de células vivas em cultura. Após 48, 72, 96 ou 120 horas da realização do silenciamento de *NNT*, as células foram incubadas com o reagente *CellTiter 96® AQueous One Solution* a 37°C por uma hora. A leitura foi realizada em absorbância de 490nM. Os efeitos do silenciamento de *NNT* sobre a viabilidade celular foram calculados a partir da absorbância obtida pelas células controle, que foi considerada igual à 100% de viabilidade celular. Foram realizados três experimentos em triplicata.

4.9 Análise de parâmetros mitocondriais

4.9.1 Análise da formação de EROs e estresse oxidativo

A detecção das EROs foi realizada utilizando o CMDCFDA (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos). Este é um marcador que emite fluorescência na presença de O_2^- e H_2O_2. As células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços, após 72h de silenciamento do gene *NNT* **(Item 4.3)** foram incubadas com CMDCFDA (5 uM) por 30 minutos, e a seguir lavadas com PBS 1x e ressuspendidas em PBS 1x e a leitura foi 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. Foram analisadas 4.10^5 células em três experimentos independentes.

4.9.2 Marcação Mitocondrial

As análises de massa e marcação mitocondrial foram realizadas por meio da coloração com *Mitotracker deep Red* (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos) segundo os protocolos descritos pelo fabricante. Este é um marcador que por potencial de membrana se acumula em mitocôndrias ativas. As células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços após 72h de silenciamento do gene *NNT* **(Item 4.3)**. Após este período, foram incubadas com Mitotracker (250 nM) por 30 minutos, e a seguir lavadas com PBS 1x e ressuspendidas em PBS 1x e a leitura foi feita no citômetro de fluxo BD-FACS Canto (Becton Dickinson, NJ, Estados Unidos) com comprimento de onda para APC com excitação e emissão a 644／665 nm. Foram analisadas $4X10^5$ células, em três experimentos independentes.

4.10 Imunoflurescência

As células H295R foram plaqueadas em placas de 24 poços, contendo lamínulas estéreis. Foram silenciadas e estimuladas seguindo os protocolos já descritos **(Item 4.3 e 4.4)**. Para verificação da integridade mitocondrial as células vivas foram incubadas durante 30 minutos com 250 nM de *Mitotracker* (Thermo

Fisher Scientific, MA, Estados Unidos). Para confecção das lâminas, após a marcação com *Mitotracker*, as células foram fixadas com formaldeído a 4% e permeabilizadas com BSA a 1% e Triton (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Em seguida foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário (Anti-MAPK8 antibody diluição: 1:200; AB18680, Abcam). Foram incubadas por uma hora com o anticorpo secundário (Alexafluor 488 dunkey anti-rabbit igG; A21206; diluição 1:250; Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos), em seguida incubadas com o marcador nuclear 4,6-diamidino-2-feninlidol (Dapi) (diluição: 1:25000 #4,083, Cell Signaling Technology) por um minuto. Ao fim desses processos as lamínulas foram retiradas dos poços e aderidas em lâminas utilizando o meio de montagem *ProLong™ Diamond* (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 a
1024 pixels foi realizada por meio do software LAS AF versão 2.7.3.9723 (Leica Microsystems, Germany) com as linhas de laser de excitação e emissão a
644⁄665 nm para o *mitotracker* e 365/405nm para o DAPI e 340 nm/ 488nm para os anticorpos. Foi realizado um experimento em triplicata.

4.11 Análise Estatística dos dados

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. As diferenças entre os parâmetros avaliados foram calculadas utilizando teste t de *Student* ou por meio de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de *Tukey* para comparações múltiplas. O limite de significância para todos os testes foi de 95% ($p<0,05$), utilizando o *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad, San Diego, CA).

5. Aspectos éticos e financiamento

Este projeto foi financiado com recursos públicos da agência fomentadora Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), principalmente pelo projeto vinculado ao processo #2014/03989-6. A aluna teve bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (CAPES) no período de agosto de 2020 a julho de 2022. Este estudo não envolveu seres humanos nem experimentos em animais.

Resultados

6. Resultados

6.1 Sequenciamento do gene *NNT* na linhagem H295R

A triagem molecular dos 22 éxons do gene *NNT* na linhagem celular H295R não encontrou alterações potencialmente danosas **(Figura 8)**.

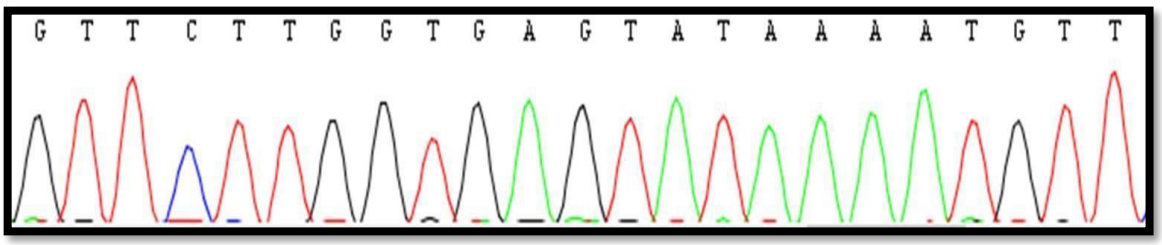

Figura 8. Imagem representativa da análise do sequenciamento direto de fragmento do éxon 2 do gene *NNT*.

6.2 Validação do silenciamento de *NNT*

Para a validação do silenciamento do gene *NNT* na linhagem H295R, foi avaliada a redução da expressão gênica e proteica do gene *NNT* e a viabilidade das células após 48,72, 96 e 120 horas da transfecção com o RNAi (NonTarget ou siNNT).

A linhagem H295R apresentou uma expressão relativa do gene *NNT* de 22%, ou seja, 78% de eficiência do silenciamento (p<0,0001) **(Figura 9A)** e redução de 49% da expressão da proteína (p=0,001) **(Figura 9B e C)**. A viabilidade celular relativa das células após o silenciamento de *NNT* não apresentou alterações em relação ao controle (NT) **(Figura 9D)**. Comprovada a eficiência do silenciamento e a manutenção da viabilidade celular, essas células foram consideradas adequadas para a continuidade dos experimentos.

