



# Análise das consequências funcionais dos polimorfismos da proteína SOD1 na carcinogênese tireoidiana

**Palavras-Chave:** SOD1, câncer de tireoide, estresse oxidativo

**Autores:**

**Guilherme Acioli Landim, FCM – UNICAMP**

**Ms. Elisângela de Souza Teixeira (co-orientadora), FCM – UNICAMP**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laura Sterian Ward (orientadora), FCM – UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

Segundo estimativas do INCA, a incidência de câncer de tireoide (CT) vem aumentando vertiginosamente no Brasil e em todo o mundo (1). Sugere-se que, além de fatores físicos e diagnósticos, fatores biológicos também possam ser importantes nesse aumento (2–4). Nesse sentido, tem-se postulado um importante papel do estresse oxidativo (OS) no âmbito biológico, sendo um processo oriundo de um desequilíbrio redox nas células, favorecendo a oxidação de seus componentes e, por conseguinte, induzindo dano celular (5–7). Assim, como mecanismo de mitigação desses danos, a proteína superóxido dismutase Cu-Zn (SOD1) é uma importante enzima celular antioxidante que garante a conversão de íons superóxidos em peróxido de hidrogênio e em oxigênio (8).

De fato, é possível afirmar que altos níveis de OS e de danos oxidativos, como quebras de cadeias de DNA, são relacionados com a diminuição de função da SOD1, algo que pode ser causado por polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em seu gene. Dessa forma, existem evidências de que polimorfismos no gene *SOD1* estão relacionados a uma maior propensão ao desenvolvimento de tumores como: câncer de estômago, câncer colorretal e câncer de mama. Contudo, não há um consenso a respeito de sua relação com o câncer de tireoide (9–13). No presente estudo, objetiva-se identificar os polimorfismos deletérios do gene *SOD1* e analisar seus efeitos estruturais, conformacionais e funcionais na proteína subsequente utilizando ferramentas *in silico* de ponta, especialmente no contexto tireoidiano, com o intuito de identificar possíveis marcadores genéticos oncológicos.

## METODOLOGIA:

Neste estudo, realizamos uma análise *in silico* de 223 SNPs do tipo missense de SOD1, extraídos da base de dados dbSNP do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Nosso objetivo foi prever os efeitos de estabilidade e de patogenicidade desses SNPs na proteína SOD1. Para isso, inicialmente submetemos os SNPs à ferramenta SIFT-BLINK (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), que utiliza dados sobre a conservação evolutiva de diferentes regiões de um gene alvo para determinar aquelas que são importantes para a função da proteína codificada. Selecionamos apenas as mutações identificadas como deletérias por essa ferramenta (14,15).

Após isso, realizamos uma bateria de análises de confirmação desses SNPs com um conjunto de ferramentas que avaliam função, estabilidade e patogenicidade, como: PolyPhen-2.0 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SNPs&GO (<https://snps.biofold.org/snps-and-go/snps-and-go.html>), PMUT (<https://mmb.irbbarcelona.org/PMut/>), PhD-SNP (<https://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html>), PANTHER (<http://www.pantherdb.org/tools/csnpscore.do>) e SNAP2 (<https://roslab.org/services/snap2web/>) (16–22). Ao término dessas análises de confirmação, selecionamos os polimorfismos mais deletérios para uma análise mais aprofundada, a fim de melhor entender seus mecanismos de patogenicidade. Essas análises basearam-se primeiramente nas seguintes plataformas: I-Mutant2.0 ([https://folding.biofold.org/i-](https://folding.biofold.org/i-mutant/i-)

mutant2.0.html), MuPro (<https://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>), ConSurf ([https://consurf.tau.ac.il/consurf\\_index.php](https://consurf.tau.ac.il/consurf_index.php)) e InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (23–26).

