

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)**

Beatriz Caroline de Moraes

**Efeito de mutações no gene TrkA encontradas na
insensibilidade à dor congênita sobre vias de
sinalização celular.**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

17/08/2020

Beatriz Caroline de Moraes

**Efeito de mutações no gene TrkA encontradas na
insensibilidade à dor congênita sobre vias de
sinalização celular.**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Bioquímica).*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Deborah Schechtman

São Paulo

2020

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.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:

Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M828e Moraes, Beatriz Caroline de
Efeito de mutações no gene TrkA encontradas na insensibilidade à dor congênita sobre vias de sinalização celular. / Beatriz Caroline de Moraes. - São Paulo, 2020.
100 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Schechtman, Deborah

1. Dor. 2. Mutação. 3. TrkA. I. T. II.
Schechtman, Deborah, orientador.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora da Assunção que sempre me protegeram em todos caminhos e escolhas da minha trajetória.

A minha família, especialmente a minha mãe, por todo o carinho e paciência nos dias difíceis. Aos irmãos, Thales que sempre demonstrava interesse quando falava desse projeto e a Geovana, que foi meu ponto de conforto toda vez que chegava em casa nessa jornada em São Paulo. E também ao meu namorado Lucas que sempre me deu forças para me incentivar a concluir esse trabalho.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Deborah Schechtman, por me aceitar como sua orientanda e me dar a oportunidade de trabalhar com esse projeto que me conquistou. Agradeço por todo o conhecimento adquirido, não só acadêmico, mas de vida. Pela confiança que sempre teve em mim e por me tornar uma pesquisadora melhor. Por cada uma das experiências diferentes e especiais que tivemos durante a elaboração desse trabalho.

Aos amigos do LAPIC, que compartilham diariamente as frustrações e alegrias da vida acadêmica e que me auxiliaram a não desistir no meio do processo, obrigada por todas as conversas e risadas na copinha e conselhos nos momentos de crise.

A Prof^a. Dr^a. Camila Dale, por abrir seu laboratório para a parceria, que foi essencial para o sucesso desse trabalho, tanto na infraestrutura, quanto os inúmeros conselhos que você me deu. Agradeço a todos do laboratório, em especial a Victoria Oliveira por toda a ajuda e apoio.

A Elaine Flávia Toniolo por me ensinar tanto nesse mestrado, por ser um exemplo de mulher, cientista e professora a ser seguido. Agradeço pelo apoio, pelos conselhos, dicas, correções, pelas risadas e mais que tudo pelo carinho em todos os momentos.

As amigas que foram um dos melhores presentes que encontrei no IQ USP, Mayara Botelho, Rebeqa Tomasin e Ana Maria Rodrigues, que acompanharam toda essa trajetória do mestrado e eram meu refúgio em todos os momentos, sejam eles felizes ou tristes. Agradeço imensamente a amizade

de vocês e quero levá-las para a vida toda. Aqui nesse momento cabe um agradecimento especial ao Allan Pradelli e Lutero Hasenkamp, pelos inúmeros dias de companhia quando trabalhávamos até tarde, por todas as crises de riso no momento errado no laboratório e principalmente por tudo que aprendi com vocês.

Aos meus conhecidos próximos, que estão sempre presentes em todos os momentos da minha vida, Helara Branco, Alexandre Teixeira e minha querida Isabelle Resende, que me acolheu em sua casa e é um exemplo de pessoa para mim. A minha companheira de viagens Laura Nardelo e minha grande amiga Jéssica Silva, por nunca desistir de mim, mesmo eu estando distante na maioria do tempo.

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento desse projeto 2018/07201-5, fator que foi essencial para seu desenvolvimento e ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo por todo o suporte e infraestrutura que essa instituição me ofereceu.

“Se você não sabe onde quer ir, qualquer caminho serve.”

Lewis Carrol

RESUMO

De Moraes, B. C. **Efeito de mutações no gene TrkA encontradas na insensibilidade à dor congênita sobre vias de sinalização celular.** 2020. 108p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A insensibilidade congênita à dor e anidrose (CIPA), uma desordem genética autossômica recessiva, é caracterizada por episódios recorrentes de febre inexplicável, anidrose, retardo mental e principalmente pela falta de percepção da dor sensorial, devido à ausência de fibras sensitivas primárias dependentes de NGF e de neurônios simpáticos pós ganglionares. Mutações que causam perda de função do receptor de tropomiosina quinase A (TrkA) estão entre os principais fatores que levam à doença. O TrkA é um receptor de alta afinidade pelo NGF, e a formação do complexo NGF/TrkA tem papel no desenvolvimento neuronal, bem como na sensibilização para percepção de aumento de temperatura e de estímulo mecânico, que resulta em hiperalgesia. Muitas mutações compõem o espectro da síndrome da CIPA, entre elas, as localizadas no domínio quinase do TrkA são o alvo desse estudo, pois estas podem alterar o funcionamento da quinase e, assim, interferir em importantes vias de sinalização celular (PLC γ , Akt e ERK). Com o objetivo de compreender como as vias de sinalização são alteradas pelas mutações em TrkA na CIPA, através da análise de artigos publicados no PubMed, identificamos 131 mutações diferentes neste gene. As mutações *missense* foram localizadas na estrutura tridimensional e classificadas em três classes (1) mutações próximas ao local de ligação da ATP (sítio catalítico), (2) mutações no local de ligação ao substrato (SBS) e (3) mutações em outras regiões estruturadas do TrkA que poderiam impedir o enovelamento correto da proteína. Validamos *in vitro* uma das mutações de CIPA (R654C), classificada tanto como mutação no sítio de

ligação de ATP quanto na região de SBS. Como previsto nas modelagens, essa mutação apresentou inativação total da TrkA. As mutações *nonsense* e *frameshift* também afetariam significativamente a estrutura da TrkA, porém, embora algumas delas como Q770*, Q782*, V777Cfs*91 e L784Sfs*79, fariam com que uma proteína truncada fosse expressa afetando especificamente a ancoragem de PLC γ , sua presença desencadeou o fenótipo de CIPA nos pacientes, indicando que a ativação de PLC γ seria uma importante via para a ocorrência da dor. Baseado nestes achados, foi desenvolvido um peptídeo que inibe a interação do TrkA e PLC γ , denominado QYP. Em células HEK 293 transfectadas com TrkA, QYP foi capaz inibir a ativação de PLC γ mediada por NGF. Ainda, em ensaios comportamentais *in vivo* de dor inflamatória aguda e crônica induzida por CFA, QYP foi capaz de inibir a hipersensibilidade mecânica e parcialmente a térmica causada pela inflamação por até 6 horas. QYP também se mostrou mais eficiente que inibidores comerciais (GNF, inibidor de TrkA e U73347, inibidor de PLC) na reversão da sensibilidade dolorosa. Com base nos nossos resultados, validamos que a via de PLC γ é essencial para o desenvolvimento de dor mecânica, sendo essa via um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos analgésicos. Ainda, o peptídeo QYP mostrou-se efetivo na reversão da sensibilidade dolorosa aguda e crônica em modelos *in vivo* de dor inflamatória.

Palavras-chave: TrkA, NGF, CIPA, Dor, Mutação, PLC γ .

ABSTRACT

De Moraes, B.C. **Effect of mutations in TrkA gene found in insensitivity to congenital pain on cell signaling pathways.** 2020. 108p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Mutations that cause loss of function of the tropomyosin kinase A receptor (TrkA) are among the main factors that lead to the disease. TrkA is a high affinity receptor for NGF, and the formation of the NGF / TrkA complex plays a role in neuronal development, as well as in sensitization to perceived temperature increases and mechanical stimulation, which results in hyperalgesia. Many mutations compose the syndrome spectrum of CIPA, amongst them the ones found in the kinase domain are object of the present study, because they can alter this domain's activity and thus interfere in important signaling pathways mediated by TrkA (PLC γ , Akt, and ERK). With the objective of understanding how signaling pathways are altered by the mutations in CIPA, we searched several published articles on PubMed and identified the description of more than 131 mutations in this gene. Missense mutations were in the three-dimensional structure and classified in three kinds: (1) mutations close to the ATP binding site (catalytic site), (2) mutations in the substrate binding site (SBS), and (3) mutations in other structured regions of TrkA, that can prevent correct protein folding. We validated in vitro one of the CIPA mutations (R654C), both as a mutation at the ATP binding site and in the SBS region. As predicted in the modeling, this mutation presented total inactivation of TrkA. The nonsense and frameshift mutations would also significantly affect TrkA structure, although some of them such as Q770*, Q782*, V777Cfs*91 and L784Sfs*79, would lead to the

expression of a truncated protein, specifically effecting PLC anchoring, their presence triggered the phenotype of CIPA in patients, indicating that the activation of PLC γ would be an important route for the occurrence of pain. Based on these results, a peptide was developed that inhibits an interaction of TrkA and PLC γ , called QYP. In HEK 293 cells transfected with TrkA, this peptide was capable of inhibiting PLC γ activation mediated by NGF. In addition, in in vivo behavioral trials of acute and CFA-induced inflammatory pain, QYP was able to inhibit mechanical hypersensitivity and partially caused by inflammation for up to 6 hours. QYP also proved to be more efficient than commercial inhibitors (GNF, TrkA inhibitor and U73347, PLC inhibitor) in reversing painful sensitivity. Based on our results, we validate that the PLC γ pathway is essential for the development of mechanical pain, which is a potential target for the development of new analgesics. In addition, the QYP peptide has been shown to be effective in reversing acute and chronic mechanical painful sensitivity in in vivo models of inflammatory pain.

Key words: TrkA, NGF, CIPA, Pain, Mutation, PLC γ .

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA	Adjuvante completo de Freund
CIPA	Insensibilidade congênita a dor
CYS	Domínio Cisteína
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DpnI	Enzima de restrição que reconhece sítios metilados
DRG	Gânglio da raiz dorsal
ELK-1	Fator de Transcrição ELK1
ERK 1/2	Quinase reguladora de sinal extracelular
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico 2
Grb2	Fator de crescimento ligado ao receptor 2
GDP	Guanosina difosfato
GNF5837	Inibidor de TrkA
GTP	Guanosina trifosfato
HSAN IV	Neuropatia sensorial e autonômica hereditária do tipo IV
HEK 293	Célula de rim embrionário humano 293
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
Ig1/2	Domínio imunoglobulina 1 e 2
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IP3	Inositol trifosfato
LNBIO	Laboratório Nacional de Biociências
LRR	Domínio rico em leucina
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MEK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NF-κB	Fator nuclear kappa B

NGF	Fator de crescimento nervoso
NTRK1	<i>Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1</i>
p85	Subunidade regulatória da PI3K
PBS	Tampão salino de fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Banco de dados de proteína
PDK1	Quinase dependente de fosfoinositol
PEI	Polietilenoimina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC γ	Fosfolipase C γ
QYP	Peptídeo fosforilado
QYP*	Peptídeo não fosforilado
QYP ^{-TAT}	Peptídeo sem o carreador TAT
RAF	Fibrossarcoma rapidamente acelerado
Ras	Oncogene viral de sarcoma murino
RIPA	Tampão de lise
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SH2	Src Homologo 2
SHC	Proteína transformadora SHC
SNC	Sistema Nervoso Central
Sos	Fator de troca de guanina de Ras
SP	Substância P
SP	Peptídeo Sinal
TAT	Carreador
TKD	Domínio quinase
TM	Domínio transmembrana

TrkA	Receptor tropomiosina quinase (Receptor de alta afinidade pelo NGF)
TRPV1	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1</i>
U73347	Inibidor de PLC

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Dor e nocicepção	15
1.2 TrkA e NGF	21
1.3 Insensibilidade congênita a dor com anidrose	29
2. OBJETIVO GERAL.....	32
2.1 Objetivos específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Cultura celular e transfecções.....	33
3.2 Mutagênese sítio dirigida	33
3.3 Western blot.....	34
3.4 Peptídeos.....	37
3.5 Modelagem Molecular.....	37
3.6 Avaliações comportamentais	38
3.6.1 Animais	38
3.6.2 Modelo CFA.....	38
3.6.3 Teste de sensibilidade ao estímulo mecânico	39
3.6.4 Teste de sensibilidade ao estímulo térmico quente	40
3.6.5 Análise estatística	41
4. RESULTADOS	41
4.1 Mutações da TrkA presentes na Insensibilidade Congênita à Dor com Anidrose (CIPA).....	41
4.2 Análise da atividade <i>in vitro</i> do peptídeo QYP	51
4.3 A inibição da interação da PLC β com TrkA tem um efeito analgésico na dor inflamatória.	56
5. DISCUSSÃO.....	64
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
7. REFERENCIAS	69
8. APÊNDICE	81
9. SÚMULA CURRICULAR	106

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor e nocicepção

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a, dano real ou potencial ao tecido” (RAJA et al., 2020). Sendo assim, o papel fisiológico primordial da dor estaria associado a uma resposta de proteção para a manutenção da integridade dos tecidos, funcionando como um sinal de alerta para o indivíduo (WOOLF; MA, 2007).

Os estímulos dolorosos são percebidos por terminações nervosas específicas para a dor, os nociceptores, que não estão localizados em nenhuma estrutura anatômica específica, mas sim dispersos pelo corpo (JULIUS; BASBAUM, 2001). Esses estímulos recebidos são transduzidos em potenciais de ação, e a informação é encaminhada até o Sistema Nervoso Central (SNC) pelos neurônios de primeira ordem, cujos axônio podem compor as fibras do tipo C ou A δ , (KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, 2003). Diferente dos mecanorreceptores e termoreceptores, os nociceptores possuem um limiar de ativação alto, característica que garante sua ativação apenas com estímulos intensos, que podem ser de natureza mecânica, térmica ou química (WOOLF; MA, 2007).

Fibras C e as A δ tem características anatômicas específicas, e, por conseguinte, propriedades condutoras distintas. Enquanto as fibras C não são mielinizadas, e, portanto, conduzem o estímulo mais lentamente, as A δ são mielinizadas e de condução mais rápida (JULIUS; BASBAUM, 2001). Ainda, as fibras C podem ser divididas em duas classes: (1) as fibras peptidérgicas, que

expressam o neuropeptídeo substância P (SP), CGRP e o receptor de alta afinidade para o fator de crescimento nervoso (NGF) acoplado à tirosina quinase A (TrkA) e (2) as fibras não peptidérgicas, que não expressam SP, CGRP e nem TrkA e são positivas para IB4 (SNIDER; MCMAHON, 1998).

Os corpos celulares dos nociceptores sensoriais primários, estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG) da medula espinal e também no nervo trigeminal, e fazem conexões sinápticas na substância cinzenta do corno dorsal da medula espinhal (PLEUVRY; LAURETTI, 1996). Os neurônios de segunda ordem por sua vez, projetam axônios que ascendem por meio de tratos específicos até o tálamo, onde irá ocorrer a recepção, integração e transferência de potencial nociceptivo para o córtex cerebral. A informação será então processada como dor, em múltiplas áreas do córtex cerebral (APKARIAN et al., 2005; JULIUS; BASBAUM, 2001).

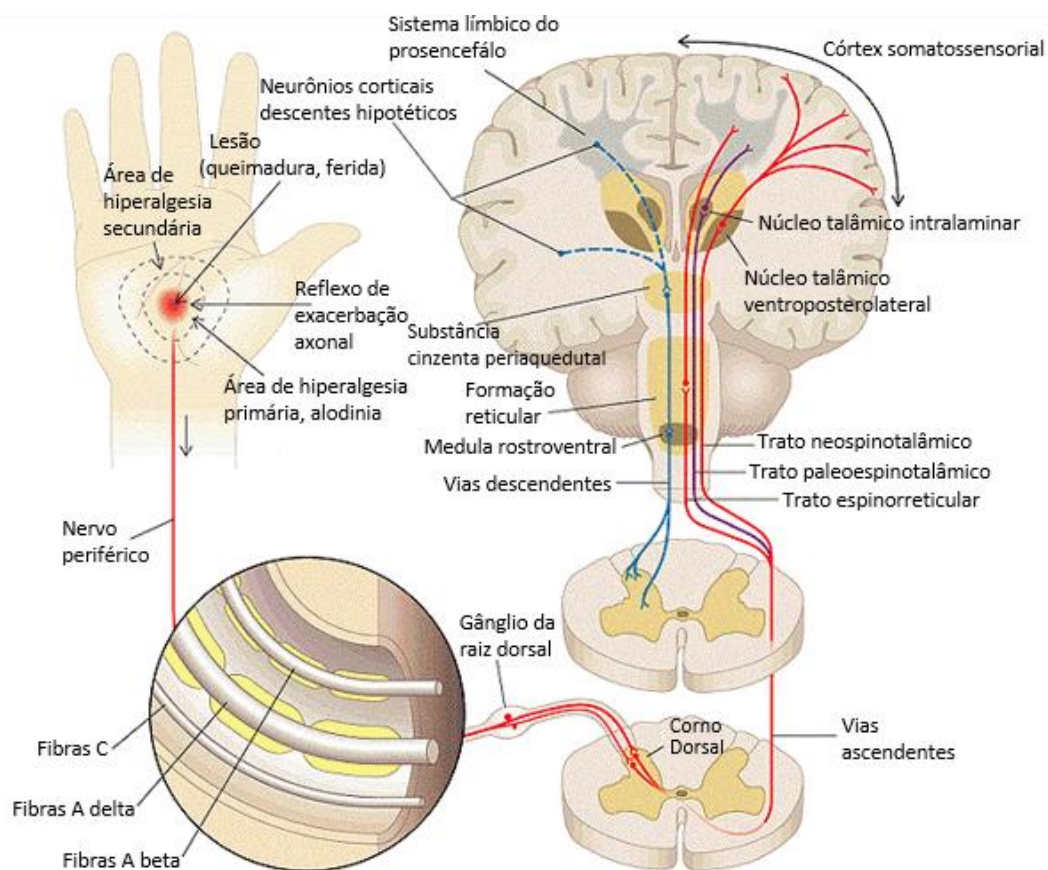


Figura 1: Processamento do estímulo doloroso. As fibras C e A delta fazem a transdução do sinal no local da lesão ocorre a hiperalgesia. Os nociceptores levam os estímulos mecânicos, térmicos ou químicos até o corpo celular do neurônio no DRG e posteriormente ao corno dorsal da medula espinhal, que é o primeiro centro de retransmissão sensorial junto ao sistema nervoso central, onde podem ocorrer as primeiras modulações antes da informação ascender aos centros superiores. A dor finalmente é percebida conscientemente quando os estímulos são processados na região do tálamo e córtex cerebral. (Kandel 2003) Adaptado de Schatzberg, A. F. e Korn, M.L Beyond Depression: The Somatic/Affective Interface. Medscape. 2002 (SCHATZBERG, A. F. E KORN, 2002).

As respostas dos nociceptores podem ser moduladas, ou seja, aumentam ou diminuem nossa percepção do estímulo doloroso. Um exemplo desta modulação seriam as queimaduras solares, que produzem sensibilização temporária da área afetada, fazendo com que estímulos normalmente não dolorosos, como um toque leve ou calor, sejam percebidos como dolorosos

(fenômeno conhecido como alodínia), ou ainda que, estímulos normalmente dolorosos provoquem dores com intensidades maiores do que em situações normais (hiperalgesia) (BASBAUM et al., 2009).

A dor pode ser classificada em dois tipos principais: a aguda e a crônica. A dor aguda é um sintoma de alerta para a ocorrência de lesões no organismo e tende a desaparecer quando o fator causal for tratado ou houver a resolução da lesão. Desta forma, a dor aguda é essencial para a preservação da integridade do indivíduo. Em contrapartida, a dor crônica é iniciada ou mantida em locais periféricos e/ou centrais, e, por ser persistente e a não se resolver espontaneamente, é importante causa de incapacidade na população mundial (BASBAUM et al., 2009; JACOBSEN TEIXEIRA, 2001). Embora a dor aguda seja o sintoma mais comum em pacientes que procuram assistência médica, principalmente serviços de urgência e emergência, sendo assim um problema clínico importante, a dor crônica é um problema de saúde muito mais complexo, pois envolve além dos aspectos de saúde, questões sociais e econômicas (GATCHEL et al., 2014).

As dores crônicas possuem um tratamento mais complexo e difícil, pois em geral, os pacientes por elas acometidos já esgotaram todas as alternativas de tratamento, sem quadro de melhora (RUSSO; BROSE, 1998). Pacientes que sofrem de dores crônicas causadas por doenças como artrite, neuralgia pós-herpética (após um surto de herpes zoster) ou câncer ósseo, relatam sentir dor intensa e muitas vezes incessante, que não é apenas fisiologicamente, mas também psicologicamente debilitante (BASBAUM et al., 2009). Desta maneira, fica claro que o impacto da dor crônica persistente sobre a vida do paciente é

causa direta de estresse, sofrimento e perda na qualidade de vida (HANSSON; DICKENSON, 2005).

As diferenças entre a dor aguda e a dor crônica, evidenciam que a dor é gerada e percebida por um sistema de sinalização altamente complexo e conectado, que resulta da interação entre diversas moléculas e circuitos altamente plásticos (BASBAUM et al., 2009). Sendo assim, entender como essa sinalização ocorre, abriria a oportunidade para a identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento da dor.

De fato, a necessidade de novas terapias, sobretudo para dor crônica, fica clara devido ao fato de que apenas uma pequena parcela da população que apresenta dor crônica relata alívio com uso de analgésicos anti-inflamatórios não esteroidais e opióides, disponíveis atualmente no mercado. Não obstante, o uso constante de opióides, resulta em tolerância à medicação, o que pode levar à dependência (vício) desses fármacos, além de diversos outros efeitos colaterais indesejáveis, como problemas gastrointestinais e cardiovasculares. Ainda assim, esses medicamentos são os únicos que possibilitam alguma melhora na condição de vida desses pacientes (AVOUAC; GOSSEC; DOUGADOS, 2007; HOLDGATE; POLLOCK, 2004).

Nos Estados Unidos, entre os anos de 2000 e 2014, foi constatada uma epidemia de uso de opióides, isso é, um aumento significativo na morbidade e mortalidade devido ao uso indiscriminado dessas substâncias. Essa crise não se deve apenas pela facilidade com a qual os opióides são obtidos e prescritos pelos médicos, caso da oxicodona e da hidrocodona, mas também devido ao uso de opióides ilícitos, como a heroína (RUDD; ALESHIRE; ZIBBELL, 2016).

No Brasil, apesar do uso de opióides ser bem mais baixo quando comparado a países desenvolvidos, a prescrição de opióides como analgésicos vem sendo incentivada e se tornando cada vez mais comum na prática médica (MANJIANI et al., 2014), o que, mais uma vez evidencia a necessidade de compreender vias de sinalização que levam à dor ou à ausência dela, para a identificação de novos alvos farmacológicos e o desenvolvimento de analgésicos eficazes e com menores efeitos adversos.

1.2 TrkA e NGF

A TrkA é uma tirosina quinase acoplada a um receptor extracelular, com alta afinidade pelo fator de crescimento neural, nerve growth factor (NGF), e por um domínio intracelular, com atividade de tirosina quinase. A ativação da TrkA é importante para a sinalização celular em processos de dor, diferenciação neuronal (incluindo crescimento de neuritos), sobrevivência e crescimento de neurônios, bem como para a plasticidade sináptica (DEMIR et al., 2016; MARDY et al., 2001; REICHARDT, 2006).

