

INVESTIGAÇÃO IN SILICO DO PAPEL DO GENE HMGB1 RELACIONADO À AUTOFAGIA NO CÂNCER DE TIREOIDE

Palavras-Chave: Autofagia, HMGB1, análise in silico

Autores(as):

Bianca De Araújo Sobral, CCV – PUCCAMP

Elisângela De Souza Teixeira, FCM – UNICAMP

Larissa Teodoro Rabi, FCM – UNICAMP

Sabrina Luiza Paz De Souza, FCM – UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. Laura Sterian (orientadora), FCM – UNICAMP

INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide é um tumor maligno cuja incidência vem aumentando no Brasil assim como em todo o mundo nas últimas três décadas (1). No Brasil, entre 2023 e 2025, estima-se que ocorrerão aproximadamente 16.660 novos casos de câncer de tireoide e a incidência prevista para mulheres é cerca de 5,49 vezes maior do que para homens (2). Assim, o câncer de tireoide é uma doença complexa e heterogênea, e a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à sua patogênese é de grande importância para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas mais eficazes.

O processo de autofagia, ou morte celular programado tipo 2, é um processo celular fundamental que envolve a degradação de proteínas intracelulares, importante para a sobrevivência celular e regulação pró-tumoral na carcinogênese (3), desempenhando um papel crucial na homeostase celular, na eliminação de componentes celulares danificados e no equilíbrio de nutrientes. Este processo é desencadeado por diferentes estímulos, como privação de fatores de crescimento e nutrientes, hipóxia e condições patológicas (4-7).

Múltiplas vias de sinalização regulatória estão envolvidas na autofagia (8-10), incluindo diversas proteínas, que atuam como fatores reguladores da autofagia (9). A proteína HMGB1 (do inglês, *High Mobility Group Box 1*), codificada pelo gene *HMGB1*, localizado no cromossomo 13, e secretada por células do sistema imune, células endoteliais e tumorais (11). Ela atua como molécula sinalizadora extracelular em processos inflamatórios, resposta ao estresse, regulação do microambiente tumoral, na apoptose e na autofagia (12-14). Durante a autofagia, HMGB1 se liga à proteína Beclin 1 e impede a sua interação com Bcl-2, levando a promoção da autofagia (15).

A autofagia, tem efeitos duplos na promoção e inibição do surgimento e desenvolvimento de tumores (16). A crescente literatura sustenta o papel central da autofagia no desenvolvimento do câncer, desde a sua iniciação, na metástase e na progressão tumoral (17-19). Para a progressão tumoral, a célula necessita da interação entre a autofagia e processos biológicos importantes como a senescência celular, resposta imunológica, processo inflamatório e apoptose. Em condições de restrição de nutrientes, a deficiência na autofagia pode resultar em morte celular através de necrose, em vez de apoptose, liberando moléculas pró-inflamatórias no microambiente tumoral o que contribui para a progressão tumoral (20).

Além disso, a autofagia auxilia o sistema imune na identificação e remoção de células tumorais, o que pode influenciar a progressão tumoral (21).

Mutações em genes que codificam proteínas associadas à autofagia, como os genes ATG (do inglês, autophagy-related genes), que são essenciais para a formação e função dos autofagossomos durante o processo de degradação celular (10), podem resultar no acúmulo de moléculas defeituosas ou excesso de radicais livres. Isso prejudica as células, levando à instabilidade no DNA e promovendo um ambiente pró-oncogênico (20). A proteína HMGB1 desempenha um papel crítico na regulação da autofagia, interagindo diretamente com as proteínas ATG para facilitar a formação dos autofagossomos (10). Assim, polimorfismos em HMGB1 podem influenciar a eficiência da autofagia, comprometendo a capacidade da célula de se autodegradar adequadamente. Como consequência, pode haver o acúmulo de proteínas anormais e resíduos celulares, formando um microambiente propício ao desenvolvimento do câncer (20).

