



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

AMANDA CRISTOFOLI CAMARGO

NÍVEIS DIFERENCIAIS DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA NA
CARCINOGENESE COLORRETAL

Porto Alegre

2024

AMANDA CRISTOFOLI CAMARGO

NÍVEIS DIFERENCIAIS DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA NA
CARCINOGENESE COLORRETAL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Marina Siebert
Coorientador(a): Profa. Dra. Ursula Matte

Porto Alegre

2024

CIP – Catalogação na Publicação

Cristofoli Camargo , Amanda
NÍVEIS DIFERENCIAIS DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À
AUTOFAGIA NA CARCINOGENESE COLORRETAL / Amanda
Cristofoli Camargo . -- 2024.
71 f.
Orientadora: Marina Siebert.

Coorientadora: Ursula Matte.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Câncer colorretal. 2. Autofagia. 3. Morfometria
nuclear. 4. Histopatologia. 5. Tissue Microarray. I.
Siebert, Marina, orient. II. Matte, Ursula, coorient.
III. Título.

AMANDA CRISTOFOLI CAMARGO

NÍVEIS DIFERENCIAIS DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA NA
CARCINOGENÊSE COLORRETAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Gastroenterologia e Hepatologia.

Aprovado em: 31/10/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Igor Araújo Vieira
Unisinos

Profa. Dra. Caroline Uribe
UFRGS

Profa. Dra. Clévia Rosset
HCPA

*Dedico esse manuscrito à minha
família.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a minha orientadora Prof. Dra Marina Siebert pela dedicação, pelo apoio em momentos difíceis, por mover montanhas para que conseguíssemos tirar esse nosso lindo trabalho do papel e por ser essa pessoa sensacional.

À minha coorientadora Prof. Dra Ursula Matte pela orientação e por ter contribuído com a realização desse trabalho.

À Leticia Brondani, à Emily Pilar e à Alexia Deluca que foram extremamente essenciais para a realização dos experimentos e obtenção dos dados.

Ao Prof. Dr Eduardo Filippi-Chiela pela competência, por ser extremamente atencioso e solícito para nos auxiliar nas análises dos dados.

À Prof. Dra Fernanda Visioli que sempre foi extremamente atenciosa e solícita para nos auxiliar na obtenção e nas análises dos dados do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia e a sua excelente equipe de professores, onde pude aprender com excelência durante as aulas e seminários.

À UFRGS e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pela oportunidade de ingressar em uma Pós-Graduação de extrema qualidade, enriquecendo a minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do HCPA pelo apoio financeiro para esse trabalho.

À minha família, agradeço o apoio e incentivo para que eu embarcasse nessa jornada. E por sempre me ampararem nos momentos difíceis.

RESUMO

O carcinoma colorretal (CCR) representa um significativo desafio de saúde pública mundial, sendo o terceiro tipo de câncer mais prevalente e a segunda principal causa de mortes por câncer globalmente. Uma compreensão aprofundada dos mecanismos celulares envolvidos no CCR é crucial para o desenvolvimento de novas terapias e para o aprimoramento dos métodos diagnósticos. A autofagia, um processo celular vital e conservado evolutivamente, é essencial para a degradação e reciclagem lisossomal de organelas e proteínas, sustentando a homeostase celular. Contudo, disfunções nesse mecanismo têm sido consistentemente vinculadas à carcinogênese. Este estudo teve como objetivo geral a investigação dos níveis de três proteínas relacionadas à autofagia (p62, beclina-1, e LC3), além do fator de transcrição EB e do marcador de proliferação celular Ki67 em amostras de tecido colorretal não-tumoral, lesões pré-malignas (pólipos) e tecido de CCR, correlacionando-os com a progressão do tumor e características clínico-patológicas. Amostras de 62 pacientes com CCR, 64 amostras de tecido não-tumoral e 10 pacientes com pólipos foram incluídas no estudo. Os tecidos foram organizados em *tissue microarrays* (TMAs) e submetidos à análise por imunohistoquímica usando anticorpos específicos para cada proteína. A quantificação dos níveis proteicos foi efetuada utilizando o *software* ImageJ, permitindo o estabelecimento de um índice de autofagia para cada amostra. Adicionalmente, realizamos análises de morfometria nuclear para detectar alterações morfológicas celulares e associá-las à autofagia e características histopatológicas do tumor. Os resultados indicaram um aumento significativo na expressão de p62 e uma diminuição nos níveis de LC3 nas amostras de CCR, sugerindo uma função autofágica alterada associada à progressão do tumor. O aumento na expressão de Ki67, um marcador de proliferação celular, destacou a intensa atividade proliferativa nas amostras de CCR e pólipos, evidenciando a agressividade da patologia. Além disso, a predominância de homens nos casos de CCR e a maior prevalência de mulheres nas lesões de pólipos sugerem influências hormonais e no estilo de vida/dieta na progressão da doença. As análises de morfometria nuclear revelaram mudanças substanciais na morfologia nuclear, incluindo o aumento do tamanho nuclear, que está associado com a malignidade avançada e instabilidade genômica. Tais alterações são consistentes com o comportamento agressivo das células tumorais em estágios avançados. A prevalência significativa do perfil p62^{Alto}, beclina-1^{Baixo} e LC3^{Baixo} nas amostras de CCR sugere uma resposta autofágica disfuncional, que pode facilitar a progressão do tumor ao permitir o acúmulo de material celular danificado. A partir destes achados, é possível concluir que a desregulação da autofagia pode desempenhar um papel crítico na progressão do CCR, favorecendo a resistência e o avanço do tumor, o que resulta em um prognóstico desfavorável para os pacientes. Sugere-se que a realização de uma avaliação conjunta desses indicadores, ao invés de seu uso isolado, pode conferir uma melhoria da precisão prognóstica e proposição de novas abordagens terapêuticas no tratamento do CCR.