Camundongos sem o gene codificante para a TrkA (NTRK1) apresentam características fenotípicas de síndromes congênitas de insensibilidade a dor, caracterizadas pela perda de respostas a estímulos dolorosos, bem como pela ausência de gânglios nociceptivos (SMEYNE et al., 1994; SNIDER; MCMAHON, 1998). Dentre outros efeitos observados devido à perda de NTRK1 estão extensa perda de células neurais em gânglios simpáticos e diminuição do número de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal (SMEYNE et al., 1994). Diversos tecidos expressam TrkA, dentre eles, o sistema nervoso central e periférico, o sistema imune, o trato digestório, o córtex adrenal, a próstata, o útero, o rim e a pele, sendo um componente principal do sistema nervoso nociceptivo e simpático (INDO, 2002; MINNONE; DE BENEDETTI; BRACCI-LAUDIERO, 2017). Demonstrou-se que a TrkA também aumenta a proliferação celular e sobrevivência, tendo um papel na tumorigênese (DEMIR et al., 2016).

O NGF é essencial para o desenvolvimento dos nociceptores sensoriais primários, sendo um dos primeiros fatores de crescimento a ser identificado e caracterizado, bem como um dos fatores neurotróficos mais bem estudados. A descoberta do NGF se deu pela observação de que sarcomas murinos, quando

transplantados em embriões de galinha secretavam um fator que promovia o crescimento de nervos sensoriais e simpáticos. Esse fator recebeu o nome de NGF (GOSCHWIND; FISCHER; ULLRICH, 2004; LEVI-MONTALCINI et al., 1996). Devido à descoberta do NGF, Rita Levi-Montalcini recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1986 (INDO, 2018).

Assim, a sinalização de NGF/TrkA é necessária para o surgimento e diferenciação de neurônios nociceptores durante o desenvolvimento (LIU; MA, 2011). Neurônios sensoriais envolvidos na detecção de dor, temperatura e coceira, são caracterizados pela expressão de TrkA. Mas, o papel do NGF vai muito além do desenvolvimento neuronal. NGF pode ser liberado por mastócitos, fibroblastos e outros tipos de células nos locais de lesão e inflamação (BASBAUM et al., 2009; DENK; BENNETT; MCMAHON, 2017). Neste contexto, a sensibilização tecidual ao aumento de temperatura e/ou à estimulação mecânica de nociceptores também é mediada pelo eixo NGF/TrkA estando este, portanto, envolvido também em quadros de alodínia e hiperalgesia (DENK; BENNETT; MCMAHON, 2017; LEVI-MONTALCINI et al., 1996). Assim, em modelos de dor aguda utilizando ratos, foi constatado reversão da hiperalgesia quando a ação do NGF era inibida, salientando o importante papel deste fator como mediador endógeno da hiperalgesia (CHENG; JI, 2008).

Os níveis de NGF estão aumentados em condições como dores de cabeça crônica e em processos inflamatórios como artrite, cistite e prostatite. De fato, dentre os fatores que levam a secreção de NGF, temos a inflamação e a lesão tecidual, situações nas quais o NGF secretado liga-se à TrkA presente nas terminações nervosas de neurônios sensoriais, principalmente em fibras C peptidérgicas, culminando na sensibilização do sistema nervoso periférico e

central. Essa via de sinalização ainda pode levar tanto à alodínia quanto à hipersensibilidade local à dor (BONNINGTON; MCNAUGHTON, 2003; CHENG; JI, 2008).

A alodínia pode resultar de duas condições: (1) aumento da capacidade de resposta dos neurônios da via nociceptiva da medula espinhal (sensibilização central) ou (2) diminuição dos limiares de ativação dos nociceptores (sensibilização periférica). A sensibilização periférica decorre da exposição dos terminais nociceptores a compostos gerados por lesões e inflamações nos tecidos, coletivamente denominados de mediadores inflamatórios. Alguns mediadores inflamatórios (por exemplo, prótons, ATP, serotonina ou lipídios) podem alterar a excitabilidade neuronal diretamente, interagindo com os canais iônicos na superfície do nociceptor, enquanto outros (por exemplo, bradicinina e NGF) se ligam a receptores metabotrópicos e exercem seus efeitos através de cascatas de sinalização baseadas em segundos mensageiros (JULIUS; BASBAUM, 2001; WOOLF; SALTER, 2000).

Após a interação ligante-receptor nos terminais dos axônios, o complexo NGF–TrkA é transportado pelos endossomas para o corpo celular dos neurônios sensoriais (localizados no DRG), onde fosforilará, entre outras proteínas, fatores de transcrição como c-FOS, c-JUN, ELK-1 e NF- κ B, levando à expressão de genes envolvidos na modulação da nocicepção periférica nos terminais nervosos (entre eles o TRPV1), bem como neurotransmissores e fatores responsáveis pela propagação do estímulo doloroso ao sistema nervoso central (dentre eles SP e Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro - BDNF) (HEFTI et al., 2006).

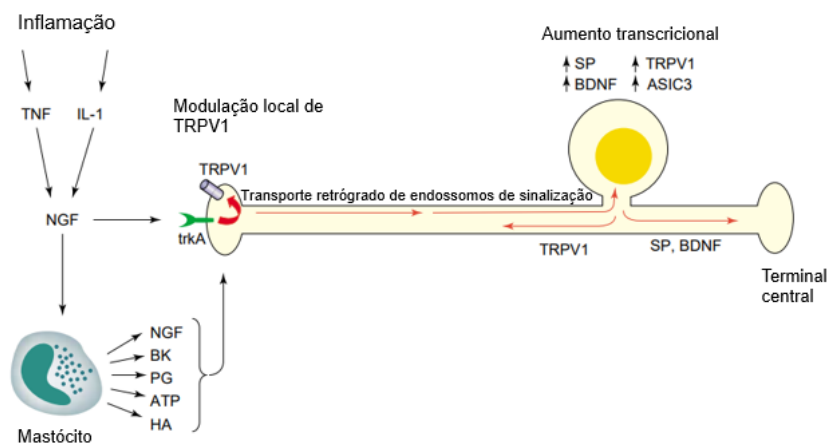


Figura 2: Vias principais do NGF levando à dor. O NGF se liga a receptores TrkA em neurônios nociceptivos. Modificações pós-traducionais induzidas pelo complexo NGF-TrkA ativam o canal iônico TRPV1. Paralelamente, ocorre o transporte retrógrado de NGF-TrkA dentro de endossomos para o corpo celular, onde ocorre a indução da expressão de fatores de transcrição ou aumento da expressão de transmissores para a ativação de neurônios secundários do sistema nervoso central. Adaptado do Trends in Pharmacological Sciences vol 27 N° 2 Feb 2006 (HEFTI et al., 2006).

Ao nível molecular, a via de sinalização pelo NGF se inicia extracelularmente com dímeros de NGF que se ligam a duas TrkAs, levando a homodimerização desses receptores, seguido da transativação pela autofosforilação de diversas tirosinas em seu domínio intracelular. A fosforilação de tirosinas específicas dão origem à auto-ativação, e a sítios de proteínas com sítios de ligação de domínios SH2. A ligação das proteínas com domínios SH2 à fosfo-tirosinas é uma forma de ancoragem de substratos e proteínas ancoradoras pela TrkA, incluindo proteínas como Shc, fosfolipase $C\gamma$ (PLC- γ) e o domínio regulatório da fosfatidilinositol (PI) 3 quinase (PI3K), entre outras proteínas, levando à ativação das vias da *mitogen activated protein kinase* (MAPK), da PLC/PKC (proteína quinase C) e da PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase) respectivamente (BONNINGTON; MCNAUGHTON, 2003; OBERMEIER et al., 1993).

A subunidade regulatória da PI3K, p85, se liga à tirosina Y751 fosforilada do TrkA, facilitando a ligação do domínio catalítico (da PI3K) com o domínio regulatório e consequentemente ativando a quinase. A fosforilação de PIP2 leva a formação de PIP3, que na sequência ativa respectivamente a quinase dependente de fosfoinositol (PDK1) e a Akt. A proteína adaptadora, SHC, se liga a Y490 fosforilada da TrkA, sendo importante para a ativação da via da MAPK (ERK 1/2). SHC ligada à TrkA se liga à Grb2 e ao fator de troca de GDP por GTP da Ras, Sos. Ras ativado se liga à RAF quinase, ativando MEK que ativa ERK. A PLC γ se liga a Y785 fosforilada, já ligada à TrkA ela é ativada quando fosforilada pela TrkA. (ALEY et al., 2000; BONNINGTON; MCNAUGHTON, 2003).

Um outro componente importante para a propagação da sinalização da dor inflamatória é a via da PLC γ , ativada por fosforilação via TrkA como descrito acima. A ativação da PLC γ resulta na produção de diacilglicerol (DAG), fruto da clivagem de PIP2. Essa é considerada uma etapa essencial para a ativação e manutenção do *Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1* (TRPV1) aberto (BONNINGTON; MCNAUGHTON, 2003; CHUANG et al., 2001). O complexo TrkA/PLC γ transloca para a membrana plasmática e a PLC γ cliva PIP2 em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 leva à liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático, e tanto o DAG como o cálcio podem ativar a PKC (Figura 2) (OBERMEIER et al., 1993).

Dentre as formas de sensibilização periférica está a ativação do TRPV1, decorrente da ligação do NGF à TrkA. O TRPV1 é um canal vanilóide ativado por capsaicina e calor. Uma vez ativado, o TRPV1 permite o influxo de cátions mono e bivalentes para o interior da célula neuronal, o que torna o potencial de

membrana menos negativo, facilitando a despolarização e, por conseguinte, a propagação do estímulo elétrico aos neurônios dos gânglios da raiz dorsal (DRG), à medula espinal e, finalmente, ao encéfalo (CHUANG et al., 2001; HEFTI et al., 2006). Animais nocaute para TRPV1 apresentam dificuldades em responder a estímulos moderados de calor, apresentando comportamento de dor atenuado com estímulos acima do limiar de ativação do canal ($>50^{\circ}\text{C}$). Isso se deve provavelmente ao fato de que enquanto a resposta da dor na pele é determinada pelo limiar térmico de um pequeno número de nociceptores, a discriminação entre temperaturas acima do limite requer informações de uma maior quantidade de nociceptores, que transmitem então adequadamente a intensidade do estímulo (CATERINA et al., 2000; DAVIS et al., 2000).

Outras formas de ativação podem ocorrer via a fosforilação do canal por diversas quinases, como por exemplo PKA, PKC e PI3K. Essas fosforilações auxiliam na ativação do canal por aumentar sua afinidade por capsaicina e diminuir o limiar de ativação por temperatura, ou ainda por manterem o canal aberto por um tempo maior (BEVAN; QUALLO; ANDERSSON, 2014). Por exemplo, demonstrou-se que a $\text{PKC}\epsilon$ fosforila diretamente o TRPV1 aumentando a sua atividade e auxiliando na sua translocação para a superfície celular (ZHANG et al., 2007). De fato, peptídeos inibidores da $\text{PKC}\epsilon$ tem um efeito analgésico (ALEY et al., 2000; KHASAR et al., 1999; KUMAR; MAHAL, 2012). Ainda, existem trabalhos que demonstram uma diminuição na atividade de TRPV1 com inibidores da ERK (downstream da via ativada por $\text{PKC}\epsilon$), enaltecendo, o papel da $\text{PKC}\epsilon$ na ativação de TRPV1 (CHENG; JI, 2008). Estudos com inibidores farmacológicos da PI3K demonstraram que ela também está envolvida na ativação local de TRPV1. Src quinases ativadas por PI3K

fosforilam TRPV1 (Y200) auxiliando o posicionamento do canal na membrana. De fato, a ativação de PI3K e Akt no DRG também contribui para a dor neuropática.(BONNINGTON; MCNAUGHTON, 2003)

Adicionalmente, estudos de ligação demonstram que PLC γ e PI3KR1 podem ligar concomitantemente ao TrKA fosforilado (T785 e T751 respectivamente), de forma que a via da PLC γ /PKC e PI3K podem ser ativadas concomitantemente. Por outro lado, a via da MAPK não poderia ser ativada em paralelo à da PLC γ , pois a ligação simultânea de PLC γ e da SHC (que ativa MAPK *downstream*) à TrKA não poderia ocorrer (OBERMEIER et al., 1993). Caracterizações mais detalhadas dessas cinéticas de ativação poderiam ser de grande importância para a compreensão da via de ativação da TrKA mediante à ligação de NGF (KUMAR; MAHAL, 2012) (Figura 3).

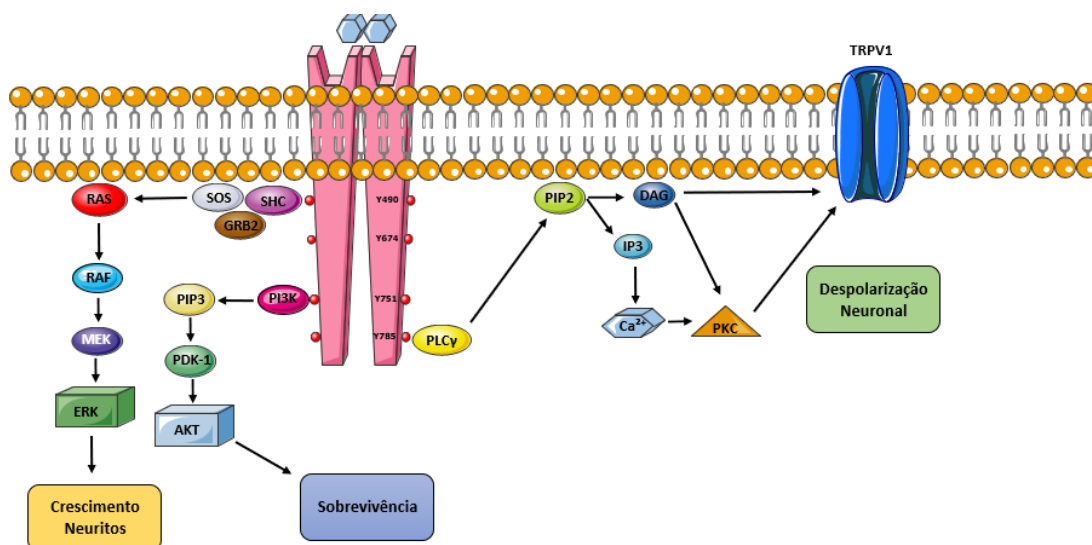


Figura 3: Esquema das vias de sinalização mediadas pelo NGF. As vias de sinalização ativadas pela TrKA-NGF levam de imediato a ativação local do canal TRPV1 e, posteriormente, à indução de diversos processos celulares, entre eles o crescimento de neuritos em neurônios sensoriais e sobrevivência celular.

1.3 Insensibilidade congênita a dor com anidrose

A Insensibilidade congênita à dor com anidrose (CIPA), também conhecida como neuropatia sensitiva e autonômica hereditária tipo IV (HSAN IV), é uma desordem genética autossômica recessiva causada por mutações que levam à perda de função do gene NTRK1, que está localizado no cromossomo 1 humano. Muitas dessas mutações já foram descritas e podem ocorrer em diferentes posições do gene (MARDY et al., 2001; MIURA et al., 2000a). Por se tratar de uma doença recessiva, para que ocorra, os dois alelos devem estar mutados (MIURA et al., 2000a).

A CIPA é caracterizada por episódios recorrentes de febre, anidrose, retardo mental, e sobretudo pela ausência de percepção e reação a estímulos nocivos, resultando em comportamentos de automutilação e irresponsividade ao frio ou calor. Existem relatos de CIPA em diversos países, com maior prevalência na China e no Japão (INDO et al., 1996a; MIURA et al., 2000a). No Japão, o número de pacientes com CIPA foi estimado entre 130 e 210 pacientes no ano de 2009 (HAGA; KUBOTA; MIWA, 2015).

Crianças com CIPA são as que mais sofrem com lesões decorrentes da ausência do estímulo doloroso. Elas podem sofrer lesões graves e não perceberem, o que acaba levando a infecções e inflamações recorrentes e lentas para curar. A anidrose perturba a homeostase do corpo, atrapalhando a manutenção da temperatura corporal, o que faz com que aumente a suscetibilidade desses indivíduos a episódios febris recorrentes, uma vez que a transpiração é essencial para manter a normotermia (INDO, 2018). Segundo Rosemberg, aproximadamente 20% das crianças afetadas por CIPA vêm a óbito

por conta da hiperpirexia (febre acima dos 41°C) nos primeiros 3 anos de vida (ROSEMBERG; NAGAHASHI MARIE; KLIEMANN, 1994).

Conforme discutido acima, o NGF é essencial para a formação de fibras sensoriais. Nos pacientes com CIPA, a dificuldade na percepção do estímulo doloroso pode estar associada a ausência de fibras sensitivas primárias, enquanto a anidrose é consequência da falta de inervação das glândulas sudoríparas (INDO, 2002). As mutações encontradas no NTRK1 mostram-se importantes na sinalização da dor, visto que podem levar a ausência de fibras sensitivas primárias dependentes de NGF e de neurônios simpáticos pós-ganglionares (INDO, 2018), e consequentemente, à insensibilidade à dor.

O espectro de fenótipos encontrados na CIPA é fruto das diferentes mutações encontradas no NTRK1 . As mutações podem levar à falta total de TrkA, inativação do receptor, perda da atividade quinase, alterações nos perfis de glicosilação, ou ainda alteração da capacidade de ligação às proteínas parceiras. O melhor entendimento de como mutações no NTRK1 atuam sobre as vias de sinalização que levam à dor, pode levar à validação de novos alvos para o desenvolvimento de fármacos não opioides para o tratamento da dor (INDO, 2002; MA et al., 2010; MIRANDA et al., 2002).

A fisiopatologia da CIPA oferece oportunidades únicas para explorar as funções dos neurônios dependentes do NGF na fisiologia humana, pois enquanto camundongos nocaute para NGF e NTRK1 não sobrevivem por mais de um mês (CROWLEY et al., 1994; SMEYNE et al., 1994), indivíduos com CIPA geralmente sobrevivem até a idade adulta se receberem tratamento médico adequado. Assim, a CIPA pode servir como um modelo humano valioso para determinar os mecanismos de sobrevivência e manutenção de neurônios

dependentes de NGF, bem como sua contribuição para a fisiologia e sinalização celular (INDO, 2002, 2018).

Dessa forma, na presente dissertação, visou-se compreender como as diferentes mutações dos pacientes portadores de CIPA podem apontar vias de sinalização essenciais para o desenvolvimento de dor e possíveis tratamentos para mesma.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar como mutações encontradas no NTRK1 em pacientes com insensibilidade congênita à dor (CIPA) afetam as vias de sinalização reguladas pelo NGF.

2.1 Objetivos específicos

I. Construir um banco de dados de mutações no NTRK1 descritas na literatura que levam à CIPA. Analisar as mutações no domínio quinase do NTRK1 e localizando as na estrutura tridimensional da TrkA e as classificando de acordo com possíveis consequências funcionais atribuídas pela sua localização estrutural .

II. Validar as mutações selecionados em I, e verificar como elas afetam as vias de sinalização desencadeadas pela TrkA (PLC γ , Akt e ERK).

III. Identificar quais mutações no NTRK1 interfeririam especificamente numa determinada via de sinalização da TrkA e validar o papel dessa via em modelo de dor inflamatória aguda e crônica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular e transfecções

Células embrionárias humanas de rim HEK-293T (HEK), cedidas pela Prof. Dra. Bettina Malnic (Instituto de Química / USP), foram cultivadas em DMEM com alta glicose (Gibco® by LifeTechnologies™, NaHCO₃ 3,7 g/L, piruvato de sódio 1 mM, 100U/mL de penicilina e 100µL/mL de estreptomicina) suplementado com soro fetal bovino a 10% e mantidas em estufa de cultura celular a 37 °C sob 5% de CO₂.

As células foram transfectadas em meio Opti-MEM™ (Gibco® da Life Technologies™ #31985062) usando 3,2 µg/mL PEI e 4ug de DNA por placa de células P100, uma vez que atingiram 80% de confluência. Seis horas após a transfecção, o meio foi trocado por meio de cultura completo. O gene NTRK1 de rato foi gentilmente doado pelo Dr. Gary Lewin (Centro Max Delbruck de Medicina Molecular, Berlim) em um plasmídeo eucariótico de expressão (pEXPR IBA 105), com resistência a ampicilina e neomicina (OMERBAŠIĆ et al., 2016).

3.2 Mutagênese sítio dirigida

Para a geração do mutante de TrKA R654C foi utilizado como modelo para a a mutagênese o plasmídeo contendo o gene NTRK1 de rato obtido do Dr. Gary Lewin. Em um tubo foram pipetados 60ng do DNA molde, 0,5µM de cada primer (senso: 5'-TGGCCACATGCAACTGTCTGGTGGGTCAGG-3' e antisenso: 5'-CAGACAGTTGCATGTGGCCAGGTCCCGGTG-3'), 0,2mM dNTP e 0,5 µL da enzima Q5 high fidelity DNA polymerase (New England Biolabs) 20U/mL, o volume final da reação foi ajustado com água ultrapura para 50µL. O

protocolo seguiu com a realização de uma PCR (*polymerase chain reaction*) com ciclos conforme o esquema abaixo.

Passo	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	98°C	30s
30 ciclos	98°C	10s
	72°C	30s
	70°C	30s
Extensão final	72°C	8min

Após a finalização da PCR, os amplicons foram digeridos com DpnI, uma enzima de restrição para degradação do DNA parental metilado. O produto final foi transformado em células termocompetentes de *E. coli* DH5a através de choque térmico. O DNA plasmidial foi extraído de colônias isoladas de bactérias cultivadas em meio de cultura com o antibiótico de resistência (ampicilina 100uM), seguindo o protocolo do kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen).

O DNA plasmidial obtido foi enviado ao Centro de Pesquisas sobre Genoma Humano e Células-tronco da Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, para sequenciamento Sanger, com o intuito de confirmar que a mutação de interesse estava presente. Para o sequenciamento foi utilizado o primer 5 'CGTGATGCACTCGATC 3'.

3.3 Western blot

Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram lavadas em PBS e incubadas em meio sem soro fetal bovino durante a noite. No dia seguinte,

as células foram tratadas com NGF (β NGF humano recombinante - PeproTech®) 100ng/mL por 5 minutos e logo em seguida foram lavadas com PBS frio. No ensaio de inibição com o QYP, as células foram pré tratadas por uma hora com 3,2 μ M do peptídeo e depois foi retirado 5 ml do meio de cultura da placa, nesse volume foi diluído NGF e o meio foi devolvido a placa para iniciar o tempo de ativação pelo NGF.

O tampão de lise RIPA (50mM Tris pH 7,4, NaCl 150mM, SDS 0,1%, deoxicolato de sódio 0,5%, EDTA 1mM, IGEPAL 1%) foi preparado junto com um inibidor de proteases (Sigmafast - Sigma Aldrich) e um inibidor de fosfatases (PhosStop™ - Roche). Foram adicionados 200 μ L por placa para obtenção dos lisados celulares, que foram sonicados em 30 pulsos de 1 segundo e então, centrifugados 16000 RCF por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante obtido foi quantificado através do kit de Bradford (Bradford Protein Assays Bio-Rad), usando como curva padrão concentrações variadas de BSA (albumina sérica bovina).

Os lisados foram preparados para SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS) fervendo 70 μ g de proteína em uma solução contendo 10% de β -mercaptoetanol e 1X tampão de corrida (Tris 240mM, pH 6,8, glicerol 40%, SDS 80g/L, azul de bromofenol 400mg/L), por 10 minutos a 100°C (PEACH et al., 2015). Para os ensaios de sinalização de TrkA e PLC γ , foi preparado gel de poliacrilamida a 7,5%, enquanto gel de 10% foi preparado para visualização de ERK. Os géis foram transferidos para membranas de PVDF ativadas por metanol, utilizando um sistema de transferência de gel úmido (Biorad®), durante 2 horas e 30 minutos com corrente constante de 400mA. Membranas foram

bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente usando a solução de bloqueio Intercept® Blocking Buffer Li-cor®.

