



Análise *in silico* do impacto dos polimorfismos do gene *GPX1* em nódulos tireoidianos infectados pelo HSV-2

Palavras-Chave: Câncer de Tireoide, *GPX-1* e SNPs.

Autores/as:

Antonio Costa Ferreira Filho¹, Elisângela Souza Teixeira¹, Sarah de Lima Saraiva Leão¹, Israel de Oliveira Santana Torres¹, Laura Ward¹

1- Laboratório de Genética Molecular do Câncer da Universidade Estadual de Campinas.

INTRODUÇÃO:

A incidência do Câncer de Tireoide (CT) vem aumentando vertiginosamente no Brasil assim como em todo mundo. Embora a maior detecção seja responsável por parte deste aumento, fatores biológicos provavelmente também contribuam de forma significativa. O estresse oxidativo (OS) é oriundo de um desequilíbrio redox que favorece a oxidação de componentes celulares, produção de peróxidos e, por conseguinte, indução de dano celular que pode causar malignidade. A glutathione peroxidase 1 (GPX1) protege a tireoide do excesso de H₂O₂ e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene GPX-1 podem interferir na função proteica e influenciar no câncer.

Além disso, as infecções virais é outro fator estressor para o desenvolvimento cancerígeno de diversas patologias, um exemplo disso é a infecção pelo Herpes Simplex Vírus tipo 2 (HSV-2) e apesar de sua transmissão via sexual e o tropismo pelas regiões genital e orofacial, pode se difundir e atingir diversos órgãos, inclusive na tireoide. Quanto à tireoide, nela, foi observado que o HSV-2 se associa a metástases linfonodais e à promoção do estresse oxidativo. As infecções virais regulam estrategicamente os processos celulares do hospedeiro e subvertem as defesas antivirais das células, inclusive parte de seu ciclo de vida, propiciando a progressão de eventos celulares patológicos.

O presente estudo visa compreender melhor a possível relação entre a infecção viral e o papel dos polimorfismos do gene GPX1 na produção de desequilíbrio redox, e consequente contribuição para o desenvolvimento de CT.

METODOLOGIA:

Para a realização da análise in silico, a sequência FASTA da proteína GPX-1 foi extraída do UniProt. E os polimorfismos do tipo missenses foram recuperados do dbSNP presente no NCBI (National Center for Biotechnology Information). Todos os dados foram transferidos para Microsoft Excel®.

Para prever e analisar a patogenicidade da GPX1, ferramentas de bioinformática foram usadas, incluindo a ferramenta SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), a qual forneceu as previsões dos efeitos das trocas de aminoácidos presente na sequência de proteínas. A ferramenta SIFT, utilizando como base o grau de resíduos de aminoácidos conservados em comparação com as sequências montadas por meio de PSI-BLAST, prevê SNPs prejudiciais classificando com Score de 0 a 1, onde as pontuações $\leq 0,05$ são previstas como substituições de aminoácidos prejudiciais, enquanto pontuações $> 0,05$ são consideradas toleradas.

As variantes classificadas como deletérias no SIFT, foram analisadas na plataforma PredictSNP1.0, que funciona como o preditor do efeito SNP na função da proteína. Também utilizamos o PolyPhen 2.0 e o PROVEAN que visa prever as alterações nas funções biológicas da proteína devido a uma substituição de aminoácido.

Em seguida, as variantes foram analisadas em ferramentas que preveem o impacto na estabilidade de proteínas e seu potencial patogênico, (figura 1). Dentre elas, MUpro e I-Mutant1.0, ferramentas que avaliam o impacto da substituição de aminoácidos na estabilidade da proteína. Assim como a estabilidade, a energia livre do desdobramento da proteína é crítica para a estabilidade da proteína e ambas são fatores importantes que afetam a função e a atividade das moléculas biológicas. Portanto, o impacto da mutação na estabilidade da proteína poderia determinar com precisão os efeitos da mutação na energia livre. Tendo como parâmetro a diferença de energia livre de Gibbs ($\Delta\Delta G$) e a direção da mudança após a mutação de ponto único da proteína; pontuações positivas aumentam a estabilidade da proteína, enquanto uma pontuação negativa designa desestabilização.