Palavras-chave: Câncer colorretal; Autofagia; Morfometria nuclear; Histopatologia; *Tissue Microarray*.

ABSTRACT

Colorectal carcinoma (CRC) represents a significant global public health challenge, being the third most prevalent cancer type and the second leading cause of cancer-related deaths worldwide. A thorough understanding of the cellular mechanisms involved in CRC is crucial for the development of new therapies and the enhancement of diagnostic methods. Autophagy, a vital and evolutionarily conserved cellular process, is essential for the lysosomal degradation and recycling of organelles and proteins, sustaining cellular homeostasis. However, dysfunctions in this mechanism have consistently been linked to carcinogenesis. This study aimed to investigate the levels of three autophagy-related proteins (p62, beclin-1, and LC3), along with the transcription factor EB and the cellular proliferation marker Ki67, in samples of non-tumoral colorectal tissue, pre-malignant lesions (polyps), and CRC tissue, correlating them with tumor progression and clinicopathological characteristics. Samples from 62 CRC patients, 64 non-tumoral tissues, and 10 patients with polyps were included in the study. The tissues were organized into tissue microarrays (TMAs) and subjected to immunohistochemical analysis using specific antibodies for each protein. Protein levels were quantified using ImageJ software, allowing the establishment of an autophagy index for each sample. Additionally, we performed nuclear morphometric analyses to detect cellular morphological changes and associate them with autophagy and tumor histopathological characteristics. The results indicated a significant increase in p62 expression and a decrease in LC3 levels in CRC samples, suggesting an altered autophagic function associated with tumor progression. Increased expression of Ki67, a cell proliferation marker, highlighted the intense proliferative activity in CRC and polyp samples, underscoring the aggressiveness of the pathology. Furthermore, the predominance of men among CRC cases and the higher prevalence of polyps in women suggest hormonal influences and lifestyle/dietary factors in disease progression. Nuclear morphometry analyses revealed substantial morphological changes, including increased nuclear size, associated with advanced malignancy and genomic instability. Such changes align with the aggressive behavior of tumor cells in advanced stages. The significant prevalence of the p62^{High}, beclin-1^{Low}, and LC3^{Low} profile in CRC samples suggests dysfunctional autophagic responses, potentially facilitating tumor progression by allowing the accumulation of damaged cellular material. These findings suggest that autophagy deregulation may play a critical role in CRC progression, fostering tumor resistance and advancement, which result in a poor prognosis for patients. It is proposed that a combined assessment of these indicators, rather than their isolated use, could improve prognostic accuracy and support the development of novel therapeutic approaches for CRC treatment.