Os anticorpos primários Phospho TrkA Y674/675 - Science Signaling, Phospho TrkA Y785 - Science Signaling, TrkA Total - ABCAM, Phospho PLC γ 771 - ABCAM, Phospho PLC γ Y783 - Science Signaling, PLC γ total - Science Signaling, Phospho ERK1/2 - SantaCruz, ERK1/2 total - Santa Cruz e α -Tubulin - Thermo Fisher) foram diluídos de acordo com instruções dos fabricantes na solução de bloqueio acrescida de Tween 20 a 0,1% e as membranas incubadas durante a noite a 4° C.

Após a incubação, as membranas foram lavadas por 15 minutos 3 vezes com TBS-T (tampão TBS e 0,1% de Tween 20). Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários adequados (IRDye 800CW donkey anti rabbit, IRDye 800CW donkey anti goat e IRDye Anti-donkey 680RD) durante 1 hora em temperatura ambiente ao abrigo da luz e. Esses anticorpos são compatíveis com o sistema de imagem Li-cor® Odyssey. Nos casos em que as fosforilações foram avaliadas, as membranas foram retiradas, bloqueadas e incubadas com anticorpos contra a proteína total.

A análise quantitativa de três experimentos independentes foi realizada usando Image Studio™ Lite do LI-COR, através da quantificação das bandas, realizando uma proporção de proteína fosforilada pela quantidade de proteína total (fosfo/total). As comparações para diferentes grupos foram feitas através do teste One-way ANOVA onde * $p = < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.4 Peptídeos

O peptídeo QYP, sintetizado com a sequência QAPPVpYLDVLG, é um homólogo da sequência de TrkA humana, da região da tirosina Y785. Ele possui a tirosina já fosforilada e foi sintetizado junto com o domínio de transdução TAT da proteína HIV (GRKKRRQRRRPQ) (RIZZUTI et al., 2015), e uma sequência de vinculadora GSG após a sequência TAT. Como controle para esse peptídeo, foram sintetizados também uma versão sem a tirosina fosforilada (QYP*) e uma versão sem o domínio de transdução TAT (QYP^{-TAT}). Os peptídeos foram obtidos da empresa Chinese Peptide.

3.5 Modelagem Molecular

A estrutura da TrkA humana ativa em seu complexo com Tyr 771 C-SH2 de PLC γ (1) e a autofosforilação da TrkA na Tyr 680/681 (Tyr 674/675 na isoforma TrkA I) (2) foram modeladas por homologia utilizando como moldes as estruturas cristalográficas disponíveis e o software YASARA (KRIEGER; VRIEND; KELSO, 2014). Para modelagem da TrkA humana ativa, a estrutura cristalográfica (PDB ID: 5EG3) de FGF-2 foi usada como base, já o modelo de homologia da autofosforilação de TrkA Tyr 680/681 foi construído usando a estrutura cristalográfica IGF1 (PDB ID: 3D94). Esse modelo da TrkA ativa foi feita pelo Dr. Helder Veras do grupo do Prof. Dr. Paulo Oliveira do Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO).

Utilizando o modelo de TrkA ativa localizou-se as diferentes mutações encontradas no domínio quinase da NTRK1. As mutações foram classificadas em 1. Localizadas no domínio catalítico. 2. Sítio de ligação do substrato (SBS) e 3. Outras regiões estruturadas. Para identificar resíduos do sítios catalíticos, uma

distância máxima de 4 Å (incluindo hidrogênios) foi utilizada para selecionar resíduos próximos aos átomos de ATP no modelo do TrkA ativo. Para identificar resíduos SBS, o modelo de TrkA ativo foi alinhado com as seguintes tirosina-quinases que foram cristalizadas em complexo com substratos: Receptor de insulina quinase (PDB ID: 1GAG e 1IR3), receptor de fator de crescimento de fibroblastos 2 (PDB ID:2PVF e 5EG3), receptor de Efrina tipo-A 3 quinase (PDB ID: 3FY2). Essa classificação foi feita pelo Dr. Helder Veras do LnBio.

3.6 Avaliações comportamentais

3.6.1 Animais

Camundongos machos C57BL/6 pesando entre 20 e 26 g, com idade de 4 a 6 semanas, foram escolhidos para o desenvolvimento desse estudo. Os animais foram mantidos sob ciclos claro/escuro com 12 horas de duração e temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com livre acesso a comida e água. Eles foram manejados respeitando os princípios e diretrizes sobre cuidado de animais de laboratório em estudos envolvendo dor, em protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA, 7474280219). Após os experimentos, os animais foram eutanasiados e descartados de acordo com procedimentos laboratoriais de rotina.

3.6.2 Modelo CFA

Para o estabelecimento da dor inflamatória, os animais receberam uma injeção intraplantar de 25 μL de Adjuvante Completo de Freund (CFA; F5881 Sigma) na pata traseira posterior esquerda. Após 3 horas da injeção de CFA, os diferentes grupos de animais receberam uma segunda injeção intraplantar, na mesma pata, com 20 μL de QYP (em diferentes concentrações) ou peptídeos

controle (QYP-TAT ou QYP*) ou ainda H₂O. Também utilizamos como controle, o inibidor de TrkA (GNF5837; Sigma-Aldrich®) na concentração de 500ng/pata e o inibidor de PLC (U-73347; Sigma-Aldrich®) na concentração de 30 mg/Kg do animal, ambas as drogas tinham como veículo o DMSO e foram aplicadas intraplantar em volumes que não ultrapassaram 20uL. Os testes comportamentais foram realizados em diferentes momentos (1, 2, 3, 4, 6, 7 e 48 horas) após a injeção dos peptídeos e das drogas.

3.6.3 Teste de sensibilidade ao estímulo mecânico

A avaliação da sensibilidade ao estímulo mecânico baseou-se no método de Chaplan e colaboradores (1994) onde são utilizados filamentos von Frey. Os filamentos de von Frey consistem em filamentos de nylon de diferentes diâmetros responsáveis por empregar diferentes intensidades de força. Tal teste consiste em um conjunto de nove filamentos que foram aplicados sobre a região plantar da pata posterior de cada animal.

Os filamentos utilizados foram: 0.07 g, 0.16 g, 0.4 g, 0.6 g, 1.0 g, 1.4 g, 2.0 g, 4.0 g, 6.0 g. Sendo que o limiar de retirada da pata foi determinado pelo aumento ou diminuição sequencial da força. O teste foi iniciado sempre com o filamento de 1.0 g e a contagem da de respostas foi iniciada quando a primeira resposta foi negativa e a segunda positiva. A partir desta resposta negativa/positiva, foram registradas mais quatro respostas, respeitando-se sempre o princípio de que uma resposta positiva é sempre seguida por um estímulo (filamento) inferior ao anterior, enquanto que uma resposta negativa é sempre seguida por um estímulo (filamento) superior ao anterior. Uma resposta é considerada positiva quando o animal retira a pata ao estímulo mecânico, e negativa quando o animal não possuiu reação alguma. O limiar de retirada da

pata do animal foi analisado observando os padrões de respostas, onde estes padrões foram inseridos no cálculo a seguir: $50\% g = 10 [X_f + K.y]$

Sendo que: X_f é o valor do último filamento em gramas que é convertido em log de base 10; K : é o valor da sequência de seis respostas as quais os dados foram retirados da tabela (CHAPLAN et al., 1994); e Y : é a média da diferença (em log) entre os filamentos apresentados.

Para avaliar a sensibilidade mecânica, os camundongos foram colocados individualmente em aparato de acrílico, que permitiam o acesso às patas. Filamentos de Von Frey (North Coast Medical, Morgan Hill, CA) foram aplicados na região plantar da pata traseira esquerda de cada animal por 5 segundos. Para reduzir o estresse, os camundongos foram habituados por 1 hora ao local do experimento 1 dia antes do início do protocolo (CHAPLAN et al., 1994). As medidas de sensibilidade mecânica foram realizadas antes da injeção de CFA (Basal) e após 1 hora, 3 horas, 7 e 14 dias de administração de CFA.

3.6.4 Teste de sensibilidade ao estímulo térmico quente

Para análise de sensibilidade térmica ao quente (placa quente), os animais foram colocados sobre uma placa quente com a temperatura padronizada de $52,5^{\circ}\text{C}$. É observado o tempo que o animal leva para desenvolver o comportamento de lambar ou retirar a pata da superfície quente, sendo então o animal imediatamente retirado da placa. Caso o animal não responda ao teste, é determinado um tempo limite de exposição à placa (30 segundos) para que não ocorra nenhuma lesão tecidual.

3.6.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Os resultados dos testes comportamentais foram analisados estatisticamente utilizando two-way ANOVA, seguido de pós teste de Bonferroni para comparação múltipla. As análises estatísticas foram conduzidas no GraphPad Prism, versão 7.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA). Em todos os casos, foi considerado um valor $*p \leq 0,05$ estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Mutações da TrkA presentes na Insensibilidade Congênita à Dor com Anidrose (CIPA)

A CIPA é uma doença rara, que apresenta um vasto quadro de sintomas. Entretanto, existem poucos estudos que analisam o panorama geral das mutações e sua distribuição ou que descrevam os efeitos dessas mutações em vias associadas a TrkA.

O gene codificando para a TrkA (NTRK1) contém 17 éxons e 16 íntrons. Os éxons são subdivididos de acordo com os diferentes domínios, *peptídeo sinal* (SP), domínio rico em cisteína 1 e 2 (CYS), *domínio rico em leucina* (LRR), *domínio semelhante à imunoglobulina* (Ig-1 e Ig-2), *domínio transmembranar* (TM) e *domínio de tirosina quinase* (TKD) (GENG et al., 2018; LI et al., 2019). O NTRK1 possui três isoformas diferentes, resultantes de *splicing* alternativos, sendo a isoforma 2 (NM_002529.3) a maior e mais utilizada para numeração genética das mutações, sendo assim, essa foi a isoforma que utilizamos para a padronização do nosso banco de dados.

Foi realizada uma busca no *PubMed* utilizando as palavras chave: “ntrk1” “mutations” “congenital insensitivity to pain with anhidrosis” ou “hereditary sensory and autonomic neuropathies”. Com o resultado da pesquisa foi criado um banco de dados de 236 pacientes, a partir de 59 artigos em inglês, que foram publicados entre 1996 e 2020 e que descreviam mutações em pacientes com CIPA. Foram excluídos das análises artigos publicados em outros idiomas. As alterações genéticas foram encontradas em heterozigose ou homozigose, sendo assim, consideramos o número de ocorrência da mutação por alelo.

No total no nosso banco de dados foram identificadas 131 mutações diferentes em 236 pacientes, sendo 29 em íntrons e 103 em éxons, dessas, 56 foram *missense*, 18 *nonsense*, 27 *frameshifts* que levam ao truncamento da proteína e 2 deleções. Das 103 mutações exônicas, 65 ocorrem no domínio quinase, sendo assim o domínio com maior prevalência de mutações no contexto da CIPA. O número de ocorrência utilizado a partir desse ponto se refere a quantas vezes essas mutações ocorreram em cada alelo, materno e paterno, sendo que quando a alteração gênica ocorre em homozigose, corresponde a duas ocorrências (anexo 1).

Sobre as mutações intrônicas, estas foram encontradas 166 vezes nos pacientes listados, sendo que dos 236 pacientes, 114 pacientes tiveram pelo menos uma mutação em íntron. Curiosamente, o íntron 7, que fica entre os éxons que codificam os domínios do tipo imunoglobulina (Ig) (Ig1 e Ig2) que se ligam diretamente ao NGF, é o íntron com maior prevalência de mutações, sendo encontradas três mutações diferentes que ocorreram 84 vezes (Figura 3 e Tabela 1). Uma dessas mutações, c.851-33T>A, a mais prevalente em nossos

pacientes, é relatada em heterozigose em um a cada 968 chineses saudáveis (WANG et al., 2018).

Essa troca de T para A ocorre em um local de ramificação, relatado na literatura por causar *splicing* aberrante do íntron 7 *in vitro*, levando a uma inserção de 137 pares de base (pb), seguido da criação de um códon de parada causando truncamento da proteína. Em nosso banco de dados, esta mutação foi encontrada em sua maioria nos pacientes chineses, totalizando 47 indivíduos, sendo que desses 9 eram homocigotos e 38 heterocigotos (Tabela 1 e Figura 4).

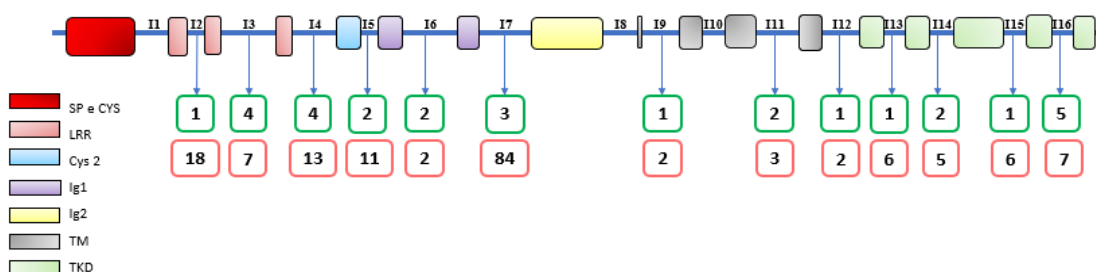


Figura 4: O gene NTRK1 representado com seus 17 éxons e 16 íntrons. Nos quadrados de borda verde o número de diferentes mutações encontradas nos íntrons do gene NTRK1 e com borda vermelha a ocorrência, número de vezes que essas mutações aparecem no nosso banco de dados (soma da ocorrência de todas as mutações para determinado íntron).

Mutation	Intron
1 c.287+2dupT (18)	2
2 c.353_359+2TdelGTGCCTGT (2)	3
3 c.354_359+3delTCGCCTGTG (2)	3
4 c.359+5 G>T (2)	3
5 c.360-45 C>A (1)	3
6 c.428+1G>C (2)	4
7 c.429-374_717+485del (9)	4, 5 e 6
8 c.429-395_717+485delins CCCAGG CTGGAGTGCAGTGGC (1)	4, 5 e 6
9 c.429-1 G>C (1)	4
10 c.574+1 G>A (6)	5
11 c.575-19 G>A (5)	5
12 c.717+1 G>C (1)	6
13 c.717+4 A>T (1)	6
14 c.[851-798C>T; 851-794C>G] (4)	7
15 c.850+1 G>A (6)	7

Mutation	Intron
16 c.851-33 T>A (74)	7
17 c.1196-1 G>A (2)	9
18 c.1354+10_1633-1 del 1381 (2)	11, 12 e 13
19 c.1355-125 G>A (1)	11
20 c.1502-1delA (2)	12
21 c.1633-1 G>T (6)	13
22 c.1805+3 A>T (3)	14
23 c.1806-2 A>G (2)	14
24 c.2046+3 A>C (6)	15
25 c.2188-11 G>A (1)	16
26 c.2205+1 G>T (1)	16
27 c.2206-12 C>A (2)	16
28 c.2206-2 A>G (1)	16
29 c.2206-11 G>A (2)	16

Tabela 1: Mutações encontradas nos íntrons do gene NTRK1, sua posição nos íntrons e entre parênteses o número de ocorrência dessas mutações no nosso banco de dados.

Nos éxons foram encontradas 103 mutações, sendo que dessas, 65 foram encontradas no domínio quinase (63,5%), 33 mutações (31,7%) foram encontradas no domínio extracelular e 5 mutações (4,8%) no domínio transmembranar (Figura 5). Em relação às ocorrências, do total das 283 ocorrências em éxons, 189 são no domínio quinase, indicando uma prevalência de mutações nessa região do gene. Na figura 5 demonstra-se a distribuição das mutações em NTRK1 e na tabela 2 uma lista das mutações encontradas em nossa análise. No apêndice 1 pode ser encontrada a relação completa dos pacientes com suas mutações.

Particularmente, dentre as mutações encontradas no domínio quinase, 45 eram mutações *missense*, 12 mutações de *frameshift* e 7 mutações *nonsense*, sendo as últimas duas responsáveis pela criação de códons de parada que resultariam em uma proteína truncada, ou mesmo aboliriam totalmente a expressão da proteína. Também foi encontrada uma mutação onde houve a deleção de nucleotídeos múltiplos de três que não levavam a inclusão de códon de parada nem a alteração da fase de leitura (Figura 5, Tabela 2 e Apêndice 1).

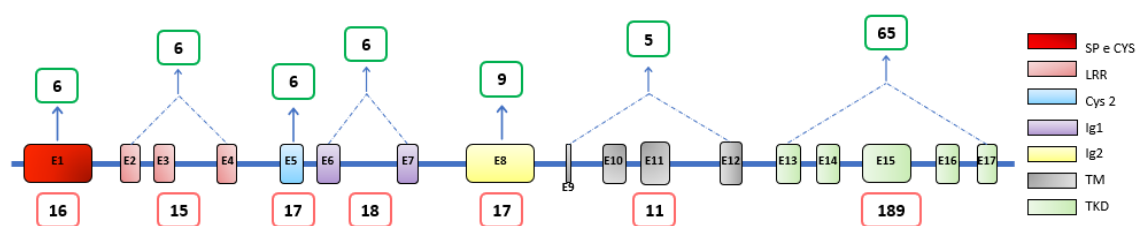


Figura 5: Mutações encontradas nos éxons do gene NTRK1. Nos quadrados de borda verde encontram-se o número de mutações encontradas no éxon e nos de borda vermelha a ocorrência, número de vezes que as mutações aparecem no nosso banco de dados (soma da ocorrência de todas as mutações para determinado éxon). Cada domínio da proteína está representado com uma cor diferente.

1 p.Arg3Term (2)	28 p.Leu346Pro (1)	55 p.Gly577Arg (2)	82 p.Ile699Thr (1)
2 p.Arg6Trp (2)	29 p.Tyr359Term (1)	56 p.Leu585Argfs*73 (4)	83 p.Leu700Pro (2)
3 p.Gln9Term (2)	30 p.Tyr359Term (2)	57 p.Met587Val (5)	84 p.Gly714Ser (2)
4 p.Trp15Term (2)	31 p.Tyr359Cys (2)	58 p.Glu590Lys (2)	85 p.Gly714Asp (2)
5 p.Asn67Thrfs*2 (4)	32 p.Glu388Lys (1)	59 p.Met592Arg (1)	86 p.Val715Leu (7)
6 p.Glu70Alafs*16 (4)	33 p.Asp389Alafs*12 (1)	60 p.Asp596Asn (1)	87 p.Val715Ala (1)
7 p.Arg85Ser (1)	34 p.Pro407Argfs*63 (1)	61 p.Leu601Arg (6)	88 p.Leu717Arg (1)
8 p.Glu92Glyfs*81 (4)	35 p.Ser419Glyfs*80 (5)	62 p.Arg602Gln (5)	89 p.Glu719Lys (1)
9 p.Leu93Pro (1)	36 p.Gly472Valfs*75 (1)	63 p.Arg602Term (6)	90 p.Gly724Ser (6)
10 p.Asp109Gly (2)	37 p.Lys482Term (2)	64 p.His604Tyr (3)	91 p.Pro727Leu (2)
11 p.Ala110Asp (4)	38 p.Glu492Lys (2)	65 p.Gly605Term (2)	92 p.Cys752Ser (1)
12 p.Ser131Leufs*41 (3)	39 p.Arg508Glyfs*20 (4)	66 p.Gly613Val (3)	93 p.Tyr757Term (1)
13 p.Ser146Term (2)	40 p.Val511Glyfs*39 (2)	67 p.Glu615Term (1)	94 p.Arg761Trp (6)
14 p.His151Serfs*23 (3)	41 p.Gly517Arg (1)	68 p.Val617Leu (1)	95 p.Cys763Ser (2)
15 p.Glu164Term (1)	42 p.Gly517Glu (1)	69 p.Pro621Serfs*12 (7)	96 p.Pro768Leu (3)
16 p.Gly166Term (2)	43 p.Gly519Arg (1)	70 p.Leu627Alafs*6 (2)	97 p.Gln770Term (3)
17 p.Gln176Term (7)	44 p.Gly519Alafs*28 (1)	71 p.Ala635Pro (1)	98 p.Arg771Cys (5)
18 p.Leu183Trpfs*14 (2)	45 p.Phe521Leu (1)	72 p.Arg649Gln (2)	99 p.Arg771His (2)
19 p.Val211Glu (6)	46 p.Gly522Arg (1)	73 p.Arg649Trp (4)	100 p.Val777Cysfs*91 (1)
20 p.Leu213Pro (2)	47 p.Gly522Glu (1)	74 p.Arg654Cys (8)	101 p.Arg780Pro (2)
21 p.Ser235Term (1)	48 p.Ala527Pro (1)	75 p.Leu657Pro (4)	102 p.Gln782Term (1)
22 p.Gly242Trpfs*16 (4)	49 p.Glu551Glyfs*107 (1)	76 p.Asp674Tyr (5)	103 p.Leu784Serfs*79 (1)
23 p.Gly243Valfs*15 (1)	50 p.Arg554Glyfs*104 (29)	77 p.Arg686His (1)	
24 p.Lys261del (4)	51 p.Gln558Term (1)	78 p.Arg692Cys (5)	
25 p.Cys300Term (4)	52 p.Ile572Ser (2)	79 p.Pro695Leu (2)	
26 p.Gln308Hisfs*160 (1)	53 p.Gly577Argfs*10 (2)	80 p.Pro696 Phe704del (1)	
27 p.Leu322Serfs*148 (4)	54 p.Gly577Ser (1)	81 p.Glu697Argfs*7 (2)	

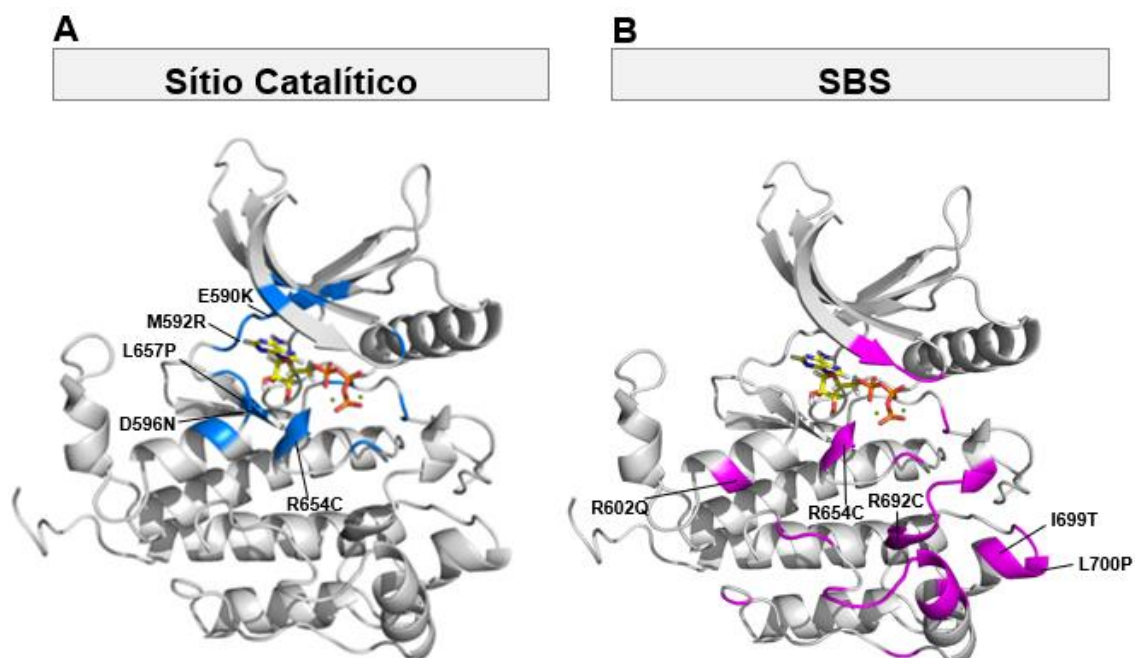
Tabela 2: Mutações encontradas nos éxons do gene NTRK1 descritas na literatura, as cores correspondem aos diferentes domínios e entre parênteses o número de ocorrência dessas mutações no nosso banco de dados.