No entanto, o papel da autofagia no câncer de tireoide e os efeitos dos polimorfismos genéticos em *HMGB1* ainda não foram adequadamente explorados ou ainda apresentam resultados conflitantes. Assim, objetivamos investigar os impactos morfofuncionais do gene *HMGB1* utilizando ferramentas *in silico* e explorar o seu papel como possível biomarcadores de diagnóstico e prognóstico no cancer de tireoide.

METODOLOGIA

Em julho de 2024, acessamos o dbSNP do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) para obter os SNPs e recuperamos a FASTA da proteína no UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>). Por fim, realizou-se a previsão dos nsSNPs por meio de diversas ferramentas bioinformáticas de livre acesso para analisar os efeitos das variantes em função, patogenicidade e estabilidade da proteína.

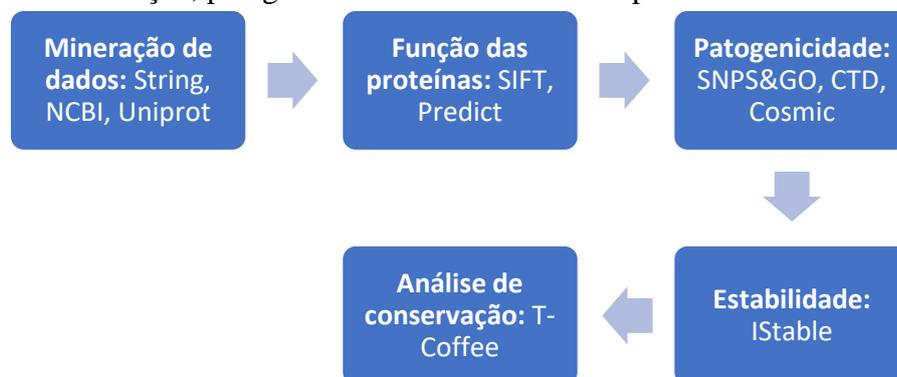


Figura 1: Descrição das etapas realizadas e ferramentas utilizadas durante a análise *in silico* do gene *HMGB1*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas 101 variantes missense para *HMGB1* no dbSNP. Essas variantes foram analisadas pelo SIFT, onde 73 trocas de aminoácidos correspondentes foram localizadas. Todas estas trocas encontradas foram submetidas ao PredictSNP, onde apenas as variantes rs2388544, rs61733675 e rs4597168 foram preditas como sendo deletérias em mais de 60% do conjunto de ferramentas utilizadas pela plataforma. As três variantes têm maior probabilidade de afetar negativamente a função da proteína, o que as torna relevantes para estudos funcionais e clínicos, especialmente se associadas a doenças.

Em relação aos efeitos na estabilidade, os polimorfismos identificados como deletérios no PredictSNP foram submetidos ao IStable, que reúne dados próprios e das plataformas I-Mutant2.0 e MuPro, assim a redução na estabilidade foi observada para as variantes rs2388544 (P98L) e rs61733675 (F103C), no entanto, para rs4597168 (P143L), foi observado aumento de estabilidade no I-Mutant2.0 e

MuPro e uma redução pelo IStable. Além disso, a estabilidade também foi analisada na ferramenta HOPE, que estimou redução na estabilidade para todas as variantes. A redução na estabilidade para as variantes rs2388544 (P98L) e rs61733675 (F103C) é consistentemente observada nas análises do IStable e HOPE, sugerindo que elas provavelmente diminuem a estabilidade da proteína, o que pode afetar sua função e contribuir para efeitos deletérios. Já a variante rs4597168 (P143L) apresenta resultados contraditórios, com I-Mutant2.0 e MuPro sugerindo um aumento na estabilidade, enquanto o IStable e HOPE indicam uma redução, o que sugere que sua predição de estabilidade é complexa e pode depender de contextos específicos ou outros fatores não considerados nas ferramentas. Devido à variabilidade nas previsões, especialmente para rs4597168 (P143L), estudos experimentais são necessários para confirmar os efeitos destas variantes na estabilidade proteica.