Keywords: Colorectal cancer; Autophagy; Nuclear morphometry; Histopathology; Tissue Microarray.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação dos pólipos adenomatosos que podem ser (a) sésseis ou pedunculados e (b) vilosos.	21
Figura 2 - Progressão do epitélio intestinal até o desenvolvimento de CCR.	22
Figura 3 - Representação esquemática do processo de autofagia.	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BECN1	Beclina-1
CCR	Carcinoma colorretal
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina-eosina
HRP	<i>Horseradish</i> peroxidase
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LGPD	Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais
MAP	Polipose Associada à <i>MUTYH</i>
MAP1LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NII	Índice de Irregularidade Nuclear
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
SPC	Serviço de Patologia Cirúrgica
SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
TFEB	Fator de transcrição EB
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
tNMA	Análise da morfometria nuclear de tecido
UICC	União Internacional para o Controle do Câncer
UPL	Unidade de Pesquisa Laboratorial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 JUSTIFICATIVA	12
1.2 QUESTÃO DE PESQUISA	13
1.3 HIPÓTESE	13
1.4 OBJETIVOS	13
1.4.1 Objetivo geral.....	13
1.4.2 Objetivos específicos.....	13
2 MÉTODOS.....	15
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ESTUDO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	15
2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	15
2.3 <i>TISSUE MICROARRAY</i> (TMA)	16
2.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)	16
2.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA NUCLEAR DE TECIDO (tNMA).....	18
2.6 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL	18
2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 CARCINOMA COLORRETAL	20
3.2 LESÕES PRÉ-MALIGNAS.....	21
3.3 AUTOFAGIA.....	22
3.3.1 MAP1LC3 (<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3</i>).....	23
3.3.2 TFEB (<i>Transcription factor EB</i>)	24
3.3.3 p62 (<i>SQSTM1, Sequestosome 1</i>)	25
3.3.4 Beclina-1 (<i>BECN1</i>)	27
4 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
APÊNDICE A – ROTEIRO DE LIGAÇÃO TELEFÔNICA ...	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma colorretal (CCR) é um problema de saúde global significativo, classificado como o terceiro câncer mais comum e a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo (Roshandel; Ghasemi-Kebria; Malekzadeh, 2024). O CCR se origina no cólon ou no reto, iniciando como pólipos benignos na mucosa intestinal, os quais podem se transformar em malignos com o passar do tempo. A etiologia do CCR é multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais e relacionados ao estilo de vida (Palliyaguru; Palliyaguru; Liyanage, 2024). Atualmente os países ocidentais são os mais acometidos pelo CCR, com uma incidência de 55% em relação aos outros países (Holmes, 2015). Entretanto, novos estudos trazem que essa tendência está mudando devido ao rápido desenvolvimento de alguns países nos últimos anos (Brody, 2015). O CCR muitas vezes progride de forma gradual e assintomática. As células da mucosa intestinal sofrem mutações transformando-se em adenomas, pólipos benignos que podem conter células displásicas, que crescem lentamente ao longo de anos (Brenner; Kloor; Pox, 2014).

Estudos relatam o importante papel das proteínas autofágicas na carcinogênese (Galluzzi *et al.*, 2015; Koustas *et al.*, 2019). Alterações no processo de ativação da autofagia têm sido associadas à progressão e ao desenvolvimento de tumores (Wang *et al.*, 2021). Nas células malignas, a autofagia pode acelerar a progressão do CCR ao promover a proliferação de células cancerígenas, inibir a apoptose e interromper o ciclo celular, o que favorece a sobrevivência tanto das células cancerígenas quanto das células estaminais cancerígenas, especialmente em condições de deficiência nutricional. Além disso, a autofagia reduz a quimiossensibilidade e a radiosensibilidade das células (Diniz; Lacerda, 2004). Estudos prévios demonstraram que a autofagia está relacionada a diversos aspectos da fisiopatologia colorretal, incluindo a manutenção da homeostase celular (Diniz ; Lacerda , 2004; Macrae *et al.*, 2016). A desregulação de proteínas relacionadas à autofagia, como p62, glicoproteína-3, ATGs, LC3, beclina-1, Rab7 e fator de transcrição EB (TFEB), foi descrita como um fator contribuinte para o desenvolvimento e progressão do CCR (Macrae *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2021).

Apesar dos avanços significativos na terapia do câncer, aproximadamente 86% dos pacientes com tumores terminais morrem dentro de cinco anos após o diagnóstico inicial (Jin *et al.*, 2020). Embora os mecanismos exatos da autofagia permaneçam incertos, ela se tornou um foco cada vez mais popular da pesquisa oncológica atual (Kosumi *et al.*, 2017). Um olhar mais atento às vias e mecanismos envolvidos na progressão das lesões benignas até o

aparecimento do CCR pode ser uma alternativa para auxiliar no diagnóstico e prognóstico dos pacientes devido à identificação de biomarcadores.

