



Análise *in sílico* do impacto dos polimorfismos do gene da *p22phox* em nódulos tireoidianos infectados pelo HSV-2

Palavras-Chave: polimorfismo, p22phox, nódulos tireoidianos

Autores/as:

Israel de Oliveira Santana Torres, Laboratório de Genética Molecular do Câncer, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de São Paulo (FCM-Unicamp)
Elisângela de Souza Teixeira, Laboratório de Genética Molecular do Câncer, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de São Paulo (FCM-Unicamp)
Antonio Costa Ferreira Filho, Laboratório de Genética Molecular do Câncer, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de São Paulo (FCM-Unicamp)
Sarah de Lima Saraiva Leão, Laboratório de Genética Molecular do Câncer, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de São Paulo (FCM-Unicamp)
Prof.^a Dr.^a Laura Sterian Ward, Laboratório de Genética Molecular do Câncer, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de São Paulo (FCM-Unicamp)

INTRODUÇÃO:

A incidência do Câncer de Tireoide (CT) vem aumentando consideravelmente no Brasil e no mundo. A ocorrência dessa malignidade é bem estabelecida com diversos fatores de riscos, os quais estão incluídos fatores genéticos, químicos, de radiação ionizante e fatores biológicos, como o estresse oxidativo (OS) (1, 2). O entendimento do metabolismo energético mitocondrial e a desregulação dos produtos desse metabolismo oxidativo é fundamental para compreensão da formação de neoplasias (3). Os estudos que relacionam as mitocôndrias ao câncer de tireoide mostram que o metabolismo energético e alterações adquiridas no DNA mitocondrial estão diretamente associados com a progressão do câncer de tireoide (4-6). No processo oxidativo as enzimas são essenciais para formação das ROS, entre as proteínas participantes desse processo temos a p22phox (7).

A p22phox (figura 1) é uma subunidade do complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX), complexo este que catalisa a reação de O₂ a O₂⁻, estando diretamente associado à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (8). A variação na estrutura ou função da p22phox tem o potencial de influenciar a atividade da NOX, podendo descompensar a geração de ROS em diversos tecidos, gerando um cenário intracelular patogênico ou até cancerígeno (8).

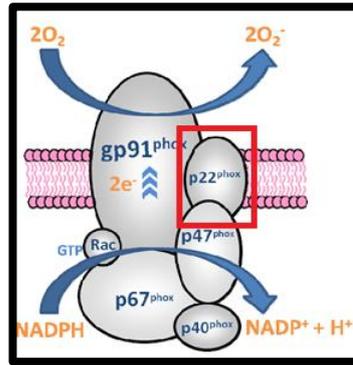


Figura: Complexo NOX. contendo a proteína p22phox.

Adaptado de MCCANN et al,2013.

Vários polimorfismos já foram descritos na região promotora e na região codificadora da p22pox, e alguns deles são capazes de influenciar a expressão gênica e o resultar em variação funcional significativa no nível de estresse oxidativo (9). Alguns polimorfismos do *CYBA* já foram associados com hipertensão arterial sistêmica (HAS), doença arterial coronariana, infarto do miocárdio e nefropatia diabética e não diabética (9,10).

Ante a ascensão do câncer de tireoide e a percepção do impacto do SNP do gene *CYBA* no organismo humano, o presente estudo teve como objetivo avaliar os polimorfismos do gene *CYBA*, por meio de uma análise in sílico, em nódulos tireoidianos.

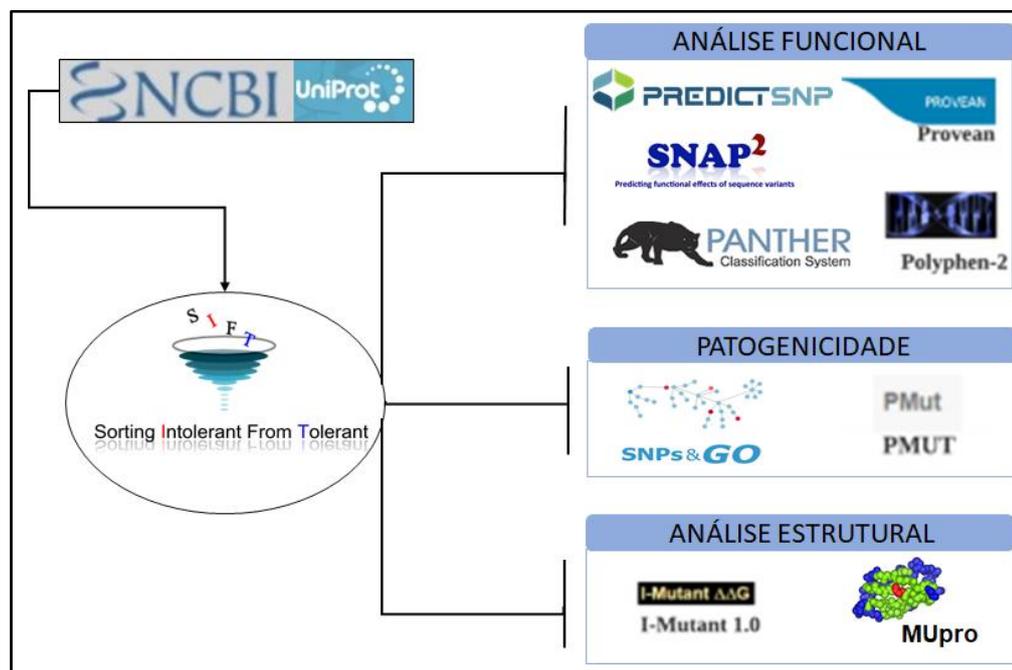
METODOLOGIA:

Os dados dos SNPs do gene *CYBA* foram recuperados do dsSNP do NCBI. A sequência de nucleotídeos no formato FASTA (identificador de entrada: P13498) foi obtida através do site UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

Os SNPs foram submetidos ao servidor SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), a qual forneceu as previsões dos efeitos das trocas de aminoácidos presentes na sequência de proteínas (11). As variantes classificadas como deletérias no SIFT foram submetidas às demais ferramentas para análise de efeito funcional, possível patogenicidade e estabilidade da proteína (12).

Para analisar a predição dos efeitos funcionais dos SNPs foram utilizadas as ferramentas e servidores: PredictSNP1.0, SNAP2, PolyPhen 2.0, PROVEANA e PANTHER (13, 17). Paralelamente, a fim de investigar possível patogenicidade, os polimorfismos foram submetidos às ferramentas SNP&GO e PMut (18, 19). Por fim, para a predição automática de alterações de estabilidade de proteínas em mutações de ponto único,

utilizou-se as ferramentas I-Mutant2.0 e MUpro (20, 21). A metodologia foi sintetizada no fluxograma 1.



Fluxograma 1: Metodologia da análise computacional dos SNPs do gene CYBA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Um total de 3878 SNPs foram recuperados do dsSNP, destes foram selecionados 314 SNPs missenses. Os SNPs missenses foram então submetidos à ferramenta SIFT e de acordo com a predição do SIFT, 297 SNPs foram classificados como tolerantes e 17 deletérios (tabela 1). As variantes com posições deletérias na função proteica foram mantidas e analisadas nas demais ferramentas.

SNPs	Mudança de AA*	Predição	Pontuação	SNPs	Mudança de AA*	Predição	Pontuação
rs8053867	E12D	Prejudicial	0.02	rs179363891	G25V	Prejudicial	0
rs28941476	G24R	Prejudicial	0.01	rs179363892	R90W	Prejudicial	0
rs104894510	H94R	Prejudicial	0.02	rs179363893	E53V	Prejudicial	0
rs104894513	R90Q	Prejudicial	0	rs179363894	A124V	Prejudicial	0.023
rs104894514	S118R	Prejudicial	0.002	rs201755210	S98L	Prejudicial	0.045
rs104894515	P156Q	Prejudicial	0	rs9940427	Q130S	Prejudicial	0.015
rs119103269	A125T	Prejudicial	0.006	rs11547384	Y41C	Prejudicial	0.001

rs149344911	V76M	Prejudicial	0.02	rs13306297	R158Q	Prejudicial	0.01
rs179363890	L52P	Prejudicial	0.001				

*AA: Aminoácido

Tabela 1: Predição de SNPs deletérios usando SIFT

As 17 variantes foram submetidas no PredictSNP1.0 que evidenciou um possível efeito deletério em 16 dos SNPs testados, onde apenas o rs9940427(Q130S), em contra partida, demonstrou um potencial neutro. Além disso Q130S também foi previsto como neutro ou benigno nas ferramentas SNAP2, PolyPhen 2.0, Provean e PANTHER.

No I-Mutant2.0 e MUpro, 15 variantes demonstraram associação com redução da estabilidade da proteína p22phox, entretanto, apenas rs179363893 e rs179363894 demonstraram um possível aumento na estabilidade. A estabilidade da proteína é o principal fator que afeta a função e a atividade das moléculas biológicas. A energia livre do desdobramento da proteína é crítica para a estabilidade da proteína. Portanto, o impacto da mutação na estabilidade da proteína poderia ser determinado com precisão estudando o efeito 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. Portanto, o impacto da mutação na estabilidade da proteína poderia ser determinado com precisão estudando o efeito da mutação na energia livre.

