

# AVALIAÇÃO DO IMPACTO POTENCIAL DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NO GENE BECN1 NO CÂNCER DE TIREOIDE

**Palavras-Chave:** Câncer de Tireoide, Análise in Sílico, Polimorfismos de Nucleotídeo Único

**Autores(as):**

VITOR EIKMEIER ROCHA, FCM – UNICAMP

LARISSA TEODORO RABI, GEMOCA - FCM – UNICAMP

ELISÂNGELA DE SOUZA TEIXEIRA (Coorientadora), GEMOCA - FCM – UNICAMP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. LAURA STERIAN WARD (Orientadora), GEMOCA - FCM - UNICAMP

---

## INTRODUÇÃO:

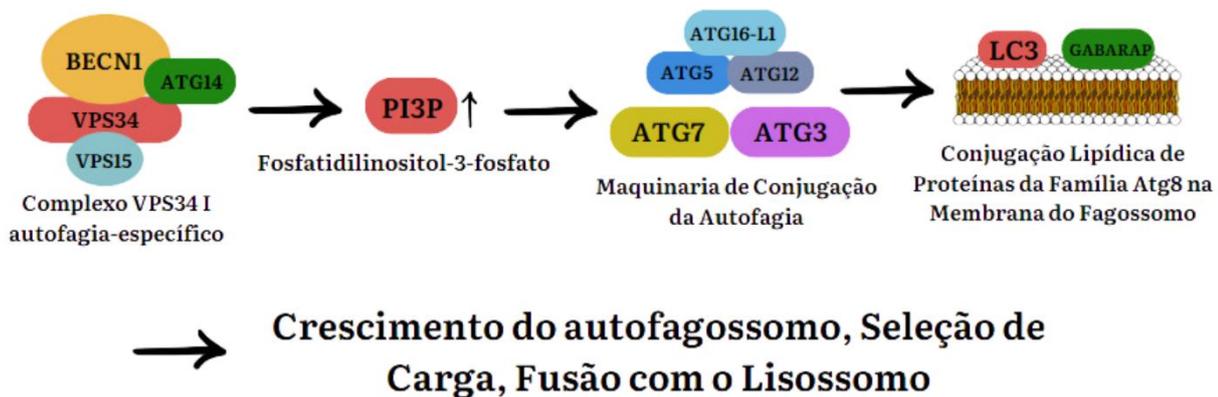
O câncer de tireoide, responsável por 3% de todos os casos de câncer, tem apresentado uma crescente incidência no Brasil e no mundo (1,2). No Brasil, entre 2023 e 2025, são esperados 16.660 novos casos da doença, o que o configura como um problema de saúde pública (3). A variante mais comum deste tumor é o carcinoma papilífero de tireoide (CPT), representando aproximadamente 90% de todos os casos. Sua etiologia é multifatorial e complexa, envolvendo tanto fatores ambientais, como a deficiência de iodo e a exposição à radiação ionizante na região da cabeça e do pescoço, quanto fatores genéticos e hereditários (4).

A autofagia, um processo de degradação seletiva de elementos intracelulares mediado por lisossomos, auxilia na manutenção da homeostase celular (5, 6). Evidências associam a autofagia ao câncer de tireoide de maneira ambígua.

A relação entre a autofagia e a carcinogênese é complexa, sendo capaz de agir tanto a favor quanto contra a formação de tumores: não só pode fornecer combustível para tumores já estabelecidos, como também pode degradar organelas danificadas e prevenir danos ao DNA (7).

O gene *BECN1*, presente no locus gênico 17q21 em humanos, tem um papel central na regulação da autofagia (8). A proteína beclin-1, codificada por este gene, compõe o complexo VPS34 autofagia-específico, que promove a síntese de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), levando à ativação de uma via intracelular que culmina na formação e expansão do autofagossomo uma estrutura esférica composta por uma bicamada fosfolipídica que engloba os conteúdos a serem digeridos (5,7). A Figura 1 detalha essa via, mostrando a forma como a formação de PI3P auxilia a formação e maturação do autofagossomo.

Mutações no gene *BECN1* foram relatadas em grande parte dos tumores de mama, ovário e próstata (40 a 75%), sugerindo que este gene possa ser um supressor tumoral (9). No entanto, no contexto do câncer de tireoide, os estudos são escassos e contraditórios. Evidências associam a autofagia ao câncer de tireoide de maneira ambígua. Um estudo de Yeşil e colaboradores sugeriu que beclin-1 pudesse ser eficaz como um marcador molecular eficaz de malignidade em tumores tireoidianos (10). Por outro lado, Huang e colaboradores (11) verificaram que a expressão de beclin-1 era menor em tecidos neoplásicos quando comparado aos tecidos adjacentes.