Um dos métodos disponíveis para identificação e pesquisa de marcadores biológicos é a imuno-histoquímica (IHQ). Essa técnica pode viabilizar a identificação de novos biomarcadores, que poderão ser utilizados para melhorar a compreensão dos mecanismos tumorais com impacto no prognóstico, estadiamento e tratamento do CCR, melhorando a qualidade de vida dos indivíduos afetados (Kosumi *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021).

A literatura indica que alterações na estrutura dos núcleos celulares são frequentemente observadas em células cancerígenas. Diferentes tipos de tumores estão associados a alterações nucleares específicas. Por exemplo, nos adenocarcinomas, uma alteração comum é a polilobulação, caracterizada por um núcleo subdividido em vários lobos. Uma análise detalhada da estrutura nuclear pode, portanto, oferecer um valioso recurso diagnóstico (dos Santos *et al.*, 2022; Iserhard *et al.*, 2024; Zink; Fischer; Nickerson, 2004).

A presente dissertação teve como objetivo avaliar os níveis de três marcadores de autofagia — as proteínas LC3, p62 e beclina-1 — e o marcador TFEB, além do marcador de proliferação celular Ki67, em amostras primárias de lesões pré-malignas e tecido tumoral de CCR. O estudo buscou associar esses marcadores com a progressão tumoral e suas características clínico-patológicas. Adicionalmente, a morfometria nuclear foi analisada, associando-a tanto à autofagia quanto à histopatologia tumoral.

1.1 JUSTIFICATIVA

Alterações na autofagia estão implicadas no desenvolvimento de diversos tipos tumorais. Os tecidos humanos reagem a diferentes formas de estresse através da ativação de uma variedade de mecanismos, entre os quais a autofagia se destaca. Órgãos e tecidos que estão frequentemente expostos a sinais de estresse ambiental tendem a depender mais da autofagia para preservar seu estado de homeostase. A análise integrada da expressão de marcadores de autofagia pode proporcionar *insights* valiosos sobre o papel desse mecanismo na carcinogênese do CCR. Esta abordagem não apenas contribui para o entendimento da doença, mas também possibilita a utilização clínica de proteínas de autofagia como potenciais marcadores prognósticos e terapêuticos.

Além disso, durante o processo fisiológico, a autofagia contribui para a manutenção do equilíbrio celular, e sua perturbação está associada à transformação celular. Nas células que se transformam, mas ainda não são tumorais, a restauração da função autofágica pode favorecer

o desenvolvimento tumoral. A associação da avaliação de marcadores de autofagia com a morfometria nuclear pode aprofundar o entendimento do impacto da autofagia na carcinogênese do CCR.

1.2 QUESTÃO DE PESQUISA

Existe diferença na expressão das proteínas LC3, p62, beclina-1, TFEB e Ki67 entre amostras de tecido com CCR, tecido com lesões pré-malignas e tecido não-tumoral?

1.3 HIPÓTESE

Existe diferença significativa nos níveis das proteínas autofágicas LC3, p62 e beclina-1, assim como da proteína TFEB e da proteína marcadora de proliferação celular Ki67, em amostras de tecido com CCR em comparação com os níveis destas proteínas em tecido com lesões pré-malignas (pólipos) e não-tumoral.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Avaliar os perfis de expressão de proteínas relacionadas à autofagia em diferentes estágios do processo celular em amostras primárias de lesões pré-malignas e tecidos de carcinoma colorretal, visando associar estes marcadores à progressão tumoral e às características clínico-patológicas.

1.4.2 Objetivos específicos

- i. Avaliar e comparar os níveis de expressão das proteínas relacionadas à autofagia LC3, p62, beclina-1, e TFEB, em amostras de biópsias de tecido colorretal não-tumoral, tecido colorretal com lesões pré-malignas (pólipos) e tecido de CCR;
- ii. Correlacionar os níveis de expressão dessas proteínas com o marcador de proliferação celular Ki67 para as interações entre a autofagia e a atividade proliferativa nos diversos estados celulares;

iii. Analisar a morfologia nuclear, examinando a forma e o tamanho dos núcleos nas diferentes amostras de tecido;

iv. Associar as características morfológicas do núcleo com os níveis das proteínas relacionadas à autofagia LC3, p62, beclina-1, e TFEB para compreender as dinâmicas celulares em resposta à progressão do tumor e ao *status* da autofagia.