No SNPS&GO, que reúne dados também das plataformas PhD-SNP e Panther, para HMGB1, as trocas P98L, F103C, K30Q, A138T, P143L, A170V, S181G e D190E foram preditivas como associadas com doenças. Para as mutações P98L, F103C, A138T e P143L também foi encontrada associação com doenças hereditárias na plataforma FATHMM. Assim, P98L, F103C, A138T e P143L estão consistentemente associadas a doenças, indicando a importância de realizar estudos clínicos e genéticos para essas variantes.

Na plataforma CTD, utilizamos “cancer” como filtro para “disease category” e “inferred” para “association type”, obtendo uma lista de 287 tipos de câncer associados ao gene *HMGB1*. Especificamente filtrando para “thyroid cancer”, para *HMGB1*, foi encontrada associação com câncer folicular de tireoide, câncer medular de tireoide, carcinoma papilífero de tireoide e carcinoma anaplásico de tireoide. Na plataforma COSMIC, dentre os genes com mutações associados aos carcinomas de tireoide, obtivemos 6573 após eliminarmos repetidos. Filtrando dentre estes genes mutados para *HMGB1*, foram encontradas 12 cópias. A associação de *HMGB1* com variados tipos de câncer sugere que ele desempenha um papel crucial na oncogênese.

Análise de conservação da sequência proteica de HMGB1 ao longo da evolução foi realizada utilizando T-Coffee e o gráfico de conservação (figura 2), revelou que cerca de 50% das posições no alinhamento múltiplo de sequências são classificadas em regiões com baixa conservação, mas com confiabilidade moderada no alinhamento, sugerindo uma certa variabilidade entre as sequências homólogas e regiões com baixa conservação e baixa confiabilidade no alinhamento, sugerindo alta variabilidade. As regiões de conservação moderada e boa confiabilidade, indicando uma região nobre, mas que pode tolerar certas alterações. Assim, sugere-se que HMGB1 possui um grau significativo de flexibilidade evolutiva.

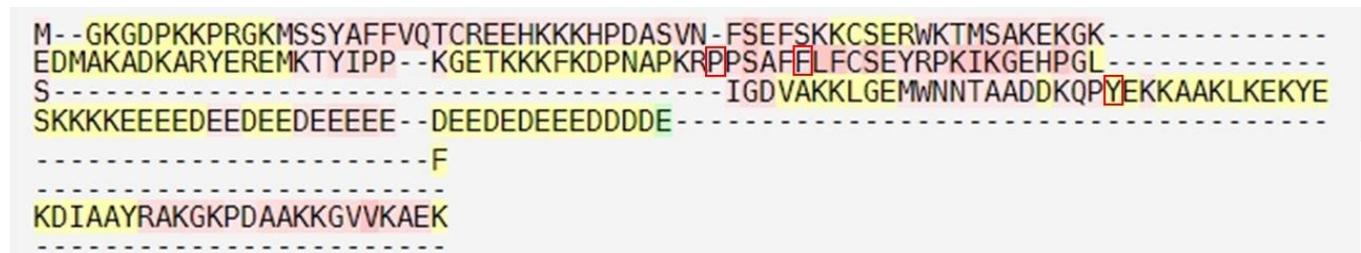


Figura 2: Representação das regiões de conservação da proteína HMGB1, obtida através do T-Coffee. Retângulos vermelhos indicam as regiões onde ocorrem as variantes deletérias rs2388544 (em rosa), rs61733675 (em rosa) e rs4597168 (em amarelo) respectivamente. Verde indica alta confiança e baixa variabilidade; amarelo, confiança intermediária e variabilidade moderada; e rosa, baixa confiança e alta variabilidade.