**Figura 1:** Mecanismo molecular básico do BECN1 na indução da autofagia

Este estudo visa analisar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene *BECN1*. Os SNPs são o tipo de mutação mais comum em humanos e sua identificação tem sido crucial para a compreensão dos processos oncogênicos e para a criação de marcadores de suscetibilidade, diagnóstico, prognóstico e acompanhamento de tumores, incluindo os de tireoide (12).

A identificação de polimorfismos de interesse foi realizada utilizando recursos de análise molecular *in silico*, disponíveis online e gratuitamente. Esses softwares preveem com alta precisão o impacto de polimorfismos na funcionalidade e estabilidade das proteínas mutadas, com o auxílio de algoritmos de aprendizado de máquina.

## METODOLOGIA:

O dbSNP do NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi consultado para obter informações sobre SNPs do tipo missense. O servidor UniProt (disponível em <https://www.uniprot.org/>) foi acessado para recuperar a sequência FASTA da proteína Beclin-1.

A ferramenta SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) foi utilizada para prever o efeito de SNPs na função de proteínas e auxiliar na organização dos SNPs (13).

Outras ferramentas foram utilizadas para análise funcional, como PredictSNP (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp/>) (14), PolyPhen 2.0 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (15), PANTHER (<https://pantherdb.org/>) (16). SNPs&GO (<https://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps->

and-go/) (17,18 e PhD-SNP (<https://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html>), todas previram o efeito dos SNPs na função de proteínas (19).

A estabilidade das proteínas foi avaliada utilizando ferramentas de aprendizado de máquina. A ferramenta I-Mutant 2.0 (<https://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>) foi empregada para prever mudanças na estabilidade de proteínas após mutações em um único local, com base em redes neurais. (20). MUpro (<https://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>), também baseada em métodos de aprendizado de máquina, previu alterações tridimensionais e de estabilidade em proteínas causadas por mutações (21). A ferramenta iStable (<http://predictor.nchu.edu.tw/istable/>) foi utilizada para analisar a sequência FASTA da proteína e prever as mudanças na estabilidade (22).

A HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>) foi empregada para analisar o impacto de mutações na função proteica, utilizando dados estruturais e evolutivos. Esta ferramenta fornece dados valiosos sobre a origem molecular do aspecto deletério de alguns SNPs, levando em consideração dados como a diferença de tamanho e polaridade entre os aminoácidos nativo e mutante, além das possíveis consequências dessas modificações para as estruturas secundária, terciária e quaternária da proteína (23). Os resultados das análises foram exportados para o software Microsoft Excel para análise descritiva dos resultados.

---

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

No dbSNP, foram identificados 6090 SNPs no gene BECN1 humano, dos quais 312 (5,1%) são SNPs de codificação não sinônimos (nsSNPs). Esses 312 nsSNPs foram selecionados para analisar os efeitos potenciais de suas mudanças estruturais e funcionais na proteína codificada pelo gene. No SIFT, apenas 28 nsSNPs (9,0%) foram identificados como existentes. Em seguida, foi realizada uma análise manual desses 28 rsIDs no dbSNP. Como resultado, mais 7 nsSNPs foram adicionados à lista de variantes, totalizando 35 nsSNPs incluídos na análise.

No PredictSNP, dos 35 nsSNPs, apenas 6 foram preditos como altamente deletérios no consenso das ferramentas, sendo eles: rs141389235 (R205P), rs143622099 (L166V), rs200971735 (A306S), rs370094164 (Y338C), rs371577008 (L144F) e rs368727081 (R329L).

Com base nesses resultados, focamos nossas análises subsequentes em 6 nsSNPs. No PANTHER, todas as variantes foram consideradas potencialmente prejudiciais, com impacto nos principais domínios conservados da proteína.

I-Mutant 2.0 e MUpro previram que todas as substituições são potencialmente deletérias e reduzem a estabilidade da proteína. O iStable também demonstrou que todas as seis variantes foram classificadas como deletérias, com um score superior a 0,50.

O relatório HOPE demonstrou que os resíduos mutantes são menores que os resíduos do tipo selvagem. Essa diferença de tamanho pode resultar em cavidades no núcleo da proteína, levando a interações hidrofóbicas e possíveis mudanças na carga na superfície da proteína. Além disso, a

ferramenta classificou as variantes rs200971735 (A306S), rs370094164 (Y338C), rs371577008 (L144F) e rs368727081 (R329L) como altamente patogênicas, com alta probabilidade de causarem alterações na proteína e estarem possivelmente associadas a condições clínicas.