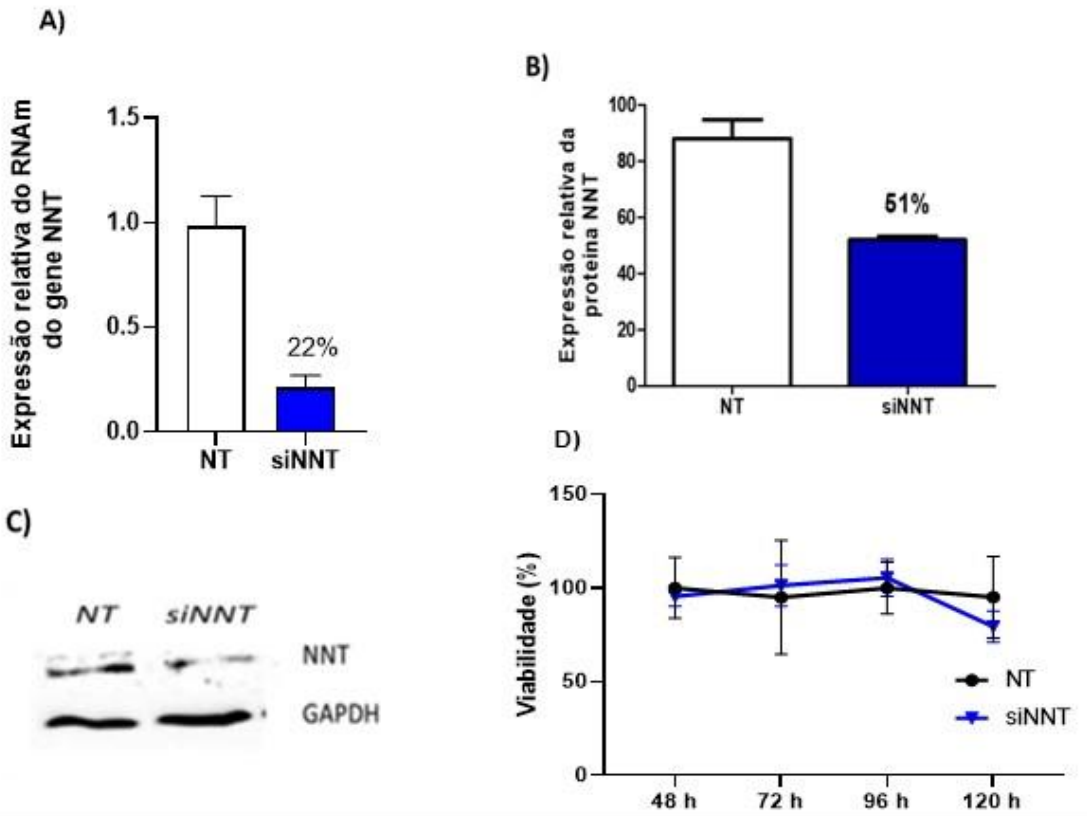

Figura 9. Expressão gênica e proteica de NNT e a viabilidade celular na linhagem H295R após silenciamento do gene NNT.A) Expressão relativa do RNAm do gene *NNT* (2-ΔΔCT) mostrando redução de 78% da expressão do gene (*p*<0,0001). **B)** Expressão relativa da proteína NNT mostrando redução de 49% da expressão da proteína (*p*=0,001). **C)** Imunoblot mostrando redução na expressão de NNT. **D)** A viabilidade celular relativa das células é preservada após o silenciamento de *NNT*.

6.3 Avaliação de parâmetros mitocondriais

6.3.1 Avaliação da formação de EROs após silenciamento de *NNT*

Na linhagem celular H295R não foram observadas diferenças no acúmulo de espécies reativas de oxigênio entre as linhagens NT e a siNNT **(Figura 10**). O achado indicou a capacidade de manutenção da defesa antioxidante destas células mesmo após a redução da expressão de *NNT.*

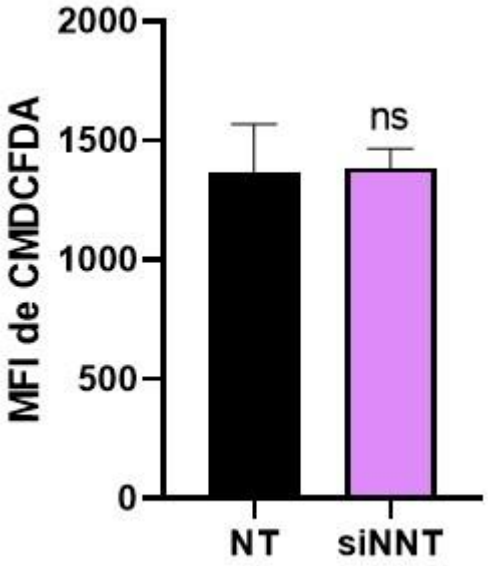

Figura 10. Gráfico representativo da média da intensidade de fluorescência (MIF) do marcador de EROs, CMDCFDA, na linhagem H295R silenciada para o gene *NNT*.

6.3.2 Avaliação da massa e da marcação mitocondrial

Na linhagem celular H295R, em condições basais, não foram observadas diferenças na massa e na marcação mitocondrial entre as linhagens NT e a siNNT **(Figura 11)**.

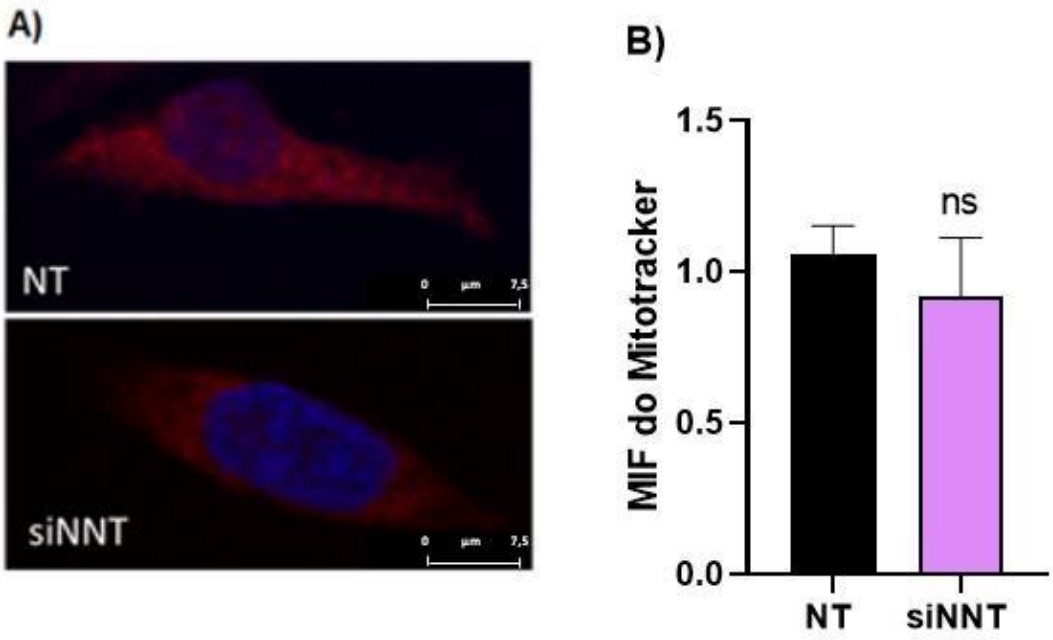

Figura 11. Avaliação da massa e da marcação mitocondrial. A) Imagem, de microscopia confocal em aumento de 7,5µm representativa da massa e integridade mitocondrial em células da linhagem H295R.. B) Gráfico representativo da MIF de fluorescência do marcador, *Mitotracker*, na linhagem H295R silenciada para o gene *NNT*.

6.4 Avaliação da esteroidogênese

6.4.1 Expressão gênica

Foram avaliadas as expressões relativas de dois dos principais genes das etapas mitocondriais da esteroidogênese adrenal após o silenciamento do gene *NNT*. Em condições basais, observamos que o comprometimento do NNT não afeta a expressão dos genes *CYP11A1* e *CYP11B1* **(Figura 12)**.