A respeito das variantes deletérias encontradas, rs2388544 tem associação genética com a neurotoxicidade periférica induzida por quimioterapia em pacientes com câncer colorretal em uso de oxaliplatina (22); rs61733675 já foi descrita por outro estudo in silico como altamente deletéria e

causadora de doenças (23); e rs4597168 ainda não foi investigada na literatura. Portanto, demonstra-se necessário realizar estudos para explorar melhor estas variantes.

CONCLUSÕES

Portanto, o estudo destacou o papel crítico do gene *HMGB1* na patogênese do câncer de tireoide, com ênfase nas variantes genéticas identificadas como potencialmente deletérias. As variantes deletérias rs2388544, rs61733675 e rs4597168 são particularmente relevantes devido ao seu impacto potencial na função e estabilidade da proteína HMGB1, contribuindo para a oncogênese. Nesse sentido, essas variantes podem ser candidatas para estudos mais aprofundados sobre seu papel em processos patológicos. A associação do HMGB1 com vários tipos de câncer de tireoide reforça sua importância na progressão tumoral. Estudos experimentais adicionais são necessários para validar esses achados e explorar o potencial de HMGB1 e suas variantes como biomarcadores para diagnóstico e prognóstico no câncer de tireoide.

REFERÊNCIAS

1. Kim J, Gosnell JE, Roman SA. Geographic influences in the global rise of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2020 Jan;16(1):17-29. doi: 10.1038/s41574-019-0263-x. Epub 2019 Oct 15. PMID: 31616074. Cited by: Moon S, Song YS, Jung KY, Lee EK, Park YJ. Lower Thyroid Cancer Mortality in Patients Detected by Screening: A Meta-Analysis. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2023 Feb;38(1):93-103. doi: 10.3803/EnM.2023.1667. Epub 2023 Feb 27. PMID: 36891656; PMCID: PMC10008652.
2. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2022. 160 p.
3. Wei H, Guan JL. Pro-tumorigenic function of autophagy in mammary oncogenesis. *Autophagy*. 2012 Jan;8(1):129-31. doi: 10.4161/autophagy.8.1.18171. Epub 2012 Jan 1. PMID: 22082959; PMCID: PMC3335994. Cited by: Wang R, He W, Li Z, Chang W, Xin Y, Huang T. Caveolin-1 functions as a key regulator of 17 β -estradiol-mediated autophagy and apoptosis in BT474 breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2014 Sep;34(3):822-7. doi: 10.3892/ijmm.2014.1836. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25017566.
4. Stanton MJ, Dutta S, Polavaram NS, Roy S, Muders MH, Datta K. Angiogenic growth factor axis in autophagy regulation. *Autophagy*. 2013 May;9(5):789-90. doi: 10.4161/autophagy.23783. Epub 2013 Feb 6. PMID: 23388383; PMCID: PMC3669190. Cited by: Wang R, He W, Li Z, Chang W, Xin Y, Huang T. Caveolin-1 functions as a key regulator of 17 β -estradiol-mediated autophagy and apoptosis in BT474 breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2014 Sep;34(3):822-7. doi: 10.3892/ijmm.2014.1836. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25017566.
5. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiya T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 2004 Dec 23;432(7020):1032-6. doi: 10.1038/nature03029. Epub 2004 Nov 3. PMID: 15525940. Cited by: Wang R, He W, Li Z, Chang W, Xin Y, Huang T. Caveolin-1 functions as a key regulator of 17 β -estradiol-mediated autophagy and apoptosis in BT474 breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2014 Sep;34(3):822-7. doi: 10.3892/ijmm.2014.1836. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25017566.
6. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):437-43. doi: 10.1038/nature04871. PMID: 16724055. Cited by: Wang R, He W, Li Z, Chang W, Xin Y, Huang T. Caveolin-1 functions as a key regulator of 17 β -estradiol-mediated autophagy and apoptosis in BT474 breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2014 Sep;34(3):822-7. doi: 10.3892/ijmm.2014.1836. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25017566.
7. Guo JY, Xia B, White E. Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell*. 2013 Dec 5;155(6):1216-9. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.019. PMID: 24315093; PMCID: PMC3987898. Cited by: Wang R, He W, Li Z, Chang W, Xin Y, Huang T. Caveolin-1 functions as a key regulator of 17 β -estradiol-mediated autophagy and apoptosis in BT474 breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2014 Sep;34(3):822-7. doi: 10.3892/ijmm.2014.1836. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25017566.
8. Zhang DM, Liu JS, Deng LJ, Chen MF, Yiu A, Cao HH, Tian HY, Fung KP, Kurihara H, Pan JX, Ye WC. Arenobufagin, a natural bufadienolide from toad venom, induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Carcinogenesis*. 2013 Jun;34(6):1331-42. doi: 10.1093/carcin/bgt060. Epub 2013 Feb 7. PMID: 23393227. Cited by: Wang R, He W, Li Z, Chang W, Xin Y, Huang T. Caveolin-1 functions as a key regulator of 17 β -estradiol-mediated autophagy and apoptosis in BT474 breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2014 Sep;34(3):822-7. doi: 10.3892/ijmm.2014.1836. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25017566.

