

# ANÁLISE *IN SILICO* DAS CONSEQUÊNCIAS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DE SNPs EM *G6PD* E *SOD2* ASSOCIADOS AO CÂNCER DE TIREOIDE.

---

## RESUMO

O câncer de tireoide é uma das neoplasias cuja incidência é crescente no Brasil, e estudos analisando fatores envolvidos em seu surgimento e desenvolvimento têm sido amplamente realizados. Dentre os fatores em análise há o estresse oxidativo do microambiente tumoral, e a partir disso buscamos entender como alterações em estruturas envolvidas no balanço redox celular podem vir a interferir na tumorigênese tireoidiana. Neste estudo, selecionamos as enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (*G6PD*), que produz a coenzima NADPH atuante na redução de espécies reativas de oxigênio (ROS), e a enzima superóxido dismutase mitocondrial MnSOD (*SOD2*), localizada predominantemente na matriz mitocondrial e importante na dismutação do superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) mitocondrial, convertendo superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. A partir de uma análise *in silico* envolvendo banco de dados e programas computacionais, avaliamos variações polimórficas nos genes *G6PD* e *SOD2* e o seu impacto na estrutura e função das respectivas proteínas resultantes. Foram incluídos os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do tipo *missense*, considerados deletérios no programa SIFT Blink e no PredictSNP 1.0. Adicionalmente, as ferramentas Mupro, I-Mutant, Polyphen-2, Provean, SNPs&GO, PMUT e PANTHER foram empregadas para maior detalhamento dos SNPs incluídos. No gene *G6PD*, 64 variantes polimórficas foram classificadas com potencial deletério na maioria das ferramentas analisadas, sendo 39 delas cumulativamente consideradas altamente deletérias em 100% das ferramentas analisadas. De forma análoga, *SOD2* apresentou variantes com potencial deletério na maioria das ferramentas, inclusive a variante rs4880 (Ala-9Val). Embora esta não apresentasse impacto conformacional e estrutural, a substituição resultou na diminuição da estabilidade da proteína, o que sugere uma menor eficiência no transporte de *SOD2* para matriz mitocondrial. A conexão entre o estresse oxidativo e doenças da tireoide é extensivamente estudado, entretanto pouco se sabe sobre o papel destas variantes no câncer de tireoide. Novas investigações, *in vitro*, em casos de tumores tireoidianos tornam-se necessárias.

Palavras-Chave: câncer de tireoide, estresse oxidativo, bioinformática

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Câncer de tireoide**

Terceiro tipo de câncer mais frequente entre mulheres na região sudeste do Brasil, desconsiderando tumores de pele não melanoma, o câncer de tireoide tem apresentado crescente no Brasil e no mundo (1). Para o triênio 2020-2022, são previstos 13.780 casos novos de câncer de tireoide, mantendo a alta discrepância anteriormente observada por sexo (11.950 mulheres e 1.830 homens) (2). Classificado de acordo com sua diferenciação, há relação proporcional entre o grau de diferenciação do tumor, a incidência e a taxa de sobrevivida (2). Cerca de 90% dos cânceres de tireoide são tumores epiteliais (3), dos quais 85% são carcinomas papilíferos de tireoide (CPT) (4). Os principais fatores de risco são histórico de irradiação no pescoço, histórico familiar de câncer de tireoide e dieta pobre em iodo (5).

### **1.1 Estresse oxidativo e câncer de tireoide**

Nas células tireoidianas, há uma intensa circulação de radicais livres e metabólitos oxidantes, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) da síntese de hormônios tireoidianos e iodeto (I) da iodinação de tireoglobulina (TGO) (6). Assim, para homeostase, um sistema antioxidativo eficiente é essencial para evitar efeitos deletérios decorrentes do estresse oxidativo que promove dano ao DNA e possível desencadeamento de tumorigênese (7, 8). Neste caso patológico, alterações do metabolismo energético e a invasão por células do sistema imune aumentam espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS) (7, 9, 10). Com exacerbação de compostos oxidantes, mesmo em neoplasias é importante o balanço redox, pois há danos ao DNA mas também interações de espécies reativas e estruturas celulares com possível apoptose (11). Tal equilíbrio essencial no microambiente de nódulos tireoidianos tem sido alvo de atuação terapêutica oncológica, como estudos que avaliam intervenções na via das pentoses-fosfato (VPP) e enzimas direta ou indiretamente associadas a ela (12), essenciais ao sistema oxidativo e que será abordada posteriormente.