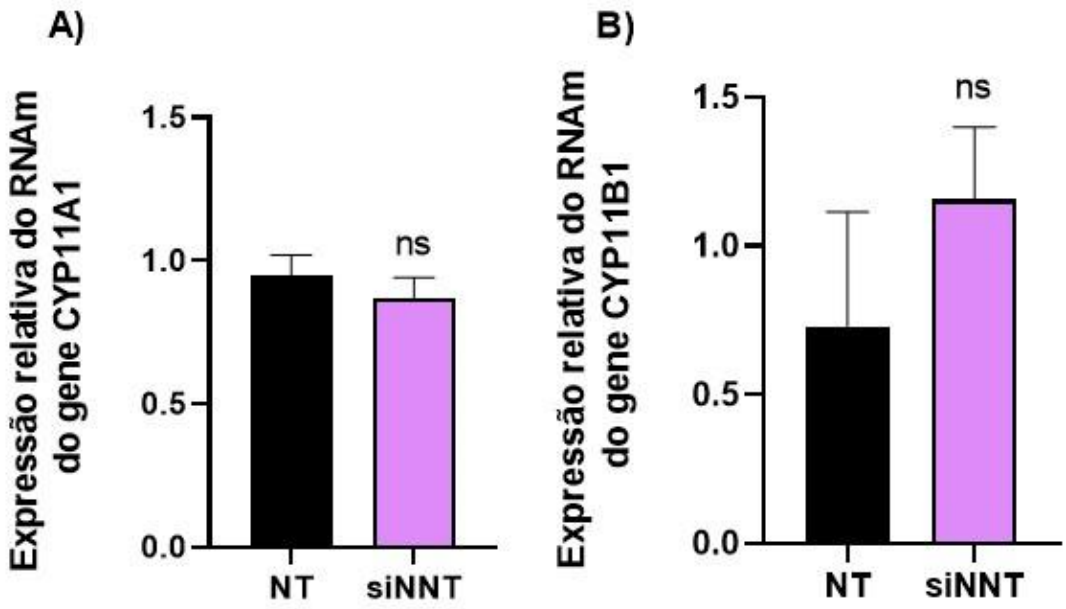

Figura 12. Expressão relativa dos principais genes mitocondriais da esteroidogênese adrenal na linhagem H295R. **A)** Expressão relativa do RNAm do gene *CYP11A1* perante silenciamento do gene *NNT*. **B)** Expressão relativa do RNAm do gene *CYP11B1* perante silenciamento do gene *NNT*

6.4.2 Produção de cortisol

A secreção de cortisol foi alterada significativamente após o silenciamento do gene *NNT* (p=0,004) **(Figura 13)**. Tal achado demonstra que mesmo em situação de equilíbrio redox, ou seja, sem aumento de EROs, o comprometimento do *NNT* afeta a esteroidogênese na linhagem H295R.

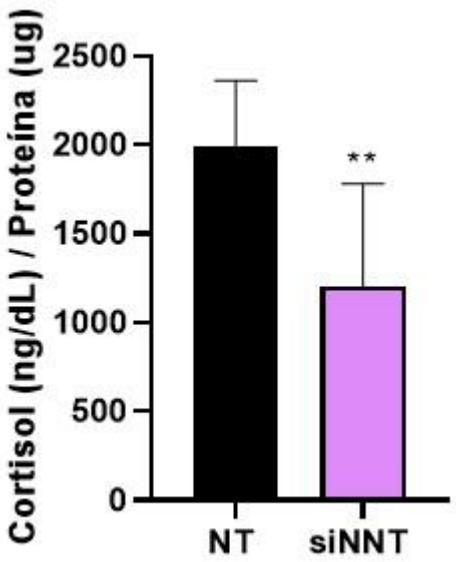

Figura 13. Gráfico representativo da secreção de cortisol normalizado por ug de proteína na linhagem H295R silenciada para o gene *NNT* (* *p*=0,004).

6.5 Análise da expressão de MAPK8

O silenciamento do gene *NNT* aumentou a expressão gênica de *MAPK8* (*p*=0,02) **(Figura 14A).** Ao avaliar a expressão da proteína MAPK8, marcada em verde por imunofluorescência, observa-se aumento da mesma nas células siNNT em relação às NT **(Figura 14B).**

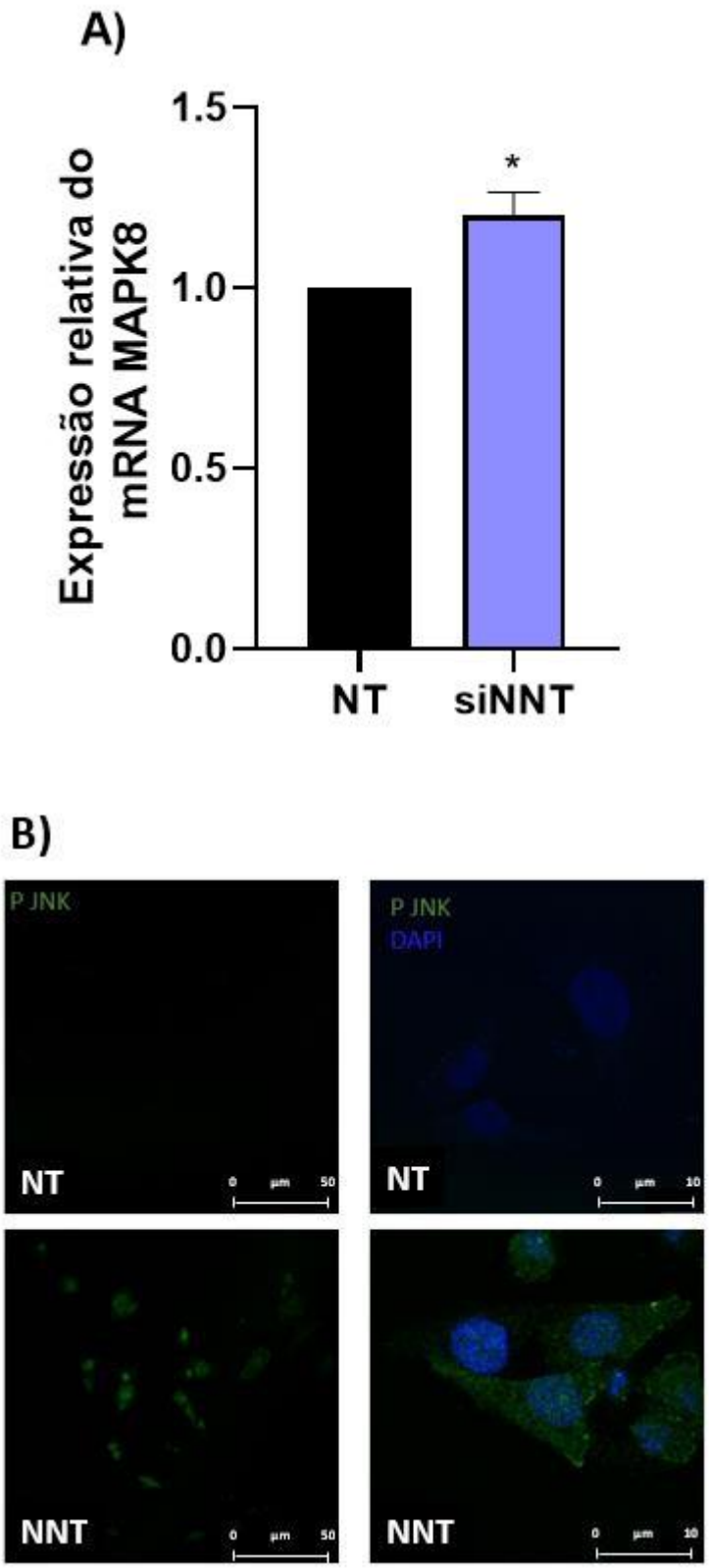

Figura 14. Expressão de *MAPK8* após silenciamento de NNT (* *p*=0,02). **A)** Expressão relativa do gene *MAPK8*. **B)** Imagem representativa da expressão proteica de MAPK8 (verde) nos aumentos de 50µm e 10µm.

6.6 Estímulo da esteroidogênese na linhagem H295R

Em células H295R o estímulo da esteroidogênese com 10uM de FSK por 24h na linhagem H295R aumentou a secreção de cortisol (*p*<0,0001) **(Figura 15A)** e a formação de EROs nas células (*p*=0,0002) **(Figura 15B)**.