Na tabela 1, apresentamos os resultados das análises no conjunto de ferramentas. Em destaque, estão as variantes classificadas como deletérias em todas as ferramentas.

**Tabela 1:** resultados das Análises in silico para o gene *BECN1*. Utilizando ferramentas de bioinformática de livre acesso.

ID	AA	PredictSNP	I-		MuPRO	iStable		SNPS&GO		PhD-SNP		PANTHER		HOPE	
			Mutant	RI		DDelta G	Conf Score	RI	RI	RI	RI	Pdel	MetaRNN		
rs138937709	E220Q	N	↓	1	↓	-1,30	↓	-0,64	N	10	N	8	D	0,57	0,20
rs138937709	E220K	N	↓	6	↓	-1,59	↓	-0,44	N	9	N	8	D	0,57	0,01
rs141389235	R205H	N	↓	9	↓	-1,33	↓	-0,40	N	9	N	7	D	0,85	0,18
rs141389235	R205L	N	↓	7	↓	-0,56	↑	0,50	N	9	N	7	D	0,85	0,61
rs141389235	R205P	D	↓	7	↓	-1,35	↓	-0,23	N	5	N	1	D	0,85	0,52
rs143622099	L166V	D	↓	8	↓	-1,07	↓	1,00	N	9	D	1	D	0,89	0,56
rs144217377	Q23L	N	↑	2	↓	-0,06	↑	0,75	N	7	N	4	D	0,85	0,37
rs147205679	R164C	N	↑	0	↓	-0,99	↓	-0,74	N	9	N	4	D	0,57	0,13
rs149225760	Q326H	N	↓	8	↓	-0,95	↓	-0,17	N	9	D	1	D	0,57	0,62
rs200971735	A306S	D	↓	9	↓	-1,43	↓	1,00	D	3	D	8	D	0,89	0,96
rs201863805	R74C	N	↓	3	↓	-0,27	↓	-0,18	N	5	N	2	D	0,57	0,11
rs34128114	Q258H	N	↓	5	↓	-1,17	↓	-0,41	N	9	N	5	D	0,85	0,76
rs367567072	R164H	N	↓	7	↓	-1,15	↓	-0,27	N	10	N	7	D	0,57	0,26
rs370094164	Y338C	D	↓	2	↓	-1,22	↓	-0,39	D	0	D	4	D	0,85	0,87
rs371577008	L144F	D	↓	4	↓	-1,29	↓	-1,00	N	8	N	4	D	0,85	0,86
rs376420962	D223G	N	↑	3	↓	-1,27	↓	-0,34	N	9	N	7	D	0,5	0,33
rs377301305	L148V	N	↓	5	↓	-1,35	↓	-1,00	N	9	N	4	D	0,78	0,67
rs143018406	R255C	N	↓	1	↓	-0,89	↓	-0,89	N	8	N	4	D	0,74	0,47
rs143018406	R255G	N	↓	7	↓	-1,74	↓	-1,00	N	9	N	7	D	0,74	0,77
rs143018406	R255S	N	↓	8	↓	-1,30	↓	-1,00	N	9	N	8	D	0,74	0,62
rs148197780	K248R	N	↓	1	↓	-0,43	↓	-0,64	N	10	N	8	D	0,74	0,16
rs148197780	K248T	N	↓	4	↓	-0,96	↓	-1,00	N	9	N	7	D	0,74	0,60
rs199562786	F69L	N	↓	3	↓	-0,36	↑	0,27	N	9	N	6	D	0,85	0,14
rs199603878	Q75H	N	↓	8	↓	-1,68	↓	-1,00	N	8	N	5	D	0,74	0,29
rs200813134	R74H	N	↓	8	↓	-0,71	↓	-0,16	N	8	N	3	D	0,57	0,09
rs201722661	E213K	N	↓	8	↓	-1,80	↓	-1,00	N	9	N	9	D	0,57	0,12
rs201722661	E213Q	N	↓	6	↓	-1,39	↓	-1,00	N	10	N	8	D	0,57	0,14
rs368727081	R329L	D	↓	8	↓	-0,50	↑	0,03	N	2	D	7	D	0,85	0,86
rs368727081	R329Q	N	↓	8	↓	-1,17	↓	-0,55	N	7	N	1	D	0,85	0,40
rs369307603	S15N	N	↑	2	↓	-0,56	↑	0,01	N	8	N	6	D	0,85	0,33
rs370523548	T273A	N	↓	9	↓	-1,29	↓	-1,00	N	8	N	2	D	0,85	0,71
rs371551932	R255H	N	↓	8	↓	-0,79	↓	-0,96	N	9	N	7	D	0,74	0,62
rs374912252	P68S	N	↓	5	↓	0,74	↓	-1,00	N	10	N	6	D	0,5	0,04
rs375451969	I415V	N	↓	7	↓	-1,51	↓	-0,90	N	9	N	3	D	0,85	0,01
rs375740758	I100T	N	↓	7	↓	-1,79	↓	-1,00	N	8	N	7	D	0,74	0,62

