

ESTUDO DO GENE NR3C1 NA DOENÇA DE GRAVES

Palavras-Chave: Doença de Graves, Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, Glicocorticoides.

Autores/as:

Mariana Alves da Silva¹, Myara Vicente dos Santos¹, Nathan Maciel da Conceição¹, Matheus Nascimento¹, Elisângela de Souza Teixeira¹, Izabela Fernanda Dal' Bó Cruz¹, Karina Colombera Peres¹, Natássia Elena Bufalo¹, Laura Sterian Ward¹.

1- Laboratório de Genética Molecular do Câncer – Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O sistema imunológico (SI) é o sistema de defesa do nosso corpo contra agentes estranhos, porém, pode ocorrer uma falha que faça o SI reconhecer autoantígenos como ameaças, originando uma doença autoimune (DAI), a qual pode afetar todos os sistemas do organismo humano, e em casos mais graves, levar à óbito. Existem muitas doenças autoimunes, dentre elas a doença de Graves (DG), na qual o SI ataca a glândula tireoide causando na maioria dos casos, um quadro de hipertireoidismo, quando há produção de hormônios tireoidianos, T3 e T4 (respectivamente, triiodotironina e tiroxina), em excesso (DELVES, 2019; FERNANDES et al., 2008; KITCHING, 2017; NEVES et al., 2008; TALBOT, 2011).

Dentre os muitos fatores que colaboram para o desenvolvimento de uma DAI, temos o estresse, que irá acarretar a liberação de hormônios de adrenalina, noradrenalina, glicocorticoides (GCs) e cortisol, os quais quando liberados em grandes quantidades causam alterações na imunidade, humor, produtividade e na qualidade de vida. Este está relacionado às doenças autoimunes porque está associado ao desbalanço do eixo *hipotálamo-pituitário-adrenal* (HPA), uma via neuroendócrina ativada em resposta ao estresse. Ela regula o SI por meio da liberação de GCs, mas se for ativada por longos períodos, ou ainda, muito raramente, pode aumentar as chances de se desenvolver uma DAI devido ao efeito imunossupressor dos GCs (BAUER et al., 2000; BAUER, 2002; GLASER JK, 1998; GLASER R, 1998).

Para regular este efeito, a proteína receptora de glicocorticoides (RGCs) é fundamental, todavia, uma variabilidade genética da sequência de DNA causada por um polimorfismo no gene *NR3C1* (receptor nuclear subfamília 3, grupo C, membro 1) expresso nessa proteína, pode influenciar na atividade regulatória dos GCs, através de alterações na estrutura ou nas funções da proteína, causando resistência aos glicocorticoides (GHIZZONI et al., 2011; ORLOVSKY, 2012; PANEK et al., 2012; ROCHA et al., 2007).

Essa resistência, por sua vez, é uma condição hereditária ou esporádica, afetando desde certos tecidos até todo organismo. A condição hereditária pode ser fruto da presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), ocorridos devido à troca indevida de aminoácidos em determinadas posições do DNA. Mas nem sempre essas trocas serão prejudiciais, e por isso é necessário analisá-las através de certos métodos, como a análise *in silico* (MONTEIRO, 2019).

O estudo de polimorfismos pode ser realizado através de técnicas de biologia molecular através da bioinformática (análise *in silico*). Utilizando a análise *in silico* podemos explorar as sequências do DNA através de softwares e ferramentas de algoritmos para analisar diversos aspectos relacionados às alterações nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos. Quanto às proteínas, podemos verificar se tais alterações têm potencial de impactar suas funções e/ou estruturas. (VERLI, 2014).

A partir do obtido com as análises computacionais é possível realizar a validação dos resultados através das técnicas experimentais de biologia molecular, como a genotipagem, baseando-se na identificação das alterações genéticas através da amplificação de sequências específicas do DNA utilizando a técnica Real-Time da PCR (Reação em cadeia da Polimerase em tempo real) (MARTINS et al., 2009).

Objetivamos estudar o gene *NR3C1* na doença de Graves, levando em conta os efeitos que SNPs podem causar na proteína receptora de glicocorticoides, como a resistência a GCs, muito presente no desenvolvimento de doenças autoimunes.