### **1.2 Enzima G6PD e câncer**

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) está em células aeróbicas e é essencial à detoxificação celular por catalisar a primeira reação da fase oxidativa da VPP (glicose-6-fosfato  $\rightarrow$  6-fosfogluconolactona) (13, 14). Ela tem cerca de 60kDa, 514 aminoácidos (15) em dímero ou tetrâmero (varia de acordo com o pH) (16), e contém

sítios para ligação de  $\text{NADP}^+$  e glicose-6-fosfato (G6P), e sítios alostéricos para modulação enzimática (17). Na VPP, a G6PD sintetiza, entre outros, a coenzima redutora nicotinamida adenina de dinucleotídeo fosfato (NADPH), indispensável ao funcionamento do sistema oxidativo por corroborar com enzimas redutoras (GPx, CAT, NOS, SOD, DUOX e PRDX) (6, 13, 18). Assim, variações na G6PD alteram níveis de NADPH e o balanço redox.

A transcrição prévia da enzima ocorre a partir do gene *G6PD*, presente no *locus* Xq28 próximo ao *hot spot* telomérico, que se expressa em mais de 20 tecidos como tireoide e linfonodos (19, 20). Ele tem 18,5 kB (20), 13 éxons e 12 íntrons (19). Estudam-se alterações na G6PD, como polimorfismos no gene *G6PD* e impactos na enzima. Sabe-se que cerca de 400 milhões de pessoas ao redor do mundo apresentam anormalidade no gene, podendo ou não ser sintomáticos (21). Quanto às variantes até então conhecidas, que somam mais de 400 (22), há uma categorização em 5 classes de acordo com o grau de atividade enzimática (G.A.E.): classe I com G.A.E. <1%, classe II com G.A.E. <10%, classe III com  $10\% < \text{G.A.E.} < 60\%$ , classe IV com  $60\% < \text{G.A.E.} < 90\%$  e classe V com G.A.E. > 150% (23, 24). No Brasil, a prevalência de patologia decorrente de variantes de *G6PD* varia de 2,5 a 5%, principalmente com variantes da classe III típicas da África (25, 26). Dentre as variantes descobertas, muitas apresentam polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) por alteração *missense* que ainda não foram caracterizados quanto ao seu impacto na estrutura, conformação e funcionalidade da G6PD. Frente à variabilidade das consequências na G6PD decorrentes de SNPs no gene *G6PD*, como deficiência, exacerbação ou manutenção da atividade enzimática, é de grande utilidade à genética molecular melhor caracterizar tais SNPs.

Apesar de a maioria dos estudos explorar a relação entre a G6PD e as hemácias, há uma crescente vertente avaliando alterações na enzima e tumorigênese. Em sua normalidade e inserida no ambiente tumoral, a G6PD contribui à carcinogênese por colaborar com a homeostase redox pela reprogramação metabólica, evitando a morte das células neoplásicas (11, 27). Há ainda interações da enzima com moléculas e fatores de transcrição envolvidos com a formação do câncer, como IL-1 $\beta$ , AMPc, PKA (28, 29), Fas, STATs (32), Ras (27), Bcl-2 e Bcl-xL (30) além das vias pró-oncogênicas MAPK e PI3K/Akt (27). Foi observado também que a VPP aumenta em células metastáticas (31). De modo geral, é favorável ao tumor que a atividade da G6PD esteja garantida, pois através do NADPH por ela produzido promove-se um mecanismo antioxidante para que o tumor sobreviva. Entretanto, estudos explorando SNPs em *G6PD* e suas variantes na

tireoide afetada por neoplasias são escassos.

### 1.3 Enzima SOD2 e câncer

As superóxidos dismutase (SODs) são enzimas importantes na desintoxicação do superóxido ( $O_2^-$ ), sendo crucial na proteção das células contra o estresse oxidativo (32, 33). Especificamente, a enzima superóxido dismutase mitocondrial MnSOD (SOD2), localizada na matriz mitocondrial e sintetizada no citoplasma (34), catalisa a conversão de radicais superóxido ( $O_2^-$ ) gerados na cadeia respiratória em oxigênio e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (34, 35). Ela é transcrita pelo gene *SOD2* localizado no braço longo do cromossomo 6 (6q25) (36), que apresenta 5 éxons, 4 íntrons e 1 região promotora que controla a expressão do SOD2 (37).