Foram incluídas ferramentas adicionais com o propósito de reforçar a discussão e interpretação dos resultados previamente obtidos. Entre essas ferramentas, destacamos a HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>), que fornece informações sobre características morfofuncionais, tais como alterações no tamanho dos aminoácidos, mudanças na hidrofobicidade desses aminoácidos, bem como outras informações relevantes. A utilização do HOPE forneceu uma camada adicional de análise, confiante para uma compreensão mais abrangente dos efeitos potenciais dos SNPs investigados na proteína SOD1 (27,28). Também utilizamos Missense3D-DB (<http://missense3d.bc.ic.ac.uk:8080/>), que realiza previsões morfofuncionais nos SNPs com foco em padrões de dano estruturais, pois consiste em uma base de dados de interpretação de estruturas proteicas com um algoritmo preditivo-comparativo próprio denominado *Phyre* e, por fim, fizemos uso da plataforma NetPhos3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>), que é capaz de prever os sítios de fosforilação de proteínas utilizando redes neurais artificiais (29,30). Ademais, empregamos os recursos adicionais da PolymiRTS Database 3.0 (<https://compbio.uthsc.edu/miR SNP/>), para analisar os impactos funcionais dos polimorfismos em regiões genéticas alvo de miRNAs. Finalizando, também fizemos uso das plataformas de agrupamento de dados COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), que fornece associações experimentais de SNPs com neoplasias conhecidas, e das plataformas ClinVar e Litvar, que avaliam respectivamente os dados clínicos e de literatura das mutações (31–34).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Dos 223 SNPs inicialmente coletados, a ferramenta SIFT identificou que 51 SNPs (22,86%) são considerados deletérios. Esses resultados indicam que uma parcela significativa dos polimorfismos no gene SOD1 apresenta potencial patogênico iminente. Os 51 SNPs selecionados seguiram para o conjunto de análises de confirmação. Ao utilizar a ferramenta PolyPhen-2.0, 27 dos SNPs analisados foram classificados como deletérios (52,94%). Em SNPs&GO, 20 SNPs foram considerados deletérios (39,21%). Já na PMUT, 28 SNPs foram identificados como deletérios (54,91%). Em PANTHER, 27 SNPs foram considerados deletérios (52,94%). No SNAP-2, 23 SNPs foram classificados como deletérios (45,09%), enquanto no PhD-SNP, 27 SNPs foram considerados deletérios (52,94%). Dessa forma, podemos inferir que há uma concordância significativa entre os resultados preliminares do SIFT e os recebidos pelas ferramentas da bateria de confirmação. Em várias dessas ferramentas, mais de 50% dos SNPs foram classificados como deletérios, fortalecendo como prova do potencial patogênico desses polimorfismos no gene *SOD1*. Entretanto, notamos que apenas 16 SNPs (31,37%) foram considerados danificados por todas as ferramentas, o que ressalta sua importância e, portanto, esses foram selecionados para análises individuais mais aprofundadas. Os resultados são apresentados na tabela 1.

**Tabela 1:** Análise preditiva de variantes de *SOD1* utilizando um amplo conjunto de ferramentas *in silico*.

rsID	Mudança AA	SIFT		Polyphen-2.0		SNPs&GO		PMUT		PANTHER		SNAP-2		PhD-SNP	
		Resultado	Score	Resultado	Score	Resultado	Score	Resultado	Score	Resultado	Score	Resultado	Score	Resultado	Score
rs11556620	N87S	D	0,001	D	1,000	D	0,842	D	0,96	D	0,89	N	-4	D	0,886
rs11556621	P29Q	D	0,043	D	0,904	N	0,157	D	0,89	D	0,89	D	18	D	0,637
rs121912431	G38R	D	0	D	1,000	D	0,881	D	0,93	D	0,89	D	52	D	0,926
rs121912432	L39V	D	0,023	D	0,999	D	0,731	D	0,96	D	0,95	D	7	D	0,883
rs121912433	G42S	D	0,022	D	0,998	D	0,692	D	0,96	D	0,95	D	30	D	0,805
rs121912434	G42D	D	0,001	D	0,827	D	0,881	D	0,96	D	0,95	D	54	D	0,934
rs121912436	G86R	D	0,012	D	1,000	D	0,802	D	0,90	D	0,89	D	54	D	0,879
rs121912437	G94C	D	0,005	D	1,000	D	0,762	D	0,96	D	0,95	D	49	D	0,863
rs121912437	G94R	D	0,012	D	0,996	D	0,687	D	0,96	D	0,95	D	42	D	0,836
rs121912438	G94A	D	0,045	D	0,932	N	0,414	D	0,96	D	0,95	D	26	D	0,660
rs121912440	L107V	D	0,006	D	0,999	D	0,579	D	0,89	D	0,95	D	13	D	0,793
rs121912441	I114T	D	0,014	D	1,000	D	0,748	D	0,95	D	0,89	D	52	D	0,808
rs121912442	A5V	D	0,014	D	0,994	N	0,305	D	0,95	D	0,89	D	14	D	0,633
rs121912443	H47R	D	0	D	0,986	D	0,889	D	0,93	D	0,95	D	41	D	0,921