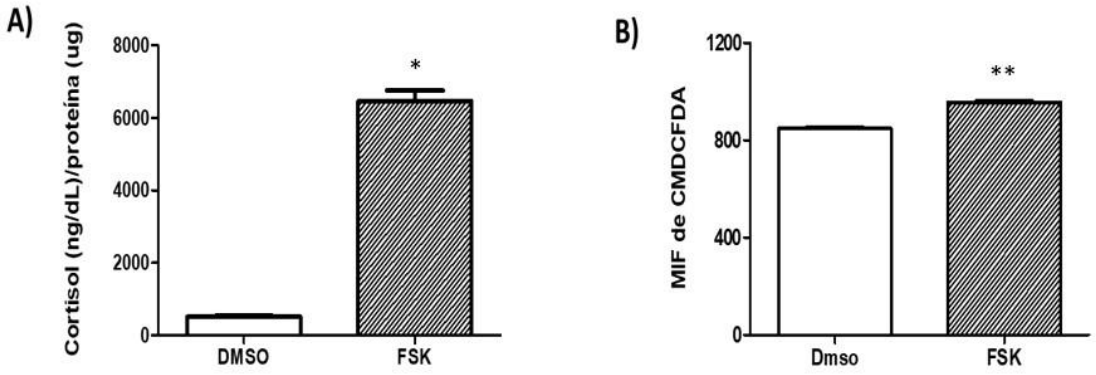

Figura 15. Resposta da linhagem H295R após estímulo com forskolina. **A)** Gráfico representativo da secreção de cortisol (* *p*<0,0001). **B)** Gráfico representativo da formação de espécies reativas de oxigênio (** *p*=0,0002).

Avaliamos então o impacto do silenciamento de NNT e do estímulo da esteroidogênese sobre a viabilidade da linhagem H295R. Após o silenciamento do *NNT*, em condições basais ou perante estímulo da esteroidogênese com FSK por 24 horas, não houve alterações na viabilidade celular **(Figura 16)**.

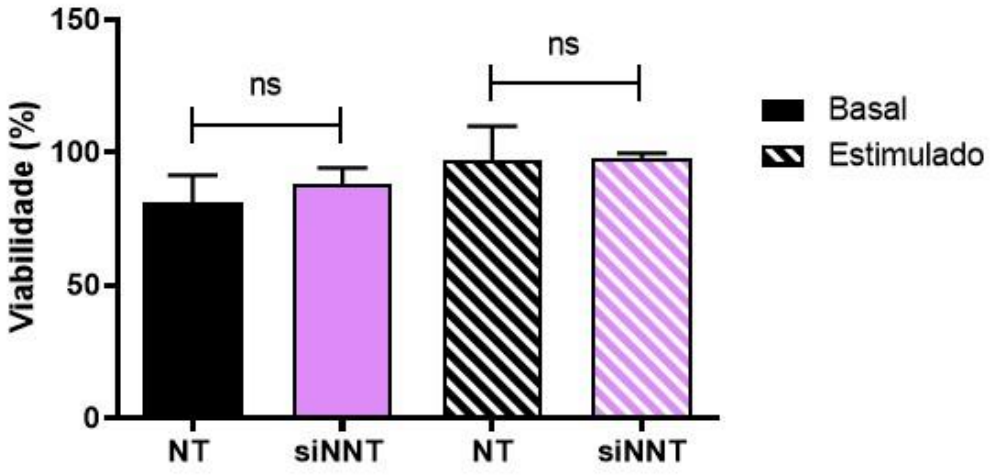

Figura 16. Avaliação do impacto do estímulo com forskolina (FSK) na linhagem H295R. Gráfico representativo da viabilidade celular em células com e sem estímulo de FSK.

6.7 Avaliação de parâmetros mitocondriais após estímulo com FSK

6.7.1 Formação de EROs

Na linhagem celular H295R NT estimulada com FSK foi observado aumento da formação de EROs em relação ao NT sem estímulo (*p*= 0,003) **(Figura 17)**. As células siNNT, quando estimuladas com FSK, porém, não apresentaram aumento na formação de EROs. O que indica uma possível via alternativa de manutenção da defesa antioxidante perante comprometimento da expressão de *NNT.*

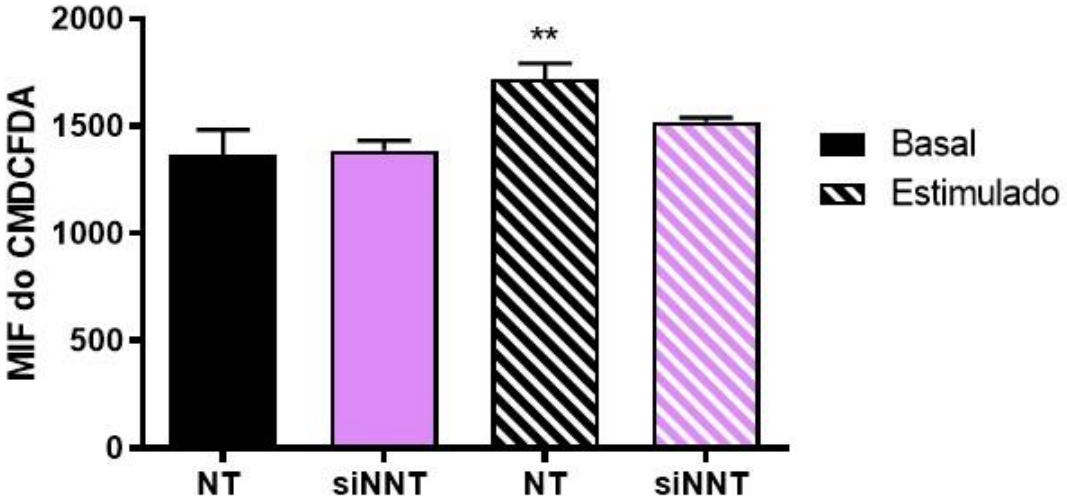

Figura 17. Gráfico representativo da intensidade de fluorescência média (MIF) do marcador de EROs, CMDCFDA, na linhagem H295R silenciada para o gene *NNT* na ausência e presença de estímulo com FSK (* *p*=0,003).

6.7.2 Avaliação da massa e da marcação mitocondrial

Na linhagem celular H295R não foram observadas diferenças na massa e na marcação mitocondrial entre as linhagens NT e a siNNT, em situação basal ou perante estímulo da esteroidogênese com FSK **(Figura 18)**.