9. Wang EY, Gang H, Aviv Y, Dhingra R, Margulets V, Kirshenbaum LA. p53 mediates autophagy and cell death by a mechanism contingent on Bnip3. *Hypertension*. 2013 Jul;62(1):70-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01028. Epub 2013 May 6. PMID: 23648705. Cited by: Wang R, He W, Li Z, Chang W, Xin Y, Huang T. Caveolin-1 functions as a key regulator of 17 β -estradiol-mediated autophagy and apoptosis in BT474 breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2014 Sep;34(3):822-7. doi: 10.3892/ijmm.2014.1836. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25017566.
10. Ramalho E, Olivon V, Martins WK. ESTADO DA ARTE DO MECANISMO AUTOFÁGICO COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NA CARDIOLOGIA. *Arq Catarin Med [Internet]*. 15º de julho de 2022 [citado 24º de novembro de 2023];50(4). Available at: <https://revista.acm.org.br/index.php/arquivos/article/view/1003>
11. Kornblit B, Munthe-Fog L, Madsen HO, Strøm J, Vindeløv L, Garred P. Association of HMGB1 polymorphisms with outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care*. 2008;12(3):R83. doi: 10.1186/cc6935. Epub 2008 Jun 24. PMID: 18577209; PMCID: PMC2481482.
12. Xu T, Jiang L, Wang Z. The progression of HMGB1-induced autophagy in cancer biology. *Onco Targets Ther*. 2018 Dec 31;12:365-377. doi: 10.2147/OTT.S185876. PMID: 30643434; PMCID: PMC6317470. Cited by: Liu L, Liu S, Luo H, Chen C, Zhang X, He L, Tu G. GPR30-mediated HMGB1 upregulation in CAFs induces autophagy and tamoxifen resistance in ER α -positive breast cancer cells. *Aging (Albany NY)*. 2021 Jun 28;13(12):16178-16197. doi: 10.18632/aging.203145. Epub 2021 Jun 28. PMID: 34182538; PMCID: PMC8266353.
13. Singh MP, Cho HJ, Kim JT, Baek KE, Lee HG, Kang SC. Morin Hydrate Reverses Cisplatin Resistance by Impairing PARP1/HMGB1-Dependent Autophagy in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2019 Jul 15;11(7):986. doi: 10.3390/cancers11070986. PMID: 31311167; PMCID: PMC6678360. Cited by: Run L, Wang L, Nong X, Li N, Huang X, Xiao Y. Involvement of HMGB1 in vemurafenib resistance in thyroid cancer cells harboring BRAF (V600E) mutation by regulating excessive autophagy. *Endocrine*. 2021 Feb;71(2):418-426. doi: 10.1007/s12020-020-02417-y. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32666385.
14. Xiong J, Wang D, Wei A, Ke N, Wang Y, Tang J, He S, Hu W, Liu X. MicroRNA-410-3p attenuates gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma by inhibiting HMGB1-mediated autophagy. *Oncotarget*. 2017 Nov 18;8(64):107500-107512. doi: 10.18632/oncotarget.22494. PMID: 29296182; PMCID: PMC5746084.
15. Decuypere JP, Parys JB, Bultynck G. Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction. *Cells*. 2012 Jul 6;1(3):284-312. doi: 10.3390/cells1030284. PMID: 24710477; PMCID: PMC3901098