Vários polimorfismos do gene *SOD2* e suas implicações clínicas foram descritos (38-40). O polimorfismo rs4880 (Ala-9Val), localizado no éxon 2, realiza a substituição de uma citosina (C) por uma timina (T), resultando na troca de uma alanina (CGT) por uma valina (GTT) na região do peptídeo sinal da proteína (41, 42). Esta substituição altera a conformação da molécula, afetando o transporte eficiente de SOD2 para matriz mitocondrial e diminuição da eficiência do SOD2 em neutralizar o superóxido (43). Este polimorfismo tem sido associado a diferentes doenças, incluindo diabetes, cardiopatias, leucemias e câncer de mama (44-47), até o momento não descrito nas neoplasias tireoidianas.

A investigação da relação entre o SNP rs4880 e o câncer tireoide se pauta na associação entre alterações mitocondriais e a tumorigênese tireoidiana. As mitocôndrias são organelas vitais responsáveis pela produção de energia, homeostase do cálcio, regulação da sinalização apoptótica e geração de espécies radicais de oxigênio (ERO), desempenhando papel essencial na tumorigênese (48). O número de artigos que exploram a relação entre câncer de tireoide e mitocôndrias aumentaram consideravelmente desde o início dos anos 2000, mostrando que o metabolismo energético e alterações adquiridas no DNA mitocondrial estão associados com a progressão câncer de tireoide (49-51). Sabemos que os tumores da tireoide contêm um alto número de mitocôndrias (52-54). Os oncocitomas da tireoide, também conhecidos como tumores de células de Hürthle, são caracterizados pela presença de citoplasma granular oxifílico abundante devido ao acúmulo de numerosas mitocôndrias anormais (53, 54). Dada esta evidência, explorar o efeito da variante em nódulos tireoidianos poderia melhor esclarecer a existência ou não de interferência do SNP no microambiente tireoidiano neoplásico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Analisar o impacto das variantes polimórficas dos genes *G6PD* e *SOD2* e seu papel no estresse oxidativo em nódulos tireoidianos.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar se os SNPs nos genes *G6PD* e *SOD2* causam impactos funcionais, conformacionais e estruturais na enzima G6PD. Compreender o papel dos polimorfismos em *G6PD* e *SOD2* no microambiente tumoral tireoidiano.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Bancos de dados**

Para obter informações genéticas e moleculares dos genes *G6PD* e *SOD2*, foram coletados no banco de dados dbSNP do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) para posterior análise nas ferramentas computacionais. Como critério de inclusão, o parâmetro de seleção foi de SNPs com troca do tipo *missense*. Estes foram obtidos, listados e transferidos para Microsoft Excel®. Para possibilitar a análise por ferramentas de bioinformática, foram obtidas as sequências FASTA das proteínas G6PD e SOD2 na plataforma virtual Universal Protein Resource (UniProt) (<https://www.uniprot.org/>) (ID G6PD-B: P11413, ID G6PD-A P11413-3 e ID SOD2: P04179). Obtidos os dados necessários, a análise *in silico* foi realizada nas ferramentas a seguir apresentadas na seguinte ordem: SIFT, PredictSNP, Mupro, I-Mutant, Polyphen-2, Provean, SNPs&GO, PMUT e PANTHER.

### **3.2 Ferramentas computacionais: análise de alteração funcional**

A Sort Intolerant from Tolerant (SIFT) prevê variação na função da proteína ao avaliar a conservação de posições gênicas importantes à funcionalidade proteica. SNPs serão classificados como tolerantes (valor de corte  $\geq 0,05$ ) ou deletérios (valor de corte  $\leq 0,05$ ) com base no escore de predição (55). Selecionados os SNPs deletérios, haverá análise na plataforma PredictSNP1.0, um consenso de nove ferramentas (SIFT, PolyPhen-1, PolyPhen-2, MAPP, PhD-SNP, SNAP, PANTHER, PredictSNP e nsSNPAnalyzer) que prevê alterações proteicas (56). A partir desta ferramenta, considerando a análise da G6PD, esta e as seguintes plataformas terão a análise em duas partes, primeiramente com a sequência FASTA da isoforma B canônica (G6PD-B),

seguida da isoforma A (G6PD-A).

Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2), algoritmo interativo baseado em considerações físicas e comparativas para prever o possível impacto da variante gênica na função e estrutura proteica (57). Analogamente, a ferramenta Protein Variation Effect Analyzer (Provean) prevê alterações nas funções da proteína por substituição ou indel, com base no agrupamento e alinhamento de sequências pontuação baseada. Variantes com pontuação menor que -2,5 serão consideradas deletérias (58). A SNPs&GO é baseada na máquina de vetor de suporte, prevendo impacto das variações na proteína ao calcular informações funcionais provenientes do banco de dados Gene Ontology (GO) (59). Valores de  $p > 0,5$  para cada variante são previstos como causadores de doença (59). Na plataforma SNPs&GO, além dos SNPs e da sequência FASTA da proteína e seu gene, é utilizado o identificador UniProt da proteína. A PMUT, que prediz a natureza patológica da proteína anômala, baseando-se em mecanismo de rede neural e calculando *hot spots* mutacionais (60). PANTHER estima chance de impacto funcional calculando o tempo de preservação de um aminoácido na linhagem da proteína de interesse (61). Ao calcular o tempo em milhões de anos que um aminoácido foi preservado na linhagem proteica, proporcional à probabilidade de impacto funcional, tem-se que quanto maior o tempo de preservação, maior a chance de impacto.

### 3.3 Ferramentas computacionais: análise de alteração na estabilidade

MUpro é um servidor baseado em métodos de aprendizado de máquinas de vetor de suporte e redes neurais que verifica a estabilidade da proteína anômala, e o parâmetro adotado é a diferença de energia livre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) (62). Na I-Mutant2.0, mesmo parâmetro é adotado ( $\Delta\Delta G$ ), utilizando, porém, apenas redes neurais para estimar estabilidade proteica (57).

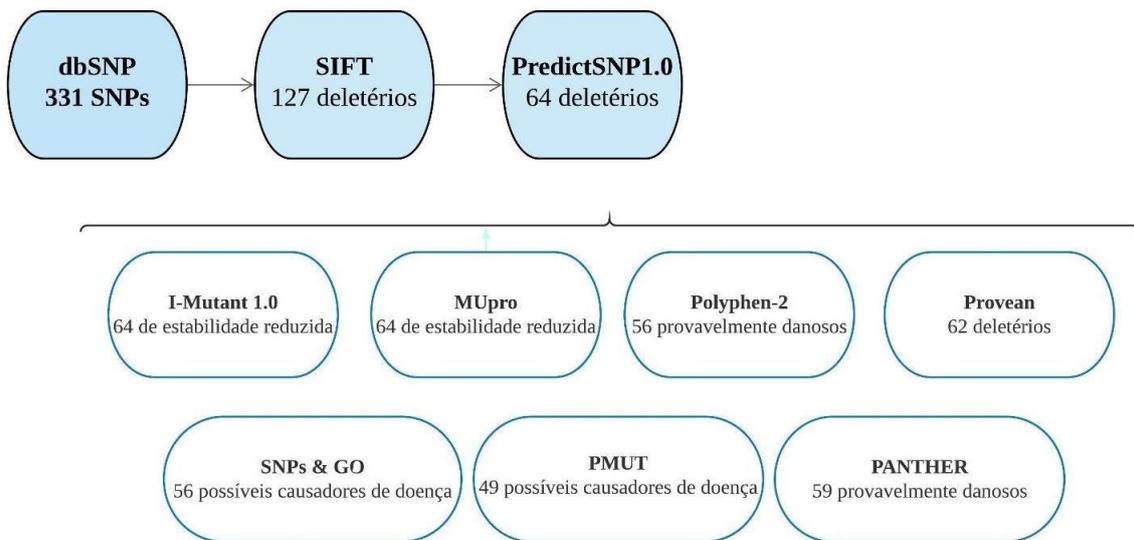
## **4. ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS GARANTIDOS AOS PARTICIPANTES DA PESQUISA**

Não houve necessidade de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) para realização da pesquisa por não haver inclusão de seres humanos nem animais no estudo em questão. Este se baseia em uma análise de bancos de dados e softwares para melhor compreensão de componentes orgânicos com predição patogênica para estudo na carcinogênese tireoidiana.

