



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Ciências Biológicas e da Saúde

Instituto Biomédico

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Análises *in silico* de variantes genéticas e modelagem estrutural da proteína frataxina humana na Ataxia de Friedreich

Loiane Mendonça Abrantes da Conceição

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Joelma Freire de Mesquita

Coorientador: Dr. Gabriel Rodrigues Coutinho Pereira

Rio de Janeiro

2025

Loiane Mendonça Abrantes da Conceição

**Análises *in silico* de variantes genéticas e modelagem
estrutural da proteína frataxina humana na Ataxia de
Friedreich**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética
e Biologia Molecular da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro como
parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Joelma Freire de Mesquita

Coorientador: Dr. Gabriel Rodrigues Coutinho Pereira

Rio de Janeiro

2025

da Conceição, Loiane
dC744A Análises in silico de variantes genéticas e modelagem
estrutural da proteína frataxina humana na Ataxia de
Friedreich / Loiane da Conceição. -- Rio de Janeiro :
UNIRIO, 2025.
100

Orientadora: Joelma De Mesquita.
Coorientador: Gabriel Pereira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Biologia
Molecular e Celular, 2025.

1. Ataxia de Friedreich. 2. Modelagem de Proteínas. 3.
Dinâmica Molecular. I. De Mesquita, Joelma, orient. II.
Pereira, Gabriel, coorient. III. Título.

Loiane Mendonça Abrantes da Conceição

**Análises *in silico* de variantes genéticas e modelagem
estrutural da proteína frataxina humana na Ataxia de
Friedreich**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética
e Biologia Molecular da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro como
parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Profa. Dra. Joelma Freire de Mesquita (Orientadora), Doutora em Ciências,
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO.

Dr. Gabriel Rodrigues Coutinho Pereira (Coorientador), Doutor em Ciências,
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO.

Profa. Dra. Glenda Corrêa Borges de Lacerda,
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO - PPGBMC.

Prof. Dr. Carlos Fernando Araujo Lima de Oliveira,
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO – PPGBMC.

Prof. Dr. André Luis dos Santos,
Faculdade de Medicina de Petrópolis – FMP

Prof. Dra. Nicole Scherer,
Instituto Nacional do Câncer - INCA

AGRADECIMENTOS

À vida, que me trouxe até aqui e me permitiu superar desafios, fortalecendo minha determinação e meu aprendizado a cada passo.

À minha família, por ser minha base inabalável, pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos. Aos meus pais, por acreditarem em mim e me incentivarem a nunca desistir dos meus sonhos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Joelma Freire de Mesquita, e ao meu coorientador, Dr. Gabriel Rodrigues Coutinho Pereira, por toda a paciência, orientação e por compartilhar seu vasto conhecimento ao longo desta jornada. Sua confiança e incentivo foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, por proporcionarem os recursos e o ambiente necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus colegas e amigos, que compartilharam comigo tanto os momentos desafiadores quanto as conquistas. Obrigado por cada conversa, apoio e motivação.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a mim mesma pela resiliência, dedicação e força em cada etapa desta caminhada.

Com profunda gratidão, dedico este trabalho a todos que, de alguma forma, fizeram parte desta trajetória.

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”
– Albert Einstein

Sumário

1. Introdução.....	13
1.1. Ataxias.....	13
1.2. Ataxia de Friedreich	15
1.2.1. Mutações <i>Missense</i> da Frataxina	16
1.2.2. Sintomatologia.....	18
1.3. Frataxina.....	19
1.4. Fisiopatologia.....	21
1.5. Diagnóstico.....	23
1.6. Tratamento	24
1.6.1. Tratamento Farmacológico	24
1.6.2. Tratamento não Farmacológico.....	28
1.7. Bioinformática	29
2. Objetivos	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3. Materiais e Métodos.....	35
3.1 Obtenção da Sequência e Compilação das Variantes da FXN Humana.	35
3.2 Predição Funcional e de Estabilidade das Mutações.	35
3.3 Modelagem e Alinhamento Estrutural.....	37
3.4 Validação Estrutural.....	38
3.5 Análise de Conservação Evolutiva.....	39
3.6 Dinâmica Molecular.....	39
4 . Resultados e Discussão.....	41
4.1 Obtenção da Sequência e Compilação das Variantes da FXN Humana.	41
4.2 Predição Funcional e de Estabilidade das Mutações.	44
4.3 Modelagem e Alinhamento Estrutural.....	47
4.4 Validação Estrutural.....	49
4.5 Análise de Conservação Evolutiva.....	54
4.6 Dinâmica Molecular.....	55
5 . Conclusão.....	70
6. Referências.....	71
APÊNDICES.....	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagrama das Ataxias cerebelares e seus diferentes subtipos.	13
Figura 2. Participação da frataxina no metabolismo do ferro na mitocôndria.	21
Figura 3. Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator (NRF2) e o mecanismo de ação do omaveloxolone.	25
Figura 4. Principais fármacos em estudo para o tratamento de FRDA.	26
Figura 5. Estrutura tridimensional e representação esquemática dos domínios.	42
Figura 6. Predição funcional das variantes da proteína FXN humana.	45
Figura 7. Predição de estabilidade e SNPEffect4.0 em mutações missense na proteína FXN.	47
Figura 8. Validação do modelo Gerado.	50
Figura 9. Validação do modelo Gerado.	52
Figura 10. Modelo teórico da FXN humana gerado no servidor Robetta.	54
Figura 11. Análise de conservação evolutiva da proteína FXN humana no ConSurf.	55
Figura 12. Análise RMSD de FXN nativa e suas variantes.	57
Figura 13. Análise do Rg da FXN nativa e suas variantes.	58
Figura 14. Análise do SASA da FXN nativa e suas variantes.	60
Figura 15. Análise RMSF da FXN nativa e suas variantes.	61
Figura 16. Análise do Bfactor da FXN nativa e suas variantes.	63
Figura 17. PCA para a FXN nativa e as suas variantes.	65
Figura 18. Contribuição do RMSF para PC1 da FXN nativa e suas variantes.	67
Figura 19. Contribuição do RMSF para PC2 da FXN nativa e suas variantes.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelagem estrutural da proteína fra taxina humana.....	48
Tabela 2. RMSD e TM-Score calculado a partir do alinhamento estrutural com o fragmento 3S4M.....	49
Tabela 3. Validação estrutural dos modelos teóricos completos da proteína FXN.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACIs - Ataxias Cerebelares Hereditárias – do Inglês “*Inherited Cerebellar Ataxias*”.

SAOA - Ataxia Esporádica do Adulto – do Inglês “*Sporadic adult-onset ataxia*”

FXTAS - Síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil - do inglês “*Fragile-X associated Tremor/Ataxia Syndrome*”.

DNA- Ácido Desoxirribonucleico – do Inglês “*Deoxyribonucleic acid*”.

SCAs - Ataxias Espinocerebrelares – do Inglês “*Spinocerebellar Ataxias*”.

FRDA - Ataxia de Friedreich - do inglês “*Friedreich’s Ataxia*”.

DMJ - Doença de Machado-Joseph.

CAG - Citosina-Adenina-Guanina.

ATXN3 - Ataxina-3.

AT - Ataxia Telangiectasia.

ATM - Proteína pertencente à família fosfatidilinositol-3-quinase (PIKKs).

PIKKs - Família fosfatidilinositol-3-quinase.

FXN - Frataxina.

GAA - Guanina-Adenina-Adenina.

SNVs - Variantes de Nucleotídeo Único – do Inglês “*Single Nucleotide Variant*”).

AUG - Adenina-Uracila-Guanina.

ISC - Clusters ferro-enxofre - do Inglês “*Iron-sulfur clusters*”.

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio - do Inglês “*Reactive Oxygen Species*”.

PPAR γ - do Inglês “*Peroxisome proliferator-activated receptor γ* ”

OMAV - Omaveloxolona.

RMSD - do Inglês “*Root Mean Square Deviation*”.

SIFT - do Inglês “*Sorting Tolerant From Intolerant*”.

SNAP - do Inglês “*Screening for Non-Acceptable Polymorphisms*”.

PDB - do Inglês “*Protein Data Bank*”.

MPP - Enzima Peptidase de Processamento Mitocondrial.

SMTL - do Inglês “*SwissModel Template Library*”

HMM - do Inglês “*Hidden Markov Models*”

FLD - Domínio Semelhante a Frataxina

PTKs - do Inglês “*Protein Tyrosine Kinases*”

RESUMO

A Ataxia de Friedreich (FRDA) é a mais comum dentre as ataxias hereditárias, sendo caracterizados pela ataxia progressiva dos movimentos, perda de sensibilidade vibratória e deformidades ósseas, com impacto significativo na capacidade de realizar atividades diárias. No entanto, até o momento ainda não foram desenvolvidos tratamentos efetivos para a FRDA, evidenciando a necessidade de mais estudos. Mutações *missense* no gene que codifica a frataxina humana (FXN), proteína responsável pela regulação da homeostase do ferro intracelular, estão associadas ao desenvolvimento de FRDA. Tais mutações resultam em disfunção da FXN, com consequente acúmulo de ferro mitocondrial e aumento do estresse oxidativo, culminando em ativação de vias de morte celular neuronal. Nesse estudo, análises preditivas, modelagem estrutural e dinâmica molecular foram realizados para caracterizar o efeito de mutações *missense* na proteína frataxina humana. Ao todo, foram compiladas 226 variantes genéticas da FXN a partir de revisão de literatura e busca em bancos de dados, das quais apenas 18 já haviam sido caracterizadas. A análise preditiva apontou uma alta taxa de predições deletérias e desestabilizadoras para as mutações da FXN, que afetam principalmente resíduos conservados e possivelmente importantes para a função da proteína. Além disso, foi gerado um modelo tridimensional completo, acurado e inédito da FXN humana. O modelo gerado da proteína nativa foi utilizado como base para a construção das variantes genéticas I154F e W155R, que foram selecionadas para o estudo dinâmica molecular (DM) em função de seu potencial clínico mais severo. A DM apontou para alterações de flexibilidade e dinâmica essencial da porção N-terminal das duas variantes, região que corresponde aos domínios FXN42, FXN56 e FXN78, envolvidos na maturação da proteína. Nossos achados, sugerem, portanto, que as mutações I154F e W155R poderiam afetar o perfil de interação nos domínios FXN42, FXN56 e FXN78, impactando a maturação da proteína, o que está alinhado com a literatura.

Palavras-chave: Frataxina, Ataxia de Friedreich, análises *in silico*.

ABSTRACT

Friedreich's Ataxia (FRDA) is the most common among hereditary ataxias, characterized by progressive movement ataxia, loss of vibratory sensitivity and bone deformities, with a significant impact on the ability to perform daily activities. However, to date, effective treatments for FRDA have not yet been developed, highlighting the need for further studies. Missense mutations in the gene that encodes human frataxin (FXN), a protein responsible for regulating intracellular iron homeostasis, are associated with the development of FRDA. Such mutations result in FXN dysfunction, with consequent accumulation of mitochondrial iron and increased oxidative stress, culminating in the activation of neuronal cell death pathways. In this study, predictive analyses, structural modeling, and molecular dynamics were performed to characterize the effect of missense mutations in the human frataxin protein. In total, 226 genetic variants of FXN were compiled from a literature review and database search, of which only 18 had already been characterized. The predictive analysis showed a high rate of harmful and destabilizing predictions for FXN mutations, which mainly affect conserved residues that are possibly important for the protein's function. Furthermore, a complete, accurate and unprecedented three-dimensional model of the human FXN was generated. The generated model of the native protein was used as a basis for the construction of the genetic variants I154F and W155R, which were selected for the molecular dynamics (MD) study due to their more severe clinical potential. The DM pointed to changes in flexibility and essential dynamics of the N-terminal portion of the two variants, a region that corresponds to the FXN42, FXN56 and FXN78 domains, involved in the maturation of the protein. Our findings therefore suggest that the I154F and W155R mutations could affect the interaction profile in the FXN42, FXN56 and FXN78 domains, impacting the maturation of the protein, which is in line with the literature.

Keywords: Frataxin, Friedreich's Ataxia, in silico analysis.

1. Introdução

1.1. Ataxias

A ataxia é caracterizada pela incoordenação dos movimentos musculares e pode ser um sintoma de diversos processos patológicos subjacentes. As ataxias cerebelares hereditárias (ACIs) pertencem a um grupo amplo e complexo de doenças neurodegenerativas raras que afetam principalmente o cerebelo, mas frequentemente envolvem também a medula espinhal e os nervos periféricos. Clinicamente, as ACIs são marcadas por uma síndrome cerebelar progressiva, onde ocorre a degeneração do córtex cerebelar e das suas conexões com as fibras nervosas aferentes e eferentes. A investigação das causas desses distúrbios é essencial para definir a melhor estratégia de tratamento. As condições que resultam em ataxia cerebelar podem ser de origem hereditária ou não, e podem ocorrer de forma adquirida ou esporádica. (Figura 1) (ASHIZAWA; XIA, 2016; COARELLI et al., 2023; KLOCKGETHER, 2008).

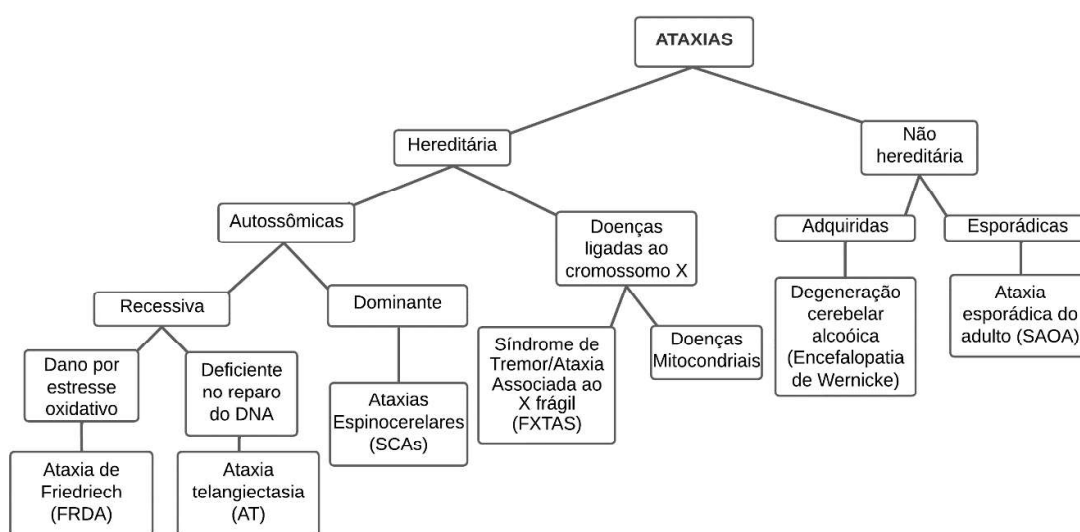


Figura 1. Diagrama das Ataxias cerebelares e seus diferentes subtipos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

As ataxias cerebelares não hereditárias incluem as ataxias adquiridas, como a degeneração cerebelar alcoólica, a forma crônica de ataxia mais comum. Esta condição pode levar à Encefalopatia de Wernicke, caracterizada pela perda de células da camada de Purkinje e pela degeneração das regiões anteriores dos hemisférios cerebelares (KLOCKGETHER, 2008). O principal mecanismo da doença está relacionado à

deficiência de tiamina (Vitamina B1) causada pela interferência do álcool na absorção da mesma (HAES et al., 2010).

Além disso, as ataxias não hereditárias também podem incluir as formas esporádicas, como a Ataxia Esporádica do Adulto (SAOA – do Inglês “*Sporadic adult-onset ataxia*”), que é causada por um distúrbio cerebelar de origem multicausal. Apresentando início dos sintomas por volta dos 50 anos de idade, com a atrofia cerebelar isolada, além de pouco ou nenhum envolvimento do tronco cerebral (BARSOTTINI et al., 2014; KLOCKGETHER, 2008)

Já as ataxias cerebelares hereditárias podem ter origem ligada ao cromossomo X e mitocondriais, ou autossômicas. As ataxias ligadas ao cromossomo X com padrão de herança ligado ao cromossomo sexual, podem levar à síndrome da ataxia ligado ao X-Frágil. A síndrome do X-Frágil é causada pela expansão de trinucleotídeos no gene FMR1. Pacientes com mais de 200 repetições desse segmento genético manifestam o quadro clássico da doença, caracterizado por atraso no desenvolvimento do paciente. Já os pacientes com repetições entre 50 a 200 repetições, desenvolvem o quadro caracterizado pela síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil (FXTAS - do inglês “*Fragile-X associated Tremor/Ataxia Syndrome*”). Apresentando tremor de intenção progressivo e ataxia motora com início após os 50 anos (CHRISTOFOLINI et al., 2009; GODEIRO JR. et al., 1999; RIBEIRO, 2017).

As doenças mitocondriais são causadas por mutações esporádicas ou espontâneas no ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial ou nuclear (GODEIRO JR. et al., 1999). A disfunção mitocondrial causada por essas doenças leva a diversas manifestações clínicas com sintomas diferentes, dentre eles a ataxia cerebelar, causada pela disfunção da cadeia respiratória. Essa disfunção, por sua vez, leva ao estresse oxidativo, e consequente dano aos tecidos mais dependentes da energia gerada por esses mecanismos para o seu funcionamento, como o cerebelo e o sistema nervoso (BRAGANETO et al., 2016; CALABRESE et al., 2005).

Por outro lado, as ataxias hereditárias autossômicas mais comuns são as Ataxias Espinocerebrales (SCAs – do Inglês “*Spinocerebellar Ataxias*”). As SCAs formam um grupo heterogêneo de doenças de ataxia progressiva, dentre elas a Doença de Machado-Joseph (DMJ), que é a mais comum no Brasil. Esta doença é causada pela expansão da sequência de trinucleotídeos CAG no gene que codifica a proteína Ataxina-3 (ATXN3), resultando numa forma mutada da ataxina-3 com propriedades neurotóxicas (GONÇALVES, 2018; KLOCKGETHER, 2008).

Já as ataxias autossômicas recessivas podem ser causadas por dois mecanismos: defeitos do mecanismo de reparo do DNA e estresse oxidativo (ASHIZAWA; XIA, 2016; KLOCKGETHER, 2008). Dentre as ataxias cerebelares causadas por defeitos do mecanismo de reparo de DNA, destaca-se a Ataxia Telangiectasia (AT) (FUSSIGER, 2017; KLOCKGETHER, 2008). A AT é um distúrbio multissistêmico causado por mutações no gene ATM que codifica a proteína serina/treonina quinase ATM que pertence a uma família fosfatidilinositol-3-quinase (PIKKs), atuando no reparo do DNA e na regulação do ciclo celular (AMIRIFAR et al., 2020).

Já no grupo das ataxias hereditárias recessivas causadas pelo estresse oxidativo, se destaca a Ataxia de Friedreich (FRDA - do inglês "*Friedreich's Ataxia*") (FUSSIGER, 2017; KUO, 2019). A FRDA é a mais comum dentre as ataxias hereditárias recessivas (ASHIZAWA; XIA, 2016). Essa doença é causada por mutações no gene FXN, que codifica a frataxina, uma proteína mitocondrial (ARAUJO et al., 2022) que participa do metabolismo do ferro. Tais mutações levam a uma produção ineficiente da proteína frataxina, fazendo com que o ferro se acumule no interior das mitocôndrias e aumente significativamente o estresse oxidativo em função de reações de Fenton (BENCZE et al., 2006; KUO, 2019).

1.2. Ataxia de Friedreich

Entre os anos de 1863 e 1877, Nikolaus Friedreich escreveu vários artigos que descreviam, pela primeira vez, um tipo de atrofia degenerativa das colunas medulares posteriores, que se caracterizava pela ataxia cerebelar, arreflexia e presença de sinal de Babinski (ACHARYA; JAMIL; DEWEY, 2024). E, logo após, ganhou o nome de Ataxia de Friedreich em homenagem ao pesquisador (FRIEDREICH, 1863 e 1877). Desde o primeiro relato, uma variedade de outros sinais e sintomas foram associados à FRDA, que são caracterizados pelo acometimento multissistêmico dos pacientes, e não apenas neurológico (CNOP; MULDER; IGOILLO-ESTEVE, 2013; KEITA et al., 2022)

A FRDA tem uma prevalência global de aproximadamente 2/100.000 pessoas (KEITA et al., 2022) e uma incidência que pode variar de 1/20.000 a 1/250.000 (MAUDOUX et al., 2020), afetando igualmente homens e mulheres (KEITA et al., 2022). Na América Latina poucos estudos foram realizados com o intuito de estimar a prevalência de FRDA no continente, inclusive no Brasil, onde ainda não foram realizados estudos de prevalência da doença (FUSSIGER, 2017; ARAUJO et al., 2022).

A FRDA ocorre devido a mutações no gene *FXN* que codifica a proteína frataxina humana localizado no cromossomo 9q21. Além de mutações missense no gene da frataxina, o desenvolvimento de FRDA também pode ocorrer por meio da expansão de repetição da trinca de bases nitrogenadas GAA no primeiro íntron do gene *FXN*. Sem nenhuma mutação, o cromossomo 9 contém de 7 a 22 repetições de GAA, porém, em cromossomos com mutações que levam ao desenvolvimento de FRDA, essas repetições podem chegar a ser de 100 a 1300 em ambas as cópias do gene (MAUDOUX et al., 2020).

Foi observado, em alguns estudos, que quanto maior o número de repetições de GAA, mais rápido seria o avanço, desenvolvimento e início dos sintomas da FRDA. Além disso, a FRDA também pode ocorrer em pacientes chamados de heterozigotos compostos, que são aqueles que apresentam uma expansão por repetição de GAA em um alelo e uma mutação *missense* no outro alelo (CAMPUZANO et al., 1996; RICHARDSON et al., 2001; PELUZZO et al., 2019).

1.2.1. Mutações *Missense* da Frataxina

As variantes de nucleotídeo único (SNVs – do Inglês “*Single Nucleotide Variant*”) são mutações que afetam um único nucleotídeo no DNA. As SNVs que afetam regiões não codificantes são ditas mutações silenciosas. Quando as SNVs afetam regiões codificantes elas podem ser do tipo sinônimas ou não sinônimas. As mutações sinônimas não afetam o aminoácido traduzido a partir do códon mutante. Já as SNVs não-sinônimas alteram o sentido do códon, resultando na alteração da sequência de aminoácidos. As mutações não-sinônimas, por fim, podem ser do tipo *missense* ou *nonsense*. As primeiras levam à substituição de um único aminoácido na sequência da proteína traduzida, ao passo que a última ocasiona a substituição para um códon de parada (AUG), interrompendo a síntese proteica e gerando uma proteína truncada (ZHANG et al., 2012).

As mutações *missense* estão associadas a uma série de distúrbios patológicos e influenciam assim, na maior propensão a doenças. Se faz necessário entender os efeitos das mutações *missense* quando se considera as doenças genéticas, já que a substituição de resíduos na sequência proteica pode estar relacionada a diversas condições patológicas, como Alzheimer. Essas mutações afetam principalmente a estabilidade e interações moleculares, além da localização celular de proteínas (STEFL et al., 2013).

Uma parte dos pacientes com FRDA são heterozigotos compostos, ou seja, apresentam uma expansão de repetição GAA em um dos alelos e uma mutação pontual, *missense*, no outro alelo (LAM et al., 2023; ZÜHLKE et al., 2004). A correlação da apresentação clínica com as mutações *missense* nos pacientes heterozigotos compostos sugeriu que estes pacientes apresentam uma produção quase nula de frataxina. Além disso, a idade de início dos sintomas foi precoce, e a *Diabetes Mellitus* se mostrou mais comum nos heterozigotos compostos, independente da produção de frataxina. Já a cardiopatia se mostrou mais comum em homozigotos (GALEA et al., 2016).

Por outro lado, os heterozigotos compostos mais frequentes apresentam quadros clínicos mais brandos, com alguns achados atípicos como reflexos tendinosos profundos presentes, ausência de um quadro cerebelar e uma evolução mais lenta da progressão da doença (COSSÉE et al., 1999; SHEN; RUMMEY; LYNCH, 2024).

Até o momento, apenas dezoito mutações *missense* foram catacterizadas nos bancos de dados. Dentre elas, dez foram associadas ao desenvolvimento de FRDA (AGARWALA et al., 2017): M1I, R40C, L106S, G130A, G130V, N146K, I154V, I154F, W155R, W173G. Por outro lado, oito mutações foram caracterizadas como neutras: A14E, L33V, T44N, T44I, R60H, M76V, D178E e D209G (SHERRY et al., 2001).

Além disso, foram encontradas mutações que ocorrem nos sítios relevantes da proteína como as que ocorrem em resíduos de ligação ao ferro: E92K, E96K, E100A, E108V, E108D, D112H, D112Y, D112A, D115E, D122Y e H177Y. Também foram relatadas mutações em sítios de fosforilação (S81T, T94A, Y118C, S160C, S160T, S160R), e ainda mutações no sítio de acetilação (K171E e K171R) e sítio de sumoilação (K197R) da proteína. Essas modificações pós-traducionais tem um importante papel na regulação do funcionamento e degradação da proteína (ENRIQUE, 2019; HIRATA, 2012)).

Ainda, segundo o estudo de Li e colaboradores (2013), duas mutações *missense* são classificadas como sendo as mais severas e com pior prognóstico associado, são elas a I154F e W155R (LI et al., 2013). Já o estudo de Cossée e colaboradores (1999), indicou que a G130V e a W173G seriam as mutações associadas à FRDA mais frequentes na população (COSSÉE et al., 1999). Além disso, o estudo de Clark e colaboradores (2019), sugeriu que a mutação G130V afeta a maturação da frataxina, embora esteja relacionada a um fenótipo mais brando da doença (CLARK et al., 2019).