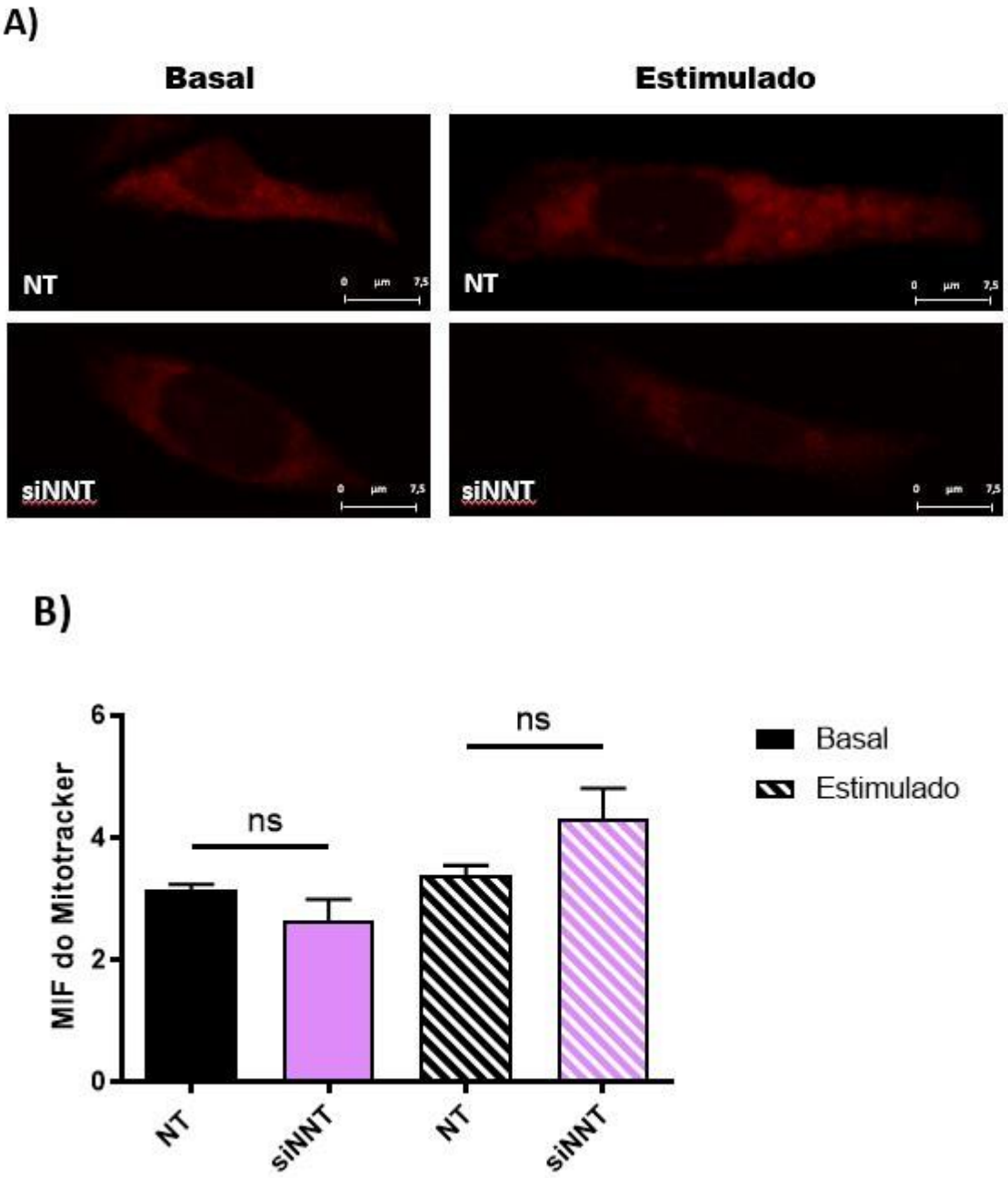

Figura 18. Avaliação da massa e da marcação mitocondrial. A) Imagem representativa da massa e integridade mitocondrial em células da linhagem H295R, sem e com estímulo com forskolina (FSK), em aumento de 7,5µm. B) Gráfico representativo da MIF de fluorescência do marcador, Mitotracker, na linhagem H295R silenciada para o gene *NNT*, sem e com estímulo.

6.8 Avaliação da esteroidogênese após estímulo com FSK

6.8.1 Expressão gênica

A avaliação das expressões relativas dos principais genes envolvidos nas etapas intramitocondriais do processo de esteroidogênese adrenal permitiu observar que o silenciamento do gene *NNT* não afeta a expressão dos genes *CYP11A1* e *CYP11B1*, em células basais ou estimuladas.

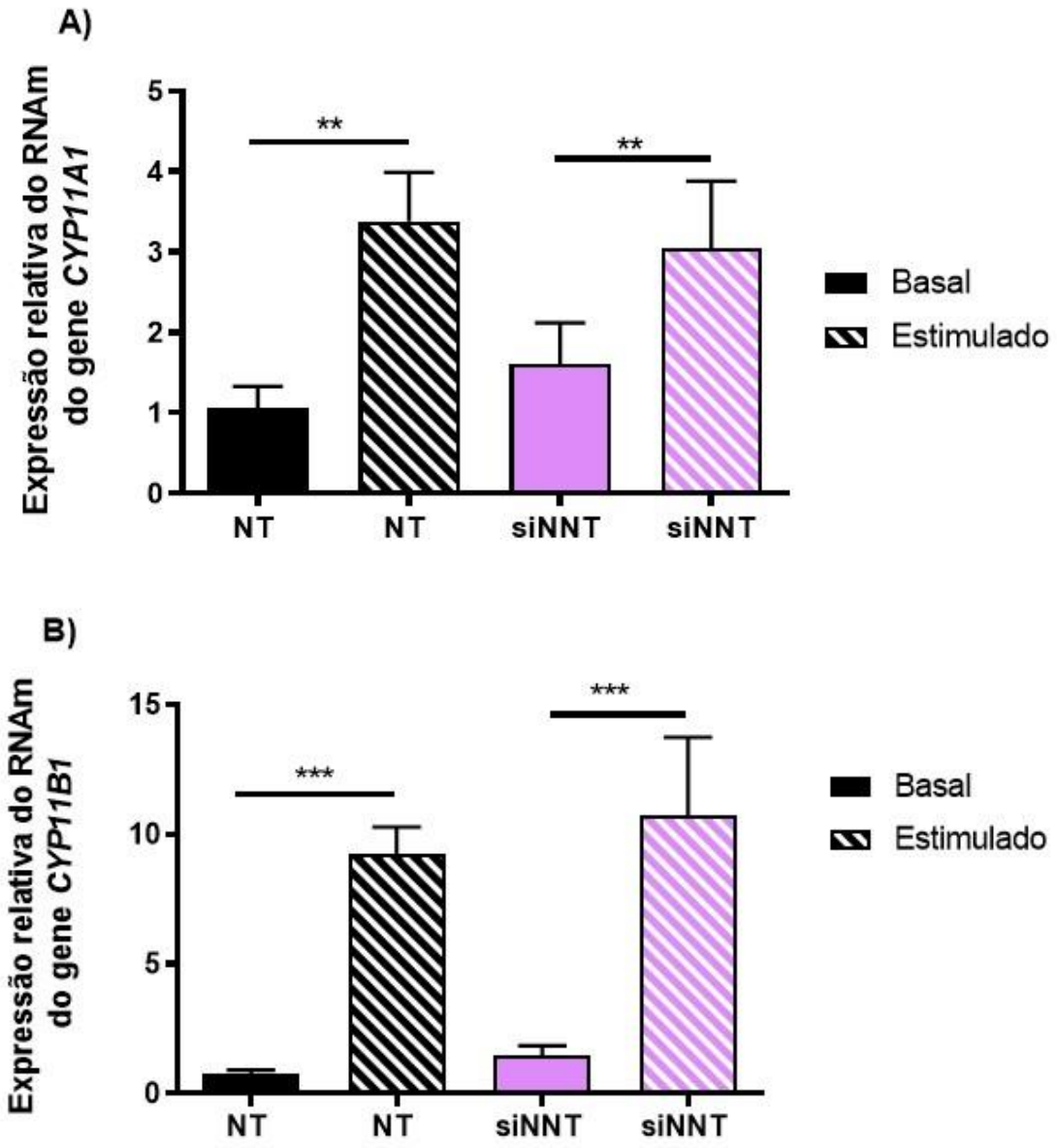

Figura 19. Expressão relativa dos principais genes da etapa mitocondrial da esteroidogênese na linhagem H295R basal ou perante estímulo com FSK**. A)** Expressão

relativa do RNAm do gene *CYP11A1* em células siNNT**. B)** Expressão relativa do RNAm do gene *CYP11B1* em células siNNT.