## 5. RESULTADOS

Para a *G6PD*, com a ferramenta SIFT 127 variantes foram classificadas como deletérias, todas com score  $<0,1$  e  $>0$ ). A partir das variantes deletérias no SIFT, a análise sequencial nas plataformas foi realizada e os resultados encontram-se no Fluxograma 1. No PredictSNP1.0, que reúne 9 ferramentas, apenas 64 variantes (50,39%) foram classificadas como deletérias, com acurácia esperada variando de 51% a 87%.

Fluxograma 1 – Resultados da análise computacional dos SNPs do gene *G6PD*



Nas demais ferramentas, houve variação quanto à classificação referente à deleção, dano e patogênese, mas houve uniformidade na análise da estabilidade de proteínas resultantes de *G6PD* polimórficos (Fluxograma 1). Tanto na I-Mutant1.0 quanto na MUpro, 100% dos SNPs tidos como deletérios pelo PredictSNP1.0 apresentaram repercussão com queda na estabilidade proteica com  $\Delta\Delta G < 0$ . No I-Mutant1.0 a carga livre oscilou entre -1,73 kcal/mol (menor valor, atingido pelo rs1050828) e -0,24 kcal/mol (maior valor, atingido pelo rs5030868) e no MUpro a variação da energia livre de Gibbs foi de -2,9 (menor valores, atingido pelo rs78365220) a -0,1 (maior valor, atingido pelo rs137852341).

Para a *SOD2*, dos 593 SNPs *missense* recuperados, apenas 16 foram classificados como deletérios e com potencial patogênico em todas as ferramentas analisadas, sugerindo que estas variantes podem causar impacto funcional e estrutural na proteína. Embora a variante rs4880 não tenha apresentado score suficiente para ser classificada como deletéria, esta foi incluída para análise nas demais ferramentas computacionais pois

seu papel vem sendo relatado na literatura em diferentes doenças, mas até então pouco se sabe sobre o seu efeito na tireoide (tabela 1).

Tabela 1 – Predição de SNPs do gene *SOD2* usando SIFT

SNP	Mudança de aminoácidos	Predição, pontuação	SNP	Mudança de aminoácidos	Predição, pontuação
rs376398472	V142F	Deletério, 0.008	rs201939534	R83W	Deletério, 0.001
rs1141718	I36T	Deletério, 0.031	rs370671213	H55Q	Deletério, 0
rs4987023	G76R	Deletério, 0	rs371098078	P92L	Deletério, 0.035
rs5746096	S10I	Deletério, 0.013	rs372074075	T97M	Deletério, 0.015
rs5746129	R117W	Deletério, 0.01	rs373540824	E67K	Deletério, 0.022
rs11575993	L84F	Deletério, 0.014	rs375177938	H5Y	Deletério, 0.042
rs112093927	C161Y	Deletério, 0	rs375884951	L38Q	Deletério, 0
rs185564053	G18W	Deletério, 0.001	rs4880	V16A	Tolerada, 0.295
rs200407278	S27R	Deletério, 0.004			

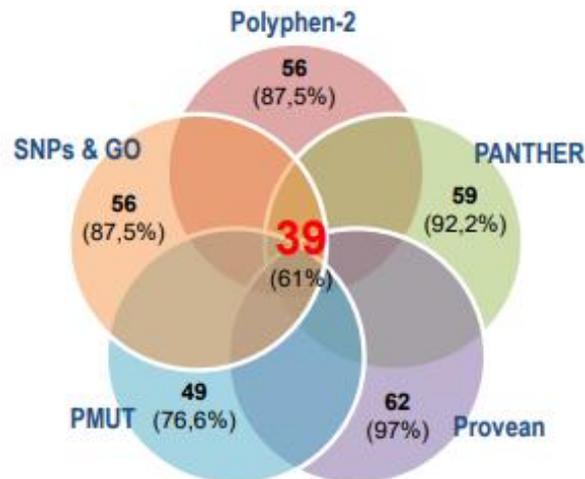
Embora não se tenha observado impacto funcional, estrutural e modificações pós-traducionais (PTM) causadas pela variante rs4880, observamos que no I-Mutant 2.0 e MUpro a substituição de alanina pela valina resulta na diminuição da estabilidade da proteína com pontuação  $\Delta\Delta G$  de 8 no I -Mutant e -1,63 no MuPRO, sugerindo um transporte menos eficiente para a matriz mitocondrial.