1.2.2. Sintomatologia

A Ataxia de Friedreich (FRDA) geralmente tem início na segunda década de vida, sendo caracterizada por uma ataxia cerebelar progressiva que afeta inicialmente os movimentos dos membros inferiores. Além disso, podem ocorrer disartria, perda da sensibilidade vibratória e atrofia muscular (CAMPUZANO et al., 1996). Os sinais e sintomas neurológicos da FRDA incluem a degeneração das colunas dorsais, dos tratos espinocerebelares e da medula espinhal (MARIA et al., 2002), levando a ataxia dos membros e da marcha e sendo a manifestação mais comum entre os pacientes com FRDA.

Outras características neurológicas incluem disartria, ausência de reflexos e perda da sensação vibratória e proprioceptiva. Os três principais sistemas neuroanatômicos afetados pela FRDA são o sistema proprioceptivo, o núcleo dentado do cerebelo e os tratos corticoespinhais. A degeneração desses sistemas é responsável pelos sintomas como ataxia de membros, espasticidade, disartria, fraqueza nos membros inferiores, perda da propriocepção e ausência de reflexos tendinosos profundos. (KEITA et al., 2022).

Além disso, os sistemas sensoriais visual e auditivo também são comprometidos na FRDA, levando a outras manifestações neurológicas. Entre elas estão a perda de visão - principalmente devido à atrofia óptica e redução da espessura da camada de fibras nervosas da retina, causada pela morte das células ganglionares da retina, perda auditiva - sem prejuízo dos tons primários, refletindo uma neuropatia auditiva, urgência urinária e dor neuropática - associada à perda dos nervos sensoriais (KEITA et al., 2022).

Os pacientes diagnosticados com FRDA também demonstram uma maior predisposição a desenvolver diabetes *mellitus*, em 20% dos casos, e cardiomiopatia hipertrófica, com uma frequência acima de 90% (MARIA et al., 2002). Também podem estar presentes anormalidades vestibulares, como o nistagmo (MAUDOUX et al., 2020), e deformidades ósseas, como escoliose e pé cavo, uma deformidade caracterizada por um arco plantar mais alto do que o normal, que não se achata ao aplicar peso sobre o pé (PIAZZA et al., 2010; COSSÉE et al., 1999).

Como consequência desse quadro, ocorre a perda lenta e gradual de dependência do indivíduo, afetando, assim, a capacidade do paciente de realização de atividades diárias como o trabalho. Por outro lado, durante o curso de toda a doença, são preservadas as funções cognitivas do paciente (FERREIRA, 2011; ZEIGELBOIM et al., 2018).

Na FRDA, a importância dos sintomas neuropsiquiátricos, distúrbios de humor, fadiga e alterações no sono tem sido reconhecida, de forma semelhante ao observado em várias outras doenças neurodegenerativas como na Doença de Parkinson. No entanto, para a FRDA, há poucos estudos avaliando tais sintomas. As alterações de funções cognitivas foram avaliadas na década de 1980, e foi sugerido que os pacientes apresentam um déficit na velocidade de processamento, porém com as demais funções preservadas. Posteriormente, foi evidenciado ainda, alterações que podem ser mais extensas, como a redução no tempo de reação motora e dificuldade na consolidação de informações verbais. Além disso, estudos sugerem ainda uma maior frequência de síndrome das pernas inquietas e a apneia obstrutiva do sono (KEITA et al., 2022; SILVA, 2014).

A expectativa de vida do paciente é de aproximadamente 15 a 20 anos após o diagnóstico da doença. Cerca de 60% das causas de morte em pacientes diagnosticados com FRDA ocorrem devido a insuficiência cardíaca ou outras disfunções cardíacas (MARIA et al., 2002; KEITA et al., 2022).

1.3. Frataxina

A frataxina humana (FXN) é uma proteína altamente conservada localizada na membrana interna das mitocôndrias que possui 210 aminoácidos (COSSÉE et al., 1999). A frataxina, codificada por genes nucleares e localizada nas mitocôndrias, é expressa predominantemente em tecidos que dependem fortemente da respiração oxidativa, e desempenha um papel importante na homeostase do ferro intracelular e na regulação do metabolismo de íons metálicos (BERNARDO-SEISDEDOS et al., 2023).

A FXN então promove a síntese e metabolismo do grupo heme, além da montagem e o reparo de *clusters* ferro-enxofre (ISC - do Inglês “*Iron-sulfur clusters*”) (DAVIDE et al., 2023; LESUISSE et al., 2003; SCHOENFELD et al., 2005), estoque de ferro (BULTEAU et al., 2004), ativação da fosforilação oxidativa e controle do estado redox (RISTOW et al., 2003). A maior parte do metabolismo do ferro ocorre no interior das mitocôndrias, incluindo a síntese do grupo heme e dos clusters ferro-enxofre (GROTTO, 2008).

Os ISC são formados pelo ferro e ânion sulfeto, gerando, por sua vez, aglomerados 2Fe-2S e 4Fe-4S na matriz mitocondrial, onde o ferro se acumula quando estiver em excesso. Esses aglomerados têm funções essenciais na cadeia de transporte de

elétrons durante as reações redox do catabolismo de gás carbônico e água. Dentre os componentes celulares envolvidos na síntese e maturação dos ISC está a proteína frataxina (PANTOPOULOS et al., 2012; RICHARDSON et al., 2010) .

Embora o mecanismo não esteja totalmente esclarecido ainda, a frataxina tem um o papel de regular a utilização do ferro dentro da mitocôndria, destinando o ferro à síntese do grupo heme ou à gênese dos ISC (Figura 2) (DAVIDE et al., 2023). Além disso, a frataxina é uma proteína que cumpre um papel importante ao se ligar ao ferro, formando um complexo que previne a formação de radicais livres na mitocôndria. Assim, a deficiência na produção de frataxina promove o acúmulo de ferro mitocondrial e o aumento do estresse oxidativo (GROTTO, 2010).

Por sua vez, a frataxina é ubiquamente expressa, mas o seu nível de expressão é variável entre os tecidos de acordo com a fase de desenvolvimento do organismo. A frataxina é mais elevada no sistema nervoso e cardíaco, bem como no fígado, músculo esquelético, córtex cerebral e cerebelar (CAMPUZANO et al., 1997) pâncreas, tecidos esses que são mais afetados pela FRDA (FERREIRA, 2011).

A cadeia respiratória mitocondrial, tem subunidades que são, por sua vez, envolvidas no transporte de elétrons. Tais subunidades são importantes na ligação com o ferro férrico (Fe^{3+}) e o ferroso (Fe^{2+}), formas em que a ferroquelatase – enzima que catalisa a última etapa da síntese do grupo heme consegue reconhecer – para que, então, seja incorporado ao anel pirrólico e complete a síntese do grupo heme (GROTTO, 2010; BERNARDO-SEISDEDOS et al., 2023).

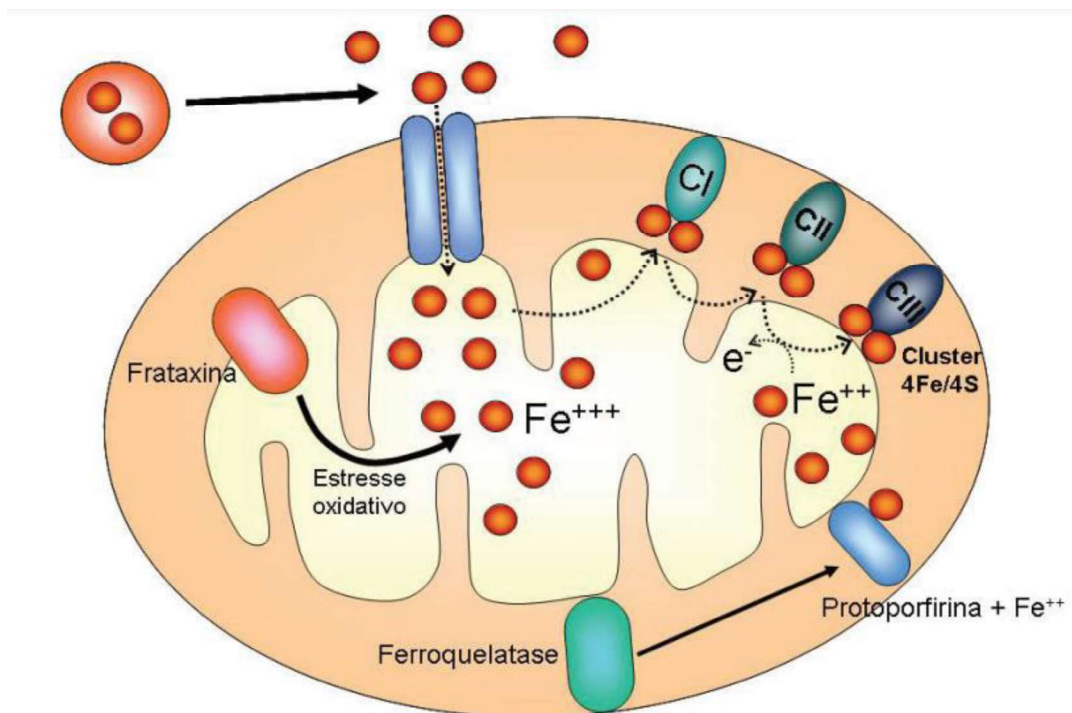


Figura 2. Participação da frataxina no metabolismo do ferro na mitocôndria.

Fonte: Figura adaptada de (GROTTO, 2010).

1.4. Fisiopatologia

Na FRDA, ocorre o acúmulo de ferro no interior das mitocôndrias, devido a deficiência da proteína frataxina, levando, assim, ao depósito do ferro nos tecidos associados à disfunção mitocondrial e aumento do estresse oxidativo. Esse acúmulo de ferro mitocondrial na FRDA, é observado principalmente no coração, cerebelo e pâncreas, tecidos onde ocorre a maior concentração de frataxina. Consequentemente, tais regiões são as mais afetadas pela doença, apresentando alterações cardíacas e maior propensão ao desenvolvimento de diabetes (CAMPUZANO et al., 1997; GROTTO, 2010; KEITA et al., 2022).

O ferro acumulado no interior das mitocôndrias, por sua vez, reage com peróxido de hidrogênio produzido pela cadeia respiratória, oxidando-se e produzindo o radical hidroxila, ainda mais reativo (reação de Fenton), ocasionando um desbalanço no equilíbrio redox (BENCZE et al., 2006).

Além disso, a deficiência de proteínas que fazem parte dos ISC também afeta o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa da cadeia respiratória, levando ao aumento da geração de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ROS - do Inglês

“*Reactive Oxygen Species*”), diminuição da produção de ATP, alterações na homeostase do cálcio e permeabilidade mitocondrial (DAVIDE et al., 2023; HALLIWELL, 2008; KUO, 2019). O estresse oxidativo ainda ocasiona danos mitocondriais e ativação de vias de morte por apoptose nos neurônios afetados (CLARK et al., 2019).

O estresse oxidativo ocorre pelo desbalanço de espécies reativas de oxigênio, que são geradas naturalmente durante a respiração e pode ser ampliado por eventos fisiopatológicos como a inflamação. As ROS, por sua vez, são encontradas em condições fisiológicas do metabolismo celular, sendo produto de suas reações químicas, onde o oxigênio (O_2) sofre reduções com transferência de elétrons. Durante esse processo, são formadas espécies reativas, radicais superóxido (O_2^-), hidroperóxido (HO_2) e hidroxila (OH), além de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas reações químicas com o oxigênio ocorrem normalmente no interior das mitocôndrias (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Existem, ainda, mecanismos antioxidantes endógenos que auxiliam na detoxificação das ROS, como a cascata enzimática, que envolve as proteínas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Esses antioxidantes evitam a formação de radicais livres por meio do sequestro ou degradação, prevenindo a ocorrência de danos celulares (RIBEIRO et al., 2014).

O sistema nervoso é um dos tecidos mais afetados pela deficiência da síntese de frataxina e consequente acúmulo de ferro, dada a sua maior necessidade energética (CALABRESE et al., 2005; DAVIDE et al., 2023). Dessa maneira, a doença ocasiona a morte neuronal, que é responsável pela perda da sensibilidade vibratória, da propriocepção e ataxia sensorial (ROCHA, 2011).

Alterações no tecido cardíaco, como a redução da atividade de proteínas responsáveis pela contração dos cardiomiócitos, contribuem para o desenvolvimento de cardiomiopatia, a principal causa de morte em pacientes com FRDA. Cerca de 85% dos pacientes apresentam anormalidades no ECG, incluindo alterações na repolarização da onda T, e muitos desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda e fibrose tardia, além de arritmias frequentes. Aproximadamente 30% dos pacientes morrem por insuficiência cardíaca, e o monitoramento da cardiomiopatia é dificultado por mudanças lentas no ecocardiograma e elevações paradoxais de biomarcadores, como troponina I (KEITA et al., 2022).

A cardiomiopatia também foi associada a um maior risco de *diabetes mellitus* (DM) relacionado à FRDA. Essa associação é menos evidente em pacientes com início precoce dos sintomas (<15 anos), onde a alta prevalência de cardiomiopatia dificulta a

detecção de variações no impacto da doença cardíaca sobre o DM. A relação entre cardiomiopatia e DM pode ser explicada pela maior gravidade da FRDA nesses casos, ou pelo próprio DM contribuindo para a progressão da cardiomiopatia, como ocorre em adultos sem FRDA. O estresse crônico causado pela cardiomiopatia também pode afetar o metabolismo da glicose, e essa interação ainda está sob investigação (TAMAROFF et al., 2022).

Há ainda, indivíduos que apresentam um amplo espectro de sensibilidade auditiva e comprometimento no processamento auditivo. Cerca de 8-13% desenvolvem perda auditiva neurossensorial, enquanto 90% manifestam dificuldades auditivas, como compreensão de fala em ambientes ruidosos e atenção seletiva a vozes. Esse tipo de perda auditiva é chamado de neuropatia auditiva, e está associado à preservação das estruturas cocleares, mas com danos no nervo auditivo e no tronco cerebral (KEITA et al., 2022).

Já no músculo esquelético, foram observadas alterações envolvidas no metabolismo de lipídios e oxidação de ácidos-graxos, além de uma diminuição, da atividade no tecido hepático e de proteínas glicolíticas. Essas alterações podem contribuir para o aparecimento da resistência à insulina e desenvolvimento de diabetes (CNOP; MULDER; IGOILLO-ESTEVE, 2013; RISTOW et al., 2003).

1.5. Diagnóstico

O diagnóstico de Ataxia de Friedreich começa com uma avaliação clínica detalhada do quadro clínico típico, que inclui ataxia progressiva da marcha, com início tipicamente antes dos vinte anos de idade, disartria, arreflexia dos membros inferiores, perda de propriocepção e vibração, hipertrofia cardíaca e deformidades esqueléticas, como escoliose e pé cavo. A presença destes sintomas, combinada com a história familiar de consanguinidade ou de outras pessoas afetadas, pode levar à suspeita diagnóstica de FRDA (KUO, 2019).

O exame neurológico de um paciente com FRDA indica ataxia sensorial, a perda da sensibilidade vibratória e da propriocepção nos membros inferiores, reflexos tendinosos profundos ausentes ou diminuídos nos membros inferiores, e a resposta plantar extensor, conhecido como sinal de Babinski (ACHARYA; JAMIL; DEWEY, 2024) também pode estar presente. Os estudos neurofisiológicos, como exames de condução nervosa e potenciais evocados somatossensoriais, são feitos com a finalidade de identificar a presença de neuropatia sensorial axonal, com atrasos nos potenciais evocados

somatossensoriais, o que reflete no comprometimento da condução nos tratos espinhais dorsais (DELATYCKI; BIDICHANDANI, 2019; KEITA et al., 2022; KUO, 2019).

A ressonância magnética (RM) do cérebro e da medula espinhal, pode demonstrar atrofia da medula espinhal e, ocasionalmente, atrofia cerebelar. Porém, as alterações mostradas em exames de imagem não são específicas, e são mais usadas principalmente para excluir outras causas de ataxia, como tumores ou lesões vasculares (CAMPUZANO et al., 1996; DELATYCKI; BIDICHANDANI, 2019).

O diagnóstico diferencial inclui outras formas de ataxias hereditárias e adquiridas, como a Ataxia Espinocerebelar e Ataxia Telangiectasia, bem como causas metabólicas, inflamatórias ou tóxicas de ataxia. A história clínica, exame neurológico e os achados de exames genéticos permitem a distinção entre estas condições. Devido à alta prevalência de cardiomiopatia hipertrófica e diabetes mellitus em pacientes com FRDA, é recomendada uma avaliação glicêmica e cardiológica periódica com ECG e ecocardiograma (DELATYCKI; BIDICHANDANI, 2019).

O teste genético molecular é o padrão-ouro para o diagnóstico definitivo da FRDA. Testes como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e o Southern Blot são usados para quantificar o número de repetições de GAA ou mutações no gene FXN. A FRDA é uma doença grave e de grande impacto, cujo diagnóstico precoce e confirmação são fundamentais para a gestão adequada da doença (HARDING, 1981; ORTEGA SUERO et al., 2021).

1.6. Tratamento

1.6.1. Tratamento farmacológico

Até o momento, alguns fármacos foram testados com o objetivo de atrasar o desenvolvimento da doença (PILOTTO; CHELLAPANDI; PUCCIO, 2024), mas ainda não existe cura definitiva para a FRDA (LYNCH et al., 2021; MENDONÇA et al., 2024). O diagnóstico preciso permite a monitorização adequada das complicações, e a implementação de terapias de suporte que podem melhorar a qualidade de vida dos pacientes (CLARK et al., 2019; DELATYCKI; BIDICHANDANI, 2019). Além disso, a incorporação desse tema nas relações sociais, na saúde e nas pesquisas, que contribuam para estudos de novos tratamentos e fármacos, se mostra importante (LUZ; DA SILVA; DEMONTIGNY, 2016).

Fármacos de diferentes grupos foram testados visando melhorar a função mitocondrial, reduzir o estresse oxidativo, modular vias metabólicas e elevar a expressão da frataxina (Figura 4). O estudo mais avançado atualmente é o da Omaveloxolona (OMAV) (LYNCH et al., 2024).

A deficiência de frataxina desregula as defesas antioxidantes, gerando um ciclo de disfunção mitocondrial, comprometimento da sinalização do fator Nrf2 e redução na produção de ATP. Normalmente, o estresse oxidativo ativa o Nrf2 para induzir genes antioxidantes e proteger as células, mas na FRDA, essa sinalização é prejudicada. Células de pacientes com FRDA mostram hipersensibilidade ao estresse oxidativo devido à falha na ativação do Nrf2 e na produção de antioxidantes, como glutathiona e superóxido dismutase. Esse comprometimento pode contribuir para a neurodegeneração observada na doença (LYNCH et al., 2021).

O mecanismo de ação proposto da omaveloxolona, como mostra a Figura 3, é a ativação do fator de transcrição Nrf2, que pesquisas demonstraram estar paradoxalmente diminuído em células de pacientes com FRDA. A ativação de Nrf2 pode melhorar a função mitocondrial ao reduzir o estresse oxidativo e prevenir a peroxidação lipídica. Em estudos pré-clínicos, a omaveloxolona e outros compostos que ativam o Nrf2 mostraram aumentar o número de mitocôndrias, melhorar sua eficiência, aumentar a produção de energia mitocondrial e reduzir a peroxidação lipídica (LYNCH et al., 2021, 2024).

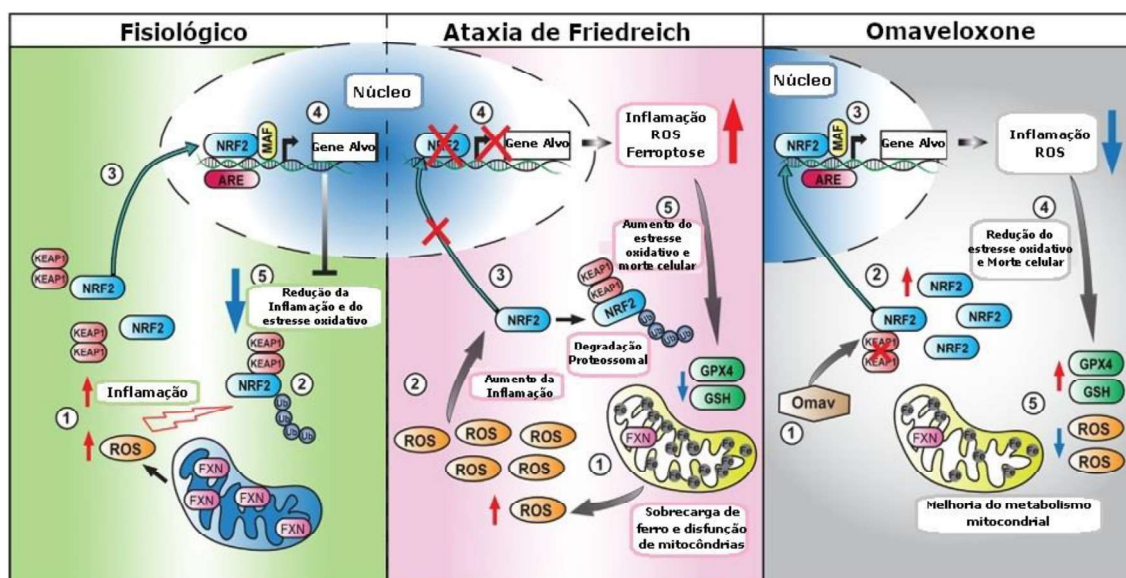


Figura 3. Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator (NRF2) e o mecanismo de ação do omaveloxolone.

Painel esquerdo: Em condições fisiológicas, o NRF2 citoplasmático encontra-se ligado à proteína associada ao Kelch-like ECH (KEAP1) (1,2). Sob condições de stress oxidativo, o NRF2 é

libertado e translocado para o núcleo (3). No núcleo, ele forma pares com pequenas proteínas musculoaponeuróticas de fibrossarcoma (MAFs) e ativa a transcrição de genes antioxidantes ao ligar-se às sequências do elemento de resposta antioxidante (ARE) (4); Painel central: Na doença ataxia de Friedreich, níveis baixos de frataxina (FXN) e a redução de proteínas ferro-enxofre (Fe-S) levam à disfunção mitocondrial e ao aumento da carga de ferro nas mitocôndrias, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (1,2). Além disso, mecanismos desconhecidos provocam a redução na expressão de NRF2, que não consegue localizar-se no núcleo (3,4), resultando em níveis reduzidos de glutathione peroxidase 4 (GPX4) e glutathione (GSH) (5). Esses eventos subsequentes aumentam a inflamação e a produção de ROS, intensificando o stress oxidativo e a ferroptose, o que acaba por causar morte celular; Painel direito: O omaveloxolone (Omap) pode inativar o KEAP1 (1), levando à acumulação de NRF2 recém-produzido (2), que pode translocar-se para o núcleo e regular a transcrição dos seus genes-alvo através da ligação às sequências ARE (3). Isso contribui para atenuar o stress oxidativo e inflamatório, melhorando o metabolismo mitocondrial (4). Fonte: Adaptado de: PILOTTO; CHELLAPANDI; PUCCIO, 2024.

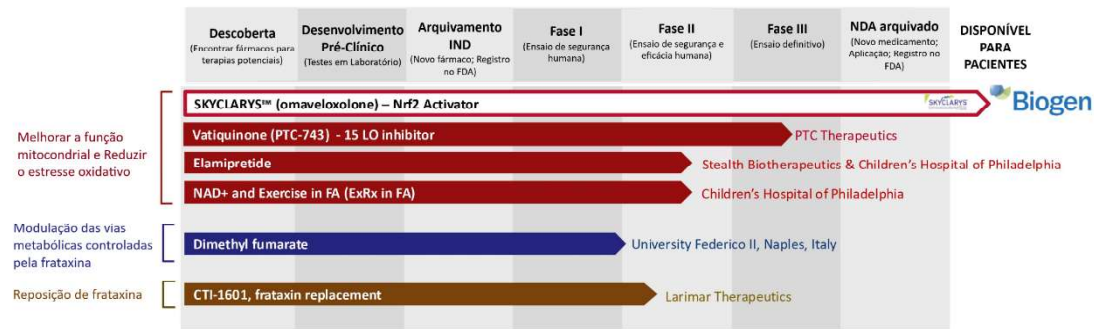


Figura 4. Principais fármacos em estudo para o tratamento de FRDA.

No eixo vertical, são mostrados os principais candidatos terapêuticos agrupados com base no mecanismo de ação ou abordagem do tratamento. Já no eixo horizontal é mostrada a etapa da pesquisa onde cada candidato está no processo de desenvolvimento. Fonte: Adaptado de: FARA et al., 2024.

A vatiquinona (PTC-743) é um composto sucessor do EPI-A0001, projetado para melhorar a função mitocondrial e celular, atuando sobre a 15-lipooxigenase. Essa enzima é um regulador chave de uma via que envolve inflamação, estresse oxidativo e morte celular, conhecida como ferroptose, implicada em doenças do sistema nervoso central, incluindo a ataxia de Friedreich. A vatiquinona em fase III de desenvolvimento, recebeu as designações de medicamento órfão e via rápida para FA pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA.

Em 2012, diversos estudos clínicos abertos relataram o uso do EPI-743 (também conhecido como PTC-743) em doenças mitocondriais, como a síndrome de Leigh e a neuropatia óptica hereditária de Leber. Esses estudos indicaram que os pacientes tratados com EPI-743 apresentaram melhorias clínicas, sem eventos adversos relatados. Um

estudo aberto anterior, envolvendo 14 pacientes com diversas condições mitocondriais, concluiu que o EPI-743 modificou a progressão da doença em mais de 90% dos casos, com base em parâmetros clínicos, qualidade de vida e exames cerebrais não invasivos. Esses resultados motivaram a realização de ensaios controlados para confirmar essas descobertas (FARA et al., 2024).

Já o Elamipretide (também conhecido como Bendavia, MPT-131 e SS31) é um composto tetrapeptídeo desenvolvido pela Stealth Therapeutics que atua na membrana mitocondrial interna, ligando-se reversivelmente à cardiolipina. Em estudos pré-clínicos e clínicos, ainda em fase II, o elamipretide demonstrou aumentar a respiração mitocondrial, melhorar a função da cadeia de transporte de elétrons e a produção de ATP, além de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) patogênicas. Esses efeitos contribuem para a melhora funcional, promovendo a produção de ATP e potencialmente interrompendo ou revertendo o estresse oxidativo prejudicial.