D= Deletério, N= Neutro, ↓= redução na estabilidade; ↑ aumento na estabilidade.

## CONCLUSÕES:

Concluimos que o gene *BECN1* possui SNPs classificados como deletérios pelas análises de bioinformática. Essas alterações podem impactar a estrutura, estabilidade e função da proteína beclin-1, interferindo significativamente no processo de autofagia, o que pode, conseqüentemente, influenciar o desenvolvimento de câncer. Portanto, investigações adicionais são necessárias para aprofundar o entendimento sobre a relação dessas variantes com a incidência de câncer de tireoide e sua possível utilidade no contexto desse tumor.

## REFERÊNCIAS:

1. Seib CD, Sosa JA. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2019;48(1):23-35.
2. Li M, Dal Maso L, Vaccarella S. Global trends in thyroid cancer incidence and the impact of overdiagnosis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(6):468-70.
3. INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. 2023.
4. Bogovic Crncic T, Ilic Tomas M, Giroto N, Grbac Ivankovic S. Risk Factors for Thyroid Cancer: What Do We Know So Far? *Acta Clin Croat.* 2020;59(Suppl 1):66-72.
5. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Jan 20;20(3):460-73. doi: 10.1089/ars.2013.5371. Epub 2013 Aug 2. PMID: 23725295; PMCID: PMC3894687
6. Saha S, Panigrahi DP, Patil S, Bhutia SK. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* 2018;104:485-95.
7. Debnath J, Gammoh N, Ryan KM. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023 Aug;24(8):560-575. doi: 10.1038/s41580-023-00585-z. Epub 2023 Mar 2. PMID: 36864290; PMCID: PMC9980873.
8. Maheshwari C, Vidoni C, Titone R, Castiglioni A, Lora C, Follo C, et al. Isolation, Characterization, and Autophagy Function of BECN1-Splicing Isoforms in Cancer Cells. *Biomolecules.* 2022;12(8).
9. Lee JW, Jeong EG, Lee SH, Yoo NJ, Lee SH. Somatic mutations of BECN1, an autophagy-related gene, in human cancers. *APMIS.* 2007;115(6):750-6.
10. Yesil C, Kandemir O, Haksever H, Dabakoglu T. Is BECLIN-1 Immunoreactivity More Effective than HBME-1 in Diagnosis of Papillary Thyroid Cancer? *Acta Chir Belg.* 2015;115(4):299-305.
11. Huang K, Cui M, Ye F, Li Y, Zhang D. Global profiling of the signaling network of papillary thyroid carcinoma. *Life Sci.* 2016;147:9-14.
12. Wakui M. [Analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs)]. *Rinsho Byori.* 2013;61(11):1008-17.
13. 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.
14. PredictSNP: Bendl, J., Stourac, J., Salanda, O., Pavelka, A., Wieben, E.D., Zendulka, J., Brezovsky, J., Damborsky, J., 2014: PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. *PLOS Computational Biology* 10: e1003440.
15. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-9.
16. Thomas PD, Ebert D, Muruganujan A, Mushayahama T, Albu L-P, Mi H. PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Science.* 2022
17. 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.
18. 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;30(8):1237-44.
19. Capriotti E, Fariselli P. PhD-SNPg: a webserver and lightweight tool for scoring single nucleotide variants. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jul 3;45(W1):W247-W252. doi: 10.1093/nar/gkx369. PMID: 28482034; PMCID: PMC5570245.
20. 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 1;33(Web Server issue):W306-10. doi:10.1093/nar/gki375. PMID: 15980478; PMCID: PMC1160136.
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. iStable: Chi-Wei Chen, Jerome Lin and Yen-Wei Chu\* (2013) iStable: Off-the-shelf Predictor Integration for Predicting Protein Stability Changes, *BMC Bioinformatics*, 14(suppl2):S5, doi:10.1186/1471-2105-14-S2-S5.
23. Venselaar H, Te Beek TA, Kuipers RK, Hekkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics.*