Importante ressaltar que os SNPs selecionados, tanto da G6PD quanto da SOD2, não apresentaram desequilíbrio de ligação.

## **6. DISCUSSÃO**

Das 64 variantes de G6PD consideradas deletérias nas plataformas SIFT e PredictSNP1.0, 39 foram cumulativamente considerados como altamente deletérias em 100% das ferramentas analisadas (diagrama 1). Todos os polimorfismos foram inseridos na plataforma HaploView®, que não detectou desequilíbrio de ligação entre nenhuma das variantes. Além disso, para caracterizar e melhor compreender o papel dos polimorfismos previstos para G6PD, foram utilizadas três bases de dados: LitVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e UniProt.

Diagrama 1 – Variantes classificadas como deletérias em ferramentas que analisam alterações estruturais e funcionais



A partir da busca sobre as variantes proteicas, foi observado que 76,7% dos polimorfismos potencialmente deletérios foram previamente categorizados de acordo com o grau de atividade enzimática (G.A.E.) a partir de estudos moleculares, onde 33,3% foram de classe I (G.A.E.<1%), 20% de classe II (G.A.E. < 10%) e 23,3% de classe III (10%<G.A.E.<60%). Os restantes (23,3%) não passaram por tal categorização, ou mesmo não se encontram registrados e consolidados na literatura atual. Vale ressaltar ainda que, apesar da maioria dos polimorfismos apresentarem dados relativos à atividade molecular, grande parte dos estudos que fornecem tais resultados são antigos – datam da década de 1990 - ou escassos, demandando uma investigação mais aprofundada nas alterações de interesse em caso de análise futura em outros contextos.

Quanto à importância clínica, nota-se majoritário direcionamento dos trabalhos à genotipagem populacional, como a do rs74575103 em povos italianos e o rs78478128 em povos indianos, e a acometimentos hematológicos, com destaque a anemias hemolíticas (destaque ao rs1050828) e sinais e sintomas delas decorrentes. No que tange à oncogenética, não há estudos que explorem o impacto dos polimorfismos abordados nesse trabalho, apenas investigações contemporâneas que estudam a G6PD selvagem e a via das pentoses como alvo terapêutico, inclusive em casos de câncer de tireoide.

A análise de rs4880 da *SOD2*, por sua vez, não demonstrou alterações estruturais e funcionais, mas uma diminuição da estabilidade da *SOD2* com conseqüente transporte menos eficiente da enzima para a matriz mitocondrial. A busca nas bases dbSNP (registra 254 publicações associadas ao polimorfismo), LitVar (registra 542 citações do polimorfismo) e ClinVar (traz 3 condições associadas ao polimorfismo) demonstrou

ampla presença da variante na literatura médica, com destaque a associações entre o SNP e farmacodinâmica (da ciclosporina, por exemplo), diabetes mellitus (nefropatia e retinopatia a ela associados), câncer (destacadamente, de mama, colorretal e ovariano) e fibrose. Entretanto, não houve exploração acerca da anormalidade genética e câncer de tireoide, condição em que o estresse oxidativo intensificado pode influenciar no desenvolvimento da doença.

Em suma, os achados correspondem a resultados reforçando potenciais SNPs danosos de *G6PD* e *SOD2* 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.

## **7. CONCLUSÃO**

A partir dos achados que conciliaram diferentes meios de análise na bioinformática, conclui-se que polimorfismos do gene *G6PD* são potenciais alvos de investigação na tumorigênese tireoidiana. Quanto ao rs4880 referente ao *SOD2*, a redução na estabilidade da proteína devido à mudança de aminoácidos sugere sua interferência nos dispositivos de adaptação das células tumorais em relação à regulação e atividade da Mn-SOD. A eficácia analítica das ferramentas virtuais utilizadas reforça a probabilidade destes SNPs serem danosos e apontam para importância da análise laboratorial para melhor exploração e verificação de tal hipótese.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Vaccarella S, Franceschi S, Bray F, Wild CP, Plummer M, Dal Maso L. Worldwide Thyroid-Cancer Epidemic? The Increasing Impact of Overdiagnosis. *N Engl J Med*. 2016;375(7):614-7.
2. Saúde INdCJAGdSMd. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. 2019.
3. WHO I. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. 3 ed2004.
4. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010;22(6):395-404.
5. Ward LS. Thyroid tumors: are we unveiling the puzzle? *Endocr Relat Cancer*. 21. England2014. p. E7-8.

6. Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Molecular and cellular endocrinology*. 2017;458.
7. 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).
8. Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutation research*. 2010;704(1-3).
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5).
10. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*. 2011;475(7354).
11. Sun L, Suo C, Li ST, Zhang H, Gao P. Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: Beyond the Warburg Effect. *Biochimica et biophysica acta Reviews on cancer*. 2018;1870(1).
12. Liu CL, Hsu YC, Lee JJ, Chen MJ, Lin CH, Huang SY, et al. Targeting the pentose phosphate pathway increases reactive oxygen species and induces apoptosis in thyroid cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 2020;499.
13. Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger* 2018.
14. Minucci A, Giardina B, Zuppi C, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: How, when, and why? *IUBMB life*. 2009;61(1):27-34.
15. Protein - G6PD [Internet]. 2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA92653.1>.
16. Au SW, Naylor CE, Gover S, Vandeputte-Rutten L, Scopes DA, Mason PJ, et al. Solution of the structure of tetrameric human glucose 6-phosphate dehydrogenase by molecular replacement. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 1999;55(Pt 4).
17. Au SW, Gover S, Lam VM, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*. 2000;8(3):293-303.
18. Stanton RC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB life*. 2012;64(5):362-9.

19. Gene - G6PD [Internet]. 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2539>.
20. Persico MG, Viglietto G, Martini G, Toniolo D, Paonessa G, Moscatelli C, et al. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. *Nucleic acids research*. 1986;14(6).
21. MPAC-WHO. Updating the WHO G6PD classification of variants and the International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11). 2019.
22. Gómez-Manzo S, Marcial-Quino J, Vanoye-Carlo A, Serrano-Posada H, Ortega-Cuellar D, González-Valdez A, et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(12).
23. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2016;30(2):373-93.
24. Group WW. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ*; 1989. p. 601-11.
25. Pereira LLMD, Bravin CA, Cintra TS, Cassa WSP, Santos TA, Fonseca A, et al. Prevalência da deficiência de G6PD e caracterização molecular dos polimorfismos G202A, A376G e C563T em neonatos no Sudeste do Brasil. *Prevalência da deficiência de G6PD e caracterização molecular dos polimorfismos G202A, A376G e C563T em neonatos no Sudeste do Brasil*. 2019;17(1).
26. Monteiro WM, Val FFA, Siqueira AM, Franca GP, Sampaio VS, Melo GC, et al. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):553-68.
27. Yang HC, Wu YH, Yen WC, Liu H, Hwang TL, Stern AhD. The Redox Role of G6PD in Cell Growth, Cell Death, and Cancer. *Cells*. 2019;8(9).
28. Guo L, Zhang Z, Green K, Stanton RC. Suppression of interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in RINm5F cells by inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*. 2002;41(50).
29. Costa Rosa LF, Curi R, Murphy C, Newsholme P. Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophage glucose, glutamine and O<sub>2</sub> metabolism. Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase mediated inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and activation of NADP<sup>+</sup>-dependent 'malic' enzyme. *The Biochemical journal*. 1995;310 ( Pt 2)(Pt 2).

30. Hu T, *al e.* Variant G6PD levels promote tumor cell proliferation or apoptosis via the STAT3/5 pathway in the human melanoma xenograft mouse model. *BMC cancer.* 2013;13.
31. Yang L, *al e.* Regulation of AMPK-related glycolipid metabolism imbalances redox homeostasis and inhibits anchorage independent growth in human breast cancer cells. *Redox biology.* 2018;17.
32. Wang Y, Branicky R, Noe A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *The Journal of cell biology.* 2018;217(6):1915-28.
33. Borgstahl GEO, Oberley-Deegan RE. Superoxide Dismutases (SODs) and SOD Mimetics. *Antioxidants.* 2018;7(11).
34. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free radical biology & medicine.* 2009;47(4):344-56.
35. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry.* 1969;244(22):6049-55.
36. Church SL, Grant JW, Meese EU, Trent JM. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics.* 1992;14(3):823-5.
37. Wan XS, Devalaraja MN, St Clair DK. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA and cell biology.* 1994;13(11):1127-36.
38. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine.* 2002;33(3):337-39.
39. Shao J, Chen L, Marrs B, Lee L, Huang H, Manton KG, et al. SOD2 polymorphisms: unmasking the effect of polymorphism on splicing. *BMC medical genetics.* 2007;8:7.
40. Kim SH, Kim SH, Lee JH, Lee BH, Yoon HJ, Shin DH, et al. Superoxide Dismutase Gene (SOD1, SOD2, and SOD3) Polymorphisms and Antituberculosis Drug-induced Hepatitis. *Allergy, asthma & immunology research.* 2015;7(1):88-91.
41. Xu Z, Chen Y, Gu D, Lee NP, Sun S, Gong W, et al. SOD2 rs4880 CT/CC genotype predicts poor survival for Chinese gastric cancer patients received platinum and fluorouracil based adjuvant chemotherapy. *American journal of translational research.*