Em modelos animais, uma única injeção de elamipretide foi capaz de reverter a energia mitocondrial deprimida e restaurar o ambiente redox celular no músculo esquelético de camundongos envelhecidos. Outros estudos também demonstraram efeitos positivos em modelos de camundongos de neurodegeneração, cardiomiopatia e degeneração macular relacionada à idade (FARA et al., 2024).

Nos estudos com a combinação NAD⁺ e exercício físico na AF, a hipótese de que a combinação de exercício físico com ribosídeo de nicotinamida (NR), um precursor do NAD⁺, aumentará a capacidade de fosforilação oxidativa mitocondrial no músculo esquelético, promovendo o ganho de massa muscular e melhorando a capacidade aeróbica em pacientes com Ataxia de Friedreich.

O fumarato de dimetila, um medicamento aprovado para o tratamento da esclerose múltipla e psoríase, demonstrou induzir a biogênese mitocondrial em pacientes com esclerose múltipla por meio da ativação da via Nrf2. Considerando que a ataxia de Friedreich também envolve comprometimentos na ativação de Nrf2 e perda de mitocôndrias, o tratamento com fumarato de dimetila pode oferecer benefícios terapêuticos, e está em fase II de desenvolvimento, como mostra a Figura 3 (FARA et al., 2024).

Por outro lado, o nomlabofusp (nomla) é uma terapia de reposição proteica desenvolvida especificamente para tratar a deficiência de frataxina na ataxia de Friedreich. O nomlabofusp é composto por um peptídeo de penetração celular (CPP) ligado à frataxina, permitindo que a proteína atravessasse as membranas celulares. Com a

adição de uma sequência de alvo mitocondrial, a frataxina é direcionada para a mitocôndria, onde restaura suas funções na cadeia de transporte de elétrons e na produção de energia (FARA et al., 2024).

1.6.2. Tratamento não farmacológico

A terapia sintomática pode ajudar os pacientes e seus familiares a lidarem de uma melhor forma com o curso da doença e a progressão da doença, além de uma melhor qualidade de vida, como a terapia psicológica e o pilates (CLARK et al., 2019). Nos últimos anos várias propostas de tratamentos estão sendo estudados com o objetivo de reverter a deficiência de frataxina (terapia genética, reposição de proteína, terapia epigenética, reversão do silenciamento de FXN) ou mesmo melhora de eventos patogênicos (KEITA et al., 2022).

Além das intervenções farmacológicas, que visam tratar a causa da FRDA, os pacientes devem ter acompanhamento médico regular, a fim de prevenir complicações, além da verificação de progressão da doença em todos os aspectos. Após a avaliação, medidas para o acompanhamento devem ser traçadas com o objetivo de minimizar as consequências da doença, assim como manter a autonomia do paciente nas atividades diárias pelo maior período possível, considerando o caráter neurodegenerativo da doença (MARING; CROARKIN, 2007).

Assim pode ser proposto o uso próteses, cadeiras de rodas, fisioterapia prescrita pelo médico especialista em reabilitação, de modo a manter um estilo de vida o mais ativo possível. Intervenções ortopédicas cirúrgicas ou não cirúrgicas para a escoliose e deformidades dos pés, além de acompanhamento com fonoaudiologia. Além disso, há casos em que alterações na dieta e o uso de sonda nasogástrica nos estágios mais graves da doença devido à disfagia (BIDICHANDANI; DELATYCKI, 2017; SCHULZ et al., 2009).

Há casos em que se faz necessário o uso de fármacos para o tratamento da cardiomiopatia observada na FRDA, que incluem diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, *beta*-bloqueadores, antagonistas de aldosterona, digoxina e amiodarona. Além do controle da Diabetes *Mellitus* feito por meio de dieta, ou com o uso de antidiabéticos orais ou mesmo insulina. Agentes antiespasmódicos podem ser usados para a disfunção vesical, o uso de próteses auditivas, tratamento da apneia, e do sono (BIDICHANDANI; DELATYCKI, 2017).

A terapia ocupacional e psicoterapia também são indicadas para os pacientes, a fim de garantir um ambiente seguro em casa e no trabalho, além de tratar os transtornos psiquiátricos que geralmente afetam pacientes com doenças neurodegenerativas, como a ansiedade e depressão (VALLI; SOBRINHO, 2014). Ainda assim, a percepção individual da qualidade de vida durante o curso da doença é influenciada por fatores culturais, circunstâncias familiares e socioeconômicas. Sendo assim, incluir a família dos pacientes nos programas de tratamento e reabilitação é de extrema importância (BIDICHANDANI; DELATYCKI, 2017).

1.7. Bioinformática

O desenvolvimento da bioinformática se consolidou a partir do Projeto Genoma Humano e de outros projetos de sequenciamento genético. A necessidade de armazenar e analisar um grande volume de dados impulsionou avanços em hardware, software e estratégias de análise e modelagem matemática (VERLI, 2014; XIONG, 2006). Essas inovações têm sustentado a pesquisa biológica e biomédica, desde a anotação de genomas e análise de expressão genética, até o desenvolvimento de dispositivos e análises preditivas. Atualmente, essas ferramentas computacionais permitem prever o impacto de mutações na função de uma proteína e modelar estruturas tridimensionais usam base em sequências de aminoácidos (KREBS; DE MESQUITA, 2016).

A bioinformática é uma área multidisciplinar que integra conceitos moleculares, de química e física, utilizando princípios e métodos computacionais para analisar e interpretar dados biológicos, especialmente aqueles gerados pela biologia molecular e genética. Abrangendo uma gama de ferramentas para o desenvolvimento e aplicação de algoritmos, ferramentas estatísticas e técnicas de modelagem computacional, para a gestão de grandes volumes de dados biológicos, visando, por exemplo, o estudo de genomas, proteomas e metagenomas, bem como a estrutura e a função de proteínas (ALTSCHUL et al., 1990; LI et al., 2017).

Os experimentos *in silico*, que correspondem à experimentação em bioinformática, utilizam ferramentas computacionais para simular e analisar processos biológicos, funcionando de forma análoga aos termos *in vivo* e *in vitro* (EKINS; MESTRES; TESTA, 2007; VERLI, 2014).

A capacidade de organização e armazenamento da crescente quantidade de informações biológicas em bancos de dados digitais é de extrema importância. Alguns desses bancos de dados tem grande relevância e são de livre acesso aos usuários, facilitando assim a busca por dados e informações, incluindo o NCBI (WINTER, 2017), UniProt (BATEMAN, 2019) e Protein Data Bank (ROSE et al., 2021).

Ferramentas computacionais também podem ser usadas para prever os aspectos evolutivos, funcionais e estruturais de proteínas (XIONG, 2006). Dados de sequências de proteínas e DNA vem ao longo de milhares de anos, acumulando informações a partir de mutações, as quais constituem evidências evolutivas, permitindo assim a identificação de ancestrais em comum e relações evolutivas entre espécies (ASHKENAZY et al., 2016). Nesse cenário, o alinhamento entre sequências se faz essencial para identificar aspectos evolutivos a partir de sequências depositadas em bancos de dados (XIONG, 2006), tornando possível a realização de análises filogenéticas (ASHKENAZY et al., 2010).

Milhões de novas mutações foram descobertas graças aos métodos de sequenciamento de nova geração. Entretanto, as abordagens experimentais de caracterização de variantes são mais caras, demoradas e de difícil execução. Simulações complexas também requerem grande poder computacional, o que implica o uso de maquinário robusto e caro. No entanto, as simulações computacionais, ou seja, simulações *in silico*, contribuem para os estudos e a predição dos efeitos de mutações de forma mais eficiente, rápida e barata. Assim sendo, os métodos computacionais são importantes aliados dos métodos experimentais, dado que essa abordagem permite priorizar as mutações mais prováveis de serem deletérias para que estas sejam estudadas a fundo em bancada molhada (PEREIRA; TELLINI; DE MESQUITA, 2019).

Além disso, as tecnologias de sequenciamento de nova geração permitem determinar a sequência de proteínas de forma massivamente paralela. No entanto, métodos de bancada para a determinação de estruturas proteicas, como a Ressonância Magnética Nuclear e a Cristalografia de Raios-X, são relativamente mais custosos, demorados e de difícil execução. Nesse cenário, ocorre uma grande defasagem entre a quantidade de sequências proteicas depositadas nos bancos de dados e a sua respectiva estrutura tridimensional. A bioinformática se apresenta como uma solução para resolver essa defasagem, visto que permite a predição de modelos tridimensionais de proteínas a partir da sua sequência (VERLI, 2014).

Dos métodos computacionais usados para a modelagem de estruturas proteicas, se destacam a modelagem comparativa, *ab initio* e *threading*. A modelagem comparativa é o método mais acurado dentre eles, permitindo a geração de modelos da proteína com uma qualidade geral que se assemelha à das estruturas de proteínas experimentais previamente determinadas. Porém depende de informação prévia de estruturas tridimensionais de proteínas potencialmente relacionadas para serem utilizadas como molde (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003; ZAFAR et al., 2016).

Já a modelagem *ab initio* é menos acurada que a comparativa, mas não é dependente de um modelo previamente determinado, necessitando somente de informações contidas na sequência de aminoácidos da proteína em questão. O método utiliza cálculos de propriedades físico-químicas e termodinâmicas, baseados no mínimo de energia livre global, visando encontrar uma conformação com menor energia livre, mínimo global (VERLI, 2014).

Por sua vez, a modelagem por *threading* identifica relações existentes entre os fragmentos estruturais e as regiões correspondentes na sequência da proteína alvo, utilizando uma biblioteca de fragmentos conhecidos. Então, tais fragmentos são unidos, gerando uma estrutura tridimensional temporária. E por fim, são utilizadas simulações como as de Monte-Carlo, que calculam as interações desses fragmentos entre si para gerar o modelo final (SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

Outra técnica computacional essencial nas simulações *in silico*, é a dinâmica molecular (DM), usada para simular o movimento de átomos e moléculas ao longo do tempo. Esta abordagem permite entender o comportamento e as interações de moléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidios e complexos moleculares, em condições próximas às fisiológicas (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

O uso de métodos de DM é essencial para o estudo detalhado da conformação, estabilidade estrutural e mecanismos funcionais de biomoléculas, com impactos diretos em áreas como o planejamento de fármacos e biologia estrutural. A DM possibilita observar como as moléculas se reorganizam e como essas mudanças conformacionais afetam suas funções biológicas. No contexto do planejamento de fármacos, por exemplo, a DM permite monitorizar o comportamento de alvos terapêuticos e sua interação com potenciais candidatos à fármaco, facilitando a identificação de compostos que possam se ligar de forma estável e específica aos sítios de ligação da biomolécula, promovendo o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e direcionados (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018).

Na investigação sobre proteínas, a DM é usada para estudar a flexibilidade estrutural e como diferentes conformações influenciam a atividade enzimática ou no reconhecimento de ligantes. Em proteínas de membrana, a DM ajuda a desvendar como canais e transportadores se movem, e funcionam, sendo uma tarefa essencial para entender os mecanismos de sinalização e transporte celular (SHUKLA et al., 2014). A análise das interações proteína-proteína é também um ponto bastante importante para a uso da DM, uma vez que se torna possível a simulação de condições fisiológicas dentro da célula, dando informações sobre como essas proteínas se comportam, formam complexos e como estas interações são influenciadas pelo ambiente molecular (KARPLUS; MCCAMMON, 2002).

O conhecimento de estruturas tridimensionais contribui para uma melhor compreensão da atividade biológica e de interações proteína-ligante, incluindo fármacos. Estruturas tridimensionais de proteínas são importantes pontos de partida para o desenho racional de novos fármacos baseados em estrutura, abordagem que se tornou fundamental para descoberta de novos medicamentos e impulsionou a indústria farmacêutica nas últimas décadas. Essa abordagem permite a identificação e otimização de *leads* de forma mais rápida e eficiente que os métodos tradicionais de tentativa e erro (BATOOL; AHMAD; CHOI, 2019)

O rápido crescimento da indústria farmacêutica nas últimas décadas se deve, em grande parte, aos avanços em modelagem molecular, caracterização de doenças e descoberta de fármacos promovidos pela bioinformática. Uma técnica amplamente usada nesse campo é o desenho racional de fármacos baseado em estrutura, que visa compreender as bases moleculares das doenças. Esse método utiliza o conhecimento da estrutura tridimensional do alvo biológico para identificar e otimizar candidatos a fármacos de forma mais rápida, econômica e eficiente (LIONTA et al., 2014).

O conhecimento das estruturas tridimensionais das proteínas permite o design de moléculas que se ligam com alta afinidade e especificidade ao sítio ativo de uma proteína-alvo ou a um receptor. Esta abordagem racional reduz significativamente a toxicidade e viabiliza o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e com menos efeitos adversos do que o método tradicional de tentativa e erro (XIONG, 2006). A bioinformática facilita essa etapa filtrando, em bibliotecas com milhões de compostos, os candidatos mais promissores para investigações *in vitro* e *in vivo*. Esse processo necessita de uma proteína-alvo, cuja função será modulada através da interação com um ligante, induzindo uma resposta farmacológica.

Na triagem virtual, são aplicados uma combinação de algoritmos de predição, filtros, além de um docking molecular, para reduzir o número de candidatos a fármacos. Inicialmente, são removidos compostos tóxicos ou com características indesejáveis, os compostos restantes têm então suas afinidades de ligação com a proteína-alvo estimadas pelo docking molecular, técnica que mostra, com certa precisão, o comportamento dos fármacos nos sítios de ligação (ROY; KAR; AMBURE, 2015). Aqueles com maior afinidade e complementaridade são selecionados para testes posteriores (SEGRETO et al., 2017).

As abordagens *in silico* também ganham destaque em contextos regulatórios, com agências como FDA (do inglês - “*Food and Drug Administration*”) e o REACH (do inglês - “*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*”) incentivando seu uso para reduzir testes *in vivo*, promovendo segurança toxicológica sustentável e diminuindo resíduos laboratoriais (GELLATLY; SEWELL, 2019). Esses métodos permitem avaliações iniciais de segurança e toxicidade, guiando os testes subsequentes e oferecendo alternativas quando faltam dados experimentais sobre carcinogenicidade e toxicidade (MYATT et al., 2018). Assim, a bioinformática se estabelece como uma ferramenta poderosa para economizar tempo e recursos, com impacto positivo em termos de sustentabilidade (CHUSHAK et al., 2018; RAUNIO, 2011). Esse avanço tecnológico facilita a priorização e o direcionamento de estudos futuros, economizando tempo e recursos, e concentrando os esforços de pesquisa nas áreas mais promissoras (GÖLLER et al., 2020).

A bioinformática, portanto, desempenha um papel fundamental como complemento dos métodos experimentais, contribuindo para identificar funções de genes e proteínas, aprofundando o entendimento dos mecanismos e das causas de doenças humanas e viabilizando o desenvolvimento de novos medicamentos e terapias (LIONTA et al., 2014). As análises *in silico* ajudam a direcionar pesquisas futuras, permitindo concentrar esforços nas hipóteses mais promissoras, o que otimiza tempo e recursos (GÖLLER et al., 2020).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é caracterizar o impacto de mutações do tipo missense na função e estrutura da proteína frataxina humana, além de desenvolver e validar um modelo teórico abrangente da proteína. Além disso, foram utilizadas técnicas de modelagem estrutural e dinâmica molecular, a fim de investigar detalhadamente os efeitos estruturais das mutações I154F e W155R na frataxina.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter a sequência nativa, estrutura tridimensional (incompleta) e mutações *missense* da proteína FXN na literatura e em banco de dados;
- Caracterizar as mutações compiladas utilizando algoritmos de predição funcional e estabilidade;
- Construir e validar um modelo teórico completo para a FXN nativa;
- Analisar o grau de conservação evolutiva de cada aminoácido da proteína;
- Construir modelos teóricos para as variantes I154F e W155R da FXN e verificar possíveis alterações estruturais existentes em relação a forma nativa.

3 Materiais e Métodos

3.1 Obtenção da Sequência e Compilação das Variantes da FXN Humana.

A sequência da proteína FXN humana nativa foi obtida no banco de dados UniProt [Q16595]. Variantes genéticas da proteína FXN foram compiladas dos seguintes bancos de dados: UNIPROT: [PDB ID: Q16595] (BATEMAN, 2019), OMIM: [OMIM ID: 606829] (AMBERGER et al., 2019), dbSNP (SHERRY et al., 2001), bem como por revisão da literatura no PubMed.

3.2 Predição Funcional e de Estabilidade das Mutações.

Os métodos de predição funcional utilizam diferentes algoritmos de machine learning e bancos de dados para treinar os seus modelos. Além disso, não existe um método padrão ouro para a predição de mutações (LOUREIRO et al., 2022). Dessa maneira, a diferença observada entre os algoritmos de predição na classificação das mutações da FXN evidencia a importância do uso combinado de algoritmos para essa análise.

Dentre os algoritmos de machine learning mais utilizados, estão: Máquina de Suporte de Vetores, árvore de decisão, Redes Neurais (LÓPEZ-FERRANDO et al., 2017), e métodos Bayesianos (BROMBERG; ROST, 2007). Esses algoritmos utilizam conceitos de Inteligência Artificial, que viabilizam o aprendizado computacional baseado na detecção de padrões a partir de exemplos contidos em grandes bancos de dados (TAVARES; LOPES; LIMA, 2007). Esses algoritmos são treinados a partir de um conjunto dados que servem como exemplo, onde os casos são divididos em classes associadas a um conjunto de variáveis ou atributos, visando, assim, detectar padrões nas variáveis que estejam associados à classe em questão. A partir das relações (padrões) aprendidos na etapa de treinamento, esses algoritmos conseguem realizar predições sobre novos casos com relativa precisão (BATISTA; MONARD, 2003).

O algoritmo PMUT é treinado em um conjunto de dados extraído do banco de dados SwissProt utilizando como método de aprendizado, as Redes Neurais a fim de analisar parâmetros como a conservação evolutiva do resíduo de aminoácido substituído, informações sobre a proteína e as propriedades físico-químicas (LÓPEZ-FERRANDO et al., 2017).

Já o algoritmo SNAP, por sua vez, utiliza o método de Redes Neurais afim de fazer as análises funcionais a partir do Banco de Dados de Proteínas Mutantes, usando parâmetros para análise derivados da sequência de aminoácidos da proteína, aspectos evolutivos e estruturais da proteína como ligação a solventes e estrutura secundária (BROMBERG; ROST, 2007).

Já o algoritmo SNPs&GO, utiliza máquina de vetores de suporte para realizar suas predições, se baseando nas informações de um conjunto de dados contendo variantes neutras e deletérias provenientes do SwissVar. Nesse sentido, o algoritmo analisa a funcionalidade e o domínio afetado pela mutação, alterações de estrutura secundária e ainda a conservação evolutiva do resíduo em questão (CAPRIOTTI et al., 2013).

O algoritmo SIFT, por sua vez, se baseia no alinhamento de múltiplas sequências (PSI-blast) e na matriz de probabilidade, utilizando como base o banco de dados do dbSNP, com o objetivo de analisar características evolutivas da sequência em questão para então realizar a sua análise preditiva (KUMAR; HENIKOFF; NG, 2009).

Ao passo que o algoritmo PolyPhen-2, usa o método classificador baseado em Naïve Bayes e utiliza para seu treinamento os bancos de dados como o HumDiv e HumVar, se baseando, por sua vez em características evolutivas e estruturais como a carga eletroestática, estrutura secundária, hidrofobicidade, acesso ao solvente, quantidade de interações, superfície e volume da cadeia lateral, para realizar sua análise (ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013).

Já o algoritmo PhD-SNP utiliza o método de máquina de vetores de suporte, sendo treinado a partir de um conjunto de dados derivado do SwissProt, a fim de analisar a conservação evolutiva do aminoácido substituído na mutação (CAPRIOTTI; CALABRESE; CASADIO, 2006).

O MutPred2 usa o método baseado em Redes Neurais se baseando em um conjunto de dados derivado dos bancos HGMD, SwissVar e dbSNP. Para assim, realizar a análise preditiva, onde avalia a superfície acessível ao solvente, a estrutura secundária, ligação a metais e modificações pós-translacionais (PEJAVER et al., 2020).

O algoritmo SNAP2 também usa o método baseado em Redes Neurais, sendo por sua vez, treinado em um conjunto de dados derivado do Protein Mutant Database. A fim de analisar parâmetros como informações sobre o domínio afetado pela mutação, a conservação evolutiva, estrutura secundária, acessibilidade ao solvente e a flexibilidade (BROMBERG; ROST, 2007).

O Panther utiliza o modelo oculto de Markov, que funciona como um modelo estatístico onde um sistema é modelado com parâmetros desconhecidos a partir de parâmetros observáveis. Sendo treinado a partir do bando de dados de mutações humanas, a fim de analisar a funcionalidade da mutação e a conservação evolutiva do resíduo (SHAN et al., 2017).

Por fim, o algoritmo Predict-SNP usa a metodologia em consenso, utilizando um conjunto de dados derivados dos bancos de dados do UniProtKB e Protein Mutant, onde ele analisa a pontuação de oito algoritmos diferentes como o MAPP, nsSNPnalyser, Panther, SIFT, SNAP, PolyPhen-1, PolyPhen-2 e o Phd SNP (BENDL et al., 2014).

A sequência da proteína nativa e as variantes compiladas foram submetidas a análises de predição funcional e de estabilidade. Dez algoritmos foram utilizados para prever o efeito funcional das variantes da FXN: PolyPhen-2, SNAP2, SNP&GO, PANTHER, SIFT, SNAP, PHD-SNP, PMut, PREDICT-SNP e MutPred2.

Os algoritmos TANGO, WALTZ e LIMBO do SNPEffect4.0 foram utilizados para prever se as mutações afetam a agregação proteica, propensão amiloide e tendência de ligação à chaperonas (LOUREIRO et al., 2022). Já o algoritmo I-Mutant foi utilizado para prever o efeito das variantes na estabilidade da proteína. A análise de predição de estabilidade feita pelo I-Mutant, se aplica ao método “Support Vector Machine”, a fim de calcular a energia livre baseada em estruturas determinadas experimentalmente (CAPRIOTTI; FARISELLI; CASADIO, 2005).

3.3 Modelagem e Alinhamento Estrutural.

Métodos *in silico* possibilitam a modelagem de estruturas proteicas de forma eficiente e precisa. Dentre os métodos disponíveis, a modelagem comparativa é o mais acurado, e permite a geração de modelos da proteína com uma faixa de qualidade geral que pode se assemelhar à das estruturas de proteínas experimentais previamente determinadas (ZAFAR et al., 2016). Essa é a técnica mais dependente de informações prévias se baseia em utilizar como molde, proteínas com sequências potencialmente relacionadas e com estruturas tridimensionais já conhecidas. A estrutura experimental é selecionada de acordo com a identidade obtida entre a sequência alvo e os possíveis candidatos a molde disponíveis em banco de dados de sequência específicos (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

Já a modelagem *ab initio* não é dependente de um modelo previamente determinado, necessitando somente de informações contidas na sequência de aminoácidos da proteína em questão. O método utiliza cálculos de propriedades físico-químicas e termodinâmicas, baseados no mínimo de energia livre global, visando encontrar uma conformação com menor energia livre (mínimo global) (VERLI, 2014).

Por sua vez, a modelagem por threading usa uma biblioteca de fragmentos conhecidos, a partir da qual identifica relações existentes entre os fragmentos estruturais e as regiões correspondentes na sequência alvo. Esses fragmentos são então unidos, gerando uma estrutura tridimensional temporária. Por fim, são utilizadas simulações como as de Monte-Carlo para calcular a interação desses fragmentos entre si e gerar o modelo final (SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

O fragmento experimental da FXN humana foi obtido no Protein Data Bank (PDB) [3S4M] (ROSE et al., 2021), sendo selecionada com base na maior cobertura e identidade de sequência calculados por meio de uma busca utilizando o algoritmo Protein Blast. A maior resolução também foi levada em consideração para a escolha da estrutura, que foi utilizada como template para a modelagem comparativa. Modelos teóricos completos da proteína nativa foram construídos por modelagem comparativa, threading e/ou *ab initio* nos seguintes servidores de modelagem: SwissModel, Robetta, I-TASSER, MholLine e Raptor-X (DE OLIVEIRA et al., 2019; PEREIRA; SILVA, 2019). Modelos incompletos em termos de cobertura de sequência ou folding foram desconsiderados para análises futuras.

3.4 Validação Estrutural

A qualidade estrutural dos modelos teóricos completos da frataxina humana (FXN) foi avaliada utilizando seis algoritmos de validação: ProSa-Web, QMEAN, PROCHECK, Verify3D, ERRAT e VoronMQA. Esses algoritmos analisam a compatibilidade entre sequência e estrutura, a qualidade geral do modelo em comparação com estruturas experimentalmente determinadas, e realizam análises estereoquímicas, incluindo a verificação do gráfico de Ramachandran (De Oliveira et al., 2019). A utilização de múltiplos algoritmos garantiu maior rigor nas análises, onde o modelo teórico que obteve o maior número de aprovações nos testes de validação foi selecionado para a etapa de alinhamento estrutural.

O modelo selecionado foi alinhado estruturalmente com o fragmento experimental 3S4M utilizando o servidor TM-align (ZHANG; SKOLNICK, 2005), de forma a verificar se este possui similaridade estrutural ao *template* utilizado em sua modelagem (comparativa).