rs121912444	A5T	D	0,001	D	0,976	N	0,236	D	0,94	D	0,89	N	-28	D	0,654
<b>rs121912445</b>	<b>I105F</b>	<b>D</b>	<b>0,034</b>	<b>D</b>	<b>0,988</b>	<b>D</b>	<b>0,707</b>	<b>D</b>	<b>0,88</b>	<b>D</b>	<b>0,50</b>	<b>D</b>	<b>34</b>	<b>D</b>	<b>0,795</b>
rs121912447	A146T	D	0,009	D	1,000	D	0,756	D	0,95	D	0,95	N	-11	D	0,866
rs121912448	C7F	D	0	D	1,000	N	0,377	D	0,89	D	0,89	D	47	D	0,807
rs121912449	I152T	D	0,02	D	0,999	N	0,198	D	0,73	D	0,86	D	42	N	0,378
rs121912451	S135N	D	0	D	0,998	D	0,665	D	0,93	D	0,89	N	-5	D	0,786
rs121912452	L85V	D	0,001	D	0,649	D	0,628	D	0,94	D	0,95	N	-6	D	0,814
<b>rs121912453</b>	<b>G17S</b>	<b>D</b>	<b>0,001</b>	<b>D</b>	<b>0,991</b>	<b>D</b>	<b>0,669</b>	<b>D</b>	<b>0,92</b>	<b>D</b>	<b>0,95</b>	<b>D</b>	<b>36</b>	<b>D</b>	<b>0,893</b>
<b>rs121912455</b>	<b>G73S</b>	<b>D</b>	<b>0,01</b>	<b>D</b>	<b>0,659</b>	<b>D</b>	<b>0,763</b>	<b>D</b>	<b>0,96</b>	<b>D</b>	<b>0,89</b>	<b>D</b>	<b>20</b>	<b>D</b>	<b>0,800</b>
rs121912456	G13R	D	0,026	D	0,969	N	0,395	D	0,62	N	0,13	D	47	D	0,738
<b>rs121912457</b>	<b>F46C</b>	<b>D</b>	<b>0,014</b>	<b>D</b>	<b>1,000</b>	<b>D</b>	<b>0,895</b>	<b>D</b>	<b>0,94</b>	<b>D</b>	<b>0,89</b>	<b>D</b>	<b>42</b>	<b>D</b>	<b>0,950</b>
<b>rs121912458</b>	<b>H81R</b>	<b>D</b>	<b>0</b>	<b>D</b>	<b>1,000</b>	<b>D</b>	<b>0,884</b>	<b>D</b>	<b>0,90</b>	<b>D</b>	<b>0,95</b>	<b>D</b>	<b>21</b>	<b>D</b>	<b>0,884</b>
rs1804450	T40I	D	0,035	N	0,189	N	0,367	D	0,89	D	0,86	D	23	D	0,636
<b>rs74315452</b>	<b>I113T</b>	<b>D</b>	<b>0</b>	<b>D</b>	<b>1,000</b>	<b>D</b>	<b>0,789</b>	<b>D</b>	<b>0,93</b>	<b>D</b>	<b>0,89</b>	<b>D</b>	<b>42</b>	<b>D</b>	<b>0,869</b>

*D= Deletérios, N= Neutro.*

As variantes preditas como deletérias em todo o conjunto de ferramentas são **G38R, L39V, G42S, G42D, G86R, G94C, G94R, L107V, I114T, H47R, I105F, G17S, G73S, F46C, H81R e I113T**, destacadas na Tabela 1. Essas seguiram para as próximas análises, iniciando com a estabilidade termodinâmica.