2 MÉTODOS

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ESTUDO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Este é um estudo do tipo transversal retrospectivo. Os grupos deste trabalho foram selecionados a partir de amostras de tecido colorretal em blocos de parafina, arquivadas pelo Serviço de Patologia Cirúrgica (SPC) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período de 01/01/2012 a 31/07/2018. Os critérios de inclusão definiram três grupos de amostras: pacientes diagnosticados com CCR, pacientes com lesões pré-malignas (pólipos) e biópsias colorretais de tecido normal de pacientes com CCR (grupo controle não-tumoral).

A seleção das amostras de tecido para inclusão no estudo foi realizada mediante uma solicitação de *Query* ao *Qualitor* da Coordenadoria de Gestão de Tecnologia da Informação e Comunicação (CGTIC), após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). A solicitação na *Query* incluiu os seguintes dados:

a) Filtros que foram aplicados: 1) Pacientes que realizaram exames anátomo-patológicos da região anatômica do intestino, no período de 01/01/2012 a 31/07/2018, com resultados indicando: intestino normal (sem alterações), intestino com pólipos intestinais e intestino com CCR; 2) Pacientes que assinaram o Termo de Consentimento da Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais (LGPD, Apêndice B) e que autorizaram serem contatados por telefone (Apêndice A).

b) Colunas a serem recuperadas: 1) número do prontuário; 2) informação sobre óbito.

As amostras foram selecionadas após o retorno da *Query* sobre os exames anátomo-patológicos realizados no SPC do HCPA, definidos na solicitação da *Query* e com os diagnósticos especificados.

2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

A avaliação das variáveis clínico-patológicas do CCR é fundamental para entender possíveis desfechos na sobrevida dos pacientes afetados e identificar características relevantes na progressão tumoral, como angiogênese e o perfil de invasão tumoral. As variáveis clínico-patológicas analisadas incluem: idade, sexo, grau de diferenciação, estadiamento (sistema TNM), diagnóstico histopatológico, sobrevida geral e sobrevida livre de doença. Essas informações foram coletadas dos prontuários dos pacientes.

O Sistema TNM de classificação dos tumores malignos, desenvolvido pela União Internacional para o Controle do Câncer (UICC), é amplamente adotado para determinar a extensão anatômica do câncer. Este sistema categoriza o tumor primário (T), os linfonodos das cadeias de drenagem linfática relacionadas (N) e a ocorrência de metástases distantes (M). Cada uma destas categorias é graduada em uma escala que, para T, varia de T0 a T4, para N de N0 a N3 e para M de M0 a M1, refletindo a progressão do tumor. Adicionalmente, as categorias T e N podem receber subdivisões alfabéticas (a, b, c) que detalham ainda mais a evolução do tumor e o envolvimento linfonodal. A utilização do símbolo "X" indica a impossibilidade de avaliar uma categoria adequadamente. As combinações destes valores resultam em estádios que se estendem do I ao IV, muitas vezes subdivididos em A e B para indicar a gravidade da doença (INCA, 2022).

2.3 TISSUE MICROARRAY (TMA)

A técnica de *tissue microarray* (TMA) consiste no agrupamento de múltiplas amostras de tecido em um único bloco de parafina, facilitando a análise de marcadores moleculares em larga escala. Entre as vantagens do uso do TMA estão a economia de tempo e a redução de custos nas análises (Wisner; Larsen; Maguire, 2022).

A primeira etapa envolveu a construção dos TMAs e de seus respectivos mapas, detalhando a posição e identificação de cada cilindro no bloco de TMA. O bloco de TMA foi criado a partir das amostras incluídas neste estudo. Para melhorar a avaliação da área tumoral e a representatividade dos campos selecionados, foram escolhidas duas áreas distintas para cada paciente, resultando em uma duplicata de cada amostra (2 cilindros no bloco de TMA por amostra selecionada). Para a seleção das áreas destinadas à remoção dos cilindros, as lâminas de hematoxilina-eosina (HE) de cada paciente foram avaliadas sob microscópio, marcando as áreas específicas para posterior corte do cilindro do bloco de parafina. A confecção dos TMAs foi realizada na Unidade de Pesquisa Laboratorial (UPL)-Patologia, produzindo blocos de 36 cilindros, cada um com 3 mm de diâmetro.