METODOLOGIA:

Casuística

Participaram do projeto 312 pacientes com DG (260 mulheres e 52 homens, com média de idade de 40 ± 11 anos), provenientes do Hospital do Servidor Público Estadual (HSPE-IAMSPE) e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Os casos foram pareados com 312 indivíduos controle (250 mulheres e 62 homens, com média de idade de 40 ± 11 anos) provenientes do Hemocentro da UNICAMP. O projeto foi aprovado pelos comitês de ética das instituições participantes.

Análise *in silico*

Para a realização da análise *in silico*, primeiro deve-se acessar o *dbSNP* presente na plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) que fornece os polimorfismos missenses presentes no gene *NR3C1*. Também recuperamos a sequência FASTA da proteína (CCQ43043.1) e todos os dados que foram exportados para o Excel.

Em seguida, utilizando como porta de entrada os “rs” recuperados na ferramenta *SIFT* (*Sorting Intolerant From Tolerant*) que fornece as previsões dos efeitos das trocas de aminoácidos presente na sequência de proteínas. Após predição, as variantes classificadas como deletérias no *SIFT*, foram analisadas nas plataformas *I-Mutant 2.0*, *PANTHER*, *PolyPhen-2*, *PredictSNP*, *PROVEAN*, *SNAP2* e *SNPs&GO*, que terão suas funções apresentadas a seguir:

- *I-Mutant 2.0*: Prevê, a partir da sequência FASTA e as mutações ocasionadas pelo SNP, o que um polimorfismo pode causar a instabilidade na estrutura da proteína, podendo ocasionar na perda de funções específicas;
- *PANTHER*: Utiliza da sequência FASTA e as mutações para realizar uma análise evolutiva de codificação de SNPs, por meio de uma medida do tempo em milhares de anos, que uma posição da proteína atual foi preservada. Quanto maior o tempo que a posição foi preservada, maiores são as chances de polimorfismo ser deletério;
- *PolyPhen-2* (Polymorphism Phenotyping v2): Prevê, por meio da sequência FASTA e as mutações, o possível impacto causado pela substituição de aminoácidos na estrutura ou na função de uma proteína humana;

- *PredictSNP*: Classifica o SNP, através da sequência FASTA e as mutações, de acordo com um consenso de outros 06 programas (*MAPP*, *PhD-SNP*, *PolyPhen-1*, *PolyPhen-2*, *SIFT* e *SNAP*), predizendo os efeitos da mutação causada pela substituição de nucleotídeos, ou aminoácidos, na função da proteína;
- *PROVEAN* (Protein Variation Effect Analyzer): Prevê se uma substituição de aminoácido tem um impacto na função biológica de uma proteína, usando como base a sequência FASTA da proteína e a mutação e deste modo a classifica como “deletérios”, ou seja, nocivos à saúde;
- *SNAP2*: Prevê, graças a sequência FASTA e as mutações, os efeitos causados pela variação da sequência, classificando os SNPs em dois grupos, o em que o SNP não causa nenhum efeito deletério, e o em que o SNP ocasiona um efeito deletério;
- *SNPs&GO*: Indica, por meio da sequência FASTA e as mutações, a probabilidade de as variações estarem associadas a doenças, portanto, predizendo se o SNP é neutro ou deletério, caso esteja associado a uma doença.

Análise dos polimorfismos

Para a identificação do perfil genético dos pacientes utilizamos a técnica TaqMan® SNP Genotyping (Applied Biosystems™) que é constituída por um par de primers, com uma sonda para cada alelo. Utilizando placas específicas para o equipamento 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems™, Foster City, EUA).