6.8.2 Produção de cortisol

Como esperado, a secreção de cortisol aumentou significativamente após o estímulo da esteroidogênese com FSK (*p*=0,008) nas células NT. Entretano, nas células siNNT, não houve aumento da secreção de cortisol após estímulo com FSK.

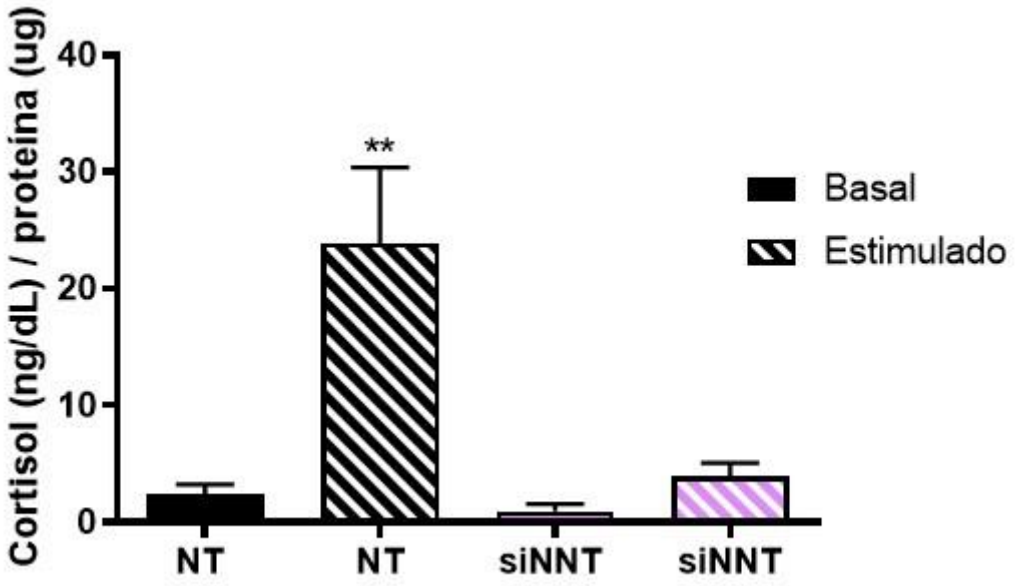

Figura 20. Gráfico representativo da secreção de cortisol normalizado por ug de proteína, na linhagem H295R silenciada para o gene *NNT* com e sem estímulo de FSK (* *p*=0,008).

6.8.3 Análise da expressão de MAPK8

Após o estímulo com 10uM de FSK na linhagem H295R houve aumento significativo na expressão de *MAPK8* (*p*=0,03) repetindo o padrão das células sem estímulo (*p*=0,03) **(Figura 21A)**. A análise da expressão da proteína MAPK8, marcada em verde por imunofluorescência, também demonstrou o aumento da mesma nas células siNNT em relação às NT, sem ou com estímulo de FSK **(Figura 21B).**

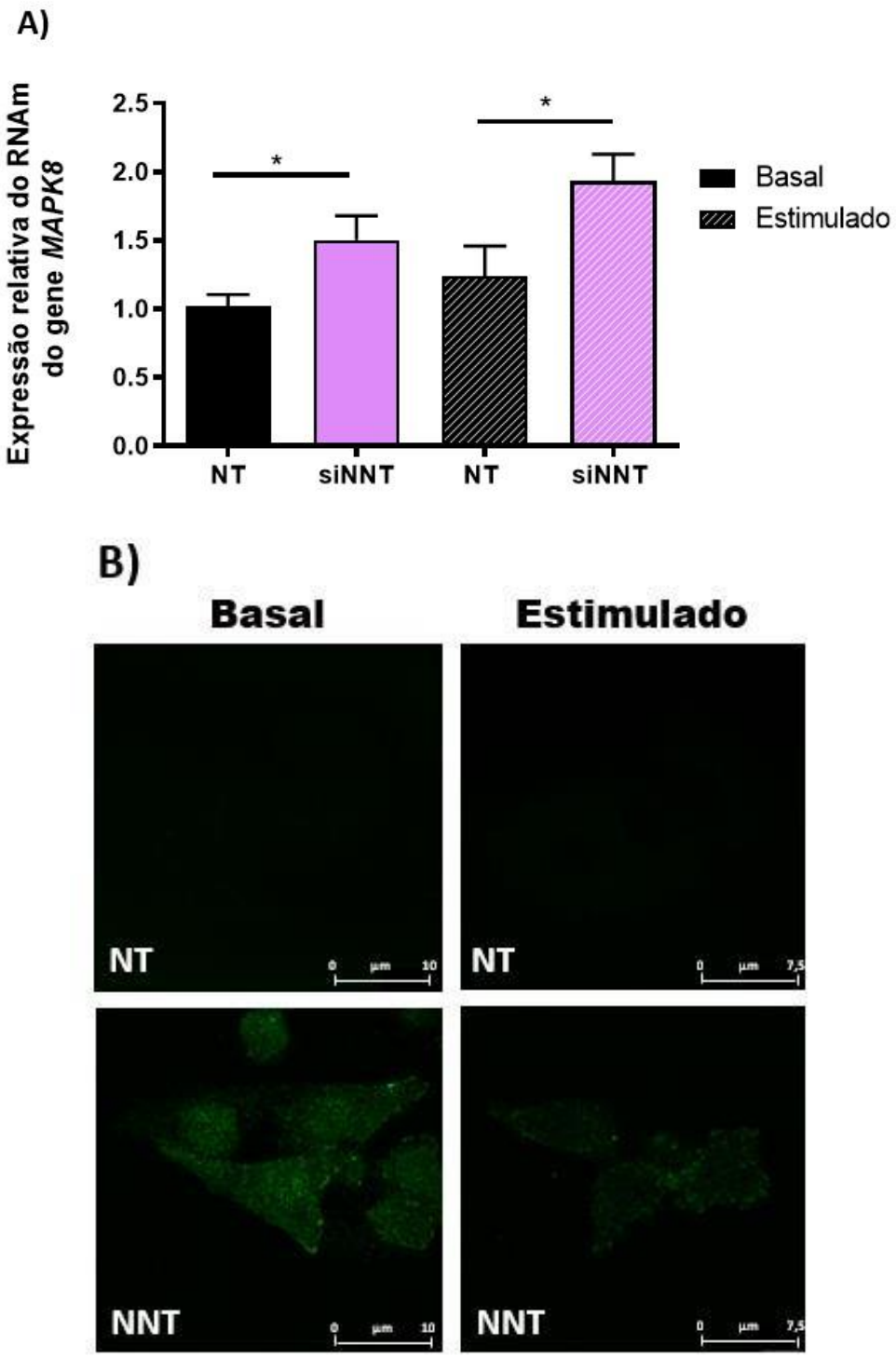

Figura 21. Análise da expressão de MAPK8. **A)** Gráfico representativo da expressão relativa do RNAm do gene *MAPK8*, na linhagem H295R NT ou siNNT, na presença (**p*=0,03) e na ausência de FSK (**p*=0,03). **B)** Imagem de imunofluorescência representativa da expressão proteica de MAPK8 na linhagem H295R NT ou NNT, na ausência (aumento de 10µm) e na presença (aumento de 7,5µm) do estímulo com a FSK.