No SNPs&GO todos os SNPs foram preditos com um potencial patogênico, enquanto no PMUT quatro variantes não foram previstas com este potencial: rs8053867, rs149344911, rs201755210 e rs9940427. Desse modo, conclui-se que dos 17 SNPs selecionados, onze foram considerados com potencial altamente deletério em 100% das ferramentas.

Após confecção e análise dos resultados, foi feita uma revisão de literatura a respeito das variantes. Entretanto, não foram encontrados estudos avaliando esses polimorfismos. Todavia, tem-se estudo sobre outros SNPs no gene CYBA, sendo que o mais estudado é o rs4673, indicando que este polimorfismo está relacionado a uma maior propensão de estresse oxidativo (22), hipertensão arterial sistêmica (HAS), doença arterial coronariana, infarto do miocárdio, nefropatia diabética e não diabética e síndrome metabólica (9, 10).

Variantes genicas no gene CYBA podem representar um impacto na função e na estrutura da proteína, p22phox e, por conseguinte, promover um desequilíbrio redox (22), o que favorece a instalação de um ambiente oxidante favorável a tumorigênese (3), portanto, apontamos para a necessidade de estudos práticos para validação destes polimorfismos.

CONCLUSÕES:

A análise *in silico* sugeriu que 11 polimorfismos do gene CYBA estão associados a um potencial deletério devido a alterações estruturais e funcionais na proteína. Os SNPs podem ser validados em estudos de bancada, utilizando nódulos tireoidianos para comprovar sua possível utilidade como marcadores de risco para o câncer de tireoide.

AGRADECIMENTO:

Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) – Bolsa de Iniciação Científica (2020-2021).

Laboratório de Genética Molecular do Câncer (GEMOCA)

BIBLIOGRAFIA

1. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-tireoide> Acessado em 04 de abril às 11:55.
2. Ameziane El Hassani R, Buffet C, Leboulleux S, Dupuy C. **Oxidative stress in thyroid carcinomas: biological and clinical significance**. *Endocrine-related cancer*. 2019;26(3).
3. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(10):685-98.
4. Psarra AM, Sekeris CE. Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB life*. 2008;60(4):210-23.
5. J. Cheng, A. Randall, and P. Baldi. Prediction of Protein Stability Changes for Single Site Mutations Using Support Vector Machines. *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics*. In press, 2005.
6. In Silico Analysis of Coding/Noncoding SNPs of Human RETN Gene and Characterization of Their Impact on Resistin Stability and Structure. Volume 2019 |Article. ID 4951627 | <https://doi.org/10.1155/2019/4951627>
7. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*.2007;87(1):245-313.
8. Bedard K, Attar H, Bonnefont J, Jaquet V, Borel C, Plastre O, ET AL. Three common polymorphisms in the CYBA gene form a haplotype associated with decreased ROS generation. *Hum Mutat*. 2009;30(7):1123-33.
9. San José G, Fortuño A, Beloqui O, Díez J, Zalba G. NADPH oxidase CYBA polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)*.2008;114(3):173-82.85.
10. Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG. Association of the p22phox component of NAD(P)H oxidase with susceptibility to diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(11):3111-5.
11. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Kumar P, Henikoff S, Ng PC *Nat Protoc*. 2009; 4(7):1073-81
12. A likelihood ratio test for evolutionary rate shifts and functional divergence among proteins. *Knudsen B, Miyamoto MM Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001Kumar P, Henikoff S, Ng PC *Nat Protoc*. 2009; 4(7):1073-81
13. In Silico Analysis of Coding/Noncoding SNPs of Human RETN Gene and Characterization of Their Impact on Resistin Stability and Structure. Volume 2019 |Article. ID 4951627 | <https://doi.org/10.1155/2019/4951627>
14. Better prediction of functional effects for sequence variants. Hecht M, Bromberg Y, Rost B *BMC Genomics*. 2015
15. A method and server for predicting damaging missense mutations. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR *Nat Methods*. 2010
16. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP *PLoS One*. 2012
17. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012) Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels
18. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. *Hum Mutat*. 2009
19. WS-SNPs&GO: a web server for predicting the deleterious effect of human protein variants using functional annotation. Capriotti E, Calabrese R, Fariselli P, Martelli PL, Altman RB, Casadio R *BMC Genomics*. 2013
20. In Silico Analysis of Coding/Noncoding SNPs of Human RETN Gene and Characterization of Their Impact on Resistin Stability and Structure. Volume 2019 |Article. ID 4951627 | <https://doi.org/10.1155/2019/4951627>
21. J. Cheng, A. Randall, and P. Baldi. Prediction of Protein Stability Changes for Single Site Mutations Using Support Vector Machines. *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics*. In press, 2005.
22. Huizing MJ, Cavallaro G, Moonen RM, et al. Is the C242T Polymorphism of the CYBA gene linked with oxidative stress-as-associated complications of prematurity? *Antioxid Redox Signal*. 2017;27:1432-1438