3.5 Análise de Conservação Evolutiva

O modelo validado foi submetido a uma análise de conservação evolutiva no servidor ConSurf (ASHKENAZY et al., 2016), que calcula o grau de conservação evolutiva de cada aminoácido da proteína baseado na relação filogenética existente entre a proteína alvo e suas sequências homólogas por meio de alinhamentos de múltiplas sequências (DE OLIVEIRA et al., 2019). O ConSurf tem uma escala que varia do ciano ou 1 (altamente variável), ao bordô ou 9 (altamente conservado). Resíduos de aminoácidos com importância funcional ou estrutural, são mais relevantes pra função proteica, e por isso muitas vezes conservados evolutivamente ao longo do tempo devido a uma maior pressão seletiva (CHOI; TORRALBA; WILLSKY, 2012).

Os seguintes parâmetros foram selecionados para análise: algoritmo de busca homóloga: PSI-BLAST; número de iterações: 3; Valor de corte E; 0,0001; banco de dados de proteínas: UniProt; sequência de referência: mais próxima; número de sequências de referência selecionadas: 150; identidade de sequência máxima: 95%; identidade mínima para contrapartes: 35%; método de alinhamento: MAFFT-L-INS-I; método de cálculo: Bayesiano; modelo de substituição evolutiva: melhor modelo (padrão).

3.6 Dinâmica Molecular

A simulação de dinâmica molecular (DM) trata-se de um método *in silico* de resolução de equações newtonianas de movimentos para um grupo de átomos, e ajudam a reproduzir o comportamento de proteínas em seu ambiente biológico (KNAPP et al., 2011). As coordenadas atômicas e velocidades calculadas para o sistema simulado são registradas ao longo do tempo no arquivo de trajetória, e assim fornecem informações detalhadas sobre as mudanças conformacionais e as flutuações das proteínas de acordo com o tempo. O arquivo de trajetória é então analisado para avaliar parâmetros bioquímicos e estruturais como flexibilidade estrutural (KHAN et al., 2016). As

simulações MD podem reproduzir o comportamento real de uma proteína em seu ambiente natural, possibilitando o estudo de processos biomoleculares como mudança conformacional, dobramento da proteína e ligação aos ligantes, além de prever os efeitos de perturbações como mutação, fosforilação e protonação na estrutura da proteína (KNAPP et al., 2011).

As mutações I154F e W155R foram induzidas individualmente por mutagenese *in silico* no modelo validado da FXN nativa utilizando o Mutator Plugin 1.3 (GAJULA et al., 2014) do software Visual Molecular Dynamics (VMD) 1.9.3 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996). O pacote GROMACS 2018.3 foi utilizado para as simulações de Dinâmica Molecular (DM) (ABRAHAM et al., 2015) da proteína nativa e variantes. Seguindo a metodologia previamente descrita pelo nosso grupo (DUARTE et al., 2022; PEREIRA; DE AZEVEDO ABRAHIM VIEIRA; DE MESQUITA, 2021), as simulações foram realizadas em triplicatas utilizando o campo de força AMBER99SB-ILDN. Este campo de força descreve com precisão muitas propriedades estruturais e dinâmicas de proteínas (FREZZA; MARTIN; LAVERY, 2018). Inicialmente, as moléculas foram solvatadas em uma caixa triclínica e preenchida com moléculas de água TIP3P. O sistema foi neutralizado pela adição de íons Na^+ e Cl^- sob uma concentração de 0.15mol/L. Em seguida, este teve sua energia minimizada pelo método *steepest descent* (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008). O sistema minimizado foi então submetido a ensembles NPT (número constante de partículas, pressão e temperatura constantes) e NVT (número, volume e temperatura constantes), os quais foram realizados durante 100ps sob pressão constante de 1atm e temperatura de 300K. Após a simulação NPT, simulações de DM foram realizadas em triplicatas por 300ns sob uma temperatura de 300K (DA SILVA et al., 2024; PEREIRA; ABRAHIM-VIEIRA; DE MESQUITA, 2023).

As trajetórias DM foram analisadas comparativamente, usando os seguintes programas de distribuição GROMACS: *gmx trjcat*, *gmx trjconv*, *gmx rms*, *gmx rmsf*, *gmx gyrate*, *gmx sasa*, *gmx hbond*, *gmx mindist*, *gmx distance*, and *gmx gangle*, para os seguintes parâmetros: desvio quadrático médio (RMSD, do inglês: “*Root-Mean-Square deviation*”), flutuação Quadrática Média (RMSF, do inglês: “*Root-Mean-Square fluctuation*”), Raio de Giro (Rg), Número de Ligações de Hidrogênio Intramoleculares, Área de Superfície Acessível ao Solvente (SASA, do inglês: “*Solvent Accessible Surface Area*”) e *Bfactor*. Também foi realizada uma análise de componentes principais (PCA, do inglês: “*Principal Component Analysis*”) para FXN nativa e suas variantes. Os

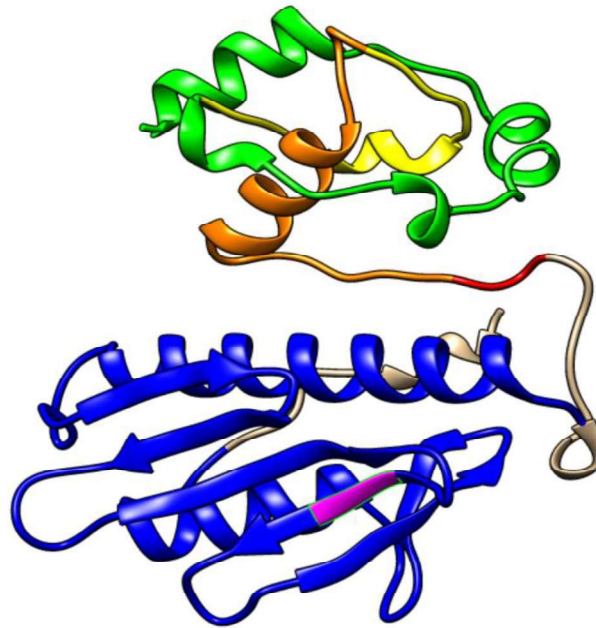
movimentos rotacionais e translacionais foram removidos para a construção das matrizes de covariância. O PCA foi realizado sobre os átomos Ca, que tiveram suas coordenadas cartesianas usadas para gerar as matrizes de covariância. O pacote Bio3D (GRANT et al., 2006) disponível no software R (GRANT et al., 2006) foi utilizado para as análises de PCA. A visualização dos dados foi realizada com auxílio do pacote ggplot2 (WICKHAM, 2011) em R e do software UCSF Chimera (GODDARD; HUANG; FERRIN, 2005).

4 Resultados e Discussão

4.1. Obtenção da Sequência e Compilação das Variantes da FXN Humana.

A sequência da FXN nativa obtida no UniProt está completa, contando com 210 aminoácidos (AGARWALA et al., 2017). A FXN é inicialmente codificada no núcleo, sendo então endereçada ao interior das mitocôndrias. Esse processo ocorre em duas etapas e depende da ação da enzima peptidase de processamento mitocondrial (MPP). Essa enzima cliva inicialmente o peptídeo de transição (resíduos 1 – 41), responsável pelo endereçamento mitocondrial, contido na porção N-terminal da frataxina, removendo-o e gerando uma forma intermediária da enzima (resíduos 42 – 210). Posteriormente, a forma intermediária da frataxina pode ser clivada em três sítios diferentes, dando origem a formas maduras distintas da proteína: FXN56, FXN78 e mFXN (FXN81). As formas maduras da FXN recebem o nome da posição em que ocorre a segunda clivagem pela enzima MPP. O estudo de Schmucker e colaboradores, 2008, sugere que a forma predominante da enzima seja a mFXN (FXN81). As demais formas maduras, FXN56 (resíduos 56 – 210) e FXN78 (resíduos 78 – 210), são produzidas no processo anormal de maturação e não se sabe ao certo sua relevância fisiológica (SCHMUCKER et al., 2008). As diferentes regiões envolvidas no processamento da frataxina são mostradas na Figura 5.

A



B

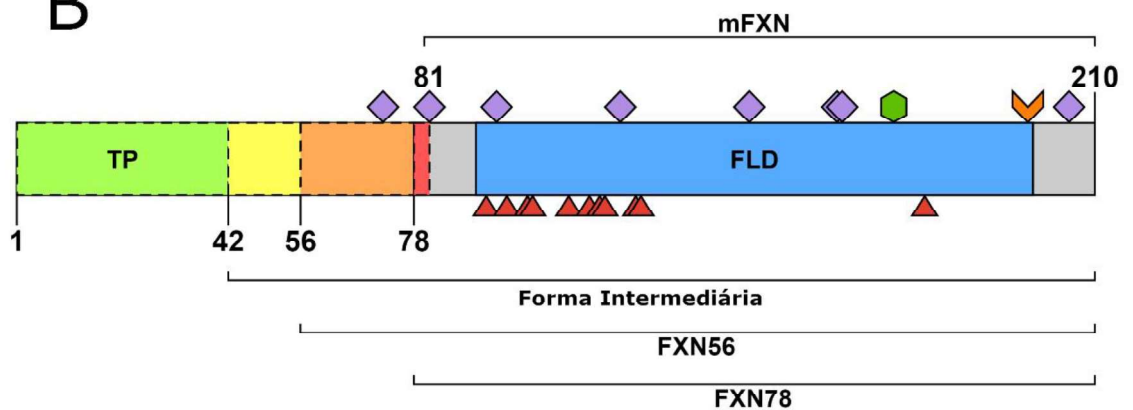


Figura 5. Estrutura tridimensional e representação esquemática dos domínios.

(A) Estrutura tridimensional da proteína FXN humana completa e seus domínios representados como no esquema logo abaixo, além dos resíduos com as mutações I154F e W155R destacados em rosa. (B) O esquema da proteína foi desenhado utilizando o software IBS (<http://ibs.biocuckoo.org/>). A sequência nativa da proteína é mostrada junto com domínios funcionais e resíduos relevantes para sua função. O peptídeo de transição está colorido em verde, ao passo que o domínio semelhante a frataxina está colorido em azul. As regiões que compõem as formas intermediária, FXN56, FXN78, FXN81 foram delimitadas pelos colchetes e destacadas em amarelo, laranja e vermelho, respectivamente. A forma madura da proteína está destacada pelo colchete que vai do aminoácido 81 até o 210. Os triângulos vermelhos representam os sítios de ligação a ferro, os losângulos roxos representam os sítios de fosforilação, os hexágonos verdes representam os sítios de acetilação, ao passo que a seta laranja representa sítios de ubiquitinação. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Segundo o Pfam, a proteína frataxina possui um domínio conservado, chamado de domínio semelhante a frataxina (FLD), que contém os resíduos de 90 a 198. Esse domínio é encontrado em frataxinas eucarióticas e na proteína homóloga à frataxina, a CyaY de *E. SCHMUCKER et al.*, 2008. Semelhante a frataxina, a CyaY é uma proteína envolvida na síntese de clusters ferro-enxofre e no metabolismo do ferro (AGARWALA et al., 2017). Uma vez que o ferro se acumula nas mitocôndrias na ausência ou defeitos na proteína frataxina, acredita-se que a frataxina possua um papel central na homeostase do ferro. Devido a função fisiológica da frataxina, acredita-se que a ligação dessa proteína a ferro seja essencial para que esta consiga desempenhar sua função biológica (SIRANO et al., 2000). De acordo com Sirano et al. (2000) e Huang et al. (2008), os seguintes resíduos da frataxina podem se ligar a ferro: E92, E96, E100, E101, E108, D112, D115, E121, D122, D124 e H177 (HUANG; DIZIN; COWAN, 2008; SIRANO et al., 2000).

A proteína frataxina pode ser fosforilada pela tirosina quinase, majoritariamente no sítio Y118, promovendo a subsequente ubiquitinação da proteína, um sinal para sua degradação (CHERUBINI et al., 2015). Além disso, outros oito sítios de fosforilação também já foram identificados na proteína, conforme mostrado na Figura 1, incluindo: S72, S81, T94, Y118, Y143, S160, S161 e Y205 (HORNBECK et al., 2015). Além disso, a posição K171 da frataxina é um sítio de acetilação, ao passo que posição K197 é um sítio de (HORNBECK et al., 2015).

Ao todo, foram compiladas 226 variantes genéticas da FXN humana (S1_Table), sendo que a maior parte delas ainda não teve seus efeitos caracterizados. Apenas 18 mutações já foram caracterizadas na literatura e nos bancos de dados consultados. Dez mutações são deletérias: M1I, R40C, L106S, G130A, G130V, N146K, I154V, I154F, W155R, W173G, ao passo que oito mutações são neutras: A14E, L33V, T44N, T44I, R60H, M76V, D178E e D209G, pois não afetam regiões críticas para a estrutura e função da proteína ou resultam na substituição de aminoácidos por outros com características físico-químicas semelhantes. (SHERRY et al., 2001).

Todas as mutações apontadas como deletérias, estão associadas ao desenvolvimento de FRDA (AGARWALA et al., 2017). Nesse sentido, 208 mutações ainda não tiveram seus efeitos determinados, o que corresponde a vasta maioria das mutações conhecidas da FXN humana. As mutações compiladas estão distribuídas de forma homogênea ao longo de toda a sequência da proteína, afetando de forma semelhante os domínios funcionais da FXN. Este artigo oferece a mais extensa

compilação de variantes da frataxina disponível na literatura até o momento, reunindo dados essenciais para o avanço no entendimento das mutações associadas a essa proteína.

Foram verificadas usando os bancos dados as mutações que ocorrem nos sítios relevantes da proteína como as que ocorrem em resíduos de ligação ao ferro, onde as seguintes mutações foram encontradas: E92K, E96K, E100A, E108V, E108D, D112H, D112Y, D112A, D115E, D122Y, H177Y. Por outro lado, as mutações: S81T, T94A, Y118C, S160C, S160T, S160R, estão em sítios importantes de fosforilação. Além disso, as mutações K171E e K171R ocorrem no sítio de acetilação, e a K197R no sítio de sumoilação da FXN.

4.2. Predição Funcional e de Estabilidade das Mutações.

Nessa etapa, foram usados dez algoritmos de predição funcional, para prever os efeitos neutros ou deletérios das mutações *missense* na função da FXN (S2_Table). Dentre eles o PopyPhen-2, SIFT, PANTHER e o SNAP2, obtiveram 100% de acerto dentre as 10 mutações sabidamente deletérias, seguidos pelo SNAP com 90%, o PredictSNP, SNP&GO e o PMut com 80%. Já os algoritmos PhD-SNP e Mutpred2, obtiveram 70% e 30% de acerto em suas predições, respectivamente.

Os algoritmos SNAP2 e MutPred2 obtiveram uma alta taxa de predição deletéria considerando a análise de todas as mutações, com respectivamente, 75 e 85% das variantes preditas por estar nessa classe (Figura 6A). Por outro lado, o PhD-SNP apresentou uma baixa taxa de predições deletérias, classificando apenas 25% das mutações como danosas.

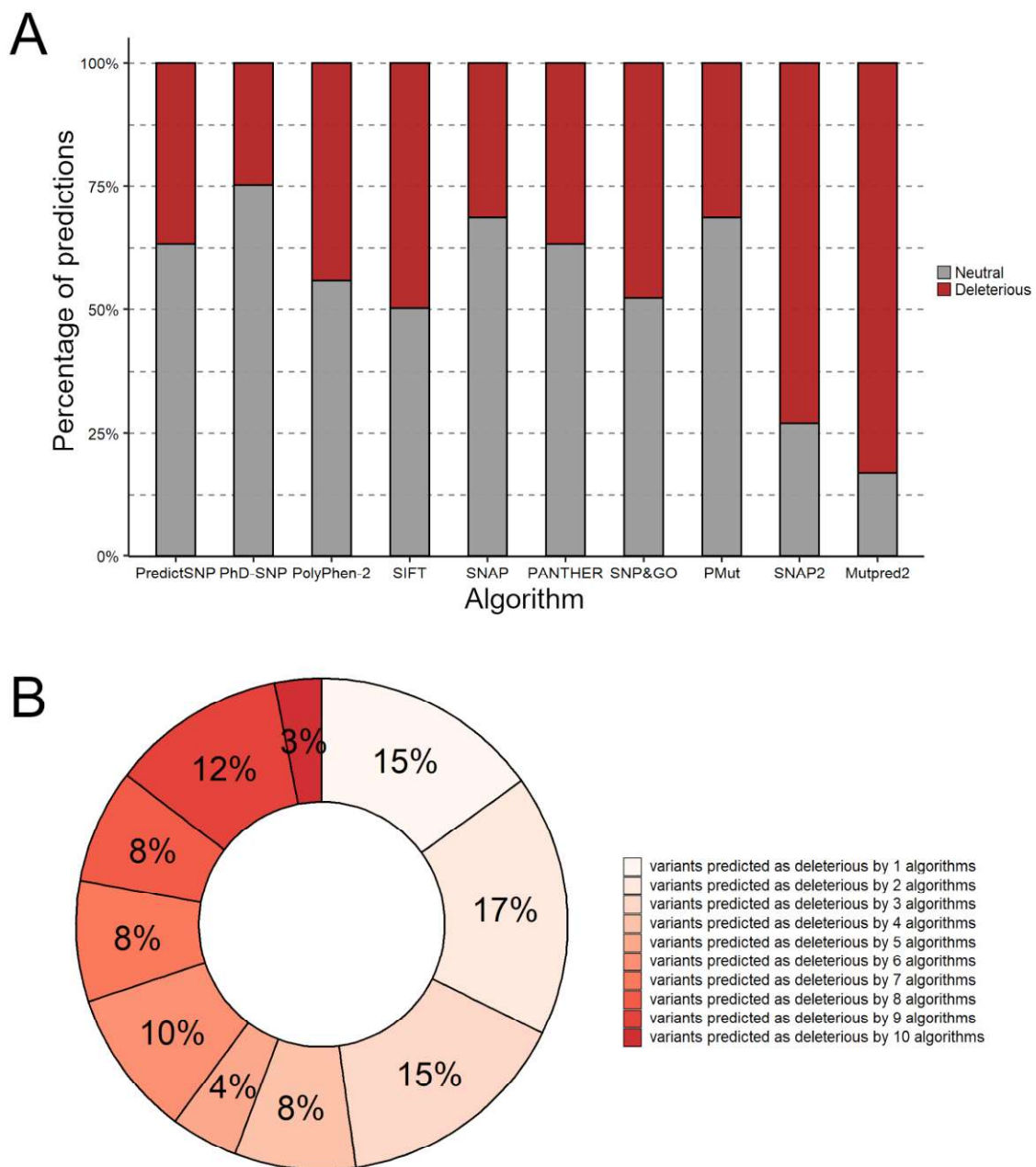


Figura 6. Predição funcional das variantes da proteína FXN humana.

(A) Predição funcional das mutações em cada algoritmo de predição funcional utilizado. O número de mutações preditas como deletérias é mostrado em vermelho, ao passo que o número de mutações preditas como neutras é mostrado em cinza. (B) Taxa de predições deletérias para as mutações estudadas.

Nesse sentido, aplicados uma abordagem consenso para análise das mutações *missense* da FXN. Quarenta e um por cento das mutações foi predito como deletéria de forma consenso, isto é, por mais da metade dos algoritmos utilizados (≥ 6 algoritmos), como mostrado na Figura 6B. Esse achado sugere que essas mutações poderiam ser

danosas para a função da proteína, sobretudo aquelas preditas como deletérias por todos os algoritmos de predição funcional ao mesmo tempo, dado que algoritmos com parâmetros diferentes convergiram para um mesmo resultado.

Além disso, as mutações que obtiveram as maiores taxas de predições deletérias se concentraram no domínio semelhante a frataxina, domínio esse que está envolvido no metabolismo do ferro e na síntese de clusteres de ferro-enxofre. O domínio semelhante a frataxina, está localizado entre os resíduos 90-198, intervalo onde se encontram a maior parte dos resíduos de ligação ao ferro e outros sítios de modificações pós-translacionais (Figura 5B), como a fosforilação, que é indispensável para a degradação da frataxina (SCHMUCKER et al., 2008).

A análise do SNPeffect, que avalia a tendência a agregação proteica, propensão amiloide, e a tendência de ligação à chaperonas através dos algoritmos TANGO, WALTZ e LIMBO (S3_Table) (DE BAETS et al., 2012), (Figura 7A). Por sua vez, indicou que nove mutações aumentaram a propensão amiloide (WALTZ): V68I, V73A, E108D, D112A, D122Y, L156I, V174A, V174L, H183R, ao passo que outras oito mutações foram classificadas por aumentar a agregação proteica (TANGO) da FXN: A10V, G11V, M76V, E108V, G130A, G130V, D139V e H177Y. Esses mecanismos são centrais na patofisiologia de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer, Parkinson e doença de Huntington. Nenhuma mutação foi predita por diminuir ou aumentar a ligação à chaperonas. (LOUREIRO et al., 2022; PEREIRA; DE AZEVEDO ABRAHIM VIEIRA; DE MESQUITA, 2021).

A análise de predição de estabilidade no I-Mutant (S3_Table e Figura 7B) sugeriu que a maior parte das mutações afetou a estabilidade da proteína. Cinquenta e dois por cento das mutações foram preditas por reduzir a estabilidade da proteína, ao passo que aumento de estabilidade foi considerado um fenótipo raro, dado que apenas 1% de todas as mutações foram preditas nessa classe. Alterações de estabilidade ocasionadas por mutações *missense*, como observado em mais da metade das mutações analisadas, podem impactar a função da proteína tanto por aumentar ou diminuir a estabilidade. Alterações de estabilidade podem prevenir mudanças conformacionais requeridas para a função da proteína, incluindo aquelas envolvidas em modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína (SANAVIA et al., 2020).

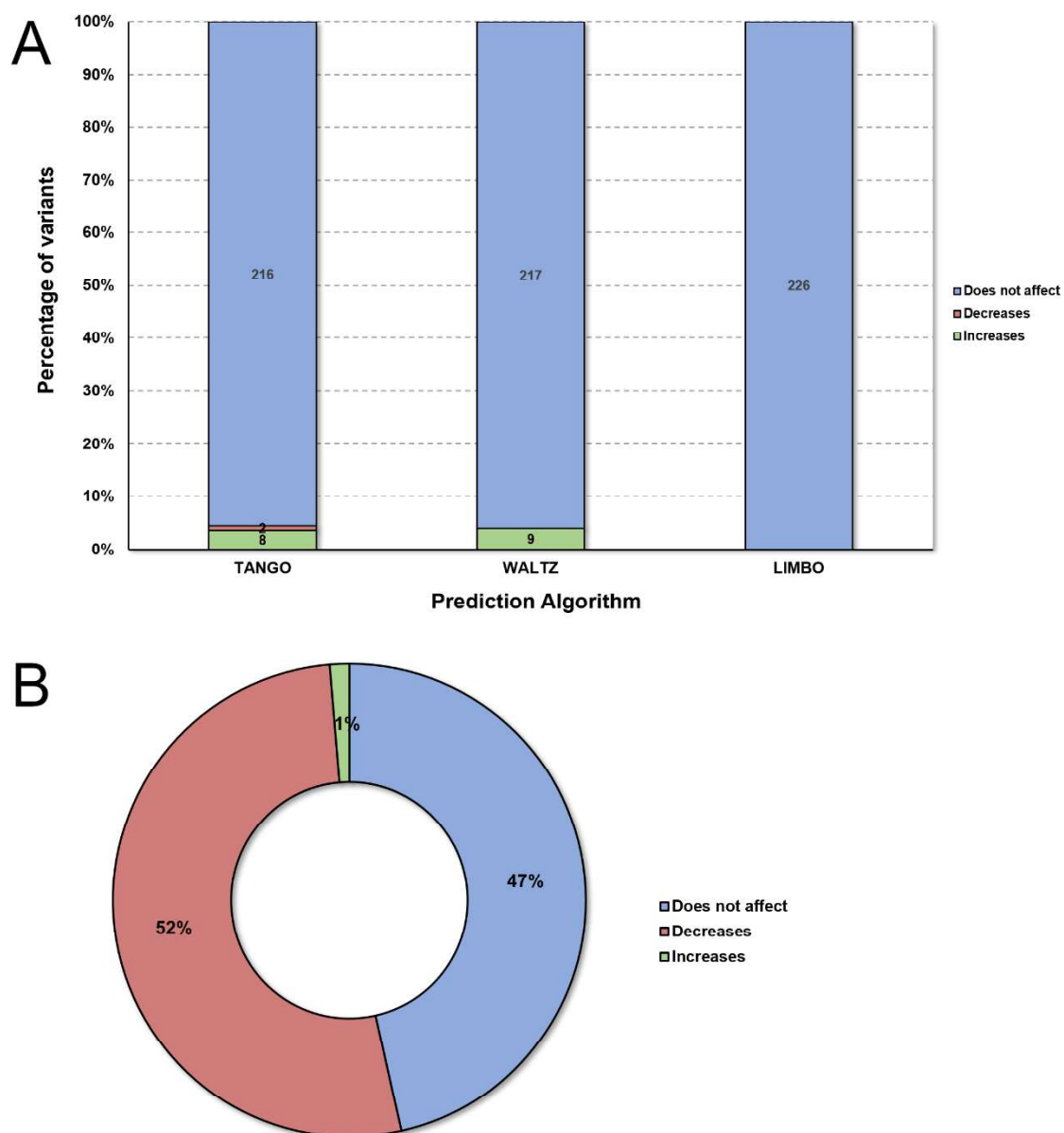


Figura 7. Predição de estabilidade e SNPEffect4.0 em mutações missense na proteína FXN.

(A) As mutações missense da FXN foram compiladas e submetidas ao WALTZ (propensão amilóide), TANGO (tendência a agregação proteica), LIMBO (ligação a chaperonas) algoritmos do SNPEffect4.0. (B) O gráfico mostra a porcentagem de mutações que alteram a estabilidade da proteína de acordo com I-Mutant3.0.