Discussão

7. Discussão

Alterações na regulação da proteína NNT vêm sendo associadas a alterações no funcionamento do córtex adrenal. Mutações inativadoras no gene *NNT* resultam em insuficiência adrenal primária, com comprometimento da produção de cortisol, porém com preservação da secreção de aldosterona. Estes achado caracterizam a DFG [31].

Apesar da importância da proteína NNT para o funcionamento da esteroidogênese adrenal ser conhecida [12;18], ainda há muitas lacunas nessa área de conhecimento. Os mecanismos que levam à desregulação da esteroidogênese na ausência de NNT ainda precisam ser elucidados.

Nesse sentido, o presente estudo realizou uma análise *in vitro* na linhagem celular de carcinoma adrenocortical H295R com o objetivo de avaliar o impacto do comprometimento da enzima NNT na esteroidogênese adrenal, formação de EROs e marcação mitocondrial. O objetivo principal foi analisar a existência de um mecanismo potencial de compensação ao estresse oxidativo pela via da enzima MAPK8. Para tal, o NNT foi silenciado por meio de RNAi nas células H295R, e ensaios para verificar os efeitos na secreção de cortisol, expressão relativa de genes da esteroidogênese, produção intracelular de EROs e massa e marcação mitocondrial em condições basais e após estímulo com 10uM de forskolina foram realizados. Adicionalmente, a expressão relativa do RNAm de *MAPK8* e a localização e expressão da proteína também foram avaliadas.

A proteína NNT é de grande importância na eliminação das EROs e na manutenção da homeostase celular. Sua principal função é manter alta as concentrações de NADPH no meio intramitocondrial, sendo responsável por regenerar a GSH em GSSG mantendo alta a razão GSH/GSSG durante o processo de eliminação das EROs [12]. O comprometimento dessa proteína, na linhagem H295R, provocou uma diminuição da razão entre as taxas de GSH/GSSG e um aumento nas concentrações de O2-, evidenciando a desregulação do potencial redox dessas células [12].

Por meio de silenciamento com RNAi nossos experimento foram capazes de reduzir de maneira transitória em cerca de 50% a expressão da proteína NNT na linhagem adrenocortical H295R. Nessas condições as células foram capazes

de manter o funcionamento normal dos mecanismos de defesa antioxidante como podemos observar nas análises de formação de EROs e massa e marcação mitocondrial. Meirimadou e colaboradores mostraram alterações em outros parâmetros mitocondriais após o silenciamento dessa linhagem por *short hairpin* [12]. Naquele estudo, as células H295R apresentaram diminuição na razão de conversão de GSH/GSSG e um aumento de O_2^-. É importante ressaltar que a metodologia utilizada naquele estudo induz a redução da proteína por um período prolongado o que pode explicar as alterações no funcionamento da mitocôndria nessas células.

Em condição basal observamos que as células H295R foram capazes de manter a expressão gênica das enzimas mitocondriais *CYP11A1* e *CYP11B1*, fundamentais para a esteroidogênese, mesmo após redução da expressão de *NNT.* Entretanto, a produção de cortisol foi significativamente reduzida. Esse achado demonstra que danos na proteína não afetam diretamente a expressão dos genes da esteroidogênese. Vasileios Chortis e colaboradores, em estudo comparando células com comprometimento transitório (siRNA) e permanente (shRNA) do gene *NNT*, mostraram que em ambos os modelos não houve alteração na expressão gênica desses genes (*CYP11A1* e *CYP11B1*) [17].

O estresse oxidativo estimula a ativação de diversas vias intracelulares, entre elas está a via de sinalização da proteína quinase ativada por estresse, cJun Nterminal (SAP / JNK). Nesta via, duas cinases de especificidade dupla MAP2K4 e MAP2K7 fosforilam e ativam a proteína MAPK8. A MAPK8 promove a apoptose celular, diminuição das junções comunicantes (GAP) entre as células, fibrose, aumento da expressão de genes para hipertrofia e disfunções mitocondriais. Durante esse processo há aumento da ativação da proteína MAPK8 localizada no citosol e translocação da mesma para a membrana interna mitocondrial o que sugere interligação entre o citosol e a mitocôndria para a manutenção do equilíbrio redox [23;24].

Ying F. e colaboradores, em estudo utilizando células de feocromocitoma adrenal de ratos PC12, silenciaram o gene *NNT* e detectaram redução nos níveis intracelulares de NADPH, na relação GSH/GSSG e aumento nos níveis de H_2O_2, culminando no aumento do estado oxidativo. A redução da expressão de *NNT* nessas células resultou também no aumento da expressão de MAPK8 fosforilada

[23]. Esse fato também foi observado no presente estudo, pois ao reduzirmos a expressão da proteína NNT na linhagem H295R foi observado o aumento das expressões gênica e proteica da MAPK8. Em nosso estudo as células não apresentaram desregulação no equilíbrio redox, o que nos sugere que a ativação da via da MAPK8 pode estar servindo como uma via de compensação nessas células, permitindo que elas mantenham o equilíbrio redox em detrimento da secreção de cortisol.

Estes dados obtidos na análise de células adrenais em situação basal indicam que, frente a diminuição parcial e temporária na função da proteína NNT, as células podem ativar mecanismo de compensação ou predileção, mantendo o funcionamento do sistema antioxidante em detrimento da esteroidogênese adrenal.

Alguns estudos mostram que a indução do estresse oxidativo em células com a função de NNT comprometida, pode afetar ainda mais o sistema de defesa antioxidante e comprometer também a esteroidogênese [4;12]. Um estudo realizado pelo nosso grupo avaliou células mononucleares sanguíneas de indivíduo homozigoto e heterozigotos para a mutação pG866D no gene *NNT*, a qual está relacionada com a DFG. Nesse trabalho os indivíduos heterozigotos não apresentam fenótipo para a doença. A avaliação de suas células mostrou que em situação basal essas apresentam um funcionamento normal do sistema da glutationa. Porém, quando submetidas a estresse oxidativo, as células dos heterozigotos apresentaram GSH significativamente menor que nos controles indicando um potencial desequilíbrio redox quando esses indivíduos são retirados das condições fisiológicas basais [4].

Em estudo utilizando camundongos naturalmente deficientes de NNT, Picard e colaboradores, detectaram diminuição da secreção de corticosterona e aumento de ACTH desses animais em relação aos animais controle, quando esses eram submetidos a uma situação de estresse [18].

Para avaliar a capacidade de resposta dessas células a situações de estresse causadas pelo aumento da esteroidogênese, induzimos esse aumento pela adição de 10µM de FSK à cultura das células adrenocorticais durante vinte e quatro horas. A FSK se liga ao seu receptor acoplado à proteína G (GPCR) e

o fosforila, ativando a via do monofosfato cíclico de adenosina cíclico (AMPc). O AMPc ativa a proteína quinase A (PKA) o que leva à fosforilação de resíduos de serina em outras proteínas da cascata de sinalização intracelular levando ao aumento da expressão gênica e proteica dos receptores de glicocorticoides (RG) [32]. Na linhagem H295R o estímulo com FSK aumenta, principalmente, a expressão de *CYP11B1* e a secreção de cortisol [33].