Analisando a frequência das mutações foi possível observar que as mutações *missense* se espalham por todo o domínio quinase, sendo que a mais frequente entre elas foi a R654C (número 74 da Tabela 2), ocorrendo 8 vezes, sendo 3 vezes em homozigose e 2 vezes em heterozigose. A mutação de *frameshift* mais comum foi R554Gfs*104 (número 50 da Tabela 2), ocorrendo em 9 pacientes em homozigose e em 11 em heterozigose, totalizando 29 ocorrências. Entre as mutações *nonsense*, a mais comum foi a p.Arg602Term (número 63 da Tabela 2), presente em 6 pacientes heterozigotos, curiosamente outros 3 pacientes tiveram uma mutação *missense* nesse mesmo resíduo, onde ocorreu a troca da arginina por uma glutamina (Arg602Gln - número 62 da Tabela 2). Como as mutações no domínio quinase foram mais prevalentes na CIPA, e

como esse domínio é crítico para as vias de sinalização que levam à dor, o domínio quinase foi escolhido como objeto de estudo nesse trabalho.

Em parceria com o grupo do Prof. Dr. Paulo Oliveira do Laboratório Nacional de Biociências (LN BIO), as mutações foram analisadas e localizadas estruturalmente por modelagem molecular para ver seu possível efeito na função quinase da TrkA e, conseqüentemente, possíveis alterações nas vias de sinalização.

Primeiramente as mutações *missense* foram classificadas em três classes: mutações próximas ao local de ligação da ATP (sítio catalítico), mutações no local de ligação do substrato (SBS) e mutações em outras regiões estruturadas da TrkA (Figura 6). Essa classificação estrutural não é exclusiva, visto que alguns resíduos podem se localizar tanto no sítio catalítico como no SBS.



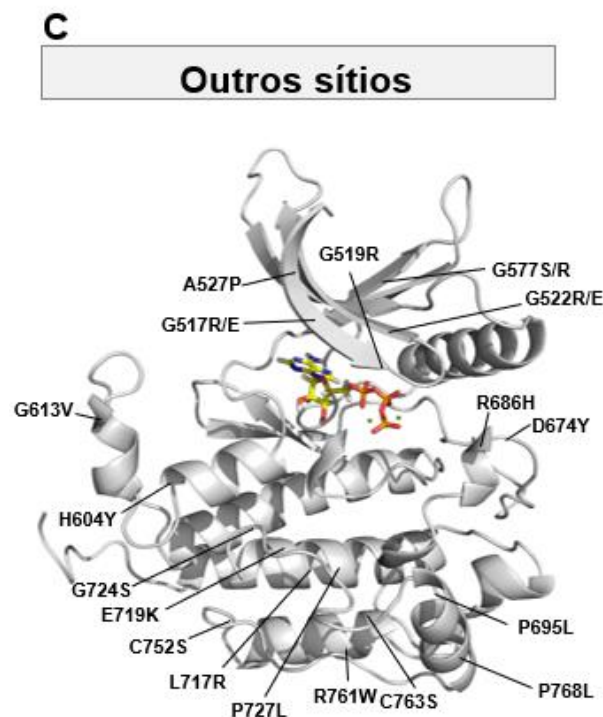


Figura 6: Mapeamento estrutural de mutações *missense* no domínio quinase da TrkA. Mutações foram mapeadas na estrutura TrkA obtida por modelagem de homologia e subdivididas em três grupos de acordo com seu impacto funcional. **(A)** Resíduos mutados no sítio catalítico (azul), **(B)** No local de ligação ao substrato (magenta) e **(C)** em outros locais (branco). Foi utilizado o modelo de TrkA ativo alinhado com tirosina-quinases cristalizadas em complexo com substratos: Receptor de insulina quinase (PDB ID: 1GAG e 1I3R), receptor de fator de crescimento de fibroblastos 2 (PDB ID: 2PVF e 5EG3) e receptor de Efrina tipo A 3 quinase (PDB ID: 3FY2).

No sítio de ligação de ATP estão localizadas cinco mutações: E590K, M592R, L657P, D596N e R654C. Essas mutações, especialmente aquelas em resíduos grandes carregados positivamente (como E590K e M592R) podem prejudicar a ligação da ATP e, conseqüentemente, abolir completamente a função catalítica de TrkA. Portanto, mutações no local de ligação da ATP provavelmente inibem a fosforilação dos substratos do TrkA de maneira inespecífica e generalizada (Figura 6A).

As mutações encontradas no SBS, especialmente aquelas relacionadas a resíduos carregados, que geralmente estão envolvidos na ancoragem de

substratos, podem reduzir a afinidade da TrkA pelo substrato e assim prejudicar sua fosforilação (DE OLIVEIRA et al., 2016). Cinco mutações foram identificadas no SBS: R602Q, R654C, R692C, I699T e L700P. A mutação R654C foi descrita acima como relacionada ao local de ligação ao ATP, porém a cadeia lateral dessa arginina está voltada para o SBS, o que pode afetar também a ligação com o substrato. (Fig. 6B).

Outras mutações *missense* de CIPA podem ocorrer em regiões essenciais para a estrutura da TrkA. Várias dessas mutações envolvem resíduos localizados em regiões como folhas β (G517R / E, A527P, G522R/E e G577S/R) e α -hélices (E719K, L717R e P727L) e poderiam ter impacto substancial na estrutura do TrkA, especialmente quando há uma troca por uma prolina, comumente associada à ruptura da estrutura secundária (Fig. 6C). Semelhante ao que ocorre para as mutações próximas ao sítio da ATP, essas mutações também afetariam a função da TrkA de maneira inespecífica. O mapeamento aqui apresentado nos permitiu guiar os experimentos seguintes, com o objetivo de entender como algumas dessas mutações afetariam o TrkA através de ensaios celulares, bem como a interação com alguns de seus substratos. Esses conhecimentos poderiam contribuir para a construção racional de inibidores e moduladores específicos.

O gene NTRK1 é bastante conservado. NTRK1 de *rattus norvegicus* possui uma identidade de 86% com o gene humano, e o domínio quinase é ainda mais conservado tendo 95% de homologia entre as duas espécies. Dessa forma, fizemos as mutações de interesse, encontradas em pacientes com CIPA, no gene NTRK1 de rato. Validamos o mutante de R654C, que está tanto na classe de mutações relacionadas ao sítio de ligação de ATP, quanto na região de SBS.

Nesse experimento é possível observar que nas amostras WT tratadas com NGF, o tempo de 5 minutos se mostrou com maior aumento de fosforilação em comparação com outros tempos de tratamento em todos os anticorpos que foram usados. Já no mutante podemos observar que ele levou à inativação total da atividade de TrkA, assim como previsto nas modelagens (Figura 7).

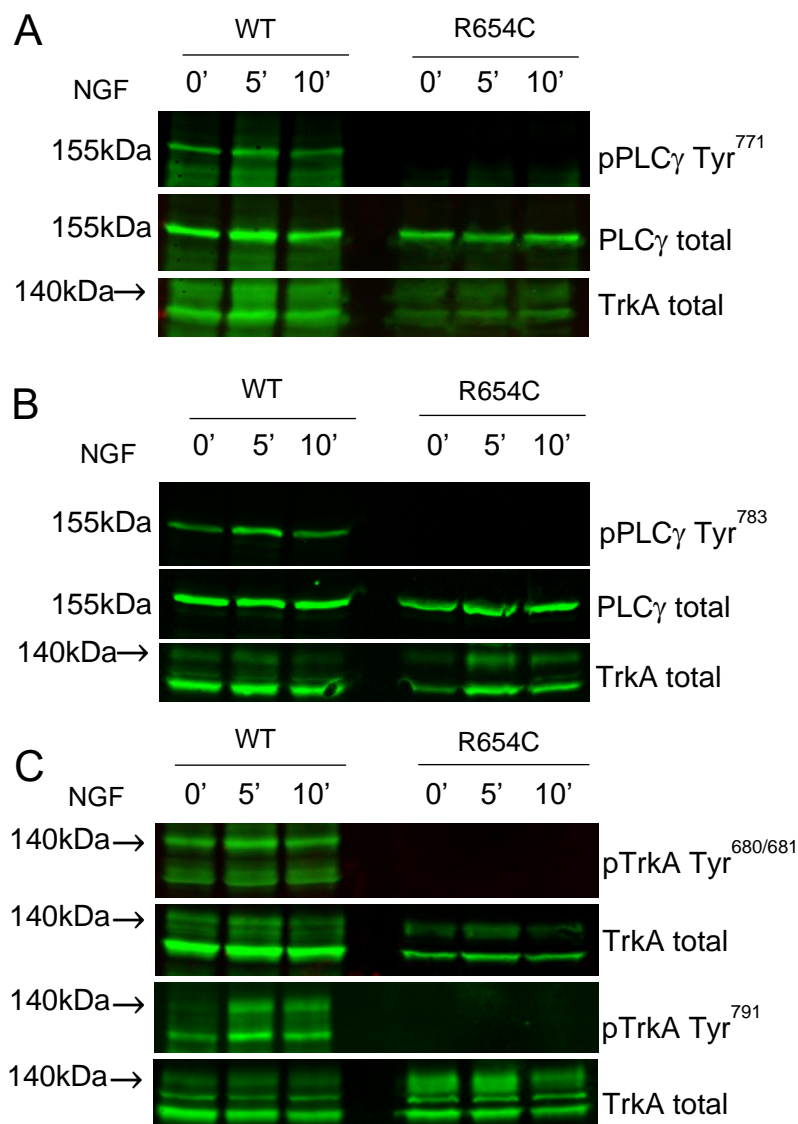


Figura 7: Interação entre o mutante de TrkA R654C e seus substratos. Células HEK293 que não expressam TrkA endógena, transfectadas com TrkA de rato selvagem (wt) ou o mutante TrkA R654C foram tratadas com 100 ng/mL de NGF por 5 e 10 minutos. **(A)** Fosfo PLCγ Tyr 771 e PLCγ total. **(B)** Fosfo PLCγ Tyr 783 e PLCγ total. **(C)** Fosfo TrkA Tyr 674/675 (680/681 isoforma 2), Fosfo TrkA Tyr 785 (791 isoforma 2) e anti TrkA total.

Outras mutações que podem ter impacto significativo na estrutura da TrkA, são as mutações *nonsense* e *frameshift*. Em nossos resultados encontramos algumas mutações próximas ao C terminal da TrkA, são elas duas mutações *nonsense* (Q770* e Q782*) e duas mutações *frameshift* (V777Cfs*91 e L784Sfs*79). Interessantemente ambas produziriam uma versão da TrkA truncada, abolindo a tirosina 785, que é o sítio de fosforilação de PLC γ , o que afetaria a interação de PLC γ , e não a interação com SHC ou PI3K, prejudicando principalmente a via da PLC γ sem o detrimento das demais vias ativadas por TrkA. Essas mutações possuem mais chances de serem expressas por não serem afetadas pelo mecanismo de nonsense-mediated mRNA decay (NMD), por estarem no último éxon e assim escapando desse mecanismo de revisão de células eucarióticas (BROGNA; WEN, 2009). Sendo assim dados da análise de mutações encontradas na CIPA sugerem que a PLC γ se apresenta como uma via importante para o desenvolvimento da dor, já que apenas a ausência dessa via pode causar o fenótipo da doença. Utilizamos então a sequência dessa região para a síntese de um peptídeo para inibir a via PLC γ e testar seu efeito sobre a sinalização da dor.

4.2 Análise da atividade *in vitro* do peptídeo QYP

As análises computacionais, assim como algumas mutações encontradas em pacientes da CIPA, nos guiaram no desenvolvimento de um peptídeo que interferiria na interação entre PLC γ e TrkA. Este peptídeo (denominado QYP) foi sintetizado com um transportador celular contendo a sequência do transactivator domain da proteína TAT do HIV e testado quanto à sua capacidade de inibir a PLC γ (Figura 8).

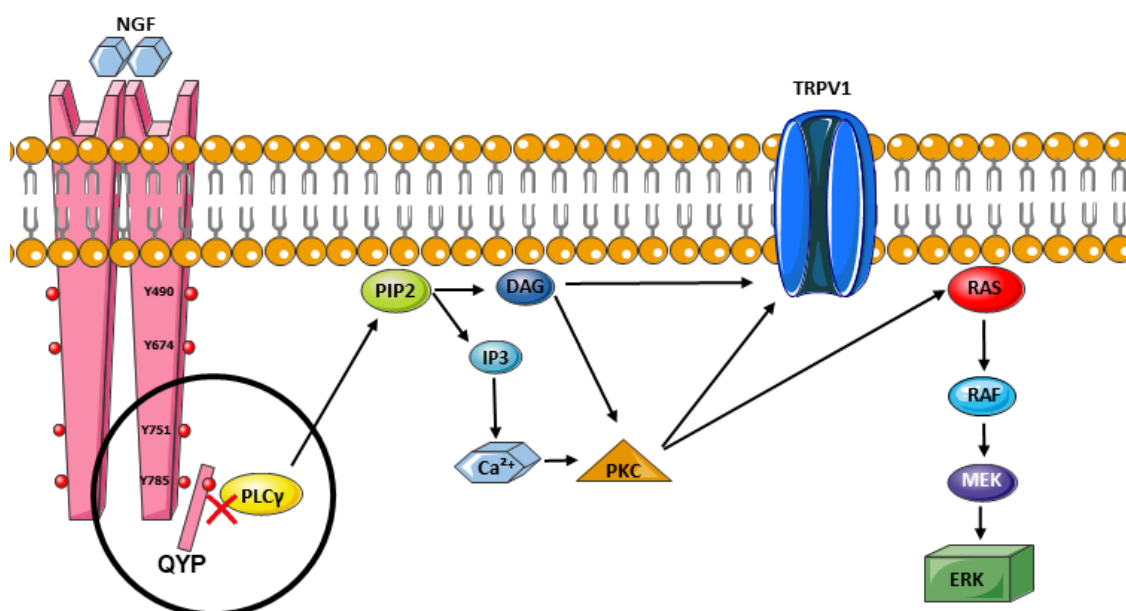
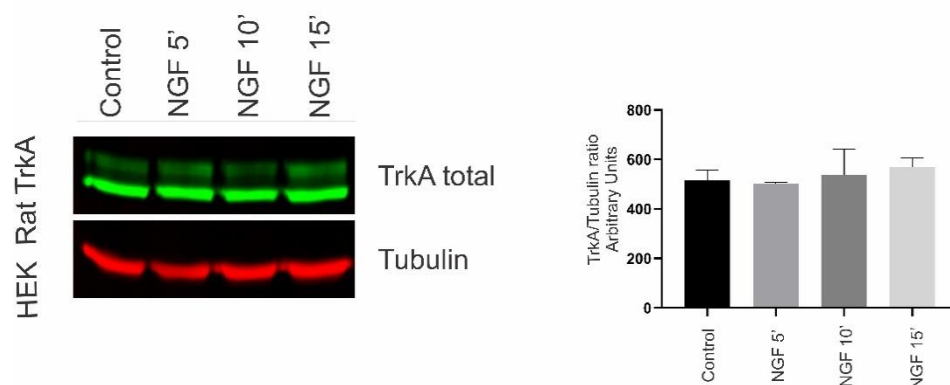


Figura 8: Modelo proposto sobre o mecanismo de inibição da via da PLC γ ativada com NGF pelo QYP.

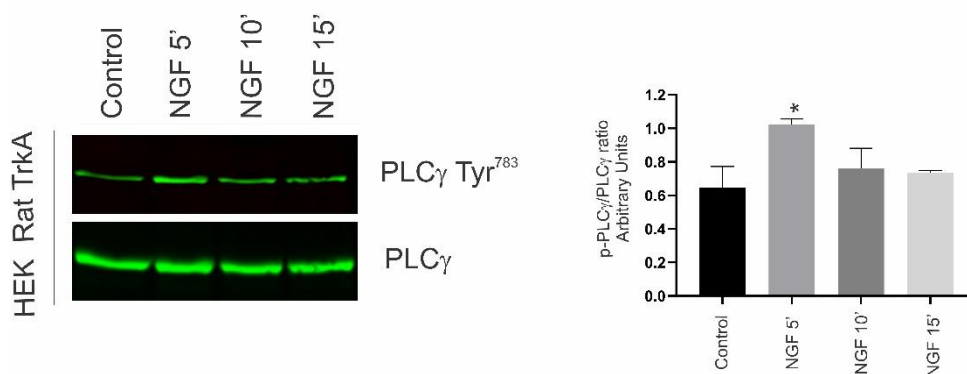
O peptídeo QYP primeiramente foi testado em linhagens de células HEK transfectadas transitoriamente com TrkA de rato selvagem. Foi avaliado então o potencial de QYP na inibição da fosforilação da PLC γ e, conseqüentemente, da ativação de sua via de sinalização.

Células HEK transfectadas transitoriamente com TrkA foram tratadas durante 5, 10 ou 15 minutos, com NGF (100 ng/mL), para observação da cinética de ativação de algumas vias *downstream*, como PLC γ e ERK (Figura 9). Os níveis de fosforilação de PLC γ Tyr 783, que aumentaram após 5min de tratamento com NGF, retornaram a valores semelhantes aos do controle (sem tratamento com NGF) nos tempos de 10 e 15 minutos após o tratamento com NGF, indicando uma cinética de ativação bastante rápida (Figura 9B). O NGF também levou à fosforilação de ERK1/2, uma via *downstream* de PLC γ . Essa ativação foi mantida por pelo menos 15 minutos após o tratamento (Figura 9C). Sabendo disso, adotamos o tempo de 5 minutos de tratamento com NGF para os próximos ensaios.

A



B



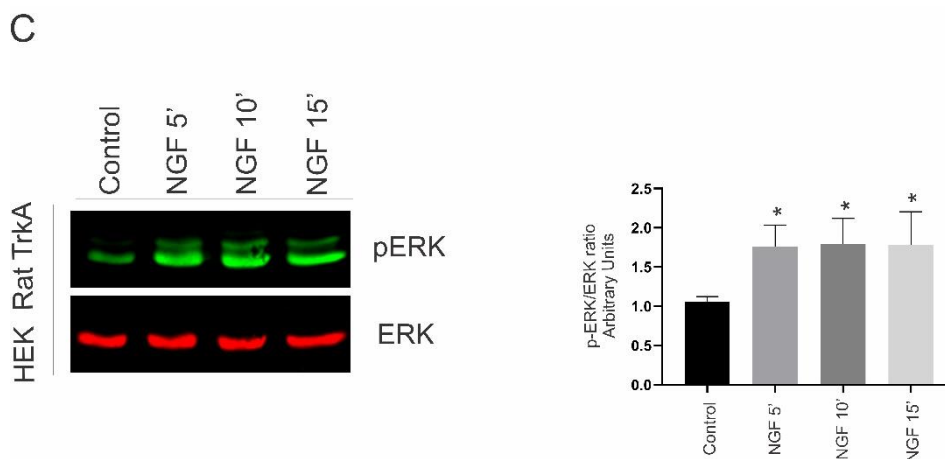
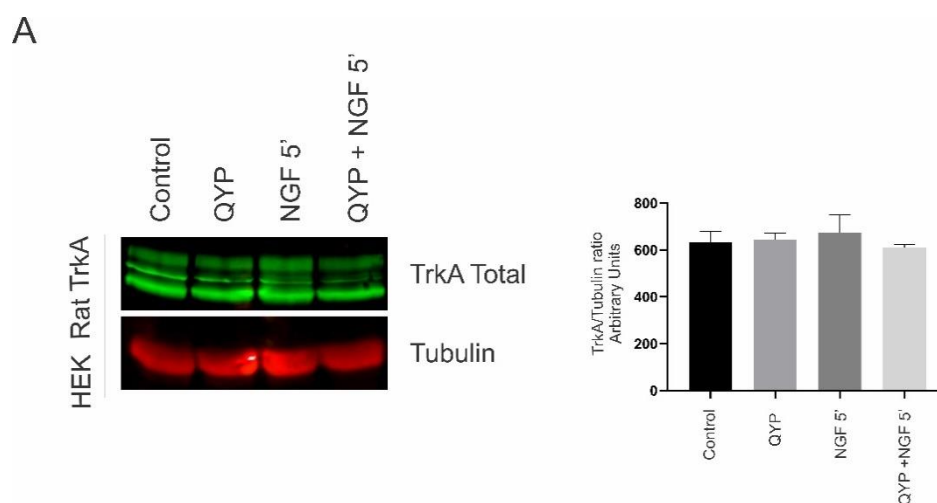


Figura 9: Cinética de ativação de alvos do TrkA (PLC γ e ERK). (A-C) Células HEK expressando transitoriamente TrkA foram tratadas com 100 ng/mL de NGF por 5, 10 ou 15min. E por Western blot observou-se os níveis de fosforilação das proteínas, PLC γ Y783 (B) e ERK 1/2 (C). A análise quantitativa de três experimentos independentes foi realizada usando o Image Studio™ Lite software da LI-COR, determinando a razão entre TrkA / Tubulina total (A), pPLC γ / totalPLC γ (B), pERK1/2 / total ERK1/2 (C). O teste one-way ANOVA foi realizado onde * p = < 0,05.

Para a avaliação da atividade *in vitro* do peptídeo QYP, foi realizado um pré-tratamento com o peptídeo (3,2 μ M) nas células HEK transfectadas com TrkA por uma hora antes da ativação com NGF (100ng/mL). Foi observado que QYP promoveu a inibição da fosforilação tanto de PLC γ Y783, quanto de ERK1/2 (Figuras 10B e 10C).