16. Xu Q, Gao S, Miao J. The relationship between autophagy-related genes and the staging and prognosis of thyroid cancer: a bioinformatics analysis. *Gland Surg*. 2021 Aug;10(8):2511-2527. doi: 10.21037/gs-21-480. PMID: 34527563; PMCID: PMC8411096.
17. Kim HM, Kim ES, Koo JS. Expression of Autophagy-Related Proteins in Different Types of Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 2;18(3):540. doi: 10.3390/ijms18030540. PMID: 28257096; PMCID: PMC5372556. Cited by: Xu Q, Gao S, Miao J. The relationship between autophagy-related genes and the staging and prognosis of thyroid cancer: a bioinformatics analysis. *Gland Surg*. 2021 Aug;10(8):2511-2527. doi: 10.21037/gs-21-480. PMID: 34527563; PMCID: PMC8411096.
18. Plantinga TS, Tesselaar MH, Morreau H, Corssmit EP, Willemsen BK, Kusters B, van Engen-van Grunsven AC, Smit JW, Netea-Maier RT. Autophagy activity is associated with membranous sodium iodide symporter expression and clinical response to radioiodine therapy in non-medullary thyroid cancer. *Autophagy*. 2016 Jul 2;12(7):1195-205. doi: 10.1080/15548627.2016.1174802. Epub 2016 Apr 22. PMID: 27105307; PMCID: PMC4990989. Cited by: Xu Q, Gao S, Miao J. The relationship between autophagy-related genes and the staging and prognosis of thyroid cancer: a bioinformatics analysis. *Gland Surg*. 2021 Aug;10(8):2511-2527. doi: 10.21037/gs-21-480. PMID: 34527563; PMCID: PMC8411096.
19. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010 May;221(1):3-12. doi: 10.1002/path.2697. PMID: 20225336; PMCID: PMC2990190. Cited by: Netea-Maier RT, Klück V, Plantinga TS, Smit J. Autophagy in Thyroid Cancer: Present Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Endocrinology*. 2015 Feb 18;6.
20. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006 Jul;10(1):51-64. doi: 10.1016/j.ccr.2006.06.001. PMID: 16843265; PMCID: PMC2857533. Cited by: Netea-Maier RT, Klück V, Plantinga TS, Smit J. Autophagy in Thyroid Cancer: Present Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Endocrinology*. 2015 Feb 18;6.
21. Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2010 Jun;29(2):273-83. doi: 10.1007/s10555-010-9220-9. PMID: 20390322; PMCID: PMC2865636. Cited by: Netea-Maier RT, Klück V, Plantinga TS, Smit J. Autophagy in Thyroid Cancer: Present Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Endocrinology*. 2015 Feb 18;6.
22. Argyriou, Andreas & Bruna, Jordi & Genazzani, Armando & Cavaletti, Guido. (2017). Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: Management informed by pharmacogenetics. *Nature reviews. Neurology*. 13. 10.1038/nrneurol.2017.88.
23. Santhiya P, Christian Bharathi A, Syed Ibrahim B. The pathogenicity, structural and functional exploration of human HMGB1 single nucleotide polymorphisms using *in silico* study. *J Biomol Struct Dyn*. 2020 Sep;38(15):4471-4482. doi: 10.1080/07391102.2019.1682048. Epub 2019 Oct 29. PMID: 31625460.