2015;7(2):401-10.

42. Paludo FJ, Picanco JB, Fallavena PR, Fraga Lda R, Graebin P, Nobrega Ode T, et al. Higher frequency of septic shock in septic patients with the 47C allele (rs4880) of the SOD2 gene. *Gene*. 2013;517(1):106-11.

43. Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(9):4471-3.

44. Jones DA, Prior SL, Tang TS, Bain SC, Hurel SJ, Humphries SE, et al. Association between the rs4880 superoxide dismutase 2 (C>T) gene variant and coronary heart disease in diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*. 2010;90(2):196-201.

45. Alachkar H, Fulton N, Sanford B, Malnassy G, Mutonga M, Larson RA, et al. Expression and polymorphism (rs4880) of mitochondrial superoxide dismutase (SOD2) and asparaginase induced hepatotoxicity in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal*. 2017;17(3):274-9.

46. Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;261(2):332-9.

47. Mitrunen K, Sillanpaa P, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis*. 2001;22(5):827-9.

48. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(10):685-98.

49. Psarra AM, Sekeris CE. Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB life*. 2008;60(4):210-23.

50. Moncayo R, Moncayo H. Applying a systems approach to thyroid physiology: Looking at the whole with a mitochondrial perspective instead of judging single TSH values or why we should know more about mitochondria to understand metabolism. *BBA clinical*. 2017;7:127-40.

51. Bonora E, Porcelli AM, Gasparre G, Biondi A, Ghelli A, Carelli V, et al. Defective oxidative phosphorylation in thyroid oncocytic carcinoma is associated with pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting complexes I and III. *Cancer research*. 2006;66(12):6087-96.

52. Le Pennec S, Mirebeau-Prunier D, Boutet-Bouzamondo N, Jacques C, Guillotin D, Lauret E, et al. Nitric oxide and calcium participate in the fine regulation of mitochondrial biogenesis in follicular thyroid carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(20):18229-39.
53. Berho M, Suster S. The oncocytic variant of papillary carcinoma of the thyroid: a clinicopathologic study of 15 cases. *Human pathology*. 1997;28(1):47-53.
54. Hong JH, Yi HS, Yi S, Kim HW, Lee J, Kim KS. Implications of oncocytic change in papillary thyroid cancer. *Clinical endocrinology*. 2016;85(5):797-804.
55. PC N, S H. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic acids research*. 2003;31(13):3812-4.
56. Elkhatabi L, Morjane I, Charoute H, Amghar S, Bouafi H, Elkarhat Z, et al. In Silico Analysis of Coding/Noncoding SNPs of Human RETN Gene and Characterization of Their Impact on Resistin Stability and Structure. *Journal of diabetes research*. 2019;2019.
57. Dabhi B, Mistry KN. In silico analysis of single nucleotide polymorphism (SNP) in human TNF- $\alpha$  gene. *Meta gene*. 2014;2:586-95.
58. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PloS one*. 2012;7(10).
59. Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Human mutation*. 2009;30(8).
60. C F-C, JL G, L Z, I P, X dIC, M O. PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2005;21(14):3176-8.
61. Tang H, Thomas PD. PANTHER-PSEP: predicting disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2016;32(14):2230-2.
62. Bendl J, Stourac J, Salanda O, Pavelka A, Wieben ED, Zendulka J, et al. PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. *PLoS computational biology*. 2014;10(1).