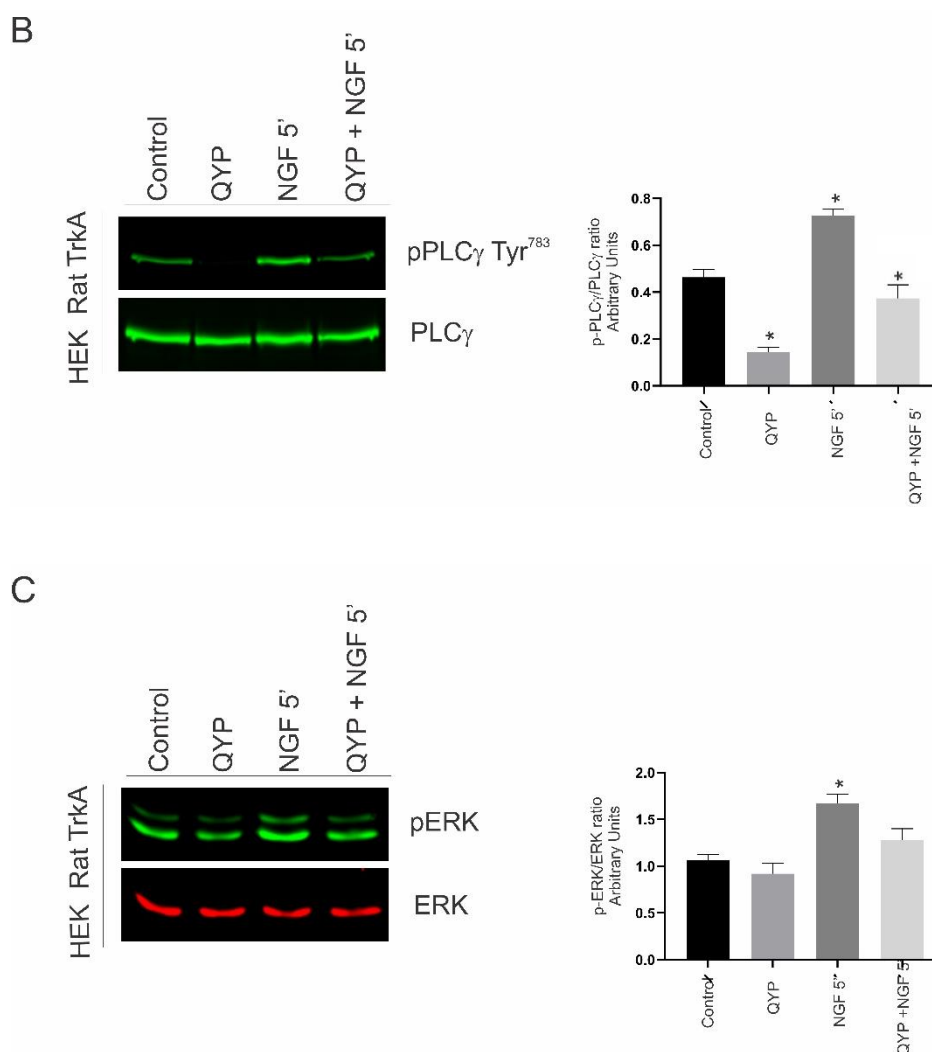


Figura 10: QYP inibe a fosforilação de substratos de TrkA e PLC γ . Células HEK293 expressando transitoriamente TrkA foram pré-incubadas com 3,2 μ M de QYP por 1 hora antes do tratamento com 100ng/mL de NGF por 5 min (A-C). Lisados das células foram preparadas e corridas em SDS PAGE e Western blot foi realizado para análise de: (A) TrkA total (B) Fosfo PLC γ Tyr 783 e PLC γ total (C) Fosfo ERK1/2 e total ERK1/2. A análise quantitativa de três experimentos independentes foi realizada usando o Image Studio™ Lite software da LI-COR, determinando a razão entre TrkA / Tubulina total (A), pPLC γ / totalPLC γ (B), pERK1/2 / total ERK1/2 (C). O teste one-way ANOVA foi realizado onde * p = < 0,05.

Como esperado QYP não foi capaz de inibir a autofosforilação da TrkA em Tyr 680/681 (Figura 11A) e teve pouco efeito na fosforilação da Tyr Y791, sítio de ancoragem de PLC γ (Figura 11B)

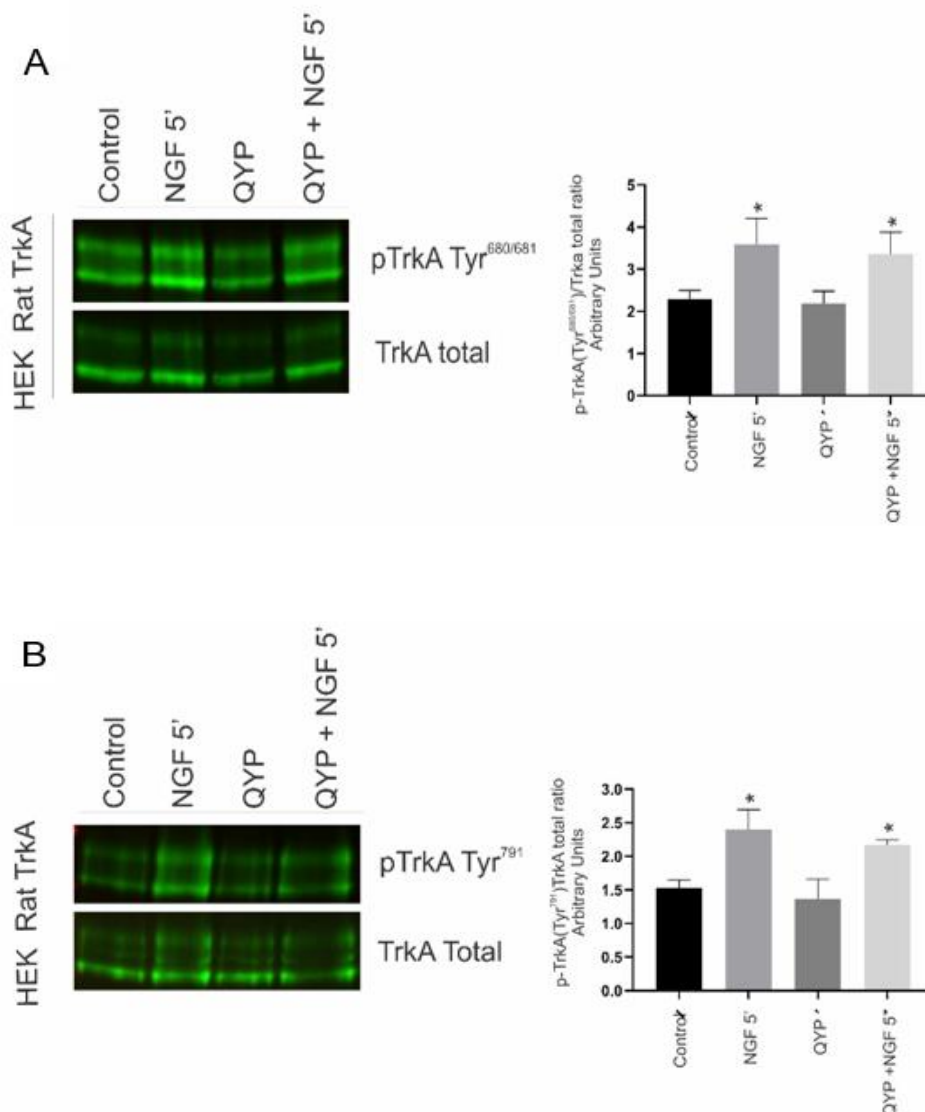


Figura 11: QYP não interfere nos sítios de fosforilação de TrkA. Células HEK293 expressando transitoriamente TrkA foram pré-incubadas com 3,2 μ M de QYP por 1 hora antes do tratamento com 100ng/mL de NGF por 5 min. Lisados das células foram preparadas para corridas de SDS PAGE e Western blot foi realizado para análise de: **(A)** Phospho TrkA Tyr 674/675 (Tyr 680/681 na isoforma II) e TrkA total. **(B)** Fosfo TrkA Tyr 785 (Tyr 791 na isoforma II) e TrkA total. A análise quantitativa de três experimentos independentes foi realizada usando o Image Studio™ Lite software da LI-COR, determinando a razão entre pTrkA (Tyr 680/681) / TrkA total **(A)** e pTrkA(Tyr 791) / TrkA total **(B)**. O teste one-way ANOVA foi realizado onde * $p < 0,05$.

4.3 A inibição da interação da PLC γ com TrkA tem um efeito analgésico na dor inflamatória.

Em parceria com o laboratório da Profa. Dra. Camila Dale do ICB-USP (Departamento de Anatomia), testamos o efeito do peptídeo QYP *in vivo* em modelo animal de dor inflamatória (CEUA nº 7474280219). Utilizamos camundongos C57BL/6 machos. Para tanto, os animais foram submetidos a anestesia inalatória com isoflurano, seguido pela injeção de 25 μ l de CFA (Freund's adjuvant complete - F5881 - Sigma) na pata posterior esquerda, para indução da dor inflamatória.

Primeiramente foi necessário definir a dose ótima de ação do peptídeo. Para isso realizamos um teste com diferentes concentrações de QYP. Após as 3 horas de ação do CFA, foi aplicado na mesma pata do animal uma injeção de 25 μ L de QYP nas concentrações de 0,32mM, 0,16mM e 0,08mM ou água, utilizada como controle do experimento. Os efeitos sobre a sensibilidade mecânica foram avaliados por filamentos de von Frey em diversos pontos de tempo após a aplicação do peptídeo (Figura 12).

Podemos observar que a concentração de 0,32mM foi capaz de reverter a sensibilidade dolorosa ao estímulo mecânico, uma vez que restabeleceu o limiar nociceptivo dos animais, após duas, quatro, seis e sete horas da injeção do peptídeo (Figura 12). Esse experimento nos permitiu definir o tempo ótimo de ação do peptídeo, que foi após 3 horas de sua administração.

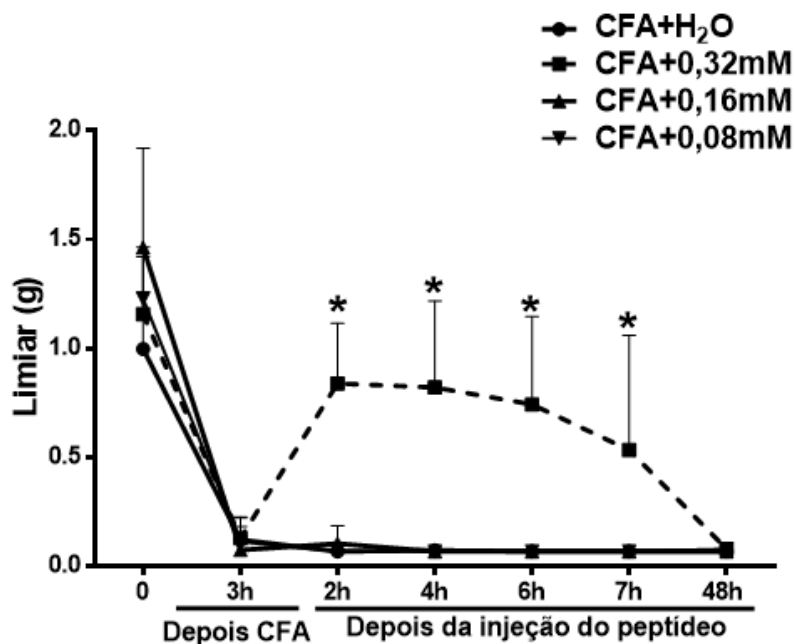


Figura 12: Análise da atividade de diferentes concentrações de QYP em modelo de dor inflamatória *in vivo*. Foram utilizados tratamentos com concentrações de 0,32 mM, 0,16mM, 0,08mM do peptídeo QYP ou água (controle). O teste de sensibilidade mecânica, foi realizado antes de qualquer manipulação, após 3 horas de CFA, e após a injeção do QYP nos tempos 2h (n=8), 4h (n=8), 6h (n=3), 7h (n=3), 48h (n=5). O teste two-way ANOVA foi realizado, com pós teste de Bonferroni, onde * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CFA+H₂O.

Com o tempo e dose ideal definidos, realizamos um ensaio com controles tanto do QYP, quanto do CFA, para avaliar se o efeito observado era decorrido da ação do peptídeo ou de alguma outra parte do TAT, por exemplo. Foram utilizados como controle o óleo mineral (veículo do CFA) e o TAT sem estar acoplado ao peptídeo (Figura 13). É possível observar a recuperação do limiar basal de sensibilidade mecânica apenas na combinação entre CFA + QYP, e não nos grupos CFA + TAT ou CFA + água. Os grupos controle (sem CFA), que não apresentavam alteração dolorosa ao estímulo mecânico, uma vez que não foi observado alteração no limiar quando realizado o teste de sensibilidade mecânica. (Figura 13).

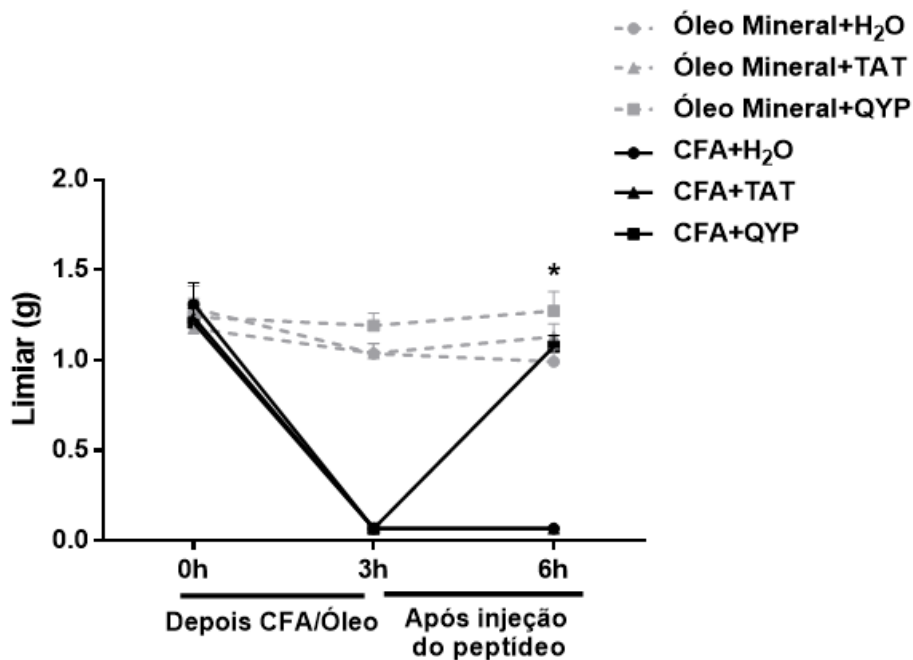


Figura 13: Sensibilidade mecânica dos controles de QYP e CFA. Teste de sensibilidade mecânica realizado com os controles óleo mineral e TAT (carreador do QYP). Todos os grupos possuem n=9 animais. O teste two-way ANOVA foi realizado, com pós teste de Bonferroni, onde * $p = <0,05$ quando comparado ao grupo CFA+H₂O.

Para a análise de sensibilidade térmica, foi realizado o teste de sensibilidade térmica ao quente (placa quente), com a temperatura padronizada de 52,5°C. Nesse experimento foi possível observar que há um aumento do tempo de latência nos animais que receberam tratamento com o QYP, após a aplicação do CFA, quando comparados ao grupo controle após 1 e 3 horas da inoculação do peptídeo (Figura 14). Estes dados indicam que o QYP apresenta efeito na reversão da hipersensibilidade térmica ao quente, induzida pela dor inflamatória nesses animais.

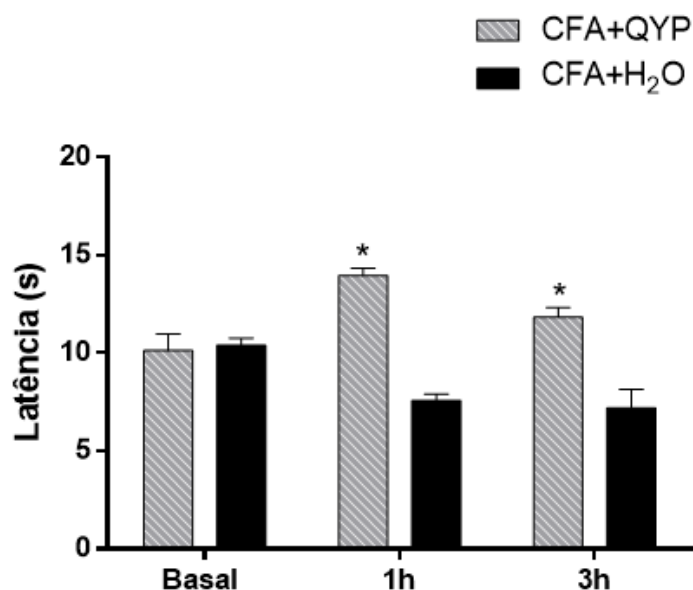


Figura 14: Teste de sensibilidade térmica (placa quente - 52,5°C). As medidas dos animais na placa quente foram realizadas antes de qualquer manipulação (basal) e após 1 e 3 horas da aplicação do QYP (0,32mM). O grupo CFA+QYP possui n=8 animais e o grupo CFA+H₂O n=7 animais. O teste two-way ANOVA foi realizado, com pós teste de Bonferroni, onde * p = <0,05 quando comparado ao grupo controle (CFA+H₂O).

Para avaliar os efeitos de QYP na nocicepção crônica, os camundongos foram injetados com CFA, como descrito acima, e após 7 e, novamente, após 14 dias, foram aplicadas novas doses de QYP no local da injeção de CFA. Os animais foram avaliados quanto à sensibilidade mecânica usando teste de filamento de von Frey após 1 e 3 horas de injeção do peptídeo.

Observamos uma reversão da sensibilidade dolorosa nos animais tratados com QYP tanto no sétimo quanto no décimo quarto dia do experimento. Esse efeito foi mantido por até 3 horas após a administração do peptídeo, demonstrando que QYP também é capaz de atuar em quadros de dor crônica (Figura 15). Nesse experimento, foram testadas outras versões do QYP, para avaliar seus possíveis efeitos. O QYP não fosforilado (QYP*), ou seja, sem a tirosina fosforilada presente no peptídeo original e a sequência do QYP sem o carreador (QYP^{-TAT}). Esses peptídeos-controle que foram utilizados não

apresentaram efeito analgésico, reforçando que o QYP necessita entrar para o interior da célula e que apenas o peptídeo fosforilado é capaz de inibir a hipersensibilidade mecânica induzida por CFA (Figura 15).

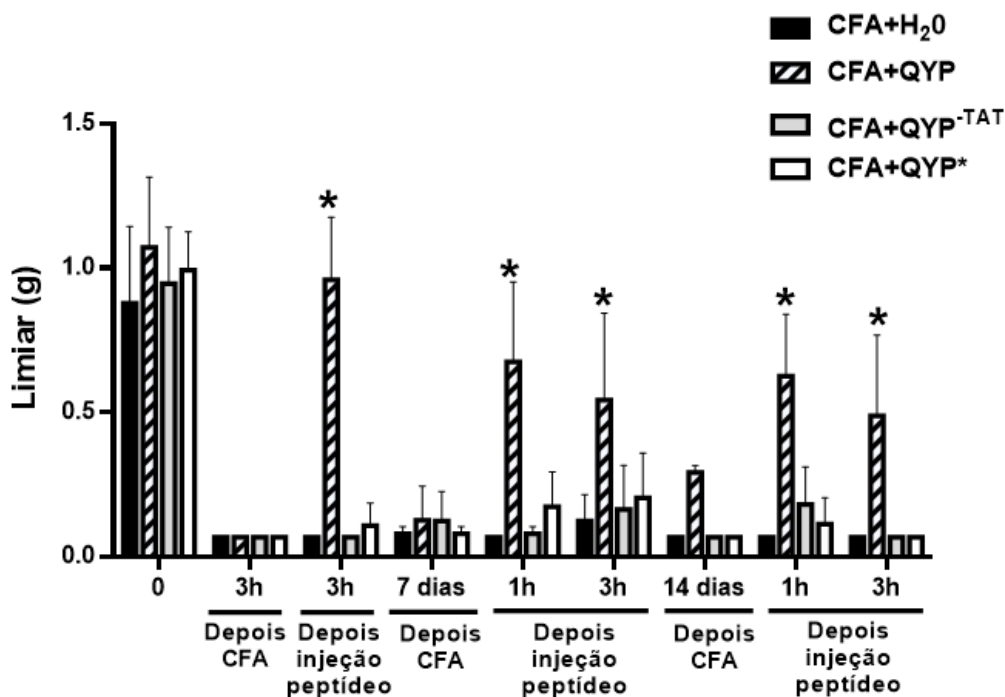


Figura 15: Efeitos de QYP na sensibilidade mecânica crônica e ensaio de especificidade de QYP. O teste de sensibilidade mecânica, foi realizado antes de qualquer manipulação (basal), após o sétimo dia, antes da aplicação do peptídeo (0,32mM) e após 1 e 3 horas da aplicação (n=5). Os grupos QYP^{-TAT} correspondem ao peptídeo sem o carreador (TAT) e QYP* ao peptídeo não fosforilado. O mesmo protocolo foi realizado no décimo quarto dia (n=5). O teste two-way ANOVA foi realizado, com pós teste de Bonferroni, onde * p = <0,05 quando comparado ao grupo CFA+H₂O do mesmo ponto de tempo.

Na sensibilidade térmica (52°C), também foi possível observar um aumento na resposta a latência ao estímulo térmico nos animais com dor inflamatória crônica induzida por CFA e que foram tratados com QYP demonstrando que, assim como para a nocicepção, QYP é capaz de atenuar a hipersensibilidade térmica ao quente, tanto na dor aguda quanto crônica (Figura 14 e 16). Os resultados demonstraram também que em algumas condições o

QYP não fosforilado apresentou efeito sob o tempo de latência dos animais na placa quente (Figura 16).

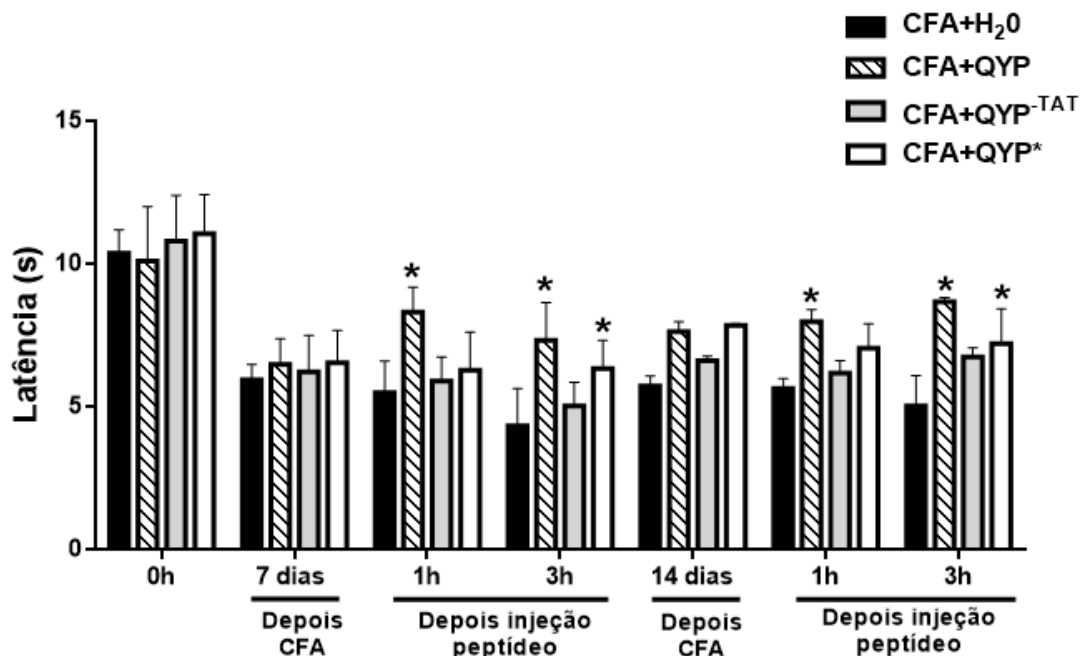


Figura 16: Efeitos de QYP na sensibilidade térmica crônica e ensaio de especificidade de QYP. Teste de sensibilidade térmica (placa quente - 52,5°C) em modelo de dor crônica inflamatória. As medidas foram realizadas antes de qualquer manipulação (basal) e no sétimo dia, após 1 e 3 horas da aplicação do QYP (0,32mM) (n=5). O protocolo foi repetido com os mesmos animais no décimo quarto dia. Os grupos QYP^{-TAT} correspondem ao peptídeo sem o carreador (TAT) e QYP* ao peptídeo não fosforilado. O teste two-way ANOVA foi realizado, com pós teste de Bonferroni, onde * p < 0,05 quando comparado ao grupo CFA+H₂O.