4.3. Modelagem e Alinhamento Estrutural.

A FXN humana teve apenas parte da sua estrutura determinada experimentalmente por cristalografia de raios-X até o momento (ROSE et al., 2021), de forma que somente a porção final da proteína, contendo os aminoácidos 89-210 possui uma estrutura tridimensional determinada experimentalmente. Conhecer as estruturas tridimensionais de proteínas, se faz necessário visto que melhoram a compreensão de

processos biológicos que cercam a proteína em questão. Isso poderia levar a um melhor entendimento da atividade, relação estrutura-função, e interação com outras moléculas (KREBS; DE MESQUITA, 2016). Sendo assim, um modelo teórico completo da proteína foi construído, utilizando modelagem *in silico*.

Dentre os fragmentos experimentais disponíveis no PDB para a FXN humana, o fragmento 3S4M apresentou maior resolução (1,30Å), cobertura (61%), e identidade (100%) de sequência, e foi, portanto, selecionado para as etapas seguintes.

Foram gerados ao todo, 13 modelos teóricos da FXN, desses somente os modelos gerados pelo servidor Robetta se apresentaram completamente modelados e enovelados (Tabela 1), e, portanto, foram os utilizados nas etapas seguintes de validação. Os cinco modelos do Robetta foram então alinhados no *TM-align* (ZHANG; SKOLNICK, 2005) e obtiveram alta similaridade estrutural com o fragmento experimental da 3S4M, dado seus valores de RMSD e TM-score como mostrado na Tabela 2. O RMSD e TM-score são parâmetros de similaridade estrutural, onde modelos similares estruturalmente aos seus *templates* apresentam RMSD <2 angstrom e TM-score >0.5 respectivamente (KREBS; DE MESQUITA, 2016).

Tabela 1. Modelagem estrutural da proteína fra taxina humana.

Algoritmo	Modelo (#)	Tamanho do Modelo	Enovelamento do Modelo
Rosetta	1	210	Completo
Rosetta	2	210	Completo
Rosetta	3	210	Completo
Rosetta	4	210	Completo
Rosetta	5	210	Completo
~~I-Tasser~~	1	210	~~Incompleto~~
~~I-Tasser~~	2	210	~~Incompleto~~
~~I-Tasser~~	3	210	~~Incompleto~~
~~I-Tasser~~	4	210	~~Incompleto~~
~~I-Tasser~~	5	210	~~Incompleto~~
~~Raptor-X~~	1	210	~~Incompleto~~
~~MholLine~~	1	210	~~Incompleto~~
~~SwissModel~~	1	~~168~~	Completo

Os modelos com tamanho e/ou enovelamento incompleto foram tachados na tabela.

Tabela 2. RMSD e TM-Score calculado a partir do alinhamento estrutural com o fragmento 3S4M.

Algoritmo	Modelo	RMSD	TM-Score
Rosetta	1	0.59	0.98055
Rosetta	2	0.67	0.97807
Rosetta	3	0.59	0.98093
Rosetta	4	1.53	0.90771
Rosetta	5	0.70	0.97564

4.4. Validação Estrutural

A qualidade estrutural dos modelos completos, isto é, aqueles gerados pelo servidor Robetta, foram analisados utilizando algoritmos de validação (Tabela 3).

O ProSa-Web estima a qualidade geral de um modelo, o Z-score, com base na avaliação da energia potencial da estrutura tridimensional. O Prosa-Web calcula o Z-score de todas as estruturas contidas no Protein Data Bank e plota esses valores em um gráfico, que contém a distribuição de valores de Z-score esperada para estruturas experimentais determinadas por cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear, Figura 8A. Por fim, o algoritmo calcula e inclui o valor de Z-score para a proteína de interesse nesse gráfico (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

O QMEAN usa seis descritores físico-químicos a fim de estimar a qualidade geral de determinada estrutura (QMEAN-score). Tal pontuação QMEAN é calculada para a estrutura alvo e disposta em um gráfico, contendo os valores da QMEAN-score para 9766 estruturas de proteínas de alta resolução (BENKERT; KÜNZLI; SCHWEDE, 2009), visto na Figura 8B.

O servidor PROCHECK, por sua vez, dispõe os resíduos em um gráfico chamado gráfico de Ramachandran, Figura 8C. Nesse gráfico, cada resíduo da proteína é alocado em diferentes regiões com base na disposição dos seus ângulos phi e psi. A validação estrutural depende do número de resíduos dispostos em regiões favoráveis no gráfico, isto é, regiões coloridas em vermelho. Estruturas que apresentam mais de 90% de seus resíduos alocados nessas regiões são validadas pelo servidor (LASKOWSKI et al., 1996).

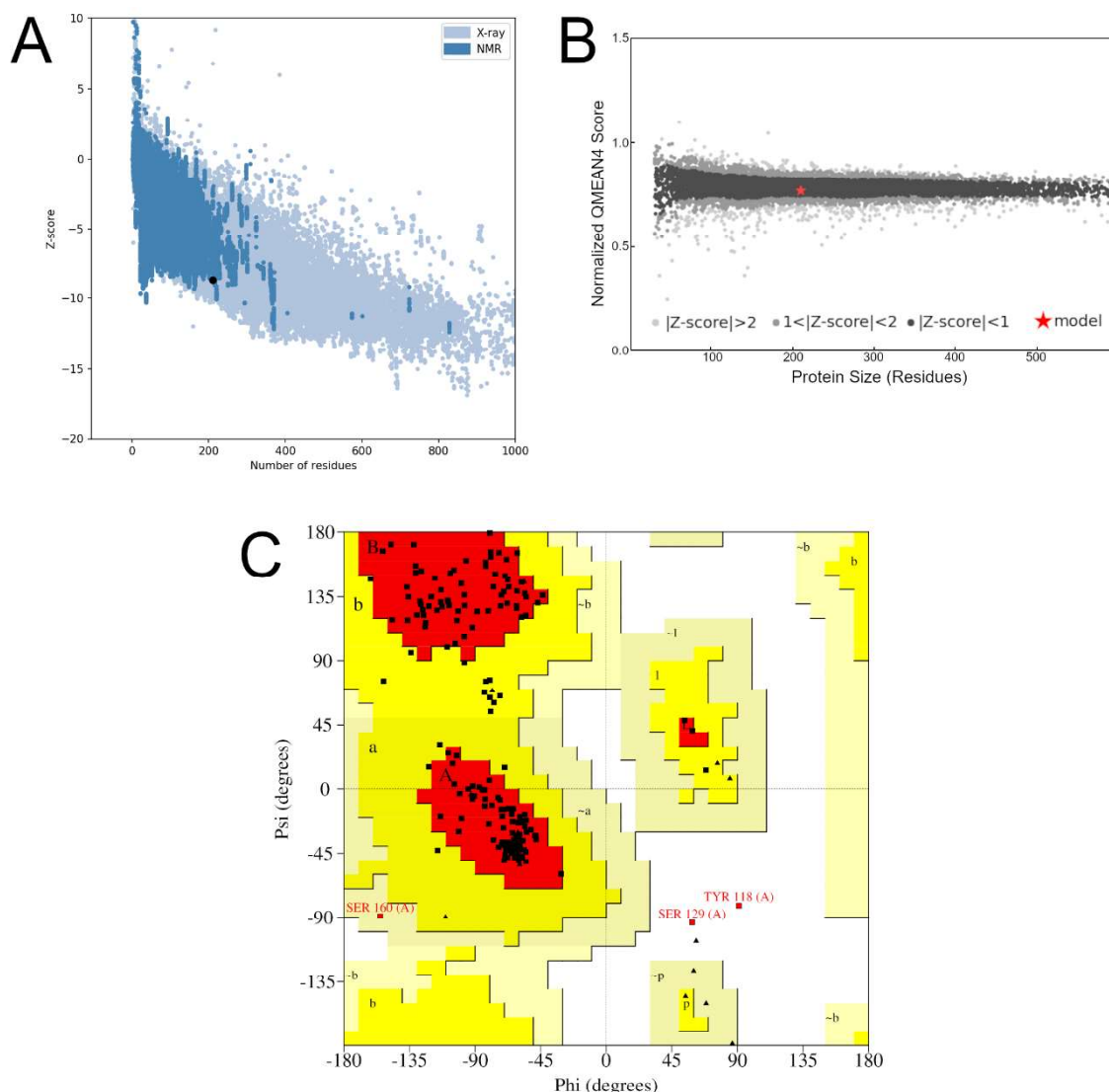


Figura 8. Validação do modelo Gerado.

(A) Validação do modelo4_robeta no servidor ProSa-web. Número de resíduos é representado no eixo X, e o z-score da estrutura está representado no eixo Y. A estrutura submetida no servidor corresponde ao ponto preto, a região azul mais claro corresponde as estruturas já determinadas por difração de raios-x e a região representada em azul mais escuro corresponde a estruturas determinadas por NMR. (B) Gráfico de validação do modelo4_robeta no servidor QMEAN. Comprimento da estrutura em número de resíduos (eixo X), QMEAN-score do modelo (eixo Y). O QMEAN-score de estruturas experimentais estão dispostos em faixas de qualidade conforme seu z-score, representadas em uma faixa de normalidade com uma escala que vai do preto ao cinza no gráfico. O QMEAN-score da estrutura submetida é representada por um “x” Vermelho na imagem. (C) Gráfico de Ramachandran gerado a partir da validação do modelo4_robeta no servidor PROCHECK. Os resíduos, representados por pontos pretos, são dispostos em regiões favoráveis (vermelho), regiões permitidas (amarelo), regiões pouco permitidas (bege) e regiões não permitidas (branco).

O ERRAT identifica as regiões propensas a erro em estruturas de proteína, por meio da análise da distância de suas interações não ligadas. Baseado na distribuição observada para essas distâncias, registradas a partir de um conjunto de dados contendo 96 estruturas proteicas de alta resolução, o algoritmo estima uma probabilidade de erro para cada resíduo da proteína. Estruturas de alta resolução apresentam aproximadamente 95% de chance dos resíduos com probabilidade de erro inferior a 95%. Como mostrado na Figura 9A, o modelo teórico da frataxina humana apresentou 96.48% dos seus resíduos dentro da faixa de erro esperada, logo sendo validado (COLOVOS; YEATES, 1993).

Já o algoritmo Verify-3D, atribui para cada resíduo um valor de compatibilidade estrutural, o 3D-1D score, e mostra o resultado dessa análise em um gráfico, como visto na Figura 9B. O servidor utiliza o valor mínimo de 0,2 de 3D-1D score como ponto de corte, de forma que apenas resíduos acima desse valor sejam considerados validados. Estruturas de alta resolução, geral apresentam mais de 80% dos seus resíduos considerados aprovados pelo servidor, *i.e.*, ≥ 0.2 de 3D-1D score (LUTHY; BOWEI; EISENBERG, 1997).

O VoronQA, "Avaliação da Qualidade do Modelo baseado em diagrama de Voronoi", por sua vez, mostra uma estimativa da qualidade geral da estrutura baseado nas interações entre átomos da proteína. A partir dessas análises interatômicas, o algoritmo estima pontuações de qualidade por resíduo que são plotadas em um gráfico, como visto na Figura 9C. Utilizando as pontuações locais calculadas, o algoritmo gera um valor geral de qualidade para a estrutura. Estruturas de alta resolução geralmente apresentam pontuações globais de qualidade $\geq 0,4$ (OLECHNOVI; VENCLOVAS, 2017). O modelo validado da frataxina apresentou valor global de qualidade de 0.4, sendo assim validado.

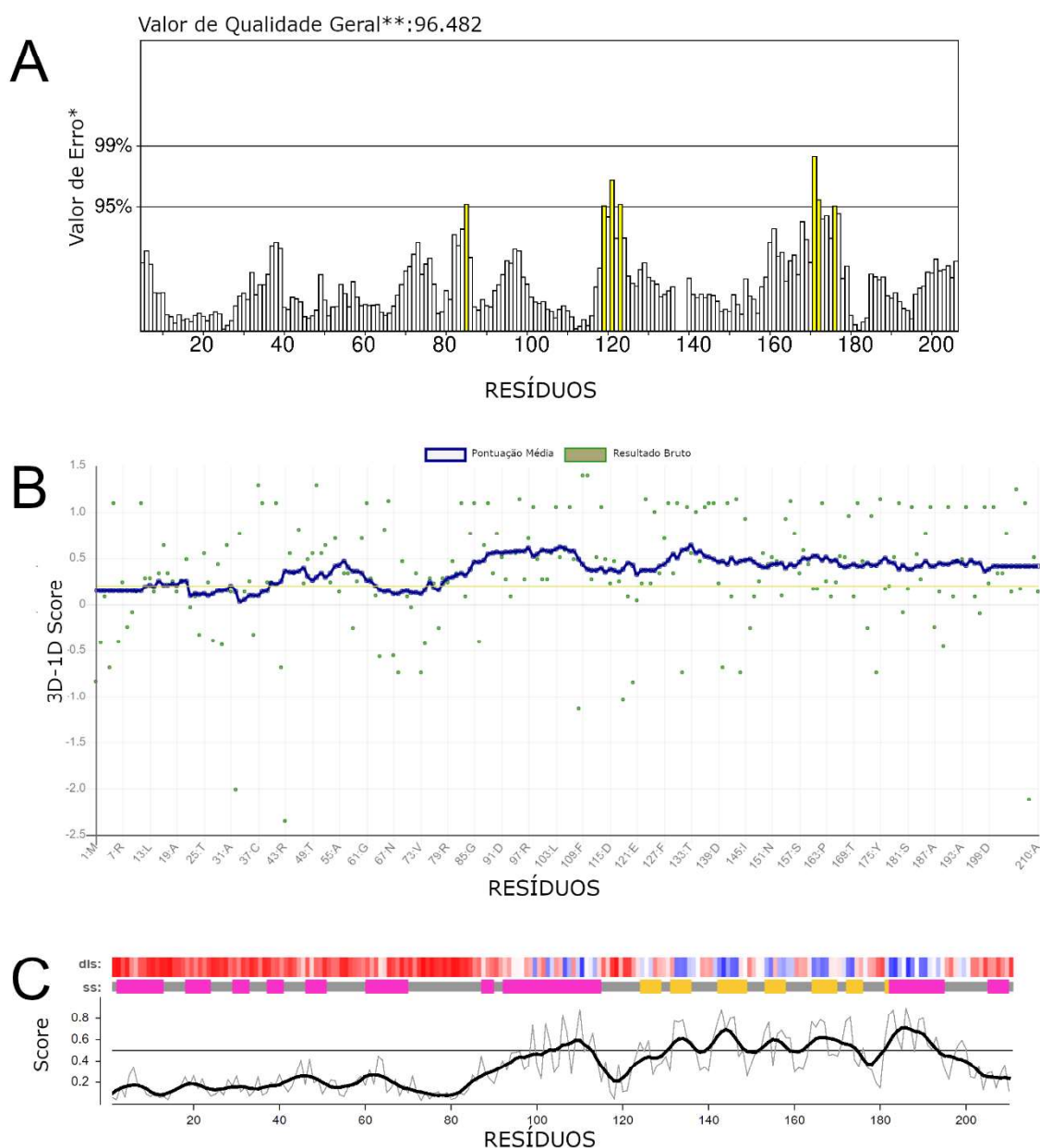


Figura 9. Validação do modelo Gerado.

(A) Gráfico de validação pelo algoritmo ERRAT, em que os resíduos estão dispostos no eixo X, e o valor de erro no eixo Y. (B) Avaliação de compatibilidade estrutural do modelo no servidor Verify-3D. Os resíduos da estrutura são mostrados no eixo X, enquanto o valor de 3D-1D score está no eixo Y. (C) Gráfico de pontuação global e por resíduos do modelo no servidor VOROMQA, onde são mostrados os scores de qualidade para cada resíduo.

Além disso, tendo em vista os valores de qualidade estrutural obtidos nos algoritmos de validação, bem como os respectivos pontos de corte para aprovação – também mostrados na Tabela 3 – o modelo 4 foi considerado validado. Essa análise indicou que o modelo 4 tem qualidade equiparável ao de estruturas determinadas experimentalmente (ProSa-Web e QMEAN), além de possuir alta qualidade

estereoquímica (PROCHECK), geométrica (ERRAT) e adequação de sua estrutura à sua sequência (Verify-3D).

Tabela 3. Validação estrutural dos modelos teóricos completos da proteína FXN.

Modelo	ERRAT ¹	PROCHECK ²	Verify-3D ³	ProSA-web ⁴	QMEAN ⁵	VoroMQA ⁶
Modelo1	99	86	100	RM	alta resolução	0.43
Modelo2	99	84	97	RM	alta resolução	0.43
Modelo3	95	87	96	RM	alta resolução	0.42
Modelo4	96	91	100	RM	alta resolução	0.40
Modelo5	98	86	93	RM	alta resolução	0.42

¹Índice de qualidade geral do ERRAT (%). Modelos de alta resolução possuem valores de qualidade $\geq 95\%$; ²Percentual de aminoácidos nas regiões mais favoráveis do gráfico de Ramachandran. Estruturas experimentais possuem $\geq 90\%$ dos seus aminoácidos localizados nessas regiões; ³Percentual de resíduos com *score* compatibilidade 3D-1D $\geq 0,2$. Estruturas experimentais possuem $\geq 80\%$ dos resíduos com 3D-1D-*score* $\geq 0,2$; ⁴A pontuação de qualidade geral, *Z-score*, estimada para o modelo está dentro da faixa de valores de *Z-score* calculados para estruturas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou difração de raios-X; ⁵O valor de qualidade geral, *QMEAN-score*, estimado para o modelo está dentro da faixa de valores de *QMEAN-score* calculados para estruturas proteicas de alta resolução; ⁶Pontuação de qualidade global do algoritmo VoroMQA. Estruturas experimentais, em geral, possuem valores de qualidade ≥ 0.4 .

O modelo final validado, bem como seu alinhamento estrutural com o fragmento experimental da 3S4M, são mostrados na Figura 10. A inspeção visual do alinhamento reafirma a similaridade estrutural entre o modelo validado e o fragmento cristalográfico da FXN humana.

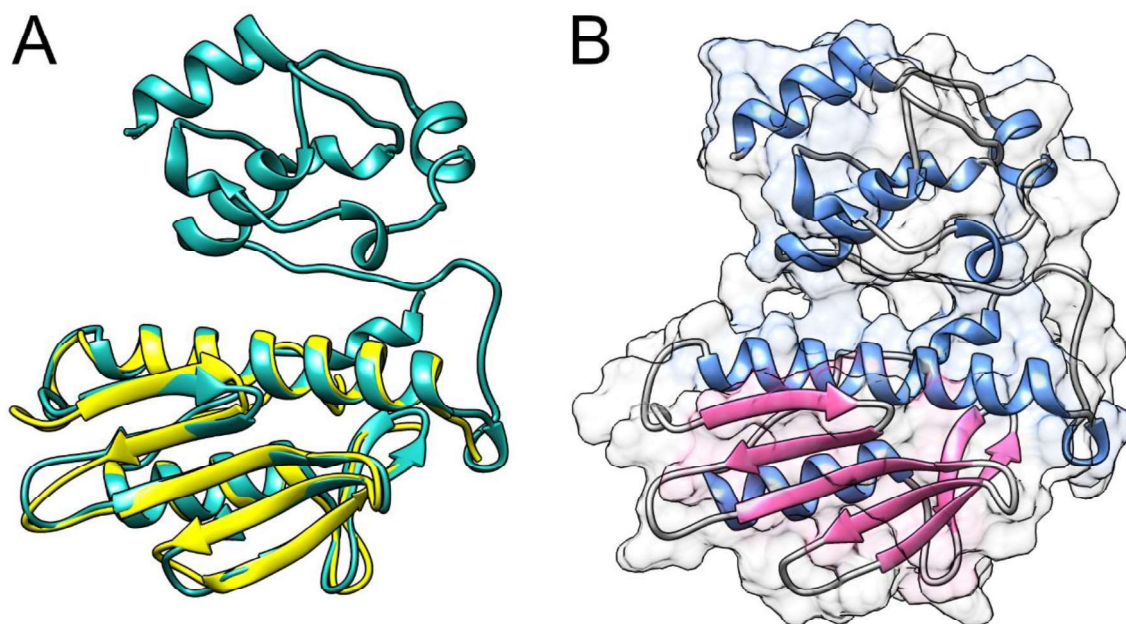


Figura 10. Modelo teórico da FXN humana gerado no servidor Robetta.

(A) Alinhamento estrutural no TM-Align do modelo 4 do Robetta e o fragmento experimental 3S4M. A estrutura tridimensional do modelo validado está representada em verde, ao passo que a estrutura do fragmento cristalográfico está representada em amarelo. (B) Modelo final validado da FXN humana. Regiões de folhas-beta estão representados por setas rosas, ao passo que as regiões de alfa-hélices estão representadas por hélices azuis. A superfície da proteína também é mostrada na figura.

4.5. Análise de Conservação Evolutiva

A superfície do modelo gerado da proteína frataxina foi colorido de acordo com a escala de codificação de cores ConSurf como mostrado na Figura 13A, com o grau de conservação evolutiva de cada aminoácido da proteína. Nesse sentido, mutações que afetam posições conservadas, tem maior probabilidade de serem prejudiciais para a proteína (PEREIRA et al., 2022).

Como mostra a Figura 13B, a análise no ConSurf indicou que a maioria das mutações na FXN, 40% ocorrem em posições conservadas (ConSurf-score ≥ 7). Por sua vez, 39% das mutações ocorrem em posições variáveis (ConSurf-score ≤ 3), e 21% ocorreram em posições de média conservação ($4 \geq$ ConSurf-score ≤ 6). Além disso, 19% das mutações na FXN tiveram um ConSurf-score igual a 9, ou seja, receberam a pontuação máxima de conservação, sendo, portanto possivelmente importantes para a função da FXN (CHOI; TORRALBA; WILLSKY, 2012).

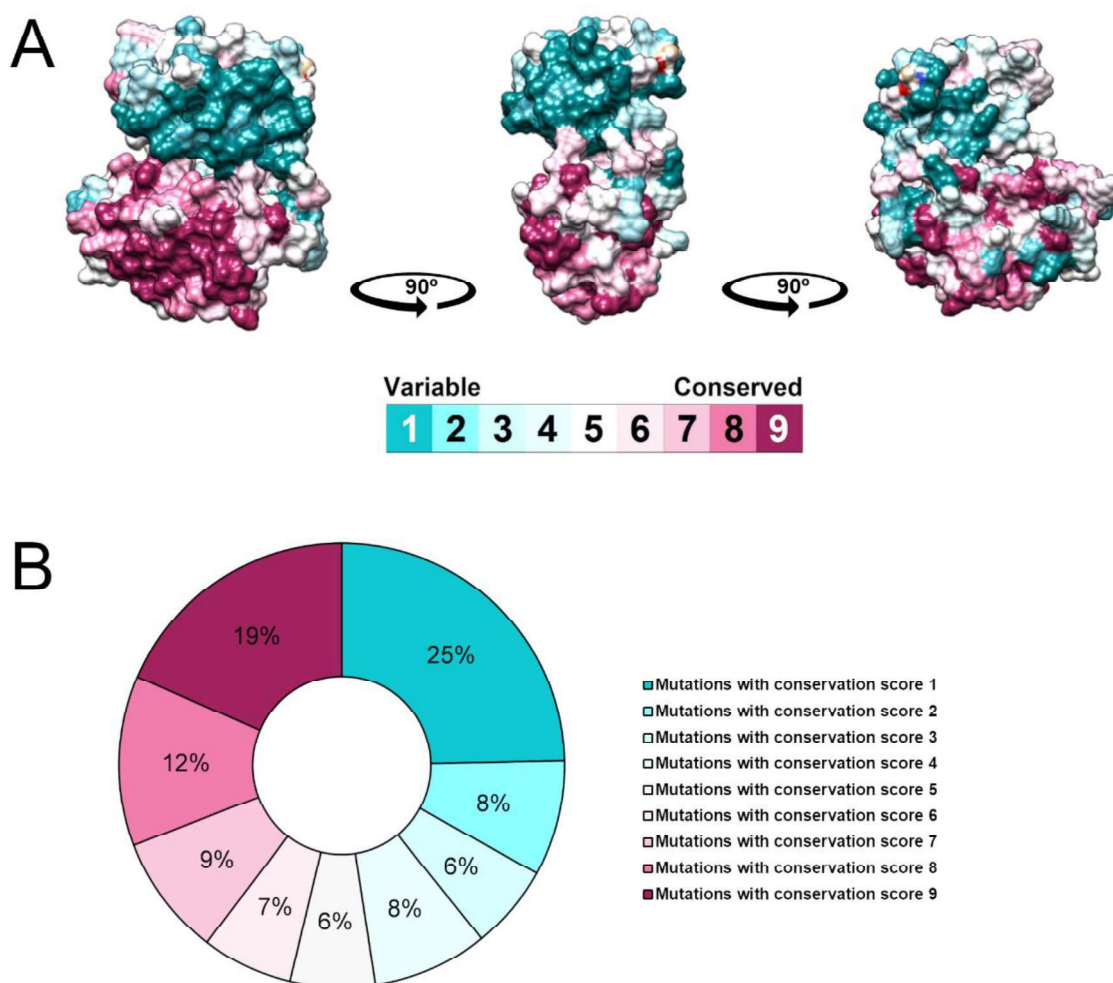


Figura 11. Análise de conservação evolutiva da proteína FXN humana no ConSurf.

(A) O grau de conservação evolutiva dos aminoácidos da proteína FXN foram representados na superfície da proteína conforme a escala colorimétrica do ConSurf, que varia de 1 e ciano (variável) até 9 e bordô (conservado). (B) Gráfico de *donut* mostrando a quantidade de mutações para cada grau de conservação evolutiva da posição afetada.

Grande parte das mutações observadas na frataxina ocorrem no domínio semelhante a frataxina (33%), onde 36 delas recebem o máximo nível de conservação do ConSurf. Isso pode ser relacionado à importância funcional deste domínio, já que nele se encontram a maior parte dos sítios de modificações pós-translacionais, como os sítios de ligação ao ferro e de fosforilação.

4.6. Dinâmica Molecular

Foram realizadas simulações de dinâmica molecular com a proteína frataxina do tipo selvagem e outras duas variantes de mutações missense com base em seu potencial patogênico, que foram: I154F e W155R, para observar melhor o impacto da substituição desses aminoácidos na estrutura da proteína.