As sondas TaqMan, são formadas por dois corantes, o *reporter* (fluorescente) e o *quencher* (inibidor da fluorescência). Durante o processo, dentro do aparelho com temperatura controlada, o DNA sofre desnaturação a 94°C, fazendo com que a fita dupla do material genético se separe, dando origem a duas fitas simples que servem como moldes. Após isso, o aparelho muda a temperatura para 55-65°C, temperatura na qual a sonda se anela após um dos *primers* (curtos pedaços de DNA de fita simples, com cerca de 20 nucleotídeos), e é clivada enquanto a enzima Taq Polimerase faz o processo de extensão utilizando os *dNTPs* (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados), que ocorre a 75°C. Após essas etapas um ciclo de PCR é finalizado. O *quencher* é separado do *reporter*, que então pode emitir fluorescência sem ser inibido. Quanto mais ciclos da PCR ocorrem, mais cópias da região alvo são feitas, podendo gerar bilhões delas e conseqüentemente, maior é a emissão de fluorescência. Essa emissão é utilizada para exibir os resultados da PCR através do aparelho, que consegue ler essa fluorescência, emitindo os resultados por meio de um software.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Análise *in silico* e seleção dos SNPs

Utilizando as ferramentas computacionais, selecionamos SNPs sinônimos não codificantes no gene *NR3C1*. A princípio foram encontrados no gene *NR3C1*, registro de 539 SNPs do tipo missenses no banco de dados dbSNP, dos quais apenas 294 SNPs foram classificados na ferramenta SIFT como deletérios com a pontuação do índice de tolerância 0,00 na plataforma, ou seja, prejudiciais à saúde. No processo de análise, 231 eram repetidos, sobrando assim apenas 63 SNPs, estes então foram selecionados para análise nas demais ferramentas, porém 35 deles ocasionaram em erros em ambas as plataformas, deste modo, restando somente 24 SNPs, dos quais alguns apresentavam resultados que variam entre neutro e deletério de acordo com a

ferramenta, sendo classificados conforme alguns aspectos, como prejudicial, benigno, aumento ou redução de estabilidade da estrutura proteica.

Ao final, foram preditos como possíveis candidatos os SNPs, *rs104893909* (I559N), *rs104893911* (V571A) e *rs104893913* (R477H) ocasionados, respectivamente, pela troca de uma Isoleucina (I) por uma Asparagina (N) na posição 559, Valina (V) por Alanina (A) na posição 571 e Arginina (R) por Histidina (H) na posição 477.

Tais SNPs foram classificados como deletérios, com a estabilidade da estrutura da proteína sendo reduzida, e assim, gerando suscetibilidade a perda de uma de suas funções ou a impactos negativos sobre elas, podendo ocasionar alguma doença.

Além dos selecionados por análise *in silico*, selecionamos também o SNP rs6198 através de levantamento bibliográfico (VAN ROSSUM, 2011). Por se tratar de um SNP intrônico, não seria possível analisá-lo através das ferramentas utilizadas, haja visto que elas são destinadas para análise de polimorfismos exônicos apenas.

Após a seleção dos SNPs com base na análise *in silico* e levantamento bibliográfico, estes foram avaliados por PCR em tempo real.

Genotipagem

Os SNPs rs104893913, rs104893909 e rs104893911 apresentaram baixa frequência na população estudada com perfil idêntico em DG e controles. No entanto, as formas variantes de rs6198 foram mais raras nos pacientes com DG (23.52%) do que nos controles (31.61%) (Gráfico 01). A presença do polimorfismo rs6198 de *NR3C1* representa um fator de proteção para DG (OR 0,6463; IC95%: 0,4488-0,9218), mas não se correlacionou com outros fatores clínicos e evolutivos da doença.

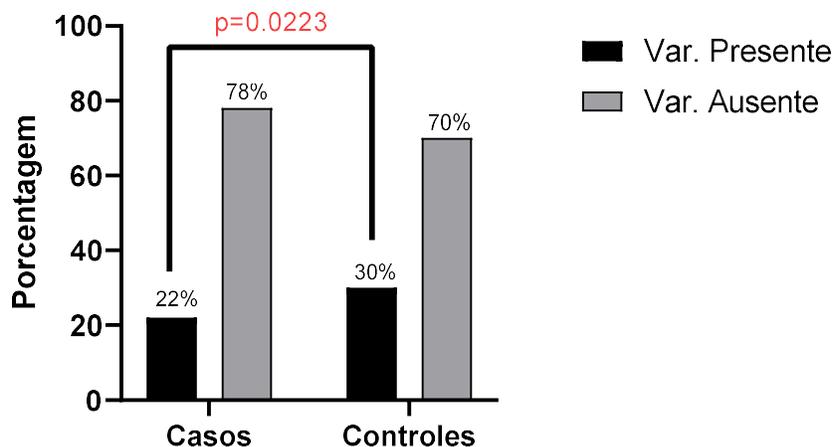


Gráfico 01 – Distribuição genotípica do SNP rs6198

CONCLUSÃO:

Apesar de os SNPs selecionados por análise *in silico* terem demonstrado resultados consideráveis nas previsões computacionais, não foi possível provar na genotipagem a tendência que demonstravam de serem deletérios, porém, sugerimos que o polimorfismo rs6198 do gene *NR3C1* possa ser fator importante na susceptibilidade para DG, mesmo que de forma protetiva.

BIBLIOGRAFIA

BAUER, Moisés Evandro. **Artigo Estresse**; Ciência Hoje; Rio Grande do Sul, 2002. Acesso em 18 de janeiro de 2021.

BAUER, M.E.; et al. **O estresse crônico em cuidadores de pacientes com demência está associado à redução da sensibilidade dos linfócitos aos glicocorticoides**. J Neuroimmunol - 2000 Feb 1;103(1):84-92. Pubmed. Acesso em 18 de fevereiro de 2021.

DELVES, Peter J. **Doenças autoimunes**. Manual MSD; University College London, 2019. Acesso em 16 de fevereiro.

FERNANDES, Ana Paula M.; et al. **Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças autoimunes endócrinas**. Scielo. Arq Bras Endocrinol Metab v. 47, no 5, São Paulo, out, 2003. Acesso em 15 de janeiro de 2021.

GHIZZONI, L.; et al. **Resistência aos glicocorticóides**. Pediatric Adrenal Diseases. Endocr Dev. Basel, Karger, 2011, vol 20, pp 127 – 136. Acesso em 13 de fevereiro de 2021.

GLASER, Janice K.; GLASER, Ronald. **Modulação imune associada ao estresse: relevância para infecções virais e síndrome da fadiga crônica**. American Journal of Medicine, v. 105, p. 35-42, set, 1998. Acesso em 23 de janeiro de 2021.

KITCHING, A. Richard. **Proteção dominante da autoimunidade ligada ao HLA por células T reguladoras específicas do antígeno**. Pubmed; 545: 243-247, maio, 2017. Acesso em 15 de janeiro de 2021.

MARTINS, L. Marina.; et al. **Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas**. São Paulo: Rev. Bras. Hematol. Hemoter. vol.31 no.4. 2009. Acesso 08 de agosto de 2021.

MONTEIRO, Laura Lisieux dos Santos. **Análise do efeito estrutural de variações de nucleotídeos únicos, causadores de resistência a glicocorticoides, presentes no gene codificador da proteína receptora de glicocorticoides (NR3C1)**. 2019. 113 f. Dissertação (Programa Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2019. Acesso em 23 de maio de 2021.

NEVES, Celestino; et al. **Artigo de revisão Doenças de Graves**, 2008. Acesso em 06 de janeiro.

ORLOVSKY, M. A.; **Polimorfismo alélico do receptor de glicocorticoide NR3C1 (GR): da biologia molecular às implicações clínicas**. Biopolímeros e células. 2012. Vol. 28. N 5. P. 338–351. Acesso em 22 de fevereiro de 2021.

PANEK, Michal; et al. **Efeito dos polimorfismos do gene do receptor de glicocorticoides nos fenótipos da asma**. Exp Ther Med. 5 (2): 572 – 580, nov, 2012. Acesso em 13 de fevereiro de 2021.

TALBOT, Jhimmy. **Estudo de associação entre polimorfismos genéticos no Receptor de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) e o desenvolvimento da Artrite Reumatóide**; Dissertação de mestrado da Usp; Teses.usp.br; Ribeirão Preto; 2011. Acesso em 06 de janeiro de 2021.

VAN ROSSUM, E.F.; VAN DEN AKKER, E.L. **Glucocorticoid resistance**. Endocrine development. 2011. Acesso em 20 de julho de 2021.

VERLI, Hugo. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. Acesso em 04 de julho de 2021.