Avaliando a estabilidade termodinâmica pelas ferramentas I-mutant2.0 e MuPro, foi observado que quase todos os 16 polimorfismos apresentaram uma redução de estabilidade da proteína em comparação com a sequência de referência. Essa tendência sugere um cenário de possível perda de função proteica decorrente desses polimorfismos, pois essas alterações estão intrinsecamente relacionadas com a capacidade funcional da proteína. No contexto específico de SOD1, a perda de estabilidade proteica pode levar à sua dobragem anômala, causando perda de função e até mesmo aquisição de recursos deletérios, com alterações em seu padrão normal de expressão. Esse cenário é observado em casos de esclerose lateral amiotrófica e outras doenças, incluindo algumas neoplasias, reforçando a importância de se compreender os efeitos dessas mudanças na estabilidade da proteína, pois elas desempenham um papel fundamental na sua função biológica e podem estar relacionados a doenças graves (35–37).

Com isso em mente, seguindo para as análises de conservação evolutiva dos sítios de mutação, de acordo com a ferramenta ConSurf, foram identificados 10 SNPs (**H47R, G17S, H81R, L39V, G42S, G42D, G86R, G94C, G94R e G73S**) em sítios altamente conservados, ou seja, com grau de conservação de *scores* 8 ou 9. Isso indica grande probabilidade de prejuízo funcional por esses polimorfismos, pois resíduos mais conservados tendem a ter maior relação com a função basal da proteína, permitindo inferências evolutivas entre famílias de proteínas (38). Esses 10 SNPs prosseguiram, dessa forma, para as próximas análises.

Para compreender em quais regiões da proteína ocorrem esses polimorfismos, foi realizada uma análise dos domínios e dos sítios de ligação de SOD1 por meio do software InterPro. Constatou-se que a proteína possui um único domínio funcional denominado "domínio cobre-zinco ligante, superóxido dismutase" (código IPR001424). Os sítios de ligação identificados abrangem os aminoácidos das posições 45 a 55 e das posições 139 a 150 (código IPR018152). Além disso, outras localizações de sítios de ligação foram confirmadas nas posições 47, 49, 64 e 121 para o cobre e nas posições 64, 72, 81 e 84 para o zinco. Dados similares foram observados em estudos experimentais e demonstraram anteriormente que as variantes H47R e H81R ocorrem em sítios ativos cruciais da proteína SOD1, o que sugere um alto potencial patogênico (39).

Quanto aos relatórios obtidos da plataforma HOPE, os dados mais significativos foram os *scores* MetaRNN e os padrões de dano morfofuncionais dos SNPs em análise. Os valores de MetaRNN são uma medida que fornece o potencial patogênico das mutações, variando de 0 a 1, em que valores mais próximos de 1 indicam patogenicidade maior (28). Em ordem decrescente de MetaRNN, os SNPs se organizam desta forma: L39V, H47R, H81R, G86R, G42D, G42S, G94R, G94C, G17S e G73S, com *scores* 0,99589360, 0,99518025, 0,99448350, 0,99413717, 0,99190295, 0,99113190, 0,99021560, 0,98917645, 0,97827770 e 0,91122700, respectivamente. Para as seguintes análises, foram escolhidas apenas as 5 mutações com maior *score* MetaRNN, ou seja, **L39V, H47R, H81R, G86R e G42D**, cujos padrões de dano na ferramenta HOPE foram estudados a fundo.

Dessa forma, as mutações H47R e H81R apresentaram os seguintes padrões de dano: excesso de tamanho no núcleo da proteína, problemas de envelhecimento por carga, prejuízo na interação com metal e alteração em pontes de hidrogênio. O excesso de tamanho no núcleo proteico é causado pela substituição de um aminoácido profundo por outro de dimensões moleculares maiores, causando compressão dos resíduos vizinhos e perda da estabilidade estrutural da proteína. Além disso, os problemas de envelhecimento por carga ocorrem pela mudança por um aminoácido com carga de um aminoácido enterrado que era previamente neutro. Essa carga irá repulsar as moléculas de mesma carga ao longo da proteína, prejudicando o dobramento adequado desta em uma estrutura terciária. Ainda nesse sentido, para haver prejuízo na interação da proteína com metais, deve haver mudança de carga ou do tamanho de um aminoácido que faça parte do sítio de ligação da SOD1, seja de Cobre ou de Zinco, seguindo a mesma lógica biofísica já explicada para os padrões anteriores. Por fim, para que haja alterações em pontes de hidrogênio, deve haver uma mudança no tamanho do aminoácido, impedindo assim o alinhamento correto dos átomos para que essas ligações intermoleculares ocorram.