O RMSD é a medida das diferenças espaciais entre a estrutura inicial e suas coordenadas correspondentes calculadas durante a simulação. O RMSD é usado para analisar o deslocamento atômico entre as estruturas proteicas durante uma simulação DM, e realizado pela comparação de conformações da proteína WT e suas variantes a cada etapa da simulação da dinâmica molecular. Tal parâmetro é útil para a análise do movimento em relação ao tempo das estruturas proteicas, e assim poder comparar a convergência das estruturas ao longo da simulação (MARTÍNEZ, 2015).

Os valores de RMSD foram calculados a partir do número total de conformações proteicas computadas nas trajetórias MD (MARTÍNEZ, 2015). Como mostrado na Figura 13, o tipo selvagem da FXN e as variantes I154F (Figura 13A) e W155R (Figura 13B), apresentaram um comportamento estável após um momento de instabilidade na estrutura no início da análise. Após aproximadamente 150 ns, é possível observar a formação de um platô nos valores de RMSD (PEREIRA; SILVA, 2019). O que sugere que essas proteínas estão em uma conformação média estável, o que por sua vez indica que o sistema encontrou o equilíbrio (PEREIRA; ABRAHIM-VIEIRA; DE MESQUITA, 2021).

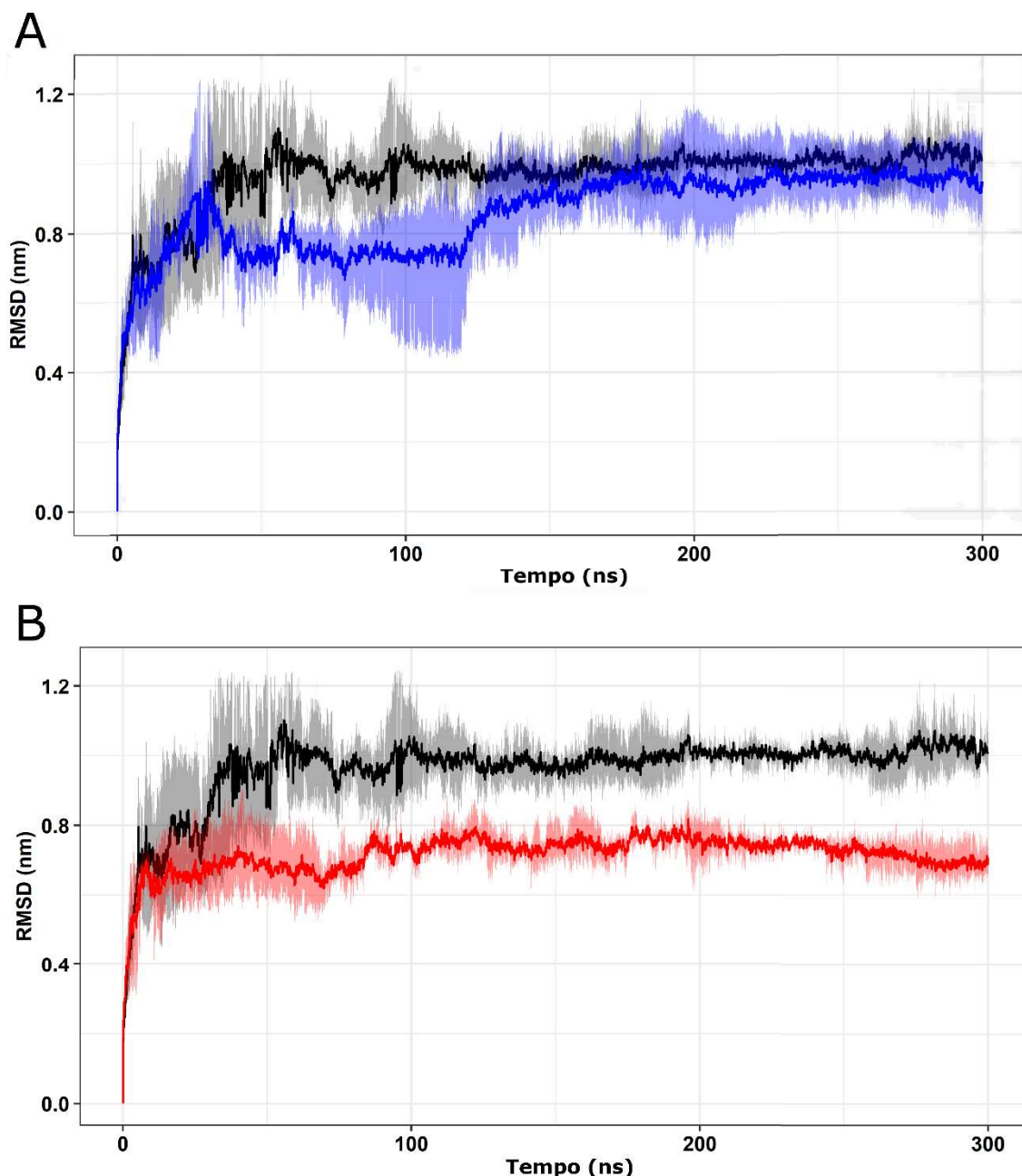


Figura 12. Análise RMSD de FXN nativa e suas variantes.

Os valores RMSD calculados para os átomos da estrutura da proteína FXN do tipo selvagem e suas variantes em 300K ao longo do tempo. As médias (linhas sólidas) e os intervalos de confiança 95% (linhas suaves) são mostradas para as triplicatas. (A) O tipo selvagem é representado em preto, enquanto a variante I154F é representada em azul. (B) O tipo selvagem é representado em preto, enquanto a variante W155R é representada em vermelho.

O R_g mede o deslocamento estrutural de átomos da proteína em seu centro de massa comum ao longo da trajetória, o que fornece informações sobre a compactação da proteína ao longo do tempo. Os valores de R_g calculados para a FXN WT e suas variantes, estão dispostos na Figura 13. As estruturas proteicas analisadas apresentaram valores

relativamente constantes de R_g , o que sugere um enovelamento estável da proteína (DUARTE et al., 2022). Os valores de média e desvio padrão de R_g para a FXN WT ($1,917 \pm 0,091$) são semelhantes aos da variante W155R ($1,968 \pm 0,095$) (Figura 13B). Já a variante I154F (Figura 13A) teve os menores valores de média e no desvio padrão, ($1,854 \pm 0,032$). Tal resultado sugere não haver alguma alteração de compactação da variante I154F analisada.

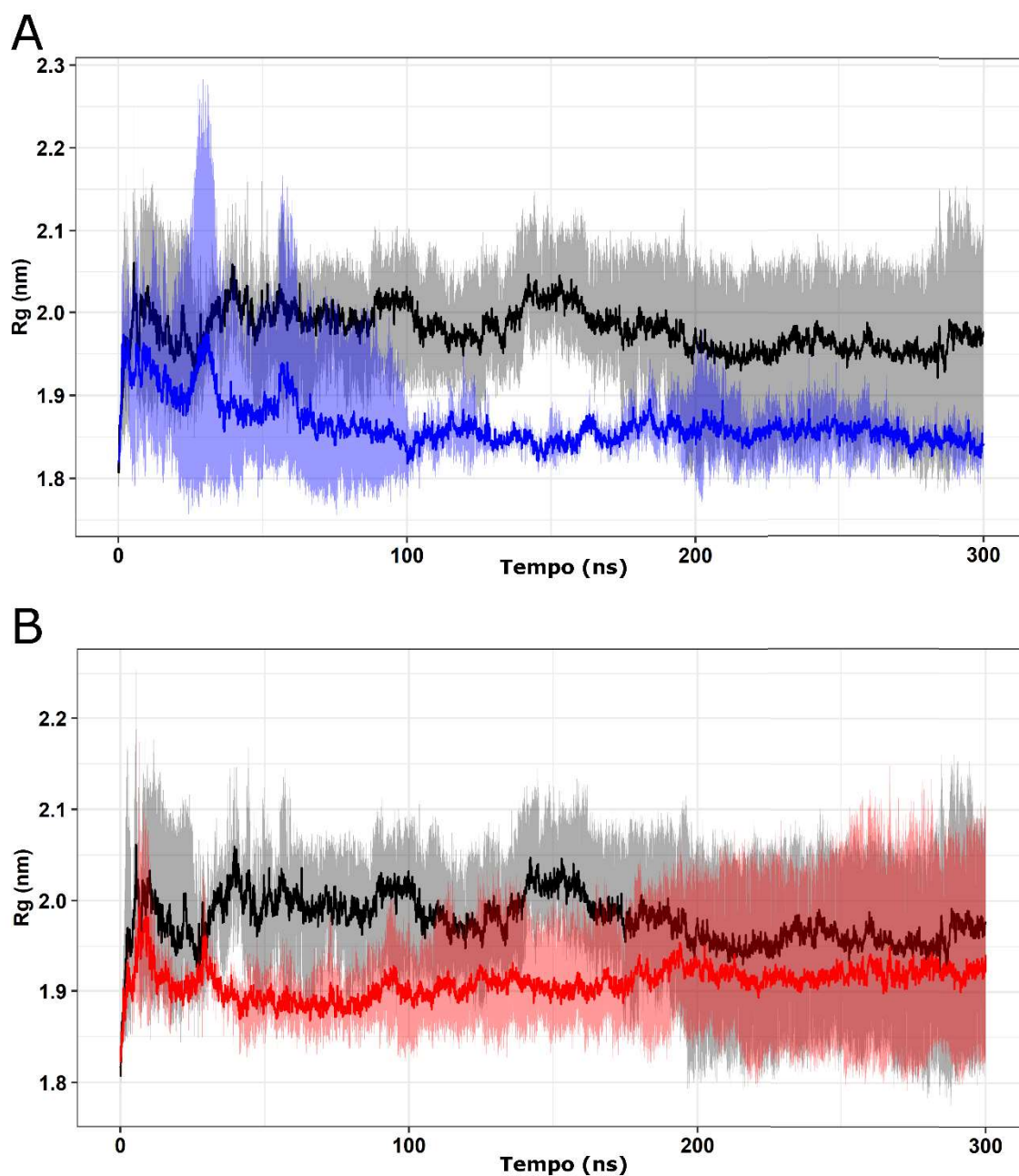


Figura 13. Análise do R_g da FXN nativa e suas variantes.

Valores de R_g da FXN nativa e suas variantes à 300K são mostradas ao longo do tempo. As médias (linhas sólidas) e os intervalos de confiança de 95% (linhas suaves) são mostradas para as triplicatas.

Sendo as médias de cada triplicata representadas pelas linhas sólidas, e nas linhas mais suaves o intervalo de confiança. (A) O tipo selvagem é representado em preto, e a variante I154F em azul. (B) O tipo selvagem é representado em preto, e a variante W155R em vermelho.

SASA mede a superfície exposta em uma estrutura proteica que pode ser, de alguma forma acessível a moléculas de solventes (SINHA et al., 2018). Fornecendo dados importantes sobre exposição da proteína ao longo do tempo em seu ambiente biológico (WANG et al., 2019). Os valores SASA calculados ao longo das simulações, mostrados na Figura 14, apontam para um comportamento estável para as variantes I154F (Figura 14A) e W155R (Figura 14B), assumindo assim um comportamento estável após 150 ns até o final das trajetórias MD. A análise indicou que os valores médios de SASA para a FXN WT ($128,0 \pm 4,7$) são semelhantes aos valores médios das variantes I154F ($127,7 \pm 3,9$) e W155R ($124,2 \pm 3,4$), indicando não haver alterações significativas que apontem para alterações na superfície proteica.

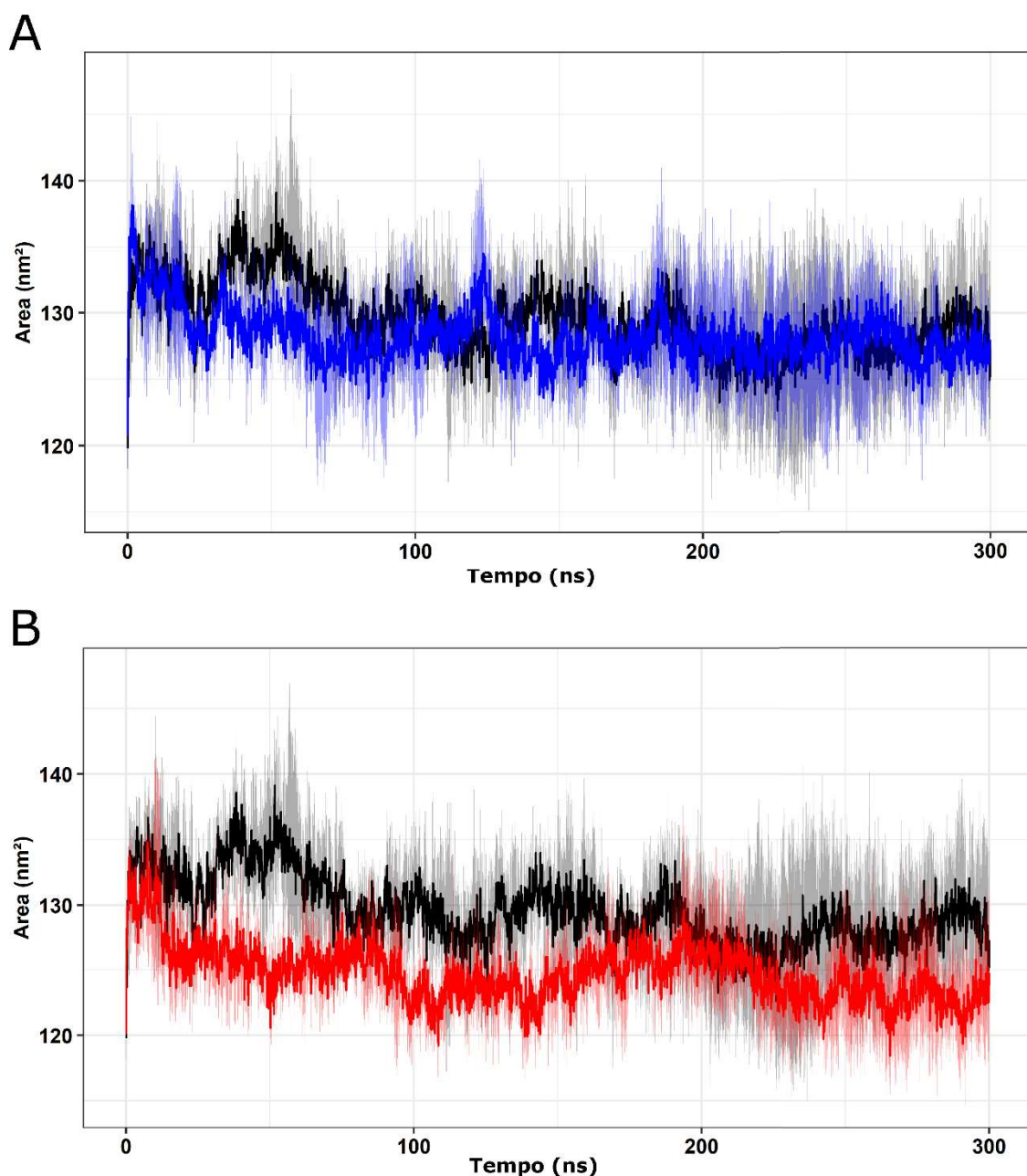


Figura 14. Análise do SASA da FXN nativa e suas variantes.

Valores de SASA da FXN nativa e suas variantes à 300K são mostradas ao longo do tempo. As médias (linhas sólidas) e os intervalos de confiança de 95% (linhas suaves) são mostradas para as triplicatas. (A) O tipo selvagem é representado em preto, e a variante I154F em azul. (B) O tipo selvagem é representado em preto, e a variante W155R em vermelho.

RMSF é um parâmetro usado para medir o deslocamento estrutural de um aminoácido com relação a sua posição média durante a simulação (PEREIRA; SILVA, 2019). O RMSF, por sua vez, avalia a flexibilidade das estruturas proteicas, levando a identificação de regiões mais flexíveis ou rígidas (CRAVEUR et al., 2015). A análise RMSF apontou aumento de flexibilidade na para a mutação I154F, Figura 15A, com maiores alterações nos domínios iniciais como no peptídeo de transição (FXN42),

FXN56, FXN78 e mFXN (FXN81). E diminuição de flexibilidade para a variante W155R, Figura 15B.

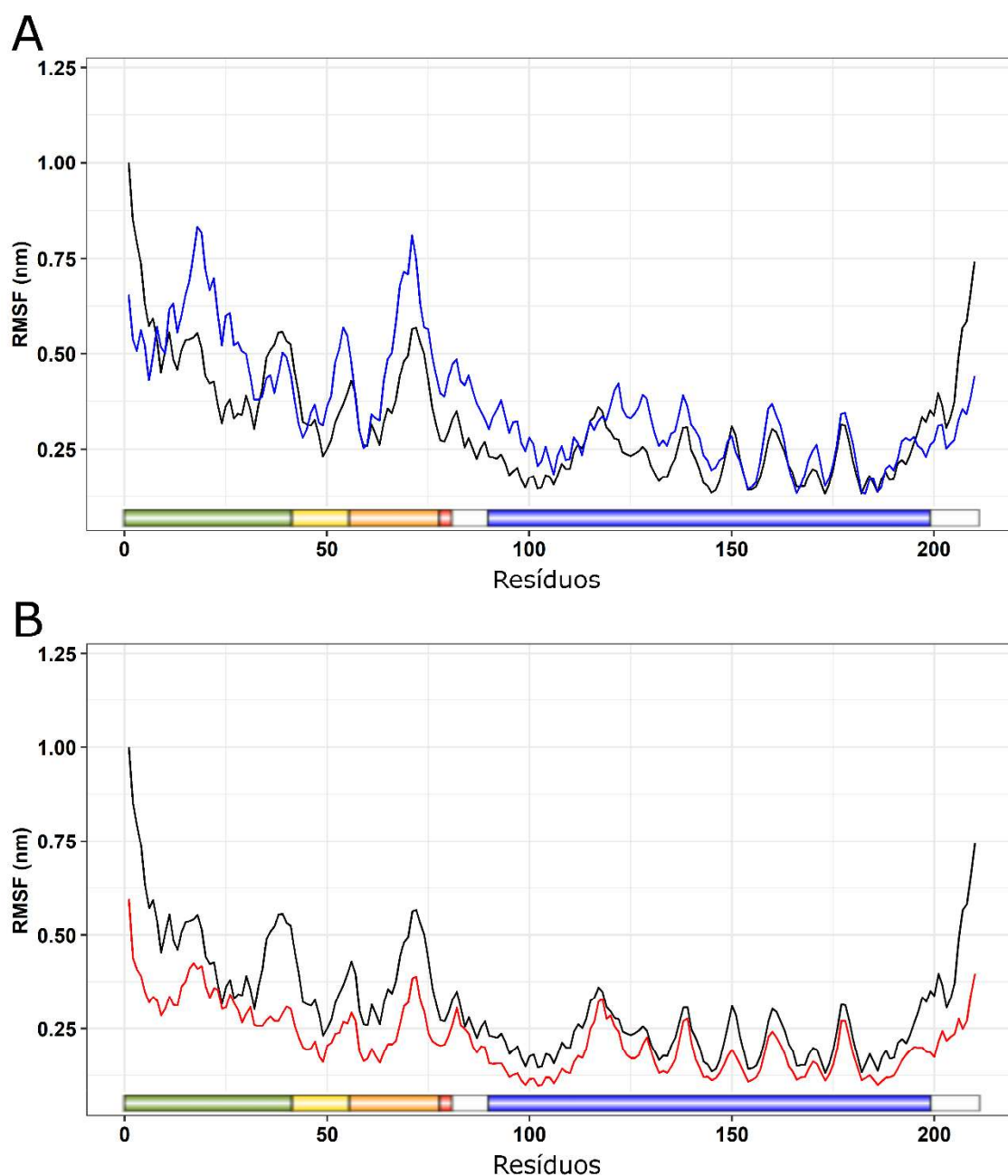


Figura 15. Análise RMSF da FXN nativa e suas variantes.

Os valores de RMSF para cada resíduo de FXN selvagem e suas variantes são mostradas em um gráfico linear, a temperatura de 300k. Logo abaixo é mostrado um esquema da estrutura da proteína selvagem onde está projetada em representações esquemáticas as regiões fundamentais da proteína. O peptídeo de transição está colorido em verde, ao passo que o domínio semelhante a frataxina está colorido em azul, e as regiões que compõem as formas intermediárias, FXN56, FXN78 e FXN81 foram destacadas em amarelo, laranja e vermelho. (A) O tipo selvagem é representado em preto, enquanto a variante I154F

é representada em azul. (B) O tipo selvagem é representado em preto, enquanto a variante W155R é representada em vermelho.

Assim como o RMSF, o Bfactor é usado para descrever a flexibilidade dos resíduos de uma proteína, sendo usado durante a simulação de DM para analisar a flexibilidade de seus resíduos (CRAVEUR et al., 2015; KUZMANIC; ZAGROVIC, 2010). Analisando o deslocamento estrutural de um aminoácido com relação a sua posição média considerando as vibrações causadas pela temperatura (KUZMANIC; ZAGROVIC, 2010). Cada aminoácido da proteína FXN teve seu valor calculado, e posteriormente foram projetados na superfície da estrutura da proteína, fornecendo, assim, uma representação tridimensional da flexibilidade estrutural da proteína (Duarte et al., 2022; Pereira & Silva, 2019).

Como mostra a Figura 16A, a variante I154F apresentou maior flexibilidade nas regiões do peptídeo de transição e FXN56, quando comparada à FXN do tipo selvagem. Já a variante W155R, Figura 16B apresentou uma menor flexibilidade na mesma região. Durante a análise do Bfactor, foram observadas alterações de flexibilidade nas duas variantes em regiões semelhantes às que foram encontradas durante a análise de RMSF, sugerindo então uma alteração na flexibilidade da proteína com as duas variantes.

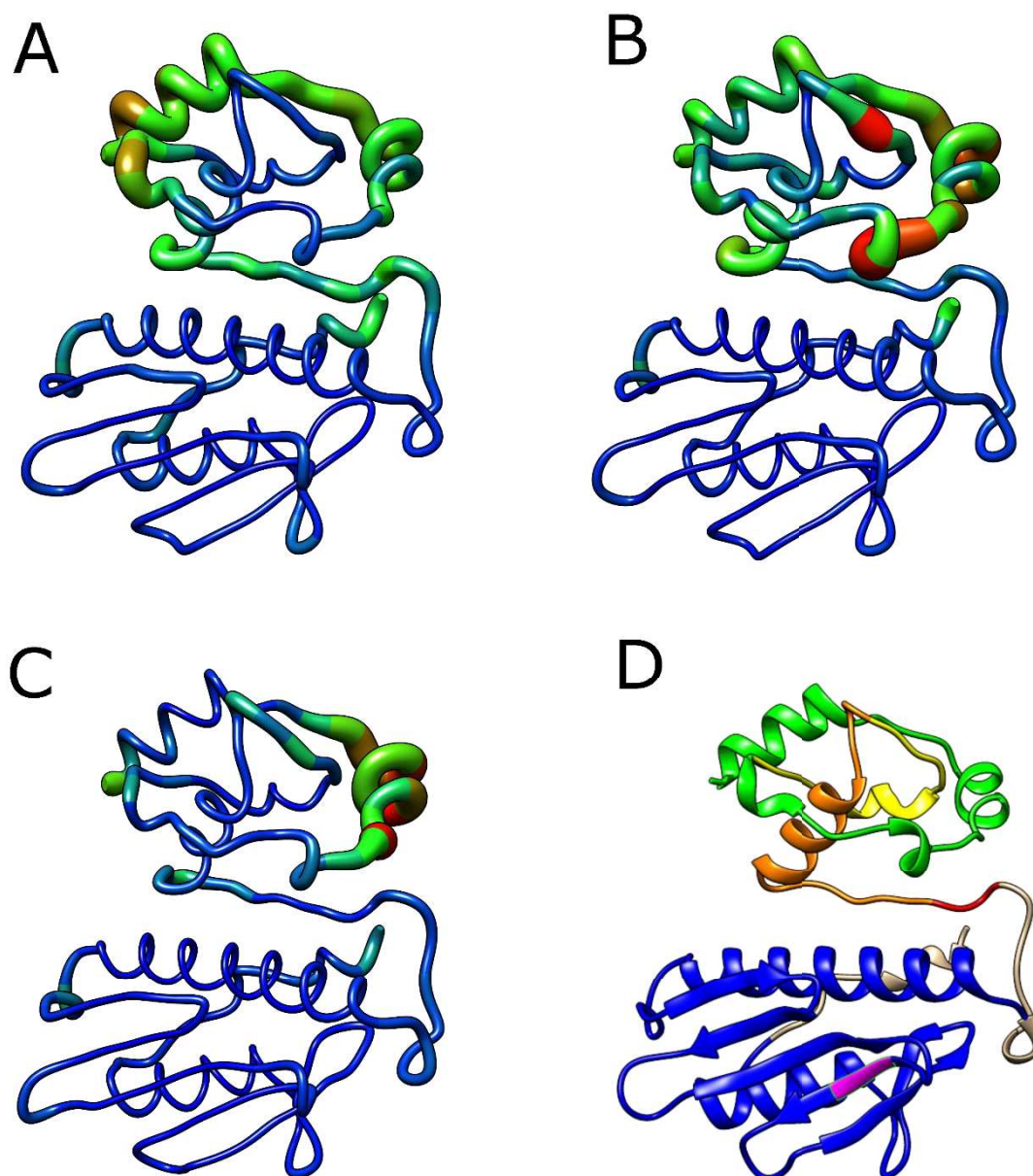


Figura 16. Análise do Bfactor da FXN nativa e suas variantes.