As ferramentas SNPs&GO e PMUT também foram usadas para analisar a função proteica e prever a chance de doença relacionada aos SNPs. Por fim, visando estimar a probabilidade de um SNP causar impacto funcional na proteína, usamos o PANTHER, que calcula o período de preservação de um aminoácido na linhagem da proteína de interesse. Sendo que, um maior tempo de preservação indica uma maior probabilidade de impacto funcional.

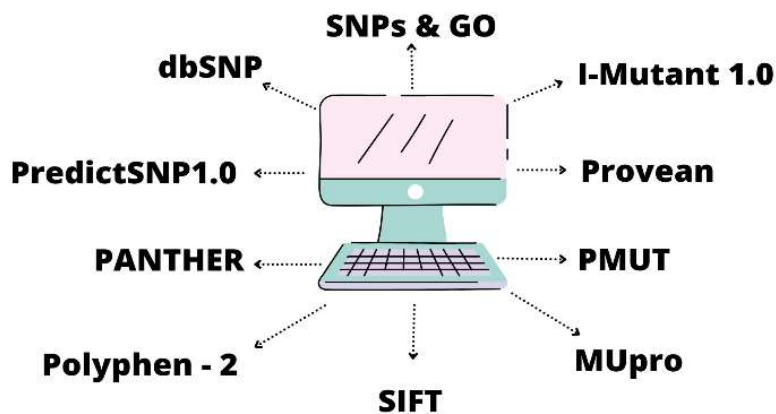


Figura 1: Representação das ferramentas utilizadas na análise *in silico*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Um total de 268 SNPs no gene *GPX1* foram recuperados do banco de dados dbSNP, dos quais sete (rs183107871, rs200311870, rs201944086, rs370228556, rs370714711, rs373838463 e rs377594183) foram considerados deletérios com a pontuação do índice de tolerância 0,00 na plataforma SIFT.

Usando Polyphen e o PROVEAN, os 7 SNPs (rs183107871, rs200311870, rs201944086, rs370228556, rs370714711, rs373838463 e rs377594183) foram considerados deletérios. A análise de estabilidade nestes SNPs foi testada por I-Mutant 1.0 e MUPro, que demonstraram que todos os SNPs diminuam a estabilidade da proteína.

O impacto funcional e a estimativa de risco desses polimorfismos na proteína de *GPX1* em causar doenças foram analisados usando o PMUT e SNP&GO. Dos 7 SNPs, 7 foram classificados como patológicos no PMUT. Já no SNP&GO 6 foram considerados patológicos. No PANTHER apenas o rs201944086 foi classificado como provavelmente danoso, os demais polimorfismos como neutros.

Esses 7 SNPs foram cumulativamente considerados como altamente deletérios, pois foram 100% acordados por SIFT, PredictSNP1.0, Provean Mupro, PolyPhen PMUT e como deletérios (Quadro 1 e Figura 2).

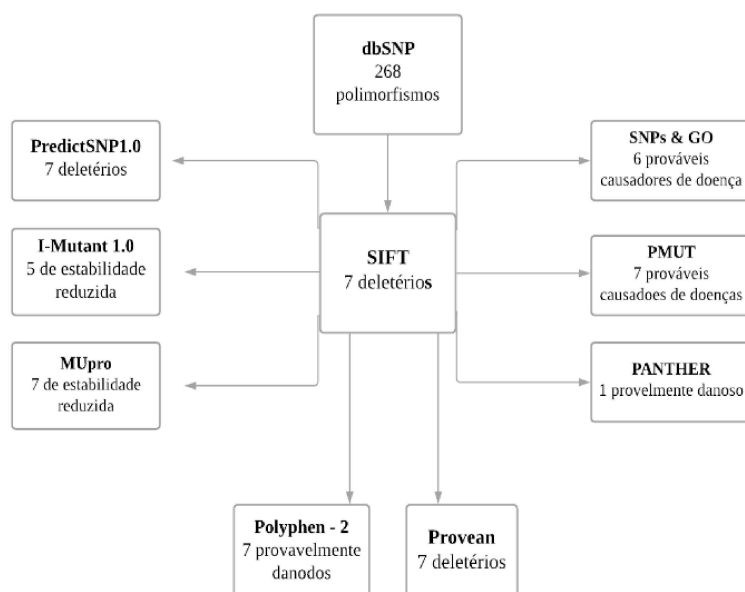


Figura 2: Representação quantitativa de resultados danosos apontado por cada ferramenta.