Como esperado, verificamos que o estímulo com FSK provocou aumento da secreção de cortisol e da expressão de genes *CYP11A1* e *CYP11B1, ambos* envolvidos na esteroidogênese adrenal. Tal dado demonstra a resposta das células H295R ao estímulo com FSK e o aumento da esteroidogênese. A viabilidade celular não foi alterada perante o estímulo da FSK apesar desta promover aumento da viabilidade celular em células H295R[33]. A ausência do aumento da viabilidade celular nas células estimuladas pode estar relacionada à metodologia de tratamento com a FSK. No presente experimento, estas células foram submetidas à apenas 24 horas de tratamento, sendo a seguir avaliada sua viabilidade celular. Dessa forma não é possível avaliar os efeitos do tratamento sobre sua viabilidade nas células H295R no longo prazo. Em paralelo, observamos que a indução da esteroidogênese causou também um acúmulo de EROs, o que não foi observado em células não estimuladas. Esse acúmulo indica que o sistema de defesa antioxidante mitocondrial (GSH-PX/GSSG-PX) não é capaz de reduzir e eliminar todo o aporte de EROs produzido excessivamente durante a esteroidogênese perante estímulo de FSK. O acúmulo de EROs no meio intracelular causa danos irreversíveis à proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, comprometendo as funções celulares e levando até à morte celular [9].

Ao avaliarmos a resposta ao estímulo com FSK das células H295R silenciadas para o gene *NNT* notamos resposta diferente à observada nas células com a proteína nativa. Apesar da expressão dos genes *CYP11A1* e *CYP11B1* aumentarem após o estímulo com FSK não houve aumento da secreção de cortisol. Esta observação indica que danos na proteína NNT podem bloquear a secreção de cortisol. Nas células H295R suficientes em NNT houve aumento na secreção de cortisol, acompanhado de aumento na produção de EROs. Entretanto, nas células H295R cujo NNT foi silenciado, esse incremento não ocorreu. Esses dados indicam que essas células podem estar bloqueando

o aumento da esteroidogênese para evitar uma maior formação de EROs e manter assim o equilíbrio redox.

O aumento da expressão relativa do RNAm da *MAPK8*, assim como o aumento de sua proteína, também foi observado nas células H295R em situação de estímulo e pode justificar o acúmulo de EROs nas células controle estimuladas que não se repete nas células estimuladas com comprometimento do *NNT*.

Conclusão

8. Conclusão

Em síntese, nossos dados demonstram que as células adrenocorticais com redução parcial e temporária na expressão gênica e proteica de NNT são capazes de manter a homeostase redox mitocondrial em detrimento da secreção de cortisol. A ativação da via MAPK8 parece ser um potencial mecanismo de compensação durante esse processo. Mesmo em uma situação de demanda aumentada de esteroides adrenais, causada pelo estímulo da FSK, a MAPK8 parece manter equilíbrio redox às custas de redução da capacidade esteroidogênica celular.

Referências

9. Referências

1. Miller, W. L. A brief history of adrenal research. Steroidogenesis - The soul of the adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* **371**, 5–14 (2013).

2. Miller, W. L. & Auchus, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.* **32**, 81–151 (2011).

3. Antonini S., Cavalcanti M., G. D. *Doenças raras de A a Z*. (2013).

4. Bodoni, A. F. Estresse oxidativo mitocondrial e deficiência familiar de glicocorticoide: caracterização fenotípica e funcional da nova variante p.G866D no gene Nicotinamide Nucleotide Transidrogenase (NNT). (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017).

5. Prasad, R., Kowalczyk, J. C., Meimaridou, E., Storr, H. L. & Metherell, L. A. Oxidative stress and adrenocortical insufficiency. *J. Endocrinol.* **221**, (2014).

6. Diemer, T., Allen, J. A., Hales, H. K. & Hales, D. B. Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (STAR) protein and steroidogenesis. *Endocrinology* **144**, 2882–2891 (2003).

7. Hales, D. B. Mitochondrial Function in Leydig Cell Steroidogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **228(1–2)**, 23–38 (2005).

8. Haddad, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell. Signal.* **14**, 879–897 (2002).

9. Nelson, D. . & Cox, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. (Editora Artemed, 2011).

10. Haddad, J. J. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 969–977 (2004).

11. Knut & Alice Wallenberg foundation. The Human Protein Atlas.

12. Meimaridou, E. *et al.* Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nat. Genet.* **44**, 740–742 (2012).

13. Ouchida, A. T. *et al.* SET protein accumulation prevents cell death in head and neck squamous cell carcinoma through regulation of redox state and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1866**, 623–637 (2019).

14. Weinberg-Shukron, A. *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. *J. Med. Genet.* **52**, 636–641 (2015).

15. Bodoni, A. F. The role of Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase in adrenal and testicular steroidogenesis. (Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, 2021).

16. Meimaridou, E., et al. NNT is a key regulator of adrenal redox homeostasis and steroidogenesis in male mice. *J. Endocrinol.* **236**, 13 (2018).

17. Chortis, V. *et al.* Nicotinamide nucleotide transhydrogenase as a novel treatment target in adrenocortical carcinoma. *Endocrinology* **159**, 2836–2849 (2018).

18. Picard, M. *et al.* Mitochondrial functions modulate neuroendocrine, metabolic, inflammatory, and transcriptional responses to acute psychological stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E6614–E6623 (2015).

19. Zarubin, T. & Han, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* **15**, 11–18 (2005).

20. Murata, T., Shinozuka, Y., Obata, Y. & Yokoyama, K. K. Phosphorylation of two eukaryotic transcription factors, Jun

dimerization protein 2 and activation transcription factor 2, in Escherichia coli by Jun N-terminal kinase 1. *Anal. Biochem.* **376**, 115–121 (2008).

21. Pereira, S. S., Monteiro, M. P., Antonini, S. R. & Pignatelli, D. Apoptosis regulation in adrenocortical carcinoma. *Endocr. Connect.* **8**, R91–R104 (2019).

22. Yoshitane, H. *et al.* JNK regulates the photic response of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep.* **13**, 455–461 (2012).

23. Yin, F., Sancheti, H. & Cadenas, E. Silencing of nicotinamide nucleotide transhydrogenase impairs cellular redox homeostasis and energy metabolism in PC12 cells. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1817**, 401–409 (2012).

24. Zhou, Q., Lam, P. Y., Han, D. & Cadenas, E. c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons. *J. Neurochem.* **104**, 325–335 (2008).

25. Mermejo, L. M. *et al.* Altered expression of noncanonical Wnt pathway genes in paediatric and adult adrenocortical tumours. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **81**, 503–510 (2014).

26. Abidi, P. *et al.* Oxidative stress-induced inhibition of adrenal steroidogenesis requires participation of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Endocrinol.* **198**, 193–207 (2008).

27. Gazdar,A.F; Oie,H.K; Shacleton,C.H; Chen, T. R. a. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res.* **50**, 5488–5496 (1990).

28. Cypess, R. H. American Type Culture Collection - ATCC.

29. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

30. Castro M, M. A. Beta-lipotropin/adrenocorticotropic hormone responses to corticotropin releasing hormone, hypoglycemia, metyrapone and dexamethasone in normal human subjects. *Braz J Med Biol Res.* **23**, (1990).

31. Florence Roucher-Boulez, et al. NNT mutations: a cause of primary adrenal insufficiency, oxidative stress and extra-adrenal defects. *Eur. J. Endocrinol.* **175**, pp.73-84 (2016).

32. Dong, Y., Aronsson, M., Gustafsson, J. A. & Okret, S. The mechanism of cAMP-induced Glucocorticoid Receptor Expression. *J. Biol. Chem.* **264**, 13679–13683 (1989).

33. Xing, Y., et al. The effects of ACTH on steroid metabolomic profiles in human adrenal cells. **239**, 1476–1488 (2011).