Os resíduos de aminoácidos de FXN de tipo selvagem (A) e suas variantes I154F (B) e W155R (C) são dimensionados e coloridos de acordo com seus valores de Bfactor, seguindo a escala de espessura de coloração que varia do azul e fino (resíduos mais rígidos) ao vermelho e mais grosso (resíduos mais flexíveis). (D) Representação esquemática da estrutura FXN para comparação. O peptídeo de transição está colorido em verde, ao passo que o domínio semelhante a frataxina está colorido em azul, e as regiões que compõem as formas intermediárias, FXN56, FXN78 e FXN81 foram destacadas em amarelo, laranja e vermelho, respectivamente. Em rosa, destacam-se os resíduos com as mutações, I154F e W155R.

A dinâmica essencial (DE) também conhecida como PCA é aplicado para analisar simulações DM (DUARTE et al., 2022). O PCA transforma os dados de alta

dimensão e mais complexos que estão contidos em uma trajetória molecular (SANG et al., 2017), e em um espaço de baixa dimensão onde são observados movimentos em grande escala de proteínas, e reduz o número de dimensões e que são necessárias para descrever a dinâmica dessas proteínas. O PCA é uma técnica que filtra estatisticamente os movimentos observados de escala espacial da trajetória molecular da proteína em questão, usando uma matriz de covariância usando as coordenadas cartesianas representando as posições atômicas da proteína (Sang et al., 2017; Dehury et al., 2017). Com isso, o PCA permite separar os movimentos proteicos essenciais dos demais. Os movimentos de maior escala, ou seja, os movimentos essenciais são geralmente biologicamente mais relevantes para a função da proteína, como a abertura, fechamento e flexão, já os demais movimentos são de pequenas flutuações locais, sendo irrelevantes (PEREIRA; DE AZEVEDO ABRAHIM VIEIRA; DE MESQUITA, 2021).

As trajetórias DM da FXN do tipo selvagem e suas variantes no subespaço abrangido por PC1 e PC2 são dispostas na Figura 16. Na imagem, a análise do PCA sugere que os componentes principais, PC1 e PC2, capturaram os movimentos dominantes da proteína, representando cerca de 89,74%, 73,31% e 91,39% da variância total para FXN WT e suas variantes I154F e W155R, respectivamente. Na Figura 16, é possível observar que as variantes ocupam uma área no espaço conformacional bem parecida, enquanto a variante I154F (Figura 17A) ocupou uma área aparentemente maior, e a variante W155R (Figura 17B) ocupou uma área menor. Alterações no formato do cluster, ou seja, no espaço conformacional das variantes também foram observadas, quando comparadas ao cluster da frataxina selvagem. A análise ED apontou, portanto, alterações na dinâmica essencial global de todas as variantes (PEREIRA; DE AZEVEDO ABRAHIM VIEIRA; DE MESQUITA, 2021).

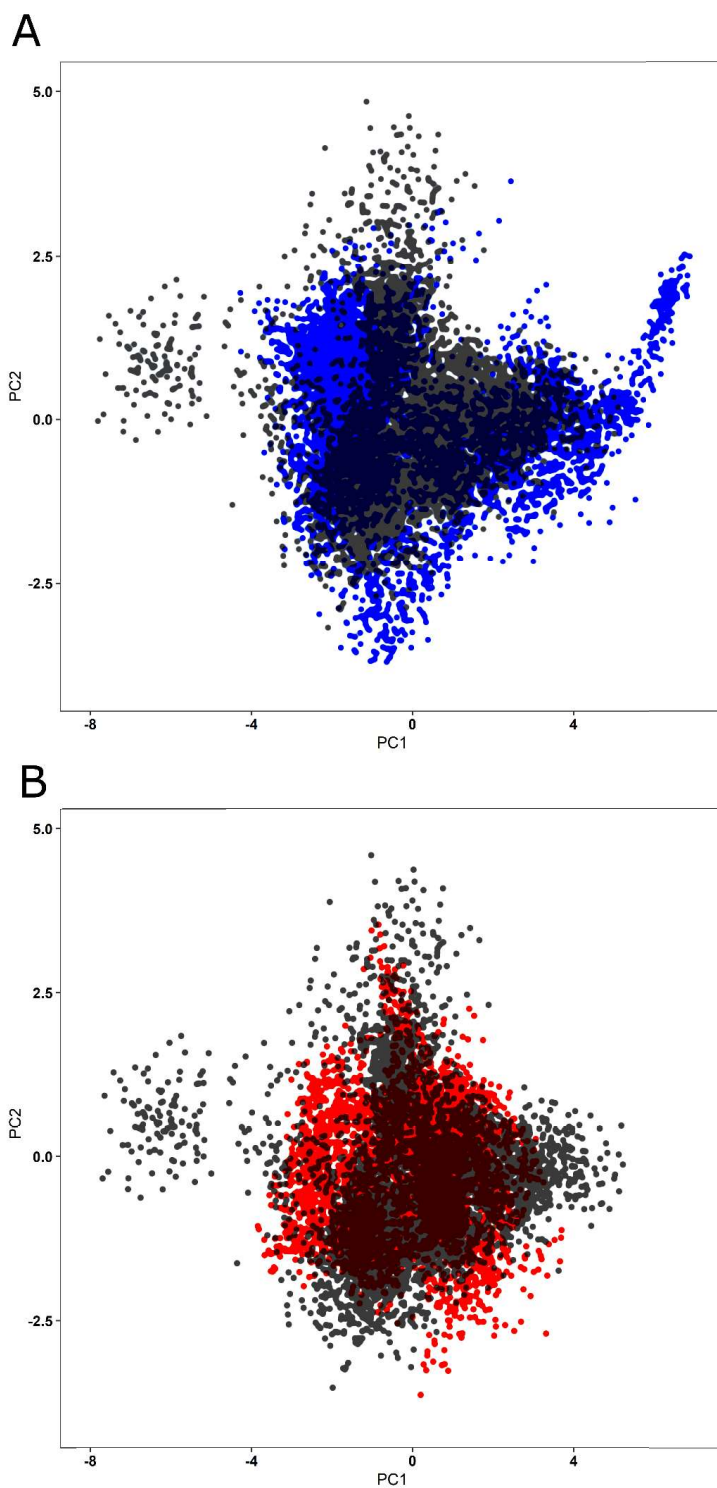


Figura 17. PCA para a FXN nativa e as suas variantes.

Projeção dos dois primeiros componentes principais extraídos das trajetórias de DM.(A) Projeção do PCA para a FXN do tipo selvagem em preto, em comparação com a variante I154F em azul. (B) Projeção do PCA para a FXN do tipo selvagem em preto, em comparação com a variante W155R em vermelho.

Foram analisadas também a contribuição do RMSF em cada aminoácido da proteína para os componentes principais PC1 e PC2. Os valores de RMSF para as projeções estão mostrados nas Figuras 18 e 19, respectivamente. O RMSF para o PC1 (Figura 18), mostrou um aumento da mobilidade essencial no peptídeo de transição das duas variantes, e no domínio FXN78 da variante I154F, além de uma diminuição de flexibilidade no domínio semelhante a frataxina, com uma maior perda na variante I154F (Figura 18B). Ao passo que a contribuição do RMSF para o PC2 (Figura 19), mostrou alterações essenciais de mobilidade no peptídeo de transição, FXN56, FXN78 e no domínio semelhante a frataxina, principalmente na variante I154F (Figura 19B). Analisando as Figuras 18 e 19, as alterações parecem ser mais acentuadas no peptídeo de transição, FXN56 e FXN78, com altas flutuações de flexibilidade, principalmente da variante I154F.

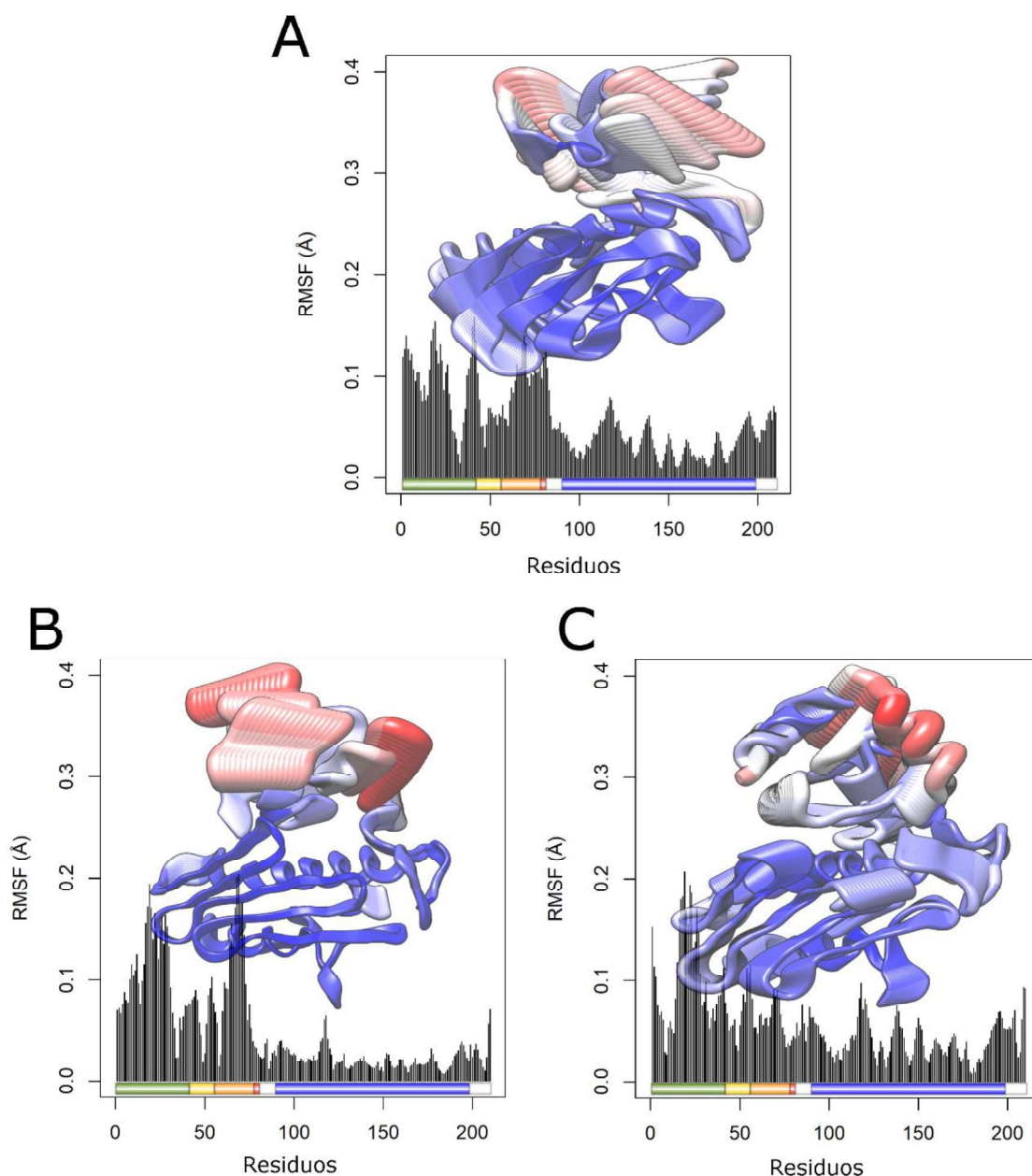


Figura 18. Contribuição do RMSF para PC1 da FXN nativa e suas variantes.

A contribuição de RMSF de cada aminoácido da proteína para PC1, é mostrado em um gráfico linear, e onde a estrutura correspondente é projetada e representações esquemáticas de regiões fundamentais da proteína estão destacadas. O peptídeo de transição está colorido em verde, ao passo que o domínio semelhante a frataxina está colorido em azul, e as regiões que compõem as formas intermediárias, FXN56, FXN78 e FXN81 foram destacadas em amarelo, laranja e vermelho. Cada aminoácido, seja da WT e suas duas variáveis em questão, foi colorido e dimensionado de acordo com sua contribuição de RMSF, em uma escala de coloração e de espessura que varia de azul e fino (baixas flutuações) a vermelho e grosso (altas flutuações). (A) Contribuição de RMSF de FXN WT para PC1. (B) Contribuição RMSF da variante I154F para PC1. (C) Contribuição RMSF da variante W155R para PC1.

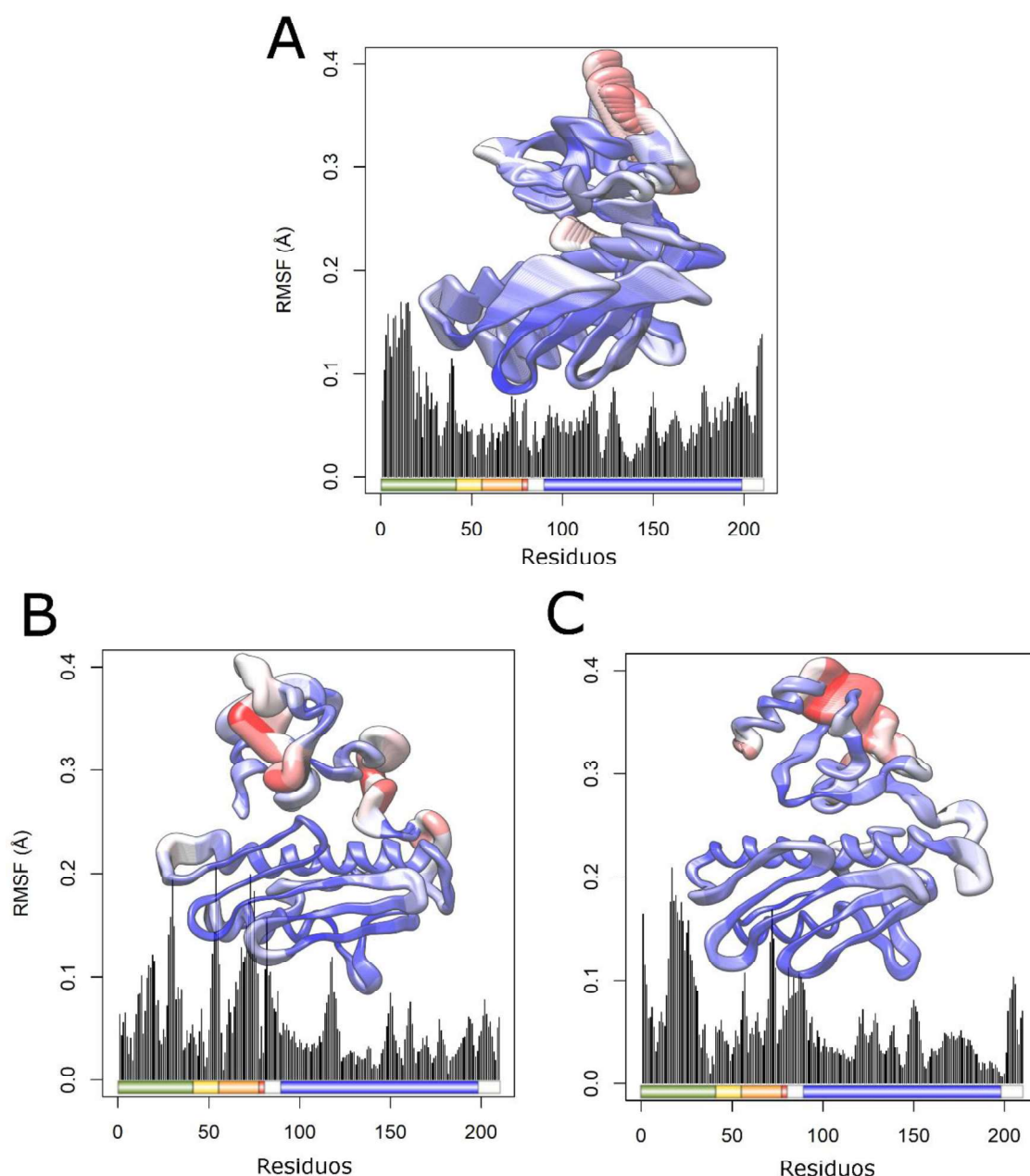


Figura 19. Contribuição do RMSF para PC2 da FXN nativa e suas variantes.

A contribuição de RMSF de cada aminoácido da proteína para PC2, é mostrado em um gráfico linear, e onde a estrutura correspondente é projetada e representações esquemáticas de regiões fundamentais da proteína estão destacadas. O peptídeo de transição está colorido em verde, ao passo que o domínio semelhante a frataxina está colorido em azul, e as regiões que compõem as formas intermediárias, FXN56, FXN78 e FXN81 foram destacadas em amarelo, laranja e vermelho. Cada aminoácido foi colorido e dimensionado de acordo com sua contribuição de RMSF, em uma escala de coloração e de espessura que varia de azul e fino (baixas flutuações) a vermelho e grosso (altas flutuações). (A) Contribuição do RMSF para PC2 da FXN WT. (B) Contribuição do RMSF para PC2 da variante I154F. (C) Contribuição do RMSF para PC2 da variante W155R.

A compreensão da forma com que as mutações missense na frataxina afetam a fisiopatologia da FRDA é dificultada pela complexidade da biogênese do FXN 1–210. O impacto dessas mutações que podem incluir desde efeitos na eficiência de dobramento, estabilidade proteica, suscetibilidade proteolítica, função ou até mesmo na maturação da proteína (PUCCIO; KENIG, 2000). Sabe-se que a frataxina humana completa é traduzida no citosol e direcionada então para as mitocôndrias usando a sequência de direcionamento no domínio N-terminal, no caso da frataxina o peptídeo de transição, FXN42, FXN56 e FXN78 (Figura 5), sendo clivada após sua importação para o interior das mitocôndrias (MONFORT et al., 2022).

As mutações I154F e W155R levam a forma de FRDA com sintomas mais graves (PUCCIO; KENIG, 2000). Em um estudo feito por Koutnikova *et al.* 1998, o grupo sugeriu que a ligação e clivagem da frataxina pela MPP parecem parcialmente afetadas por mutações missense causadoras da FRDA em sua porção N-terminal em comparação com a frataxina do tipo selvagem (KOUTNIKOVA; CAMPUZANO; KOENIG, 1998).

Nesse estudo, as análises de RMSF e Bfactor da proteína nativa e suas variantes, I154F e W155R, indicaram alteração de flexibilidade da proteína na parte N-terminal das duas variantes, porém em maior proporção na variante I154F. Os domínios peptídeo de transição, FXN42, FXN56 e FXN78 em que foram achadas as alterações de flexibilidade apontadas, podem afetar assim maturação e a clivagem da frataxina, que ocorrem na porção N-terminal onde se encontram esses domínios. Nossos achados estão alinhados com o descrito por Koutnikova *et al.* 1998 e Puccio *et al.* 2000, e poderiam estar relacionados aos fenótipos mais graves de FRDA causados pelas mutações missense I154F e W155R.

Alterações de flexibilidade podem levar a alterações fortes e não intuitivas nas propriedades de interação de proteínas, sendo que a flexibilidade estrutural de uma proteína é um ponto determinante para a afinidade e especificidade de ligações químicas, interação com outras moléculas e maturação proteica (FORREY; DOUGLAS; GILSON, 2012). Além disso, a função biológica de uma proteína é geralmente determinada por seus movimentos essenciais, especialmente aqueles envolvidos em interações proteicas e ligação a substratos (PEREIRA *et al.*, 2020). Sendo assim, as alterações observadas durante as simulações de DM para as variantes analisadas podem afetar as propriedades de maturação da frataxina já que ocorrem, em maior proporção, na porção N-terminal.

5 Conclusão

No presente trabalho, foram compiladas 226 mutações missense na frataxina humana (FXN). As análises preditivas indicaram uma alta incidência de mutações deletérias e desestabilizadoras, especialmente em resíduos conservados, sugerindo um impacto significativo na função proteica. O algoritmo SNPEffect4.0 identificou mutações que promovem alterações na tendência à agregação proteica e formação de fibras amiloides, associadas ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Para explorar as alterações estruturais causadas por mutações, realizámos alinhamentos das estruturas das variantes I154F e W155R com a FXN tipo selvagem durante simulações de dinâmica molecular (MD). O alinhamento resultou em valores de RMSD de 3,35 Å e 3,81 Å, revelando perturbações estruturais significativas, principalmente no domínio N-terminal, que podem comprometer a função da proteína.

A frataxina humana é uma proteína altamente conservada, sintetizada como uma pré-proteína que requer processamento proteolítico para se tornar funcional. As mutações relacionadas à ataxia de Friedreich (FRDA) no gene FXN podem impactar a estabilidade proteica, o dobramento, a maturação e a função da frataxina. Estudos anteriores indicaram que as mutações I154F e W155R reduzem a estabilidade termodinâmica e comprometem a maturação da proteína, associando-se à forma mais severa da FRDA.

Nossas simulações MD mostram que as mutações I154F e W155R afetam a estrutura e a dinâmica da FXN, especialmente no domínio N-terminal, crucial para a maturação proteica. Estas alterações podem prejudicar o reconhecimento e clivagem da FXN pela peptidase de processamento mitocondrial (MPP), comprometendo a capacidade da proteína de atingir uma conformação funcional e impactando sua ligação aos alvos. Esses achados corroboram a literatura existente e ampliam a compreensão dos mecanismos pelos quais essas mutações contribuem para a patogênese da FRDA.

6 Referências

- ACHARYA, A. B.; JAMIL, R. T.; DEWEY, J. J. Babinski Reflex. Em: Treasure Island (FL): [s.n.].
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- AMIRIFAR, P. et al. Ataxia-telangiectasia: epidemiology, pathogenesis, clinical phenotype, diagnosis, prognosis and management. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 16, n. 9, p. 859–871, 2020.
- ARAÚJO, C. B. et al. Ataxias Hereditárias Autossômicas Recessivas: Uma Revisão Narrativa. **Jornal Paranaense de Pediatria**, v. 23, n. 1, p. 1–9, 2022.
- ASHIZAWA, T.; XIA, G. Ataxia. **Continuum (Mineap Minn)**, v. 22, n. 4 Movement Disorders, p. 1208–1226, 2016.
- ASHKENAZY, H. et al. ConSurf 2010: Calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 529–533, 2010.
- BARSOTTINI, O. G. P. et al. Adult onset sporadic ataxias: A diagnostic challenge. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 72, n. 3, p. 232–240, 2014.
- BATEMAN, A. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D506–D515, 2019.
- BATOOL, M.; AHMAD, B.; CHOI, S. A structure-based drug discovery paradigm. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, 2019.
- BENCZE, K. Z. et al. **The structure and function of frataxin. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 1 out. 2006.
- BERNARDO-SEISDEDOS, G. et al. Protoporphyrin IX Binds to Iron(II)-Loaded and to Zinc-Loaded Human Frataxin. **Life**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2023.
- BRAGA-NETO, P. et al. Current concepts in the treatment of hereditary ataxias. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 3, p. 244–252, 2016.
- BULTEAU, A. L. et al. Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. **Science**, v. 305, n. 5681, p. 242–245, 2004.
- CALABRESE, V. et al. **Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia.** Journal of the Neurological Sciences. **Anais...** 15 jun. 2005.

CAMPUZANO, V. et al. Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion Victoria. **Science**, v. 271, p. 1423–1427, 1996.

CHRISTOFOLINI, D. M. et al. **Artigo Original Síndrome de tremor e ataxia associada ao X frágil: rastreamento por PCR em amostra de idosos Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: PCR-based screening in a sample of elderly men.** [s.l: s.n.].

CHUSHAK, Y. G. et al. In silico identification of protein targets for chemical neurotoxins using ToxCast in vitro data and read-across within the QSAR toolbox. **Toxicology Research**, v. 7, n. 3, p. 423–431, 2018.

CLARK, E. et al. Identification of a novel missense mutation in Friedreich's ataxia – FXNW168R. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 6, n. 4, p. 812–816, 2019.

CNOP, M.; MULDER, H.; IGOILLO-ESTEVE, M. Diabetes in Friedreich ataxia. **Journal of Neurochemistry**, v. 126, n. SUPPL.1, p. 94–102, 2013.

COARELLI, G. et al. The inherited cerebellar ataxias: an update. **Journal of Neurology**, v. 270, n. 1, p. 208–222, 2023.

DAVIDE, D. et al. Human frataxin, the Friedreich ataxia deficient protein, interacts with mitochondrial respiratory chain. **Cell death & disease**, v. 14, n. 12, p. 805, 2023.

DELATYCKI, M. B.; BIDICHANDANI, S. I. Friedreich ataxia- pathogenesis and implications for therapies. **Neurobiology of Disease**, v. 132, n. August, p. 104606, 2019.

EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B. **In silico pharmacology for drug discovery: Applications to targets and beyond.** **British Journal of Pharmacology**, set. 2007.

ENRIQUE, J. **ANÁLISE ESTRUTURAL DE SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO EM PROTEÍNAS.** [s.l: s.n.].

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **RADICAIS LIVRES: CONCEITOS E MECANISMO DE LESÃO** **Rev Ass Med Brasil.** [s.l: s.n.].

FERREIRA, D. R. M. F. R. **ATAXIA DE FRIEDREICH.** **Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto**, v. Artigo de, n. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina, p. 32, 2011.

FUSSIGER, H. **Ataxia De Friedreich: Da Suspeita Clínica Ao Diagnóstico Definitivo.** **Tese de Mestrado- UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SULFACULDADE DE MEDICINA**, p. 64, 2017.

GALEA, C. A. et al. Compound heterozygous FXN mutations and clinical outcome in friedreich ataxia. **Annals of Neurology**, v. 79, n. 3, p. 485–495, 1 mar. 2016.

GELLATLY, N.; SEWELL, F. Regulatory acceptance of in silico approaches for the safety assessment of cosmetic-related substances. **Computational Toxicology**, v. 11, n. October 2018, p. 82–89, 2019.

GODEIRO JR., C. DE O. et al. Abordagem clínica de pacientes com ataxia. **Revista Neurociências**, v. 15, n. 1, p. 71–76, 1999.

GÖLLER, A. H. et al. Bayer's in silico ADMET platform: a journey of machine learning over the past two decades. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 9, p. 1702–1709, 2020.

GONÇALVES, A. F. DA C. Doença de Machado-Joseph: Tratamento e Ensaaios Clínicos. p. 41, 2018.