SNPs	SIFT	PredictSNP	Mupuro	PolyPhen-2	Provean	PMUT
rs183107871	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
rs200311870	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
rs201944086	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
rs370228556	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
rs370714711	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
rs373838463	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
rs377594183	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério

Quadro 1: Representação das ferramentas utilizadas na análise *in silico*.

Após confecção e análise dos resultados, foi feita uma revisão de literatura a respeito das variantes identificadas. Contudo, não encontramos estudos anteriores sobre o papel destes polimorfismos. Todavia, tem-se observado que polimorfismos no gene *GPX1* estão relacionados com maior propensão ao desenvolvimento de cânceres como: pulmão, mama e próstata.

Nossa análise, indica que polimorfismos na GPX1 possa comprometer a função da proteína GPX-1 e, por conseguinte, promover um desequilíbrio redox, o que favoreceria a instalação de um ambiente oxidante favorável a tumorigênese. Quanto à associação destes polimorfismos com infecção por HSV-2 e a evolução do câncer de tireoide, não houve até então estudo investigando esta relação específica. Entretanto, há estudos de genotipagem de genes envolvidos no equilíbrio oxidativo em pacientes infectados por vírus, os quais trazem resultados que apontam estes aspectos (polimórfico e viral). Dentre eles, polimorfismos na própria GPX1, e SOD2 conferem aumento no risco de linfoma Não-Hodgkin simultâneo à infecção pelo vírus da Hepatite C. Tais informações reforçam a possibilidade de alterações no gene GPX1, cuja expressão se relaciona ao estresse oxidativo, terem impacto em nódulos tireoidianos infectados por HSV2. Contudo a escassez de dados na literatura científica referentes tanto aos polimorfismos quanto a sua exploração na carcinogênese tireoidiana. Associados, eles apontam para possibilidade de análise futura destes aspectos, como um potencial estudo para avaliação do impacto de alterações polimórficas no microambiente do câncer de tireoide.

CONCLUSÕES:

A análise utilizando várias ferramentas in silico previu a influência de sete SNPs nos desvios funcionais e estruturais na proteína GPX1. As variantes podem ser consideradas para análise confirmatória em estudos práticos com nódulos tireoidianos e que poderiam servir como marcadores de risco para CT.

BIBLIOGRAFIA:

1. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-tireoide> Acessado em 04 de abril às 11:55.
2. Disponível em: <https://www.hospitalsiriolibanes.org.br/hospital/especialidades/centro-oncologia/tireoide/Paginas/diagnosticos.aspx> Acessado 7 de abril as 18:30
3. Stamatiou DP, Derdas SP, Zoras OL, Spandidos DA. Vírus da família do herpes e polioma no câncer de tireoide. *Oncol Lett*. Março de 2016; 11 (3): 1635-1644. doi: 10.3892/ol.2016.4144. Epub 2016, 26 de janeiro. PMID: 26998055; PMCID: PMC4774504.
4. Halliwell B. *Oxidative stress and cancer: have we moved forward? The Biochemical journal*. 2007;401(1):1-11.
5. Winther, KH, Rayman, MP, Bonnema, SJ et al. Selênio em distúrbios da tireóide - conhecimento essencial para médicos. *Nat Rev Endocrinol* 16, 165-176 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0311-6>
6. Chen J, Cao Q, Qin C, Shao P, Wu Y, Wang M, Zhang Z, Yin C. GPx-1 polymorphism (rs1050450) contributes to tumor susceptibility: evidence from meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Oct;137(10):1553-61. doi: 10.1007/s00432-011-1033-x. Epub 2011 Aug 13. PMID: 21842217.