É possível observar que o QYP apresentou eficácia tanto na reversão da sensibilidade ao estímulo mecânico quanto ao estímulo térmico de animais submetidos ao modelo de inflamação aguda e crônica induzidos por CFA, revelando assim potencial terapêutico no tratamento de dores inflamatórias. O efeito de QYP na atenuação da hipersensibilidade térmica foi menor, e, ainda QYP* (não fosforilado) apresentou efeito, mas apenas após 3h de sua administração, e não a partir de 1h como o peptídeo fosforilado. Coletivamente,

esses dados indicam que QYP tem efeito menor na reversão da hipersensibilidade térmica.

Para confirmar o envolvimento da PLC γ na diminuição da sensibilidade dolorosa, utilizamos dois inibidores comerciais disponíveis: GNF5837, inibidor de TrkA e U-73122, inibidor de PLC, pois atualmente não há disponível um inibidor específico para PLC γ no mercado. Eles foram avaliados no mesmo ensaio de indução de dor inflamatória por CFA. Foi demonstrado que eles reverteram a nocicepção aguda induzida por CFA (Figura 17).

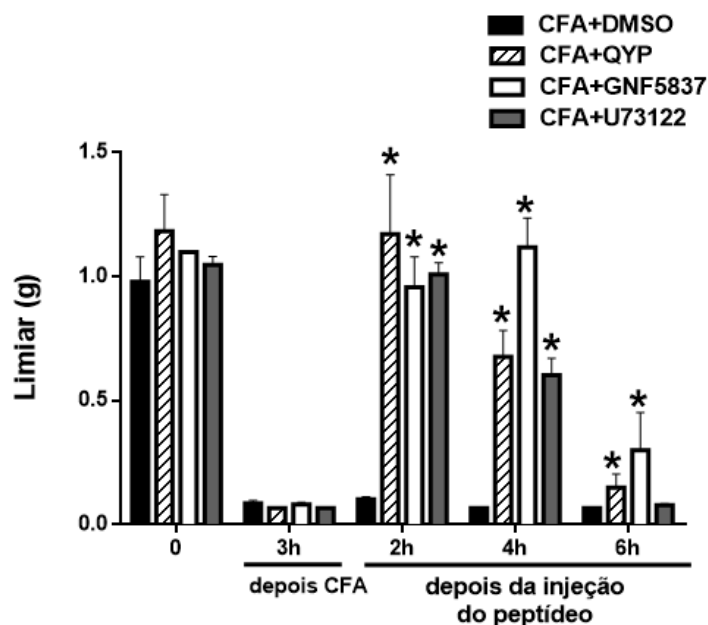


Figura 17: Ensaio com inibidores comerciais na hipersensibilidade mecânica. Os camundongos receberam injeção intraplantar de CFA (25 μ L) e após 3h uma injeção intraplantar de peptídeo QYP (0,32 mM) ou GNF5837 (0,1 mM) ou U73347 (0,125 mM). Os animais foram avaliados antes do CFA e após 2, 4 e 6h de tratamentos farmacológicos. O teste two-way ANOVA foi realizado, com pós teste de Bonferroni, onde * $p = <0,05$ quando comparado ao grupo CFA+DMSO.

Nesse experimento também foram analisadas as respostas dos animais quanto a sensibilidade ao estímulo térmico, no ensaio de placa quente. É

possível observar que apenas o QYP teve algum efeito quanto a redução da sensibilidade térmica e apenas no tempo de 2 horas (Figura 18). Lembrando que esse efeito foi observado até o tempo de 3 horas como é possível observar na figura 14.

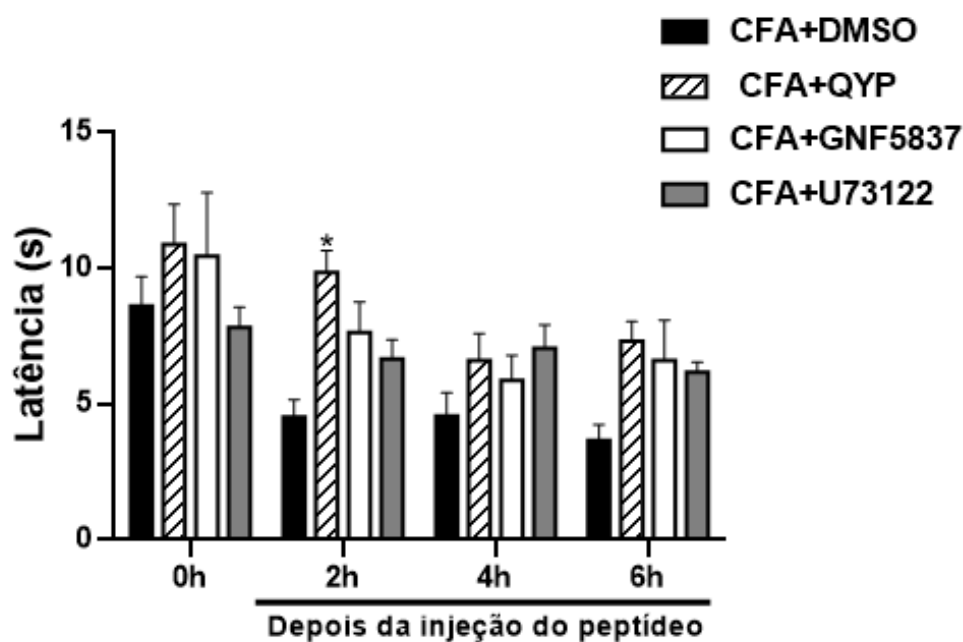


Figura 18: Ensaio com os inibidores comerciais na sensibilidade térmica. Os camundongos receberam injeção intraplantar de CFA (25 uL) e após 3h uma injeção intraplantar de peptídeo QYP (0,32 mM) ou GNF5837 (0,1 mM) ou U73347 (0,125 mM). Os animais foram avaliados antes do CFA e após 2, 4 e 6h de tratamentos farmacológicos. O teste two-way ANOVA foi realizado, com pós teste de Bonferroni, onde * $p = <0,05$ quando comparado ao grupo CFA+DMSO.

5. DISCUSSÃO

A busca por analgésicos mais específicos e que produzam menos efeitos colaterais é altamente desejada, especialmente com a crise dos opioides. Nas últimas décadas, foram identificadas mutações em vários genes que levam a insensibilidade à dor. Entre elas encontramos mutações no NGF, no receptor de alta afinidade pelo NGF (TrkA) ou em Necdin, todos envolvidos na via de sinalização de TrkA (KUWAKO et al., 2005). No entanto, além da falta de dor, pacientes com esses genes mutados frequentemente apresentam outros fenótipos, como retardo mental, automutilação, múltiplas fraturas e atraso no desenvolvimento (MARDY et al., 2001). Para identificar quais vias podem estar envolvidas especificamente na analgesia, uma análise sistemática das mutações presentes no TrkA foi realizada no presente trabalho.

A maioria das mutações encontradas em TrkA na CIPA estavam presentes em resíduos conservados em espécies como roedores, coelhos, touros e seres humanos (Apêndice 2), indicando a importância desses resíduos na estrutura ou atividade de TrkA. Uma das mutações *missense* de CIPA, a R85S, é encontrada na TrkA selvagem de *Bos Taurus*, indicando que por si só ela teria pouco efeito sobre a funcionalidade do receptor, porém essa mutação no paciente foi encontrada junto com outra mutação, localizada em um sítio de *splicing* em um íntron (c.253 C> A), sugerindo que o desenvolvimento da CIPA poderia ser causado pela mutação no íntron e não pela substituição do R85S.

No contexto do domínio quinase da TrkA, várias mutações *missense* da CIPA foram identificadas e as análises estruturais dos efeitos de tais mutações forneceram informações importantes sobre seus impactos na função da quinase. Mutações que ocorrem em regiões estruturadas, como G522R e G577R, que

estão localizadas nas folhas β do N-lobe, poderiam atrapalhar a estrutura de TrkA e, conseqüentemente, inibir a sua função quinase. Essas duas mutações já haviam sido previamente identificadas e inibem a auto fosforilação de TrkA de maneira inespecífica (MARDY et al., 2001). Nesse trabalho demonstramos experimentalmente que a mutação R654C de CIPA, que foi a mutação *missense* mais frequente em nosso banco de dados, também compromete a auto fosforilação de TrkA, devido à sua posição na estrutura da proteína, participando do sítio de ligação do substrato e possivelmente afetando a ligação ao ATP.

Os estudos de modelagem molecular e localização das mutações encontradas na CIPA, na TrkA ativa, conduzidos neste trabalho indicam que mutações *missense* da CIPA poderiam diminuir a interação de TrkA com seus substratos e interferir na autofosforilação ou no enovelamento correto da quinase. Sendo assim, essas mutações poderiam levar à interrupção inespecífica de várias vias de sinalização ativadas por TrkA.

Mutações próximas ao C-terminal da TrkA podem gerar uma proteína truncada e, assim, influenciar na ancoragem de PLC γ à quinase. Diferente de outras mutações *nonsense* e *frameshift* que ocorrem na CIPA, que poderiam produzir uma proteína não estruturada, as mutações que ocorrem no C-terminal podem resultar em uma versão de TrkA incapaz de ativar vias específicas, como por exemplo a via da PLC γ . Isso fica claro quando se considera o paciente com a mutação *non-sense* Q782* em heterozigose, e que apresentava no outro alelo a mutação E388K, localizada no domínio Ig2 (Apêndice 1). Curiosamente, esse paciente tinha um fenótipo leve, que poderia ser indicativo da expressão de uma proteína truncada, com inibição apenas da ancoragem e sinalização de PLC γ (WIECZOREK et al., 2008). Outro exemplo relatado na literatura é a mutação

Y791F em TrkA, que impede a ancoragem e sinalização de PLC γ , mas não afeta o crescimento de neuritos (LOEB et al., 1994). Essas observações, em conjunto com nossos achados, indicam que a ativação de PLC γ pelo NGF poderia estar envolvida especificamente em vias que levam à dor.

Um peptídeo semelhante ao sítio de interação da PLC γ com a TrkA, baseado na própria TrkA, já havia demonstrado previamente, em ensaios de imunoprecipitação, sua ação inibitória na interação entre TrkA e PLC γ (OBERMEIER et al., 1993). No presente trabalho, demonstramos que o nosso peptídeo QYP, pode impedir a fosforilação de PLC γ e, conseqüentemente, sua ativação e desencadeamento das vias *downstream* que levam à dor.

A inibição da sinalização da PLC γ reduz a clivagem de PIP2 em IP3 e DAG, que são compostos importante para manter o canal TRPV1 aberto. Essa abertura é necessária para a despolarização dos neurônios sensoriais e, conseqüentemente para a transmissão do estímulo doloroso (CHUANG et al., 2001). Além disso, a ativação de PKCs por DAG e cálcio poderia levar a fosforilação de TRPV1 que também promoveriam a abertura do canal (BHAVE et al., 2003). PLC γ também ativa outro elemento-chave da via da dor, ERK (JI; STRICHARTZ, 2004). Juntos, esses eventos contribuem para a sinalização da dor no modelo de dor inflamatória induzida por CFA. O inibidor de PLCs (U-73122) também inibiu a dor inflamatória no nosso modelo, corroborando com o possível papel da PLC γ no desenvolvimento de dor aguda. De acordo com sua natureza estrutural, e devido à importância da via da PLC γ na dor, QYP poderia atuar, pelo menos em parte, inibindo essa via de sinalização. QYP poderia estar afetando ainda outras vias de sinalização que usam domínios SH2 ancorados na

Y791, por isso estudos mais detalhados se fazem necessários, a fim de elucidar e caracterizar o mecanismo de ação de QYP na inibição da dor.

Nossos dados mostraram que QYP teve um efeito pequeno na reversão da sensibilidade ao estímulo térmico e que os inibidores de TrkA e de PLC γ não tiveram efeitos significativos. Estes dados poderiam indicar que, diferente da hipersensibilidade ao estímulo mecânico, a via da PLC γ pode não ser essencial para a instalação da hipersensibilidade térmica. De fato, a hipersensibilidade térmica é gerada principalmente pela hiperalgesia resultante da ativação direta do calor em TRPV1 (CHUANG et al., 2001), o que poderia indicar que o QYP atua preventivamente, evitando uma hiper ativação do canal, pois ele evitaria sua fosforilação durante o desenvolvimento do processo inflamatório.

Compreender os mecanismos subjacentes à insensibilidade dolorosa pode revelar possíveis alvos terapêuticos, criando a oportunidade para o desenvolvimento de derivações analgésicas mais específicas para a dor. Usando essa abordagem, destacamos que a ativação de PLC γ via NGF seria um componente-chave para o desenvolvimento da algesia na via da dor inflamatória. Moduladores de interações proteína-proteína estão sendo exploradas como fármacos e medicamentos devido à sua especificidade (SCOTT et al., 2016). Estudos futuros do nosso laboratório caracterizarão tanto a especificidade de QYP quanto outros papéis de PLC γ na sinalização da dor.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analisando as mutações presentes em uma doença que leva à insensibilidade à dor, nós identificamos a via de sinalização da PLC γ , ativada pela ligação do NGF ao TrkA, como essencial para a dor. Ainda, utilizando um peptídeo que especificamente inibe a interação entre TrkA e PLC γ , validamos que essa via é essencial para o desenvolvimento de dor mecânica, criando assim a oportunidade para o desenvolvimento de novos analgésicos. Nossa abordagem demonstrou que o estudo de doenças genéticas para insensibilidade à dor podem ser uma rica fonte de informação já disponível para a identificação de alvos terapêuticos para o desenvolvimento de analgésicos não opioides.

7. REFERENCIAS

- ALEY, K. O. et al. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the ϵ isozyme of protein kinase C. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 4680–4685, 15 jun. 2000.
- ALGAHTANI, H. et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: A report of two siblings with a novel mutation in (TrkA) NTRK1 gene in a Saudi family. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 370, p. 35–38, 15 nov. 2016.
- ALTASSAN, R. et al. Exome sequencing identifies novel NTRK1 mutations in patients with HSAN-IV phenotype. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 173, n. 4, p. 1009–1016, 1 abr. 2017.
- AMIN, S. et al. **Novel 9 amino acid in-frame deletion in the NTRK1 tyrosine kinase domain in a patient with congenital insensitivity to pain with anhidrosis****Clinical Genetics**Blackwell Publishing Ltd, , 1 nov. 2017.
Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28940190/>>. Acesso em: 13 ago. 2020
- APKARIAN, A. V. et al. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **European Journal of Pain**, v. 9, n. 4, p. 463, 2005.
- AVOUAC, J.; GOSSEC, L.; DOUGADOS, M. Efficacy and safety of opioids for osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 8, p. 957–965, 1 ago. 2007.
- BAKRI, F. G. et al. Congenital insensitivity to pain and anhidrosis due to a rare mutation and that is complicated by inflammatory bowel disease and amyloidosis: a case report. **Clinical Case Reports**, v. 4, n. 10, p. 997–1000, out. 2016.
- BARONE, R. et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (NTRK1 mutation) and early onset renal disease: Clinical report on three sibs with a 25-year follow-up in one of them. **Neuropediatrics**, v. 36, n. 4, p. 270–273, 24 ago. 2005.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139,

n. 2, p. 267–284, 16 out. 2009.

BEVAN, S.; QUALLO, T.; ANDERSSON, D. A. TRPV1. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 222, p. 207–245, 2014.

BHAVE, G. et al. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 21, p. 12480–12485, 14 out. 2003.

BODZIOCH, M. et al. Two novel mutant alleles of the gene encoding neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 (NTRK1) in a patient with congenital insensitivity to pain with anhidrosis: a splice junction mutation in intron 5 and cluster of four mutations in exon 15. **Human mutation**, v. 17, n. 1, p. 72, 1 jan. 2001.

BONKOWSKY, J. L. et al. An infant with primary tooth loss and palmar hyperkeratosis: a novel mutation in the NTRK1 gene causing congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Pediatrics**, v. 112, n. 3 Pt 1, 2003.

BONNINGTON, J. K.; MCNAUGHTON, P. A. Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. **Journal of Physiology**, v. 551, n. 2, p. 433–446, 1 set. 2003.

BROGNA, S.; WEN, J. **Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms** **Nature Structural and Molecular Biology**, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nsmb.1550>>. Acesso em: 6 nov. 2020

CATERINA, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, n. 5464, p. 306–313, 14 abr. 2000.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, 1994.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 10, p. 1970–1978, out. 2008.

CHUANG, H. H. et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature**, v. 411, n. 6840, p.

957–962, 21 jun. 2001.

CROWLEY, C. et al. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. **Cell**, v. 76, n. 6, p. 1001–1011, 25 mar. 1994.

DAVIDSON, G. L. et al. Frequency of mutations in the genes associated with hereditary sensory and autonomic neuropathy in a UK cohort. **Journal of Neurology**, v. 259, n. 8, p. 1673–1685, ago. 2012.

DAVIS, J. B. et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 183–187, 11 maio 2000.

DE OLIVEIRA, P. S. L. et al. Revisiting protein kinase-substrate interactions: Toward therapeutic development. **Science Signaling**, v. 9, n. 420, 22 mar. 2016.

DEMIR, I. E. et al. Nerve growth factor & TrkA as novel therapeutic targets in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1866, n. 1, p. 37–50, 1 ago. 2016.

DENK, F.; BENNETT, D. L.; MCMAHON, S. B. Nerve Growth Factor and Pain Mechanisms. **Annual Review of Neuroscience**, v. 40, p. 307–325, 25 jul. 2017.

FANG LV et al. Recurrent and novel mutations in the NTRK1 gene lead to rare congenital insensitivity to pain with anhidrosis in two Chinese patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 468, p. 39–45, 1 maio 2017.

FRANCO, M. L. et al. Mutations in TrkA causing congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) induce misfolding, aggregation, and mutation-dependent neurodegeneration by dysfunction of the autophagic flux. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 41, p. 21363–21374, 7 out. 2016.

GAO, L. et al. Oral and Craniofacial Manifestations and Two Novel Missense Mutations of the NTRK1 Gene Identified in the Patient with Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 14 jun. 2013.

GATCHEL, R. J. et al. Interdisciplinary chronic pain management. **American Psychologist**, v. 69, n. 2, p. 119–130, 2014.

GENG, X. et al. Novel NTRK1 mutations in Chinese patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Molecular Pain**, v. 14, 1 jun. 2018.

GRECO, A. et al. A novel NTRK1 mutation associated with congenital insensitivity to pain with anhidrosis [1]. **American Journal of Human Genetics**, v. 64, n. 4, p. 1207–1210, 1999.

GSCHWIND, A.; FISCHER, O. M.; ULLRICH, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: Targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 5, p. 361–370, 2004.

GUCEV, Z. et al. Heterotopic ossifications and Charcot joints: Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) and a novel NTRK1 gene mutation. **European Journal of Medical Genetics**, v. 63, n. 1, p. 103613, 1 jan. 2020.

GUO, Y.-C. et al. Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis in Taiwan: A Morphometric and Genetic Study. **European Neurology**, v. 51, n. 4, p. 206–214, 17 maio 2004.

GUVEN, Y. et al. Twins with hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV with preserved periodontal sensation. **European Journal of Medical Genetics**, v. 57, n. 5, p. 240–246, 2014.

HAGA, N.; KUBOTA, M.; MIWA, Z. Hereditary sensory and autonomic neuropathy types IV and V in Japan. **Pediatrics International**, v. 57, n. 1, p. 30–36, 1 fev. 2015.

HANSSON, P. T.; DICKENSON, A. H. Pharmacological treatment of peripheral neuropathic pain conditions based on shared commonalities despite multiple etiologies. **Pain**, v. 113, n. 3, p. 251–254, fev. 2005.

HEFTI, F. F. et al. Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 2, p. 85–91, fev. 2006.

HOLDGATE, A.; POLLOCK, T. Systematic review of the relative efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioids in the treatment of acute renal colic. **British Medical Journal**, v. 328, n. 7453, p. 1401–1404, 12 jun. 2004.

HOULDEN, H. et al. A novel TRK A (NTRK1) mutation associated with hereditary sensory and autonomic neuropathy type V. **Annals of Neurology**, v.

49, n. 4, p. 521–525, 1 abr. 2001.

HUEHNE, K. et al. Novel missense, insertion and deletion mutations in the neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 gene (NTRK1) associated with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Neuromuscular Disorders**, v. 18, n. 2, p. 159–166, fev. 2008.

INDO, Y. et al. Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Nature Genetics**, v. 13, n. 4, p. 485–488, 1996a.

INDO, Y. et al. Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Nature Genetics**, v. 13, n. 4, p. 485–488, 1996b.

INDO, Y. Genetics of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) or hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV: Clinical, biological and molecular aspects of mutations in TRKA(NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. **Clinical Autonomic Research**, v. 12, n. 1 SUPPL., 2002.

INDO, Y. NGF-dependent neurons and neurobiology of emotions and feelings: Lessons from congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 87, p. 1–16, 1 abr. 2018.

JACOBSEN TEIXEIRA, M. Fisiopatologia da Nocicepção e da Supressão da Dor* Physiopathology of Nociception and Pain Suppression. **JBA**, v. 1, n. 4, p. 329–334, 2001.

JI, R. R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2004, n. 252, 2004.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203–210, 13 set. 2001.

JUNG, C. L. et al. Atypical hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV with neither mental retardation nor pain insensitivity. **Journal of child neurology**, v. 28, n. 12, p. 1668–72, 30 dez. 2013.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T. . **Princípios da Neurociência**. 4 edição ed. [s.l: s.n.].

KHASAR, S. G. et al. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase c ϵ mutant mice. **Neuron**, v. 24, n. 1, p. 253–260, 1999.

KILIC, S. S. et al. Humoral immunodeficiency in congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Neurogenetics**, v. 10, n. 2, p. 161–165, abr. 2009.

KRIEGER, E.; VRIEND, G.; KELSO, J. YASARA View-molecular graphics for all devices-from smartphones to workstations. **BIOINFORMATICS APPLICATIONS**, v. 30, n. 20, p. 2981–2982, 2014.

KUMAR, V.; MAHAL, B. A. NGF - The TrkA to successful pain treatment. **Journal of Pain Research**, v. 5, p. 279–287, 2012.

KURTH, I. et al. Whole exome sequencing in congenital pain insensitivity identifies a novel causative intronic *NTRK1*- mutation due to uniparental disomy. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 171, n. 6, p. 875–878, 1 set. 2016.

KUWAKO, K. I. et al. Disruption of the paternal *necln* gene diminishes TrkA signaling for sensory neuron survival. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 30, p. 7090–7099, 27 jul. 2005.

LEE, S. T. et al. Clinical and genetic analysis of Korean patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Muscle and Nerve**, v. 40, n. 5, p. 855–859, nov. 2009.

LEVI-MONTALCINI, R. et al. Nerve growth factor: From neurotrophin to neurokine. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 11, p. 514–520, nov. 1996.

LI, M. et al. Novel nonsense and frameshift *NTRK1* gene mutations in Chinese patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 2156–2162, 2012.

LI, N. et al. Phenotypic and genotypic features of a pair of Chinese identical twins with congenital insensitivity to pain and anhidrosis A case report. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 47, p. e13209–e13209, 1 nov. 2018.

LI, N. et al. Heterogeneity of clinical features and mutation analysis of NTRK1 in Han Chinese patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis.

Journal of Pain Research, v. 12, p. 453–465, 2019.