GROTTO, H. Z. W. **Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase**. [s.l: s.n.].

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, 2010.

HAES, T. M. et al. Álcool E Sistema Nervoso Central. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 43, n. 2, p. 153, 2010.

HALLIWELL, B. **Antioxidant Defence Mechanisms: From the Beginning to the End (of the Beginning)**. [s.l: s.n.].

HARDING, A. E. Friedreich's ataxia: A clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. **Brain**, v. 104, n. 3, p. 589–620, 1981.

HIRATA, C. L. **Caracterização da Sumoilação de Maspina**. [s.l: s.n.].

HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, 2018.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Molecular Simulation**, v. 36, n. 13, p. 1035–1044, 2002.

KEITA, M. et al. Friedreich ataxia: clinical features and new developments. **Neurodegenerative Disease Management**, v. 12, n. 5, p. 267–283, 2022.

KLOCKGETHER, T. Ataxia. **Therapeutics of Parkinson's Disease and Other Movement Disorders**, v. 13, p. 405–415, 2008.

KUO, S. H. Ataxia. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, v. 25, n. 4, p. 1036–1054, 2019.

LAM, C. et al. FXN gene methylation determines carrier status in Friedreich ataxia. **Journal of Medical Genetics**, v. 60, n. 8, p. 797–800, 2023.

- LESUISSE, E. et al. Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). v. 12, n. 8, p. 12–14, 2003.
- LI, H. et al. Missense mutations linked to friedreich ataxia have different but synergistic effects on mitochondrial frataxin isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 6, p. 4116–4127, 2013.
- LI, M. M. et al. A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 1, p. 4–23, 2017.
- LIONTA, E. et al. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1923–1938, 2014.
- LYNCH, D. R. et al. Safety and Efficacy of Omaveloxolone in Friedreich Ataxia (MOXIe Study). **Annals of Neurology**, v. 89, n. 2, p. 212–225, 2021.
- LYNCH, D. R. et al. Propensity matched comparison of omaveloxolone treatment to Friedreich ataxia natural history data. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 11, n. 1, p. 4–16, 2024.
- MARIA, L. et al. Ataxia de Friedreich . Avaliação Cardíaca de 25 Pacientes com Diagnóstico Clínico e Revisão da Literatura. v. 78, n. n° 5, p. 444–447, 2002.
- MAUDOUX, A. et al. Vestibular impact of Friedreich ataxia in early onset patients. **Cerebellum and Ataxias**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2020.
- MENDONÇA, L. et al. An In Silico Analysis of Genetic Variants and Structural Modeling of the Human Frataxin Protein in Friedreich ' s Ataxia. 2024.
- MYATT, G. J. et al. In silico toxicology protocols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 96, n. April, p. 1–17, 2018.
- NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Química**, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.
- ORTEGA SUERO, G. et al. Epidemiology of ataxia and hereditary spastic paraplegia in Spain: a cross-sectional study. **Neurologia**, n. xxxx, 2021.
- PANTOPOULOS, K. et al. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. **Biochemistry**, v. 51, n. 29, p. 5705–5724, 2012.
- PEREIRA, G. R. C.; TELLINI, G. H. A. S.; DE MESQUITA, J. F. In silico analysis of PFN1 related to amyotrophic lateral sclerosis. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, p. 5–10, 2019.
- PIAZZA, S. et al. Pes cavus and hereditary neuropathies: When a relationship should be suspected. **Journal of Orthopaedics and Traumatology**, v. 11, p. 195–201, 2010.

PILOTTO, F.; CHELLAPANDI, D. M.; PUCCIO, H. Omaveloxolone: a groundbreaking milestone as the first FDA-approved drug for Friedreich ataxia. **Trends in Molecular Medicine**, v. 30, n. 2, p. 117–125, 2024.

RAUNIO, H. In silico toxicology non-testing methods. **Frontiers in Pharmacology**, v. JUN, n. June, p. 1–8, 2011.

RIBEIRO, M. B. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. n. 3, p. 453–460, 2014.

RIBEIRO, M. D. **DO TOPO PARA A BASE: ACONSELHAMENTO GENÉTICO EM FAMÍLIAS A PARTIR DA SÍNDROME DE TREMOR/ATAXIA ASSOCIADA AO X FRÁGIL (FXTAS)**. [s.l: s.n.].

RICHARDSON, D. R. et al. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 24, p. 10775–10782, 2010.

RISTOW, M. et al. Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of β cell mass. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 4, p. 527–534, 2003.

ROCHA, M. **Ataxia de Friedreich Perspectivas de Tratamento - Tese de Mestrado**. [s.l: s.n.].

ROSE, Y. et al. RCSB Protein Data Bank: Architectural Advances Towards Integrated Searching and Efficient Access to Macromolecular Structure Data from the PDB Archive. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 11, p. 166704, 2021.

ROY, K.; KAR, S.; AMBURE, P. On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 145, p. 22–29, 2015.

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. DE. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.

SCHOENFELD, R. A. et al. Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 24, p. 3787–3799, 2005.

SEGRETO, T. et al. Non-contact Reverse Engineering Modeling for Additive Manufacturing of Down Scaled Cultural Artefacts. **Procedia CIRP**, v. 62, p. 481–486, 2017.

SHEN, M. M.; RUMMEY, C.; LYNCH, D. R. Phenotypic variation of FXN compound heterozygotes in a Friedreich ataxia cohort. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 11, n. 5, p. 1110–1121, 2024.

SHERRY, S. T. et al. DbSNP: The NCBI database of genetic variation. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 1, p. 308–311, 2001.

SHUKLA, D. et al. Activation pathway of Src kinase reveals intermediate states as targets for drug design. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

SILVA, C. B. DA. Estudo longitudinal clínico e de imagem na Ataxia de Friedreich. 2014.

SILVA, L. X.; BASTOS, L. L.; SANTOS, L. H. **Modelagem computacional de proteínas**. [s.l: s.n.].

STEFL, S. et al. Molecular mechanisms of disease-causing missense mutations. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 21, p. 3919–3936, 2013.

TAMAROFF, J. et al. Friedreich's Ataxia related Diabetes: Epidemiology and management practices. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 186, p. 1–19, 2022.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. [s.l: s.n.].

WINTER, D. J. rentrez: An R package for the NCBI eUtils API. **R Journal**, v. 9, n. 2, p. 520–526, 2017.

XIONG, JIN. **Essential bioinformatics**. [s.l.] Cambridge University Press, 2006.

ZAFAR, M. et al. In silico study of alkaloids as α -glucosidase inhibitors: Hope for the discovery of effective lead compounds. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. DEC, p. 1–17, 2016.

ZEIGELBOIM, B. S. et al. The importance of central auditory evaluation in Friedreich's ataxia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 76, n. 3, p. 170–176, 2018.

ZHANG, Z. et al. Analyzing effects of naturally occurring missense mutations. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2012, 2012.

ZÜHLKE, C. H. et al. Extension of the mutation spectrum in Friedreich's ataxia: Detection of an exon deletion and novel missense mutations. **European Journal of Human Genetics**, v. 12, n. 11, p. 979–982, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Variantes da proteína frataxina compiladas no banco de dados do dbSNP.

Variantes	rsID	Significância clínica
M1V	rs147643987	Desconhecido
M1L	rs147643987	Desconhecido
M1I	rs104894108	Deletério
M1K	rs142133355	Desconhecido
M1T	rs142133355	Desconhecido
W2L	rs1831535584	Desconhecido
L4P	rs1197008330	Desconhecido
G5R	rs960895342	Desconhecido
R6L	rs992322273	Desconhecido
R6H	rs992322273	Desconhecido
R7H	rs1194735245	Desconhecido
A8G	rs775586060	Desconhecido
A8T	rs1831536106	Desconhecido
V9I	rs1431787480	Desconhecido
A10T	rs947792827	Desconhecido
A10V	rs1831536332	Desconhecido
G11V	rs1373837878	Desconhecido
G11S	rs1639970994	Desconhecido
L12I	rs1168839252	Desconhecido
L12V	rs1168839252	Desconhecido
L13Q	rs1462047732	Desconhecido
A14E	rs761236678	Neutro

P16H	rs1384835969	Desconhecido
P16S	rs1392880712	Desconhecido
S17T	rs1831536874	Desconhecido
P18A	rs1275914423	Desconhecido
P18T	rs1275914423	Desconhecido
A19S	rs1316684728	Desconhecido
A21V	rs1831537475	Desconhecido
A21D	rs1831537475	Desconhecido
Q22R	rs1831537597	Desconhecido
T23I	rs572324212	Desconhecido
T23N	rs572324212	Desconhecido
T23A	rs777206398	Desconhecido
T23S	rs572324212	Desconhecido
L24F	rs1052328470	Desconhecido
T25N	rs1423258307	Desconhecido
T25A	rs1831537991	Desconhecido
R26W	rs536676174	Desconhecido
R26Q	rs1167243329	Desconhecido
V27F	rs1831538235	Desconhecido
P28R	rs1292894778	Desconhecido
R29Q	rs1385313783	Desconhecido
R29L	rs1385313783	Desconhecido
P30L	rs1339514881	Desconhecido
P30Q	rs1339514881	Desconhecido
P30T	rs1295948276	Desconhecido
E32K	rs555289797	Desconhecido
E32Q	rs555289797	Desconhecido
L33V	rs767135118	Neutro
P35L	rs1244615817	Desconhecido

C37R	rs1261839617	Desconhecido
G38S	rs576852565	Desconhecido
G38C	rs576852565	Desconhecido
R39L	rs1564326540	Desconhecido
R39H	rs1564326540	Desconhecido
R39C	rs1010056458	Desconhecido
R40C	rs145854903	Deletério
G41V	rs1831539533	Desconhecido
G41R	rs1388134271	Desconhecido
L42R	rs1028088816	Desconhecido
R43H	rs752207437	Desconhecido
R43P	rs752207437	Desconhecido
R43L	rs752207437	Desconhecido
R43C	rs1486151799	Desconhecido
T44N	rs544129099	Neutro
T44I	rs544129099	Neutro
T44P	rs1423319770	Desconhecido
D45N	rs755663313	Desconhecido
D45H	rs755663313	Desconhecido
I46N	rs1464752486	Desconhecido
I46S	rs1464752486	Desconhecido
I46T	rs1464752486	Desconhecido
I46V	rs1831540145	Desconhecido
I46M	rs565294240	Desconhecido
D47E	rs1202974994	Desconhecido
A48T	rs1358112208	Desconhecido
A48V	rs1156655103	Desconhecido
T49N	rs995690945	Desconhecido
T49P	rs1587811863	Desconhecido

T49S	rs995690945	Desconhecido
C50R	rs1304232460	Desconhecido
C50Y	rs1376272802	Desconhecido
C50F	rs1376272802	Desconhecido
T51M	rs1395007559	Desconhecido
T51A	rs1831540731	Desconhecido
P52S	rs992332123	Desconhecido
P52T	rs992332123	Desconhecido
P52L	rs1026671871	Desconhecido
R53H	rs1023779193	Desconhecido
R53L	rs1023779193	Desconhecido
R54H	rs979225932	Desconhecido
R54C	rs969560796	Desconhecido
R54G	rs969560796	Desconhecido
A55T	rs1316008371	Desconhecido
S56N	rs1831753352	Desconhecido
S56R	rs1831753436	Desconhecido
S57L	rs180718803	Desconhecido
Q59H	rs1273492939	Desconhecido
R60H	rs141858334	Neutro
R60C	rs373519193	Desconhecido
G61V	rs902854618	Desconhecido
G61S	rs1239150831	Desconhecido
L62P	rs763682148	Desconhecido
N67S	rs146284289	Desconhecido
V68A	rs778674959	Desconhecido
V68G	rs778674959	Desconhecido
V68I	rs1223712761	Desconhecido
V73A	rs1051718716	Desconhecido

Y74C	rs750274023	Desconhecido
M76V	rs59907886	Neutro
M76T	rs1273772459	Desconhecido
K80N	rs1169387979	Desconhecido
S81T	rs555673369	Desconhecido
L84W	rs57777433	Desconhecido
L84F	rs747283339	Desconhecido
G85A	rs57215370	Desconhecido
G85V	rs57215370	Desconhecido
H86P	rs1587818053	Desconhecido
G88C	rs1340263641	Desconhecido
D91H	rs373668521	Desconhecido
E92K	rs1831884210	Desconhecido
T93I	rs778620538	Desconhecido
T94A	rs766667087	Desconhecido
Y95H	rs1258217167	Desconhecido
Y95C	rs1184832782	Desconhecido
E96K	rs762990650	Desconhecido
R97K	rs1378785673	Desconhecido
R97G	rs1181092877	Desconhecido
A99T	rs766086086	Desconhecido
E100A	rs541981554	Desconhecido
T102M	rs964046026	Desconhecido
D104E	rs1831885244	Desconhecido
S105F	rs267602259	Desconhecido
L106S	rs104894105	Deletério
L106V	rs1285151894	Desconhecido
A107P	rs1831885649	Desconhecido
E108V	rs1587821826	Desconhecido

E108D	rs1564333434	Desconhecido
F110S	rs1831885938	Desconhecido
D112H	rs1239243428	Desconhecido
D112Y	rs1239243428	Desconhecido
D112A	rs1587821839	Desconhecido
L113I	rs1219540200	Desconhecido
A114V	rs767712381	Desconhecido
D115E	rs756215781	Desconhecido
K116E	rs1165716226	Desconhecido
P117T	rs867960097	Desconhecido
P117L	rs778049381	Desconhecido
Y118C	rs749780215	Desconhecido
T119K	rs757847415	Desconhecido
T119M	rs757847415	Desconhecido
D122Y	rs142157346	Desconhecido
Y123F	rs1831886976	Desconhecido
G130A	rs104894107	Deletério
G130V	rs104894107	Deletério
G130S	rs1681448766	Desconhecido
T133A	rs1340783297	Desconhecido
V134I	rs759441343	Desconhecido
V134G	rs1316786478	Desconhecido
K135R	rs771963647	Desconhecido
G138R	rs775491351	Desconhecido
D139Y	rs760965156	Desconhecido
D139V	rs764352477	Desconhecido
N146K	rs146818694	Deletério
Q148R	rs140472905	Desconhecido
T149M	rs551991546	Desconhecido

T149A	rs1424491000	Desconhecido
K152E	rs1432630081	Desconhecido
Q153R	rs77781994	Desconhecido
Q153H	rs780387020	Desconhecido
I154V	rs104894106	Deletério
I154F	rs104894106	Deletério
W155R	rs138471431	Deletério
L156I	rs1423162963	Desconhecido
L156P	rs143340609	Desconhecido
S158A	rs748916855	Desconhecido
S158P	rs748916855	Desconhecido
S160C	rs1372039162	Desconhecido
S161T	rs1832143962	Desconhecido
S161R	rs1475266569	Desconhecido
K164R	rs1832295048	Desconhecido
R165H	rs143396368	Desconhecido
R165C	rs138034837	Desconhecido
R165P	rs143396368	Desconhecido
Y166F	rs901095040	Desconhecido
G170W	rs1345161827	Desconhecido
K171E	rs1280128357	Desconhecido
K171R	rs781204747	Desconhecido
W173G	rs56214919	Deletério
V174L	rs1832295554	Desconhecido
V174A	rs1212674570	Desconhecido
Y175F	rs1052201	Desconhecido
H177Y	rs747833464	Desconhecido
D178E	rs61754561	Neutro
D178N	rs777926714	Desconhecido

G179S	rs1189451813	Desconhecido
V180M	rs774482038	Desconhecido
S181C	rs568327835	Desconhecido
L182F	rs139616452	Desconhecido
L182H	rs149335881	Desconhecido
H183Y	rs1228124556	Desconhecido
H183L	rs144610605	Desconhecido
H183R	rs144610605	Desconhecido
L186R	rs148443992	Desconhecido
A187V	rs1474150285	Desconhecido
A188T	rs776068810	Desconhecido
T191S	rs200532520	Desconhecido
T191A	rs200532520	Desconhecido
A193P	rs762731436	Desconhecido
T196A	rs765980325	Desconhecido
K197R	rs1832296959	Desconhecido
L198V	rs1036228270	Desconhecido
L198R	rs144104124	Desconhecido
D199N	rs751170542	Desconhecido
D199G	rs754523390	Desconhecido
L200S	rs1379863332	Desconhecido
S202C	rs1052195	Desconhecido
S202P	rs1384605005	Desconhecido
L203F	rs1832297474	Desconhecido
A204P	rs780954419	Desconhecido
S206Y	rs1289276430	Desconhecido
S206C	rs1289276430	Desconhecido
S206T	rs1832297570	Desconhecido
G207R	rs777584849	Desconhecido

D209G	rs74621026	Neutro
-------	------------	--------

APÊNDICE B - Análise da predição funcional das variantes da proteína frataxina.

Variantes	PredictSNP	PhD-SNP	PolyPhen-2	SIFT	SNAP	PANTHER	SNP&GO	PMut	SNAP2	Mutpred2
M1L	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
M1K	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro
M1T	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro
M1V	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro
M1I	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
W2L	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
L4P	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
G5R	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério
R6H	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
R6L	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
R7H	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
A8G	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
A8T	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
V9I	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
A10T	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
A10V	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
G11S	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
G11V	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
L12I	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
L12V	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
L13Q	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
A14E	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
P16H	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
P16S	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
S17T	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério

P18A	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
P18T	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
A19S	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
A21D	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
A21V	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
Q22R	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
T23A	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
T23N	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
T 23I	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
T23S	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
L24F	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
T25A	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
T25N	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
R26Q	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
R26W	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
V27F	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
P28R	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
R29Q	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
R29L	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
P30Q	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
P30L	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério
P30T	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
E32Q	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
E32K	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
L33V	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
P35L	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério
C37R	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
G38C	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
G38S	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério
R39C	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério
R39H	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
R39L	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
R40C	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério

G41R	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
G41V	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério
L42R	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
R43C	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
R43H	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
43L	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
R43P	Deletérios	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
T44 N	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
T44I	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
T44P	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
D45 N	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
D45H	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
I46 N	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
I46M	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
I46S	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério
I46T	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
I46V	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
D47E	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
A48T	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
A48V	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
T49 N	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
T49P	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério
T49S	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
C50R	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
C50F	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
C50Y	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
T51A	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
T51M	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
P52L	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
P52S	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
P52T	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
R53H	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
R53L	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério

R54C	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
R54G	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
R54H	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
A55T	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
S56R	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
S56 N	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
S57L	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
Q59H	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
R60C	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
R60H	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
G61S	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
G61V	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
L62P	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro
N67S	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério
V68A	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
V68G	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
V68I	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
V73A	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
Y74C	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
M76T	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério
M76V	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neut	Deletério	Deletério
K80 N	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
S81T	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
L84F	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
L84W	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério
G85A	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
G85V	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério
H86P	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
G88C	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutral	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
D91H	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
E92K	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
T93I	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
T94A	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério

Y95C	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
Y95H	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
E96K	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
R97G	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
R97K	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
A99T	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
E100A	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro
T102M	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
D104E	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
S105F	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
L106S	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
L 106V	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro
A107P	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
E108 D	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
E108V	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
F110S	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
D112A	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
D112H	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
D112Y	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
L113I	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
A114V	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
D115E	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
K116E	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
P117L	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
P117T	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
Y118C	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
T119K	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
T119M	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
D122Y	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
Y123F	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
G130A	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
G130S	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
G130V	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro

T133A	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
V134G	Deletérios	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro
V134I	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
K135R	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
G138R	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
D139Y	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
D139V	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
N146K	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
Q148R	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
T149A	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
T149M	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
K152E	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
Q153R	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro
Q153H	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro
I154F	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
I154V	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
W155R	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
L156I	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
L156P	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
S158A	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
S158P	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
S160C	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
S161R	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
S161T	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
K164R	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
R165C	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
R165H	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro
R165P	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
Y166F	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
G170W	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
K171R	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
K171E	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
W173G	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro

V174A	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
V174L	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
Y175F	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
H177Y	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
D178 N	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
D178E	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
G179S	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
V180M	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
S181C	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
L182H	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
L182F	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
H183R	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
H183L	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
H183Y	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
L186R	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
A187V	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletérios	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
A188T	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
T191A	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
T191S	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
A193P	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério
T196A	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
K197R	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
L198R	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
L198V	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
D199 N	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério
D199G	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
L200S	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro
S202C	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
S202P	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
L203F	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
A204P	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério
S206C	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério
S206T	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério

S206Y	Deletério	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
G207R	Neutro	Neutro	Deletério	Neutro	Deletério	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério	Deletério
D209G	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Neutro	Deletério	Deletério

APÊNDICE C - Análise das variantes da proteína frataxina de acordo com o I-Mutant3.0 e o SNPEffect.

Variantes	I-MUTANT3.0	TANGO	WALTZ	LIMBO
M1 L	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
M1K	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
M1T	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
M1V	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
M1I	Aumenta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
W2L	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L4P	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G5R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R6H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R6L	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R7H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A8G	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A8T	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
V9I	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A10T	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A10 V	Não afeta	Aumenta	Não afeta	Não afeta
G11S	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G11V	Não afeta	Aumenta	Não afeta	Não afeta
L12I	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L12V	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L13Q	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A14E	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta

P16H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P16S	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S17T	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P18A	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P18T	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A19S	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A21D	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A21V	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
Q22R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T23A	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T23 N	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T23I	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T23S	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L24F	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T25A	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T25N	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R26Q	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R26 W	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
V27F	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P28R	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R29Q	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R29 L	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P30Q	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P30L	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P30T	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
E32Q	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
E32K	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L33V	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P35L	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta

C37R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G38C	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G38S	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R39C	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R39H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R39 L	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R40C	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G41R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G41V	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L42R	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R43C	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R43H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R43L	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R43P	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T44N	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T44I	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T44P	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D45N	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D45H	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
I46N	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
I46M	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
I46S	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
I46T	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
I46 V	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D47E	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A48T	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A48V	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T49N	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T49P	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta

T49S	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
C50R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
C50F	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
C50Y	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T51A	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T51M	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P52L	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P52S	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P52T	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R53H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R53L	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R54C	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R54G	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R54H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A55T	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S56R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S56N	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S57L	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
Q59H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R60C	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R60H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G61S	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G61V	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L62P	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
N67S	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
V68A	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
V68G	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
V68I	Não afeta	Não afeta	Aumenta	Não afeta
V73A	Diminui	Não afeta	Aumenta	Não afeta

Y74C	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
M76T	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
M76V	Diminui	Aumenta	Não afeta	Não afeta
K80N	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S81T	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L84F	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L84W	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G85A	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G85V	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
H86P	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G88C	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D91H	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
E92K	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T93I	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T94A	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
Y95C	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
Y95H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
E96K	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R97G	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R97K	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A99T	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
E100A	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T102M	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D104E	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S105F	Aumenta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L106S	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L106V	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A107P	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
E108D	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta

E108V	Não afeta	Aumenta	Aumenta	Não afeta
F110S	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D112A	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D112H	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D112Y	Não afeta	Não afeta	Aumenta	Não afeta
L113I	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A114V	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D115E	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
K116E	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P117L	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
P117T	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
Y118C	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T119K	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T119M	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D122 Y	Não afeta	Não afeta	Aumenta	Não afeta
Y123F	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G130A	Diminui	Aumenta	Não afeta	Não afeta
G130S	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G130V	Não afeta	Aumenta	Não afeta	Não afeta
T133A	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
V134G	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
V134I	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
K135R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G138R	Não afeta	Diminui	Não afeta	Não afeta
D139Y	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D139V	Não afeta	Aumenta	Não afeta	Não afeta
N146K	Não afeta	Diminui	Não afeta	Não afeta
Q148R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T149A	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta

T149M	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
K152E	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
Q153R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
Q153H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
I154F	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
I154V	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
W155R	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L156I	Diminui	Não afeta	Aumenta	Não afeta
L156P	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S158A	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S158P	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S160C	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S161R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S161T	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
K164 R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R165C	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R165H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
R165P	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
Y166F	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G170W	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
K171R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
K171E	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
W173G	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
V174A	Diminui	Não afeta	Aumenta	Não afeta
V174I	Diminui	Não afeta	Aumenta	Não afeta
Y175F	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
H177Y	Não afeta	Aumenta	Não afeta	Não afeta
D178N	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D178E	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta

G179S	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
V180M	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S181C	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L182H	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L182F	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
H183R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
H183L	Aumenta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
H183Y	Não afeta	Não afeta	Aumenta	Não afeta
L183R	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A187V	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A188T	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T191A	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T191S	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A193P	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
T196A	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
K197R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L198R	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L198V	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D199N	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
D199G	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L200S	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S202C	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S202P	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
L203F	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
A204P	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S206C	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S206T	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
S206Y	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta
G207R	Não afeta	Não afeta	Não afeta	Não afeta

D209G	Diminui	Não afeta	Não afeta	Não afeta
-------	---------	-----------	-----------	-----------

ANEXO I



International Journal of
Molecular Sciences



Article

An In Silico Analysis of Genetic Variants and Structural Modeling of the Human Frataxin Protein in Friedreich's Ataxia

Loiane Mendonça Abrantes Da Conceição ¹, Lucio Mendes Cabral ², Gabriel Rodrigues Coutinho Pereira ^{2,3,*} and Joelma Freire De Mesquita ^{1,†}

¹ Laboratory of Bioinformatics and Computational Biology, Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), Avenida Pasteur, 296, Urca, Rio de Janeiro 22290-250, Brazil; joelma.mesquita@unirio.br (J.F.D.M.)

² Pharmaceutical Industrial Technology Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, Rio de Janeiro 21941-590, Brazil

³ Laboratory of Molecular Modeling & QSAR, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, Rio de Janeiro 21941-590, Brazil

* Correspondence: gabriel.pereira@edu.unirio.br

† These authors contributed equally to this work.

LINK DA REVISTA:

https://www.mdpi.com/journal/ijms/special_issues/EL43TZGZ12