Já as mutações G86R e G42R possuem o padrão de dano de perda de flexibilidade estrutural, que ocorre pela substituição de um resíduo de glicina (G) por outro inevitavelmente menos elástico, uma vez que G é o aminoácido mais flexível existente, ideal para curvas com ângulos de torção elevados. A mutação G86R também é caracterizada pelos padrões de problemas de envelhecimento por carga e excesso de tamanho no núcleo da proteína, explicados anteriormente. Enquanto isso, o polimorfismo L39V possui o padrão de dano de espaço vazio no núcleo da proteína, que ocorre pela substituição de um aminoácido profundo em sua estrutura terciária por outro de menor tamanho molecular, criando lacunas na parte interior da estrutura proteica. Finalmente, a mutação G42R ainda colabora com os padrões de dano de repulsão de resíduos por carga superficial e prejuízo de interação molecular superficial, causados por mudanças na carga e/ou no tamanho dos aminoácidos na superfície proteica.

Observe-se que todas as 5 candidatas apresentavam padrões de dano puramente estrutural, tais como espaço vazio no núcleo da proteína, excesso de tamanho no núcleo, problemas de envelhecimento por carga, alterações em pontes de hidrogênio, perda de flexibilidade estrutural e rejeição de resíduos por carga superficial. No entanto, apenas os SNPs examinados nos sítios ativos da proteína (H47R e H81R) causaram prejuízo em uma característica intrinsecamente relacionada com a função de SOD1, prejudicando a interação com metais, o que indica um grande potencial patogênico. Assim, as variantes **H47R** e **H81R** foram selecionadas para as análises finais. Por outro lado, a mutação **G86R** foi também selecionada, mas com o auxílio da ferramenta Missense3D-DB, que é focada na análise de padrões de dano estruturais. Nessa ferramenta, a variante apresentou 2 critérios de dano (troca de glicina enterrada e permuta entre resíduos enterrados/expostos), enquanto G42D obteve apenas 1 critério de dano e L39V foi classificada como neutra do ponto de vista estrutural.

Continuando com as análises finais das três variantes (H47R, H81R e G86R), o programa NetPhos3.1 não identificou nenhum desses SNPs permanecendo em posições consideradas sítios de fosforilação. Essa informação é significativa, uma vez que a fosforilação de SOD1 regula sua capacidade de captar espécies reativas de oxigênio, sua função na manutenção do citoesqueleto e sua ação na transcrição de genes (40). No entanto, na plataforma PolymiRTS Database 3.0, foi observado que a mutação H47R ocorre em um sítio de ligação para o miRNA hsa-mir-378. Esse achado é notável, pois esse miRNA está envolvido na regulação metabólica e na angiogênese, além de exercer ações anti-apoptóticas e anti-inflamatórias (41). Essa descoberta sugere um mecanismo possível que envolve a segurança em SOD1 e sua interação com o miRNA hsa-mir-378. Esses resultados ressaltam a importância de explorar possíveis mecanismos envolvidos na regulação de SOD1, incluindo possíveis reflexos com miRNAs, para uma compreensão mais abrangente de como essas variantes genéticas podem contribuir para o desenvolvimento de doenças, abrindo caminho para o pensamento futuro nessa área. De fato, a desregulação desse miRNA já foi encontrada em casos de leucemia promielocítica aguda, de adenocarcinoma gástrico e de câncer de próstata (42–44), o que demonstra a necessidade de mais investigações nesse assunto.

Quanto aos dados clínicos e experimentais já existentes a respeito dessas 3 mutações, avaliou-se a base de dados COSMIC, na qual a mutação H81R foi confirmada experimentalmente em uma amostra de carcinoma pulmonar de células escamosas, demonstrando que os SNPs em estudo podem estar de fato relacionados a neoplasias, como o CT (45). Avaliando as plataformas ClinVar e LitVar, observou-se que as 3 SNPs em questão foram majoritariamente relacionadas com esclerose lateral amiotrófica, mas não comumente com neoplasias, o que demonstra a necessidade de mais investigações dessas variantes.