LIN, Y.-P. et al. Novel neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 gene mutation associated with congenital insensitivity to pain with anhidrosis.

Journal of child neurology, v. 25, n. 12, p. 1548–51, 20 dez. 2010.

LIU, S. et al. Novel NTRK1 Frameshift Mutation in Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis. **Journal of Child Neurology**, v. 30, n. 10, p. 1357–1361, 18 set. 2015.

LIU, Y.; MA, Q. Generation of somatic sensory neuron diversity and implications on sensory coding. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 21, n. 1, p. 52–60, fev. 2011.

LIU, Z. et al. Phenotypic heterogeneity of intellectual disability in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis: A case report and literature review. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. 6, p. 2445–2457, 1 jun. 2018.

LOEB, D. M. et al. A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C- γ 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 12, p. 8901–8910, 1994.

MA, W.-Y. et al. A Synthetic Cell-Penetrating Peptide Antagonizing TrkA Function Suppresses Neuropathic Pain in Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 114, n. 1, p. 79–84, 11 ago. 2010.

MANJANI, D. et al. Availability and utilization of opioids for pain management: Global issues. **Ochsner Journal**, v. 14, n. 2, p. 208–215, 2014.

MARDY, S. et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: Novel mutations in the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor. **American Journal of Human Genetics**, v. 64, n. 6, p. 1570–1579, 1999.

MARDY, S. et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): effect

of TRKA (NTRK1) missense mutations on autophosphorylation of the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 3, 2001.

MASRI, A. et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis syndrome: A series from Jordan. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 189, p. 105636, 1 fev. 2020.

MINNONE, G.; DE BENEDETTI, F.; BRACCI-LAUDIERO, L. NGF and its receptors in the regulation of inflammatory response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, 11 maio 2017.

MIRANDA, C. et al. Novel pathogenic mechanisms of congenital insensitivity to pain with anhidrosis genetic disorder unveiled by functional analysis of neurotrophic tyrosine receptor kinase type 1/nerve growth factor receptor mutations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 8, p. 6455–6462, 22 fev. 2002.

MIURA, Y. et al. Mutation and polymorphism analysis of the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor in congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) families. **Human Genetics**, v. 106, n. 1, p. 116–124, 2000a.

MIURA, Y. et al. Complete paternal uniparental isodisomy for chromosome 1 revealed by mutation analyses of the TRKA (NTRK1) gene encoding a receptor tyrosine kinase for nerve growth factor in a patient with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Human Genetics**, v. 107, n. 3, p. 205–209, 2000b.

NAM, T. S. et al. Novel NTRK1 mutations associated with congenital insensitivity to pain with anhidrosis verified by functional studies. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 22, n. 2, p. 92–99, 1 jun. 2017.

OBERMEIER, A. et al. Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 31, p. 22963–22966, 1993.

OHTO, T. et al. The Evaluation of Autonomic Nervous Function in a Patient with Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type IV with Novel Mutations of the *TRKA* Gene. **Neuropediatrics**, v. 35, n. 5, p. 274–278, 1 out. 2004.

OMERBAŠIĆ, D. et al. Hypofunctional TrkA Accounts for the Absence of Pain Sensitization in the African Naked Mole-Rat. **Cell Reports**, v. 17, n. 3, p. 748–758, 11 out. 2016.

PEACH, M. et al. Solubilization of proteins: The importance of lysis buffer choice. In: **Western Blotting: Methods and Protocols**. [s.l.] Springer New York, 2015. p. 49–60.

PÉREZ-LÓPEZ, L. M. et al. Update Review and Clinical Presentation in Congenital Insensitivity to Pain and Anhidrosis. **Case Reports in Pediatrics**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

PLEUVRY, B. J.; LAURETTI, G. R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 71, n. 3, p. 313–324, 1996.

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain. **Pain**, v. Publish Ah, n. 00, 2020.

RAPP, M. et al. Severe complications in wound healing and fracture treatment in two brothers with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Journal of Pediatric Orthopaedics B**, v. 22, n. 1, p. 76–80, 1 jan. 2013.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1473, p. 1545–1564, 29 set. 2006.

RIZZUTI, M. et al. Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 76–85, 2015.

ROSE A. RUDD, NOAH ALESHIRE, JON E. ZIBBELL, R. M. G. Increases in Drug and Opioid Overdose Deaths — United States, 2000–2014. **MMWR Morb Mortal Wkly Report**, v. 64, p. 50–54, 2016.

ROSEMBERG, S.; NAGAHASHI MARIE, S. K.; KLIEMANN, S. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV). **Pediatric Neurology**, v. 11, n. 1, p. 50–56, 1 jul. 1994.

ROTHIER, A. et al. Genes for hereditary sensory and autonomic neuropathies: A genotype-phenotype correlation. **Brain**, v. 132, n. 10, p. 2699–2711, 1 out.

2009.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v. 49, p. 123–133, 1998.

SALEH-GOHARI, N.; MOHAMMADI-ANAIE, M. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis in an Iranian patient. **Basic and clinical neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 88–90, 2013.

SARASOLA, E. et al. A short in-frame deletion in NTRK1 tyrosine kinase domain caused by a novel splice site mutation in a patient with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **BMC Medical Genetics**, v. 12, p. 86, 27 jun. 2011.

SATO, Y. et al. Anti-apoptotic effect of nerve growth factor is lost in Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis (CIPA) B lymphocytes. **Journal of Clinical Immunology**, v. 24, n. 3, p. 302–308, maio 2004.

SAYYAHFAR, S. et al. Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis Presenting with Palmoplantar Keratoderma. **Pediatric Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 754–756, 1 nov. 2013.

SCHATZBERG, A. F. E KORN, M. . B. Beyond Depression: The Somatic/Affective Interface. **Medscape**, 2002.

SCOTT, D. E. et al. Small molecules, big targets: Drug discovery faces the protein-protein interaction challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 533–550, 29 jul. 2016.

SHAIKH, S. S. et al. A Comprehensive Functional Analysis of NTRK1 Missense Mutations Causing Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type IV (HSAN IV). **Human Mutation**, v. 38, n. 1, p. 55–63, 1 jan. 2017.

SHALIMAR, A. et al. Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis in a Malaysian Family: A Genetic Analysis. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 15, n. 3, p. 357–360, 4 dez. 2007.

SHIRAZI, E. et al. A Case of Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis Comorbid with Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Clinical Implications for Pathophysiology and Treatment. **Journal of Nervous and Mental Disease**, v.

206, n. 4, p. 296–299, 1 abr. 2018.

SMEYNE, R. J. et al. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. **Nature**, v. 368, n. 6468, p. 246–249, 1994.

SNIDER, W. D.; MCMAHON, S. B. Tackling pain at the source: New ideas about nociceptors. **Neuron**, v. 20, n. 4, p. 629–632, 1998.

SURIU, C. et al. Skoura - a genetic island for congenital insensitivity to pain and anhidrosis among Moroccan Jews, as determined by a novel mutation in the *NTRK1* gene. **Clinical Genetics**, v. 75, n. 3, p. 230–236, 1 mar. 2009.

SZTRIHA, L. et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Pediatric Neurology**, v. 25, n. 1, p. 63–66, 1 jul. 2001.

TANAKA, T. et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: a case with preserved itch sensation to histamine and partial pain sensation. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 4, p. 888–891, 1 abr. 2012.

TÜYSÜZ, B. et al. Novel NTRK1 mutations cause hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV: Demonstration of a founder mutation in the Turkish population. **Neurogenetics**, v. 9, n. 2, p. 119–125, maio 2008.

VERPOORTEN, N. et al. Novel frameshift and splice site mutations in the neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 gene (*NTRK1*) associated with hereditary sensory neuropathy type IV. **Neuromuscular Disorders**, v. 16, n. 1, p. 19–25, 1 jan. 2006.

WANG, Q.-L. et al. Phenotypes and Genotypes in Five Children with Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis. **Pediatric Neurology**, v. 61, p. 63–69, 1 ago. 2016.

WANG, Q. et al. Novel and novel de novo mutations in NTRK1 associated with congenital insensitivity to pain with anhidrosis: A case report. **Medicine (United States)**, v. 94, n. 19, 1 maio 2015.

WANG, W. BO et al. Identification of a novel mutation of the NTRK1 gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA). **Gene**, v. 679, p. 253–259, 30 dez. 2018.

WIECZOREK, S. et al. Expanded HSAN4 phenotype associated with two novel mutations in NTRK1. **Neuromuscular Disorders**, v. 18, n. 8, p. 681–684, 25 ago. 2008.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353–364, 2 ago. 2007.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765–1768, 9 jun. 2000.

XUE, X. M. et al. Congenital Loss of Permanent Teeth in a Patient With Congenital Insensitivity to Pain With Anhidrosis due to 2 Novel Mutations in the NTRK1 Gene. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 76, n. 12, p. 2582.e1-2582.e9, 1 dez. 2018.

YIŞ, U. et al. A novel NTRK1 mutation in a patient with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Acta Neurologica Belgica**, v. 115, n. 3, p. 509–511, 24 set. 2015.

YOTSUMOTO, S. et al. A novel point mutation affecting the tyrosine kinase domain of the TRKA gene in a family with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, n. 5, p. 810–814, 1 maio 1999.

ZHANG, H. et al. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKC ϵ : A novel pathway for heat hyperalgesia. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 44, p. 12067–12077, 31 out. 2007.

8. APÊNDICE

Apêndice 1: Banco de Dados das mutações de CIPA em NTRK1.

GT: Genótipo; **Cons:** Consanguíneo; **NI:** Não informado;

*Gêmeos;

+ Mutação em outro gene Paciente 33: PKLR c.1378G>A p.Val460Met

Paciente 118 e 119: TRPV4 c.2388C>T p.N796N; SCN10A c.1493G>A p.R498Q

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
1	1	F	Homo	Sim	c.329 C>A	p.Ala110Asp	c.329 C>A	p.Ala110Asp	Arábia Saudita	(ALTASSAN et al., 2017)
2	2	M	Homo	Sim	c.329 C>A	p.Ala110Asp	c.329 C>A	p.Ala110Asp	Arábia Saudita	
3	3	F	Homo	Sim	c.437 C>A	p.Ser146Ter	c.437 C>A	p.Ser146Ter	Omã	
4	4	F	N/I	Sim	-	-	c.526 C>T	p.Gln176Ter	Arábia Saudita	
5	5	F	N/I	Sim	-	-	c.1446 A>T	p.Lys482Ter	Arábia Saudita	
6	6	F	N/I	Sim	-	-	c.1444 A>T	p.Lys482Ter	Arábia Saudita	
7	7	M	N/I	Sim	-	-	c.1860_1861ins T	p.Pro621Serfs *12	Arábia Saudita	
8	8	F	Homo	Sim	c.1946 G>A	p.Arg649Gln	c.1946 G>A	p.Arg649Gln	Arábia Saudita	
9	9	M	Homo	Sim	c.2099 T>C	p.Leu700Pro	c.2099 T>C	p.Leu700Pro	Arábia Saudita	
10	1	M	Het	Não	c.7 C>T	p.Arg3Ter	c.851-33 T>A	Intron	China	
11	2	F	Het	Não	c.7 C>T	p.Arg3Ter	c.851-33 T>A	Intron	China	
12	SN 1	F	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.1805+3 A>T	Intron	Coreia	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
13	SN 2	F	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.1805+3 A>T	Intron	Coreia	(NAM et al., 2017)
14	SN 3	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.1805+3 A>T	Intron	Coreia	
15	SN 4	M	Het	Não	c.1786 G>A	p.Asp596Asn	c.2350_2363del	p.Leu784Serfs* 79	Coreia	
16	SN 5	M	Homo	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.851-33 T>A	Intron	Coreia	
17	SN 6	M	Het	Não	c.704C>G	p.Ser235Term	c.2020 G>T	p.Asp674Tyr	Coreia	
18	1	M	Het	Não	c.1802 T>G	p.Leu601Arg	c.1804 C>T	p.Arg602Term	China	
19	2	F	Homo	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.851-33 T>A	Intron	China	(WANG et al., 2016)
20	3	F	Homo	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.851-33 T>A	Intron	China	
21	4	M	Het	Não	c.963delG	p.Leu322Serfs* 148	c.851-33 T>A	Intron	China	
22	5	M	Het	Não	c.2074 C>T	p.Arg692Cys	c.2311 C>T	p.Arg771Cys	China	
23	1	M	Het	Não	c.44 G>A	p.Trp15Term	c.1945 C>T	p.Arg649Trp	China	
24	2	F	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.1415delG	p.Gly472Valfs* 75	China	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
25	1	M	Het	Não	c.1579 G>C	p.Ala527Pro	c.2141 G>A	p.Gly714Asp	China	(WANG et al., 2015)
26	1	M	Het	Sim	c.2057 G>A	p.Arg686His	c.1561 T>C	p.Phe521Leu	China	(GAO et al., 2013)
27	KI-109	M	Homo	Sim	c.526 C>T	p.Gln176Term	c.526 C>T	p.Gln176Term	Kuwait	(MARDY et al., 1999)
28	KI-110	M	Homo	N/I	c.526 C>T	p.Gln176Term	c.526 C>T	p.Gln176Term	Kuwait	
29	KI-111	F	Homo	Sim	c.1530_1531insGG GACATC	p.Val511Glyfs* 39	c.1530_1531insGG GACATC	p.Val511Glyfs *39	Kuwait	
30	KI-112	M	Homo	Não	c.391_392deITC	p.Ser131Leufs* 41	c.391_392deITC	p.Ser131Leufs *41	Italy	
31	KI-113	M	Homo	Sim	c.1522_1523delCG	p.Arg508Glyfs* 20	c.1522_1523delCG	p.Arg508Glyfs *20	Italy	
32	KI-114	F	Het	Não	c.2271 C>G	p.Tyr757Term	c.2281 C>T	p.Arg761Trp	Italy	
33+	KI-115	M	Homo	Não	c.1196-1 G>A	Intron	c.1196-1 G>A	Intron	USA	
34	KI-116	M	Homo	Não	c.2281 C>T	p.Arg761Trp	c.2281 C>T	p.Arg761Trp	Netherlands	
35	KI-25	F	Het	Não	c.717+1 G>C	Intron	c.2144 T>C	p.Val715Ala	Japan	
36	2	F	Het	Não	c.2170 G>A	p.Gly724Ser	c.2143 G>C	p.Val715Leu	Malaysia	(SHALIMAR et al., 2007)

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
37	3	F	Het	Não	c.2170 G>A	p.Gly724Ser	c.2143 G>C	p.Val715Leu	Malásia	(SHALIMAR et al., 2007)
38	4	M	Het	Não	c.2170 G>A	p.Gly724Ser	c.2143 G>C	p.Val715Leu	Malásia	
39	1	F	Het	N/I	c.287+2dupT	Intron	c.2155 G>A	p.Glu719Lys	Coreia	
40	2	F	Het	N/I	c.851-33 T>A	Intron	c.1218delC	p.Pro407Argfs*63	Coreia	(LEE et al., 2009)
41	3	M	Homo	N/I	c.851-33 T>A	Intron	c.851-33 T>A	Intron	Coreia	
42	4	M	Het	N/I	-	-	c.851-33 T>A	Intron	Coreia	
43	1	F	Het	Não	c.2344 C>T	p.Gln782Ter _m	c.1162 G>A	p.Glu388Lys	Suécia	(WIECZOREK et al., 2008)
44	1	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.2281 C>T	p.Arg761Trp	China	(FANG et al., 2017)
45	2	M	Het	N/I	c.1652delA	p.Glu551Glyfs*107	c.851-33 T>A	Intron	China	
46	KI-01	F	Homo	Sim	c.1660delC	p.Arg554Glyfs*104	c.1660delC	p.Arg554Glyfs*104	Japão	
47	KI-02	F	Homo	Sim	c.1729 G>C	p.Gly577Arg	c.1729 G>C	p.Gly577Arg	Japão	(INDO et al., 1996)
48	GM-08382	M	Homo	Sim	c.2046+3 A>C	Intron	c.2046+3 A>C	Intron	Equador	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
49	GM-08383	M	Homo	Sim	c.2046+3 A>C	Intron	c.2046+3 A>C	Intron	Equador	(INDO et al., 1996)
50	1	M	Het	Não	c.574+1 G>A	Intron	c.1810 C>T	p.His604Tyr	N/I	(BODZIOCH et al., 2001)
							c.1839 G>T	p.Gly613Val		
							c.1843 G>T	p.Glu615Term		
							c.1849 G>T	p.Val617Leu		
51	PN_1192.3	F	Homo	Sim	c.1877_1878ins A	p.Leu627Alafs*6	c.1877_1878insA	Holanda (Marrocos)	(VERPOO RTEN et al., 2006)	
52	CMT_179_1	M	Homo	Não	c.543delG	p.Leu183Trpfs*14	c.543delG	Bélgica		
53	CMT_197_1	M	Homo	Não	c.359+5 G>T	Intron	c.359+5 G>T	Bélgica		
54	CMT_366_1	F	Homo	Não	c.2281 C>T	p.Arg761Trp	c.2281 C>T	p.Arg761Trp	Holanda	
55	CMT-826.01	N/I	Homo	Não	c.2046+3 A>C	Intron	c.2046+3 A>C	Intron	Espanha	(ROTHIER et al., 2009)
56	CMT-841.01	F	Homo	Sim	c.1805 G>A	p.Arg602Gln	c.1805 G>A	p.Arg602Gln	Holanda (Marrocos)	
57	CMT-841.02	F	Homo	Sim	c.1805 G>A	p.Arg602Gln	c.1805 G>A	p.Arg602Gln	Holanda (Marrocos)	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
58	KI-03	N/I	Homo	Sim	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	Japão	(MIURA et al., 2000)
59	Ki-04	N/I	Het	N/I	c.1804 C>T	p.Arg602Term	c.1077 C>A	p.Tyr359Term	Japão	
60	KI-05	N/I	Homo	Sim	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	Japão	
61	KI-06	N/I	Homo	N/I	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	Japão	
62	KI-07	N/I	Het	N/I	c.490 G>T	p.Glu164Term	c.2002 G>T	p.Asp674Tyr	Japão	
63	KI-08	N/I	Het	N/I	c.851-33 T>A	Intron	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	Japão	
64	KI-09	N/I	Homo	N/I	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	Japão	
65	KI-10	N/I	Het	N/I	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.1754delT	p.Leu585Argfs* 73	Japão	
66	KI-11	N/I	Homo	Sim	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	Japão	
67	KI-12	N/I	Het	N/I	c.2002 G>T	p.Asp674Tyr	c.2327_2328insT	p.Val777Cysfs* 91	Japão	
68	KI-13	N/I	Het	N/I	c.391_392del TC	p.Ser131Leufs* 41	c.851-33 T>A	Intron	Japão	
69	KI-14	N/I	Het	N/I	c.1804 C>T	p.Arg602Term	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	Japão	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
70	KI-15	N/I	Het	N/I	c.1960 C>T	p.Arg654Cys	c.2002 G>T	p.Asp674Tyr	Japão	(MIURA et al., 2000a)
71	KI-16	N/I	Het	N/I	c.1960 C>T	p.Arg654Cys	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	Japão	
72	KI-17	N/I	Het	N/I	c.278 T>C	p.Leu93Pro	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	Japão	
73	KI-18	N/I	Het	N/I	c.851-33 T>A	Intron	c.2020 G>T	p.Asp674Tyr	Japão	
74	KI-19	N/I	Het	N/I	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.851-33 T>A	Intron	Japão	
75	KI-20	N/I	Homo	N/I	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	Japão	
76	KI-21	N/I	Het	N/I	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.1564 G>A	p.Gly522Arg	Japão	
77	KI-22	N/I	Homo	N/I	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	Japão	
78	KI-23	N/I	Het	N/I	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.851-33 T>A	Intron	Japão	
79	1	M	Homo	Sim	c.1076 A>G	p.Tyr359Cys	c.1076 A>G	p.Tyr359Cys	Paquistão	
80	19	M	Homo	Sim	c.526 C>T	p.Gln176Term	c.526 C>T	p.Gln176Term	Arábia Saudita	(DAVIDSON et al., 2012)
81	20	M	Homo	Sim	c.1069_1076dup pGGCAACTA	p.Tyr359Term	c.1069_1076dup GGCAACTA	p.Tyr359Term	Arábia Saudita	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
82	21	M	Homo	Sim	c.1960 C>T	p.Arg654Cys	c.1960 C>T	p.Arg654Cys	Arábia Saudita	(DAVIDS ON et al., 2012)
83	22	M	Homo	Não	c.1474 G>A	p.Glu492Lys	c.1474 G>A	p.Glu492Lys	Reino Unido	
84	23	M	Homo	Não	c.16 C>T	p.Arg6Trp	c.16 C>T	p.Arg6Trp	Reino Unido	
85	ER-CIPA-21691	M	Het	Não	c.2150 T>G	p.Leu717Arg	c.1672 C>T	p.Gln558Term	França	(HUEHNE et al., 2008)
86	ER-CIPA-16901	M	Homo	Não	c.1354+10_1633-1 del 1381	Intron	c.1354+10_1633-1 del 1381	Intron	Alemanha	
87	ER-CIPA-16407	F	Homo	Sim	c.1715 T>G	p.Ile572Ser	c.1715 T>G	p.Ile572Ser	Turquia	
88	ER-CIPA-21357	M	Homo	Sim	c.722_723insC	p.Gly242Trpfs* ₁₆	c.722_723insC	p.Gly242Trpfs* ₁₆	Turquia	
89	ER-CIPA-21357	F	Homo	Sim	c.722_723insC	p.Gly242Trpfs* ₁₆	c.722_723insC	p.Gly242Trpfs* ₁₆	Turquia	
90	ER-CIPA-20374	M	Het	Não	c.1355-125 G>A	Intron	-	-	Alemanha	
91	1	F	Het	N/I	c.1555 G>C	p.Gly519Arg	c.2303 C>T	p.Pro768Leu	Japão	(OHTO et al., 2004)
92	NG 48	F	Homo	Sim	c.496 G>T	p.Gly166Term	c.496 G>T	p.Gly166Term	Turquia	(TÜYSÜZ et al., 2008)
93	NG 46	M	Homo	Sim	c.2308 C>T	p.Gln770Term	c.2308 C>T	p.Gln770Term	Turquia	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
94	NG 51	F	Homo	Sim	c.353_359+2Tdel GTCCCTGT	Intron	c.353_359+2Tdel GTCCCTGT	Intron	Turquia	(TÜYSÜZ et al., 2008)
95	NG 72	F	Homo	Sim	c.1633-1 G>T	Intron	c.1633-1 G>T	Intron	Turquia	
96	NG 80	M	Homo	Sim	c.1633-1 G>T	Intron	c.1633-1 G>T	Intron	Turquia	
97	NG 73	M	Homo	Sim	c.1633-1 G>T	Intron	c.1633-1 G>T	Intron	Turquia	
98	IV-5	F	Homo	Sim	c.1759 A>G	p:Met587Val	c.1759 A>G	p:Met587Val	Japão	(YOTSUMOTO et al., 1999)
99	V-3	F	Homo	Sim	c.1759 A>G	p:Met587Val	c.1759 A>G	p:Met587Val	Japão	
100	V-1	F	Het	Sim	c.1660delC	p.Arg554Glyfs *104	c.1759 A>G	p:Met587Val	Japão	
101	V-1	M	Homo	Não	c.2339 G>C	p.Arg780Pro	c.2339 G>C	p.Arg780Pro	Itália	(GRECO et al., 1999)
102	1	M	Het	Não	c.1550 G>A	p.Gly517Glu	c.717+4 A>T	Intron	Caucasiano	(SHAIKH et al., 2017)
103	2	F	Het	Não	c.1565 G>A	p.Gly522Glu	c.2254 T>A	p.Cys752Ser	Caucasiano	
104	3	F	Homo	Sim	c.1970 T>C	p.Leu657Pro	c.1970 T>C	p.Leu657Pro	Paquistão	
105	4	M	Homo	Sim	c.1970 T>C	p.Leu657Pro	c.1970 T>C	p.Leu657Pro	Paquistão	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
106	5	M	Het	Não	c.2096 T>C	p.Ile699Thr	c.287+2dupT	Intron	Paquistão	(SHAIKH et al., 2017)
107	6	M	Homo	Sim	c.2288 G>C	p.Cys763Ser	c.2288 G>C	p.Cys763Ser	Turquia	
108	7	M	Homo	Sim	c.2311 C>T	p.Arg771Cys	c.2311 C>T	p.Arg771Cys	India	
109	KI-102	M	Homo	Sim	c.429-1 G>C	Intron	c.253 C>A	p.Arg85Ser	Emirados Árábés	(MARDY et al., 1999)
110	KI-103.1	F	Homo	Sim	c.200delA	p.Ans67Thrfs* ₂	c.200delA	p.Ans67Thrfs* ₂	Kuwait	
111	KI-103.2	F	Homo	Sim	c.200delA	p.Ans67Thrfs* ₂	c.200delA	p.Ans67Thrfs* ₂	Kuwait	
112	KI-104	M	Homo	Sim	c.1945 C>T	p.Arg649Trp	c.1945 C>T	p.Arg649Trp	Espanha	
113	KI-105.1	F	Homo	Sim	c.850+1 G>A	Intron	c.850+1 G>A	Intron	Kuwait	
114	KI-105.2	F	Homo	Sim	c.850+1 G>A	Intron	c.850+1 G>A	Intron	Kuwait	
115	KI-106.1 KI-106.2 KI-106.3	N/I	Homo	Sim	c.25 C>T c.1810 C>T c.1838 G>T	p.Gln9Term p.His604Tyr p.Gly613Val	c.25 C>T c.1810 C>T c.1838 G>T	p.Gln9Term p.His604Tyr p.Gly613Val	Itália	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
116	KI-107	F	Homo	Não	c.2140 G>A	p.Gly714Ser	c.2140 G>A	p.Gly714Ser	Itália	(MARDY et al., 1999)
117	KI-108	F	Het	Não	c.924_930delGCC GGCA	p.Gln308Hisfs*160	c.638 T>C	p.Leu213Pro	Canada	
118	1 ^{*/+}	M	Het	Não	c.1253_1254delTC	p.Ser419Glyfs*80	c.632 T>A	p.Val211Glu	China	(LI et al., 2018)
119	2 ^{*/+}	M	Het	Não	c.1253_1254delTC	p.Ser419Glyfs*80	c.632 T>A	p.Val211Glu	China	
120	1	F	Homo	N/I	c.851-33 T>A	Intron	c.851-33 T>A	Intron	China	(WANG et al., 2018)
121	2	F	Het	N/I	c.851-33 T>A	Intron	c.44 G>A	p.Trp15Term	China	
122	3	F	Het	N/I	c.287+2dupT	Intron	c.1549 G>C	p.Gly517Arg	China	
123	1	M	Het	Não	c.2074 C>T	p.Arg692Cys	c.2311 C>T	p.Arg771Cys	China	
124	2	M	Homo	Não	c.287+2dupT	Intron	c.287+2dupT	Intron	China	
125	3	M	Het	Não	c.850+1 G>A	Intron	c.287+2dupT	Intron	China	(GENG et al., 2018)
126	4	M	Het	Não	c.[851-798C>T; 851-794C>G]	Intron	c.851-33 T>A	Intron	China	
127	5	M	Het	Não	c.429- 374_717+485del 1403	Intron	c.2180 C>T	p.Pro727Leu	China	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
128	6	M	Het	Não	c.632 T>A	p.Val211Glu	c.1253_1254delTC	p.Ser419Glyfs* 80	China	(GENG et al., 2018)
129	7	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.1736del	p.Leu585Argfs* 73	China	
130	8	F	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.1768 G>A	p.Glu590Lys	China	
131	9	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.287+2dupT	Intron	China	
132	10	M	Homo	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.851-33 T>A	Intron	China	
133	11	M	Het	Não	c.287+2dupT	Intron	c.429-374_717+485del 1403	Intron	China	
134	12	M	Homo	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.851-33 T>A	Intron	China	
135	13	M	Het	Não	c.963delG	p.Leu322Serfs* 148	c.287+2dupT	Intron	China	
136	14	M	Het	Não	c.429-374_717+485del 1403	Intron	c.1802 T>G	p.Leu601Arg	China	
137	15	F	Het	Não	c.1768 G>A	p.Glu590Lys	c.1037 T>C	p.Leu346Pro	China	
138	16	M	Het	Não	c.2312 G>A	p.Arg771His	c.1806-2 A>G	Intron	China	
139	17	F	Homo	Não	c.[326 A>G; 575-19 G>A]	p.[Asp109Gly; intron]	c.[326 A>G; 575-19 G>A]	p.[Asp109Gly; intron]	China	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
140	18	F	Het	Não	c.850+1 G>A	Intron	c.1802 T>G	p.Leu601Arg	China	(GENG et al., 2018)
141	19	F	Het	Não	c.1945 C>T	p.Arg649Trp	c.575-19 G>A	intron	China	
142	20	M	Homo	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.851-33 T>A	Intron	China	
143	21	M	Homo	Não	c.429-374_717+485del1403	Intron	c.429-374_717+485del1403	Intron	China	
144	22	M	Het	Não	c.2188-11 G>A	Intron	c.[851-798C>T; 851-794C>G]	Intron	China	
145	23	M	Het	Não	c.1729 G>A	p.Gly577Ser	c.[851-798C>T; 851-794C>G]	Intron	China	
146	24	M	Homo	Não	c.287+2dupT	Intron	c.287+2dupT	Intron	China	
147	25	F	Het	Não	c.1166_1167delAC	p.Asp389Alafs*12	c.1754delT	p.Leu585Argfs*73	China	
148	26	M	Het	Não	c.1804 C>T	p.Arg602Term	c.851-33 T>A	Intron	China	
149	27	F	Het	Não	c.1903 G>C	p.Ala635Pro	c.851-33 T>A	Intron	China	
150	28	M	Het	Não	c.287+2dupT	Intron	c.575-19 G>A	intron	China	
151	29	F	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.1729_1739del	p.Gly577Argfs*10	China	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
152	30	M	Het	Não	c.1802 T>G	p.Leu601Arg	c.1804 C>T	p.Arg602Term	China	(GENG et al., 2018)
153	31	M	Het	Não	c.2180 C>T	p.Pro727Leu	c.851-33 T>A	Intron	China	
154	32	M	Het	Não	c.[851-798C>T; 851-794C>G]	Intron	c.575-19 G>A	Intron	China	
155	33	F	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.963delG	p.Leu322Serfs* 148	China	
156	34	M	Het	Não	c.2074 C>T	p.Arg692Cys	c.2170 G>A	p.Gly724Ser	China	
157	1	F	Homo	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.851-33 T>A	Intron	China	
158	1	M	Het	Não	c.2086_2112del	p.Pro696_Phe704 del	c.2308 C>T	p.Gln770Term	N/I	(AMIN et al., 2017)
159	1	M	Homo	Não	c.783_785delG AA	p.Lys261del	c.783_785delG AA	p.Lys261del	Arábia Saudita	(ALGAHT ANI et al., 2016)
160	2	M	Homo	Não	c.783_785delG AA	p.Lys261del	c.783_785delG AA	p.Lys261del	Arábia Saudita	
161	1	M	Homo	N/I	c.899_900 GC>AA	p.Cys300Term	c.899_900 GC>AA	p.Cys300Term	N/I	(FRANCO et al., 2016)
162	2	F	Homo	N/I	c.899_900 GC>AA	p.Cys300Term	c.899_900 GC>AA	p.Cys300Term	N/I	
163	1	M	Homo	Não	c.2206-12 C>A	Intron	c.2206-12 C>A	Intron	N/I	(KURTH et al., 2016)