Em síntese, esses resultados podem representar avanços no entendimento dos fatores genéticos em *SOD1* predisponentes a neoplasias, principalmente SNPs. Com efeito, os SNPs H47R, H81R e G86R podem estar relacionados a várias neoplasias, incluindo CTs, pois afetam desde a estrutura de SOD1 até a regulação da expressão gênica. Portanto, é

essencial que mais estudos sejam feitos para melhor desvendar os mecanismos pelos quais essas mutações influenciam na carcinogênese tireoidiana, e como elas podem ser empregadas como marcadores oncológicos.

## BIBLIOGRAFIA:

1. Estimativas 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Neoplasia maligna da glândula tireoide. Instituto Nacional do Câncer. 2020.
2. Ward LS. Thyroid tumors: Are we unveiling the puzzle? *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(5):E7–8.
3. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* [Internet]. 2009;19(11):1167–214. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19860577&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.1089/thy.2009.0110>
4. Marcello MA, Malandrino P, Almeida JFM, Martins MB, Cunha LL, Bufalo NE, et al. The influence of the environment on the development of thyroid tumors: A new appraisal [Internet]. Vol. 21, *Endocrine-Related Cancer*. 2014. p. T235–54. Available from: <http://erc.endocrinology-journals.org>
5. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *Biochem J*. 2007 Jan;401(1):1–11.
6. Zhang L, Qin Y, Chen M. Viral strategies for triggering and manipulating mitophagy. *Autophagy*. 2018;14(10):1665–73.
7. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012 Oct;12(10):685–98.
8. Eleutherio ECA, Silva Magalhães RS, de Araújo Brasil A, Monteiro Neto JR, de Holanda Paranhos L. SOD1, more than just an antioxidant. *Arch Biochem Biophys*. 2021;697(September 2020).
9. Figlioli G, Elisei R, Romei C, Melaiu O, Cipollini M, Bambi F, et al. A comprehensive meta-analysis of case-control association studies to evaluate polymorphisms associated with the risk of differentiated thyroid carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2016;25(4):700–13. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/>
10. El-Kheshen G, Moeini M, Saadat M. Susceptibility to ulcerative colitis and genetic polymorphisms of A251G SOD1 and C-262T CAT. *J Med Biochem* [Internet]. 2016;35(3):333–6. Available from: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pro-](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pro)
11. Lewandowski Ł, Urbanowicz I, Kepinska M, Milnerowicz H. Concentration/activity of superoxide dismutase isozymes and the pro-/antioxidative status, in context of type 2 diabetes and selected single nucleotide polymorphisms (genes: INS, SOD1, SOD2, SOD3) – Preliminary findings. *Biomed Pharmacother*. 2021;137(February).
12. Gallegos-Arreola MP, Ramírez-Hernández MA, Figueroa LE, Zúñiga-González GM, Puebla-Pérez AM. The rs2234694 and 50 bp insertion/deletion polymorphisms of the SOD1 gene are associated with breast cancer risk in a Mexican population. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(15):8017–27.
13. Han L, Lee SW, Yoon JH, Park YG, Choi YJ, Nam SW, et al. Association of SOD1 and SOD2 single nucleotide polymorphisms with susceptibility to gastric cancer in a Korean population. *Apmis*. 2013 Mar;121(3):246–56.
14. Knudsen B, Miyamoto MM. A likelihood ratio test for evolutionary rate shifts and functional divergence among proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec;98(25):14512–7.
15. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073–81.
16. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Vol. 7, *Nature methods*. 2010. p. 248–9.
17. Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat*. 2009 Aug;30(8):1237–44.
18. Capriotti E, Calabrese R, Fariselli P, Martelli PL, Altman RB, Casadio R. WS-SNPs&GO: a web server for predicting the deleterious effect of human protein variants using functional annotation. *BMC Genomics*. 2013;14 Suppl 3(Suppl 3):S6.
19. López-Ferrando V, Gazzo A, de la Cruz X, Orozco M, Gelpi JL. PMut: a web-based tool for the annotation of pathological variants on proteins, 2017 update. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jul;45(W1):W222–8.
20. Capriotti E, Calabrese R, Casadio R. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics*. 2006 Nov;22(22):2729–34.
21. Tang H, Thomas PD. PANTHER-PSEP: predicting disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation. *Bioinformatics*. 2016 Jul;32(14):2230–2.
22. Hecht M, Bromberg Y, Rost B. Better prediction of functional effects for sequence variants. *BMC Genomics*. 2015;16 Suppl 8(Suppl 8):S1.
23. Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. I-Mutant2.0: Predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jul;33(SUPPL. 2):W306–10.
24. Cheng J, Randall A, Baldi P. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins*. 2006 Mar;62(4):1125–32.
25. Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T, et al. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W344–50.
26. Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Birney E, Biswas M, et al. The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(1):37–40.
27. Venselaar H, de Beek TAH, Kuipers RKP, Hekkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2010;11(1):548. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/548>
28. Li C, Zhi D, Wang K, Liu X. MetaRNN: differentiating rare pathogenic and rare benign missense SNVs and InDels using deep learning. *Genome Med* [Internet]. 2022;14(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01120-z>
29. Khanna T, Hanna G, Sternberg MJE, David A. Missense3D-DB web catalogue: an atom-based analysis and repository of 4M human protein-coding genetic variants. *Hum Genet* [Internet]. 2021;140(5):805–12. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02246-z>
30. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol*. 1999 Dec;294(5):1351–62.
31. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan;46(D1):D1062–7.
32. Allot A, Wei C-H, Phan L, Hefferon T, Landrum M, Rehm HL, et al. Tracking genetic variants in the biomedical literature using LitVar 2.0. *Nat Genet* [Internet]. 2023;55(6):901–3. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01414-x>
33. Bhattacharya A, Ziebarth JD, Cui Y. PolymiRTS Database 3.0: Linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(D1):86–91.
34. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D941–7.
35. Papa L, Hahn M, Marsh EL, Evans BS, Germain D. SOD2 to SOD1 switch in breast cancer. *J Biol Chem* [Internet]. 2014;289(9):5412–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C113.526475>
36. Saccon RA, Buntun-Stasyshyn RKA, Fisher EMC, Fratta P. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain*. 2013 Aug;136(Pt 8):2342–58.
37. Papa L, Manfredi G, Germain D. SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy. *Genes Cancer*. 2014 Apr;5(1–2):15–21.
38. Catanzaro J, Caprez A, Swanson D, Powers R. Functional Evolution of Proteins. *Proteins*. 2019 Jun;87(6):492–501.
39. Trist BG, Hilton JB, Hare DJ, Crouch PJ, Double KL. Superoxide Dismutase 1 in Health and Disease: How a Frontline Antioxidant Becomes Neurotoxic. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2021 Apr;60(17):9215–46.
40. Banks CJ, Andersen JL. Mechanisms of SOD1 regulation by post-translational modifications. *Redox Biol*. 2019 Sep;26:101270.
41. Krist B, Florczyk U, Pietraszek-Gremplewicz K, Józkwicz A, Dulak J. The Role of miR-378a in Metabolism, Angiogenesis, and Muscle Biology. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:281756.
42. Valentino A, Calarco A, Di Salle A, Finicelli M, Crispi S, Calogero RA, et al. Deregulation of MicroRNAs mediated control of carnitine cycle in prostate cancer: molecular basis and pathophysiological consequences. *Oncogene*. 2017 Oct;36(43):6030–40.
43. Treece AL, Duncan DL, Tang W, Elmore S, Morgan DR, Dominguez RL, et al. Gastric adenocarcinoma microRNA profiles in fixed tissue and in plasma reveal cancer-associated and Epstein-Barr virus-related expression patterns. *Lab Invest*. 2016 Jun;96(6):661–71.
44. Kasashima K, Nakamura Y, Kozu T. Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Sep;322(2):403–10.
45. Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, Bernabé RR, et al. International network of cancer genome projects. *Nature*. 2010 Apr;464(7291):993–8.