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
164	1	F	Het	Não	c.2205+1 G>T	Intron	c.360-45 C>A	Intron	Espanha	(PÉREZ-LÓPEZ et al., 2015)
165	CMT-1038.01	M	Homo	Não	c.2206-11 G>A	Intron	c.2206-11 G>A	Intron	Turquia	(YIŞ et al., 2015)
166	1	F	Het	Não	-	-	c.727insT	p.Gly243Valfs*15	N/I	(LIU et al., 2015)
167	1*	M	Homo	Sim	c.1960 C>T	p.Arg654Cys	c.1960 C>T	p.Arg654Cys	Turquia	(GUVEN et al., 2014)
168	2*	M	Homo	Sim	c.1960 C>T	p.Arg654Cys	c.1960 C>T	p.Arg654Cys	Turquia	
169	1	M	Homo	Sim	c.574+1 G>A	Intron	c.574+1 G>A	Intron	Irã	(SAYYAHFAR et al., 2013)
170	1	M	Het	Não	c.2303 C>T	p.Pro768Leu	c.1660delC	p.Arg554Glyfs*1	Japão	(TANAKA et al., 2012)
171	1	F	Het	Não	c.2206-2 A>G	Intron	c.574+1 G>A	Intron	Espanha	(SARASOLA et al., 2011)
172	1	M	Homo	Não	c.2086_2087insC	p.Glu697Argfs*7	c.2086_2087insC	p.Glu697Argfs*7	Taiwan	(LIN et al., 2010)
173	1	F	Homo	Não	c.354_359+3delT CGCCTGTG	Intron	c.354_359+3delT CGCCTGTG	Intron	N/I	(KILIC et al., 2009)
174	I-I	F	Homo	Não	c.207_208delITG	p.Glu70Alafs*16	c.207_208delITG	p.Glu70Alafs*16	Israel (Marrocos)	(SURIU et al., 2009)
175	I-II	M	Homo	Não	c.207_208delITG	p.Glu70Alafs*16	c.207_208delITG	p.Glu70Alafs*16	Israel (Marrocos)	

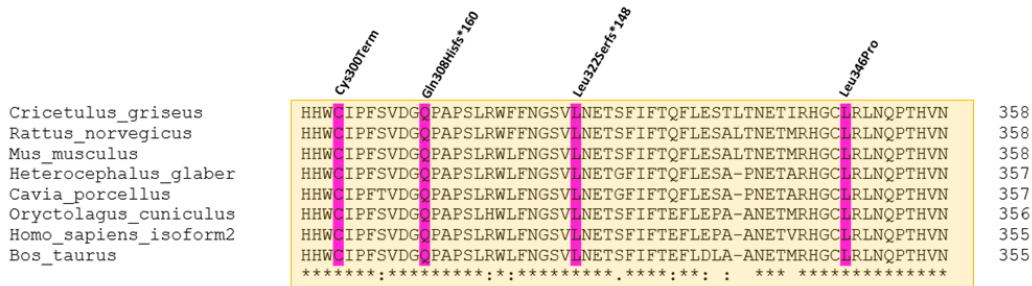
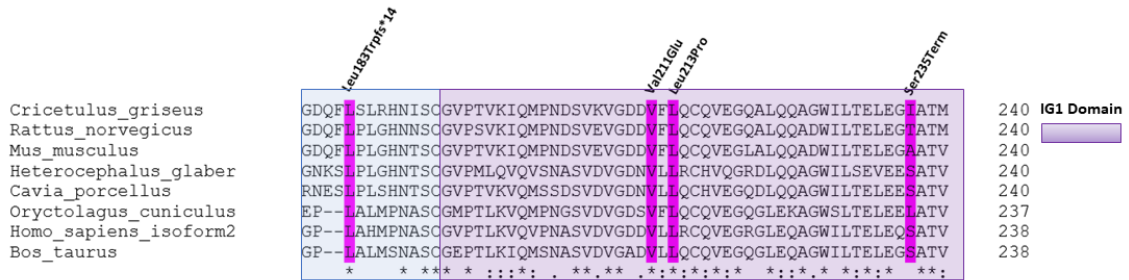
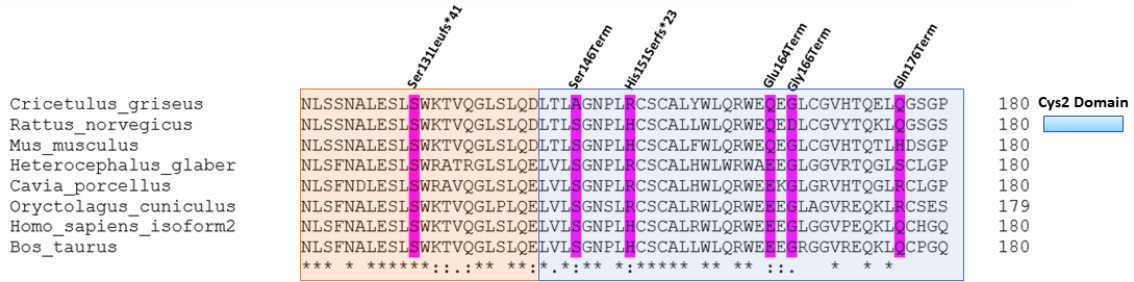
Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
176	3	F	Homo	N/I	c.1522_1523delC G	p.Arg508Glyfs* 20	c.1522_1523delC G	p.Arg508Glyfs *20	N/I	(BARONE et al., 2005)
177	1	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	-	-	Taiwan	(GUO et al., 2004)
178	2	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	-	-	Taiwan	
179	1	F	Het	N/I	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.851-33 T>A	Intron	Japão	(SATO et al., 2004)
180	1	M	Het	Não	c.638 T>C	p.Leu213Pro	c.1556delG	p. Gli519Alafs*28	Alemanha	(BONKOWSK Y et al., 2003)
181	1	M	Homo	Sim	c.428+1G>C	intron	c.428+1G>C	Intron	Emirados Arábes	(SZTRIHA et al., 2001)
182	K1-24	M	Homo	Não	c.1660delC	p.Arg554Glyfs* 104	c.1660delC	p.Arg554Glyfs *104	Japão	(MIURA et al., 2000b)
183	1	M	Het	Não	c.287+2dupT	Intron	c.1775 T>G	p.Met592Arg	China	
184	2.1	M	Homo	Não	c.429- 374_717+485del 1403	Intron	c.429- 374_717+485del 1403	Intron	China	
185	2.2	M	Homo	Não	c.429- 374_717+485del 1403	Intron	c.429- 374_717+485del 1403	Intron	China	(LI et al., 2019)
186	3	F	Het	Não	-	-	c.446_447insTCT G	p.His151Serfs* 23	China	
187	4	M	Het	Não	c.2074 C>T	p.Arg692Cys	-	-	China	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
188	5	M	Het	Não	c.2074 C>T	p.Arg692Cys	c.2311 C>T	p.Arg771Cys	China	(LI et al., 2019)
189	6	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	-	-	China	
190	7	M	Het	Não	-	-	c.287+2dupT	Intron	China	
191	8	M	Het	Não	-	-	c.851-33 T>A	Intron	China	
192	9	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.2141 G>A	p.Gly714Asp	China	
193	10	F	N/I	Não	-	-	-	-	China	
194	11	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	-	-	China	
195	12	F	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	-	-	China	
196	13	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.1754delT	p.Leu585Argfs*73	China	
197	14	F	Het	Não	-	-	c.851-33 T>A	Intron	China	
198	15	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.287+2dupT	Intron	China	
199	16-1	F	Homo	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.851-33 T>A	Intron	China	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
200	16-2	F	Homo	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.851-33 T>A	Intron	China	(LJ et al., 2019)
201	17	M	N/I	Não	-	-	-	-	China	
202	18	M	N/I	Não	-	-	-	-	China	
203	19	M	Het	Não	c.2312 G>A	p.Arg771His	c.1806-2 A>G	Intron	China	
204	20	M	N/I	Não	-	-	-	-	China	
205	21	M	N/I	Não	-	-	-	-	China	
206	22	M	Het	Não	-	-	c.851-33 T>A	Intron	China	
207	23	M	Het	Não	c.963delG	p.Leu322Serfs* 148	c.851-33 T>A	Intron	China	
208	24-1	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	-	-	China	
209	24-2	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	-	-	China	
210	25	M	Het	Não	c.1802 T>G	p.Leu601Arg	c.1804 C>T	p.Arg602Term	China	
211	26	F	Het	Não	c.1729_1739del	p.Gly577Argfs* 10	c.851-33 T>A	Intron	China	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
212	27	F	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.632 T>A	p.Val211Glu	China	(LI et al., 2019)
213	28-1	M	Het	Não	c.632 T>A	p.Val211Glu	c.1253_1254del TC	p.Ser419Glyfs *80	China	
214	28-2	M	Het	Não	c.632 T>A	p.Val211Glu	c.1253_1254del TC	p.Ser419Glyfs *80	China	
215	29	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.1805 G>A	p.Arg602Gln	China	
216	30-1	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.2084 C>T	p.Pro695Leu	China	
217	30-2	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.2084 C>T	p.Pro695Leu	China	
218	31	M	Het	Não	c.446_447ins TCTG	p.His151Serfs *23	c.287+2dupT	Intron	China	
219	32	F	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.287+2dupT	Intron	China	
220	33	F	Het	Não	c.446_447ins TCTG	p.His151Serfs *23	c.851-33 T>A	Intron	China	
221	34	M	Het	Não	c.851-33 T>A	Intron	c.287+2dupT	Intron	China	
222	35-1	M	Het	Não	-	-	c.851-33 T>A	Intron	China	
223	35-2	F	Het	Não	-	-	c.851-33 T>A	Intron	China	

Paciente	Paciente referência	Sexo	GT	Cons	Nucleotídeo paterno mutado	Proteína paterna mutada	Nucleotídeo materno mutado	Proteína materna mutada	País	Ref
224	1	M	Het	Não	c. 429-395_717+485de ins CCCAGG CTGGAGTGCAGTGGC	Intron	c.1802 T>G	p.Leu601Arg	China	(XUE et al., 2018)
225	1	M	Homo	Sim	c.574+1 G>A	Intron	c.574+1 G>A	Intron	N/I	(SHIRAZI et al., 2018)
226	1	M	Homo	Sim	c.2143 G>T	p.Val715Leu	c.2143 G>T	p.Val715Leu	N/I	(BAKRI et al., 2016)
227	1	M	Homo	Sim	c.1502-1delA	Intron	c.1502-1delA	Intron	Irã	(SALEH-GOHARI;
228	1	M	Homo	Sim	c.274dupG	p.Glu92Glyfs*8 1	c.274dupG	p.Glu92Glyfs*81	Curdos	(RAPP et al., 2013)
229	2	M	Homo	Sim	c.274dupG	p.Glu92Glyfs*8 1	c.274dupG	p.Glu92Glyfs*81	Curdos	
230	1	F	Homo	Não	c.1813 G>T	p.Gly605Term	c.1813 G>T	p.Gly605Term	Macedonia	(GUCEV et al., 2020)
231	1	M	Het	N/I	c.851-33 T>A	intron	c.2303 C>T	p.Pro768Leu	Coreia	(JUNG et al., 2013)
232	1	M	Homo	Sim	c.1860_1861insT	p.Pro621Serfs* 12	c.1860_1861insT	p.Pro621Serfs* 12	Jordania	(MASRI et al., 2020)
233	3	F	Homo	Sim	c.1860_1861insT	p.Pro621Serfs* 12	c.1860_1861insT	p.Pro621Serfs* 12	Jordania	
234	5	F	Homo	Sim	c.2170 G>A	p.Gly724Ser	c.2170 G>A	p.Gly724Ser	Jordania	
235	6	M	Homo	Sim	c.1860_1861insT	p.Pro621Serfs* 12	c.1860_1861insT	p.Pro621Serfs* 12	Jordania	
236	7	M	Homo	Sim	c.2143 G>T	p.Val715Leu	c.2143 G>T	p.Val715Leu	Jordania	



9. SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Beatriz Caroline de Moraes
São Roque – SP, 29/09/1995

EDUCAÇÃO

- Escola Técnica de São Roque (ETEC), São Roque - SP, 2010 a 2012.

Ensino Médio

- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP)
São Roque – SP, 2013 a 2016.

Licenciatura em Ciências Biológicas

- Universidade de São Paulo (USP), São Paulo – SP
Mestrado em Bioquímica, 2018 – em andamento.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- 1.IV Curso de Biologia Molecular: da teoria à prática. (Carga horária: 40h).
Fundação Faculdade de Medicina, FFM, Brasil. 2017
- 2.IV Curso em Oncologia Molecular. (Carga horária: 60h).
Fundação Faculdade de Medicina, FFM, Brasil. 2017
- 3.XI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular. (Carga horária: 80h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil. **2016**
- 4.Bioquímica dos venenos animais. (Carga horária: 8h).
Instituto Federal de São Paulo, IFSP, Brasil. **2015**
- 5.Identificação forense de espécies marinhas. (Carga horária: 6h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
2014
- 6.Métodos de Bioinformática Básica. (Carga horária: 3h).
Instituto Federal de São Paulo, IFSP, Brasil. **2014**
- 7.Estratégias didáticas para aprendizagem. (Carga horária: 3h).
Instituto Federal de São Paulo - campus São Roque, IFSP, Brasil. **2014**

- 8.Cultura de Células Humanas e Animais. (Carga horária: 3h).
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil. **2014**
- 9.Terapia Gênica: Conceitos e Desafios. (Carga horária: 6h).
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil. **2014**
- 10.Bases Genéticas do Câncer. (Carga horária: 4h).
Instituto Federal de São Paulo - campus São Roque, IFSP, Brasil. **2013**

OCUPAÇÃO

- 1.Bolsista de Mestrado, Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), 2018-2020

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Artigos completos

MORAES, B. C.; SAMPAIO, P. R. ; Souza, G.S ; CORREIA, L. B. .
Desenvolvimento de Croton floribundus Spreng (Euphorbiaceae) sob diferentes aspectos pedológicos. Scientia Vitae, v. 3, p. 1, 2015.

Capítulos de livros publicados

1. MORAES, B. C.; OLIVEIRA, B. C. D. ; Souza, G.S ; CORREIA, L. C. B. ; CASTRO, L. C.; SAMPAIO, P. R. ; CONDE, S.J. . Habitat Fragmentation Dynamics Based on Problem-Based Learning with Middle School Students at Sao Paulo Federal Institute in São Roque City. In: Mark Curcher. (Org.). The Implementation of Innovative Participatory Pedagogies by Brazilian Educators. 1ed.Tampere _ Finland: VET - Teachers for the Future®, 2018, v. 3, p. 119-134.

Resumos publicados em anais de congressos

1.MORAES, B. C.; Souza, G.S ; CONDE, S.J. . Indirect gene expression activation regulated by triiodothyronine in breast cancer cell lines. In: XVI Workshop de Genética, 2016, Botucatu. Anais do Workshop de Genética. Botucatu: Instituto de Biociências, 2016. v. 2. p. 22-22.

2.Souza, G.S ; **MORAES, B. C.** ; CONDE, S.J. . PI3K pathway activation by triiodothyronine and estradiol in breast cancer cell lines. In: Workshop de Genética, 2016, Botucatu. Anais do Workshop de Genética. Botucatu: Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, 2016. v. 2. p. 35-35.

3.MORAES, B. C.; GASPAR, P. D. ; OLIVEIRA, G. L. ; BRANCO, H. M. . Contaminação nos Locais de Uso Coletivo. In: Feira Tecnológica - Fetesp, 2012, São Paulo. FETESP - 2012, 2012.