2.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

A combinação das técnicas de IHQ e TMA possibilita a análise simultânea de centenas de amostras de tecido, proporcionando um grau de padronização experimental sem precedentes (Simon; Mirlacher; Sauter, 2010). Os blocos de TMA foram seccionados em um micrótomo

com espessura de 3 μm e transferidos para lâminas silanizadas. Os cortes passaram por um processo de desparafinização e reidratação, seguidos pela recuperação dos epítomos com aquecimento em Tris-EDTA 50 mM (pH 6) por 20 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada em temperatura ambiente usando peróxido de hidrogênio 5% em metanol por 20 minutos. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com 5% de leite em pó desnatado durante 20 minutos. As lâminas foram incubadas *overnight* à temperatura de 4°C com anticorpos primários específicos para beclina-1 (anti-BECN1, *Cell Signaling Technology*, Cat# 3738, RRID:AB_490837, 1:50, pH 9), p62 (anti-SQSTM1, *Cell Signaling Technology*, Cat# 5114, RRID:AB_10624872, 1:100, pH 6), LC3 (anti-MAP1LC3A/B, Abcam, Cat# ab128025, RRID:AB_11143008, 1:200, pH 6), TFEB (anti-TFEB, *Cell Signaling Technology*, Cat# 4240, RRID:AB_11220225, 1:50, pH 6), e Ki67 (anti-Ki67, Roche, Cat# 05278384001, RRID:AB_2631262, pH 9), com um anticorpo por vez por lâmina de TMA. Um anticorpo secundário conjugado a *horseradish* peroxidase (HRP) foi utilizado para incubação dos cortes durante 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. O reagente *liquid Dab* (Dako, K3468) foi usado para a visualização da reação, conforme as orientações do fabricante. Após a visualização, procedeu-se à contracoloração com hematoxilina e diferenciação em água amoniacal, seguida por desidratação em etanol absoluto e imersão em xilol para a montagem das lâminas em resina tipo *Entellan*. Controles positivos (cérebro para LC3, músculo esquelético ou tonsila para p62, carcinoma renal para TFEB, e carcinoma ou apêndice para Ki67) e negativos (utilizando apenas anticorpos secundários) foram incluídos.

A coloração foi avaliada de maneira independente e cega por dois pesquisadores da equipe, utilizando um microscópio de luz. As fotografias foram capturadas com uma câmera de microscopia digital com aumento final 200x. A reatividade às proteínas-alvo foi expressa como uma coloração granulosa difusa distribuída pelas membranas e pelo citoplasma, analisada com base na intensidade e proporção.

A quantificação das células imunopositivas foi realizada a partir de imagens de toda a extensão do corte histológico, capturadas com aumento de 200x usando o microscópio binocular de captura *Olympus BX51* com câmera acoplada (*Olympus Q-color 5 RTV*) e *software Q-capture* (versão 2.0.11). As imagens obtidas foram utilizadas para a quantificação das proteínas em estudo com o *software* ImageJ, avaliando-se 1000 células por amostra/cilindro para determinar a porcentagem de células positivas e negativas. Ao final da quantificação, calculou-se a média dos dados obtidos de cada cilindro da mesma amostra.

2.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA NUCLEAR DE TECIDO (tNMA)

A análise morfológica nuclear de tecido (tNMA) foi conduzida utilizando um método desenvolvido por Nunes e colaboradores (2019). A tNMA se caracteriza pela extração de dados morfológicos nucleares, obtendo informações sobre o tamanho (área) e forma dos núcleos de células eucariontes a partir de imagens de lâminas coradas com HE com o auxílio do *software Image Pro Plus 6.0* (Filippi-Chiela *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2019). As lâminas coradas com HE de cada bloco de parafina foram solicitadas ao SPC do HCPA.

Os contornos nucleares de no mínimo 50 núcleos de cada amostra foram analisados. A captura das imagens foi realizada conforme descrito anteriormente para IHQ, com aumento de 400x. Com os dados sobre tamanho e forma dos núcleos coletados, foi possível avaliar correlações entre as amostras estudadas, a morfometria nuclear e os níveis de expressão das proteínas relacionadas à autofagia (LC3, p62, beclina-1 e TFEB) e da proteína marcadora de proliferação nuclear Ki67.

2.6 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando a ferramenta online *PSS Health* (Borges *et al.*, 2021). Com base no estudo de Lima e colaboradores (2017), o cálculo indicou a necessidade de 144 indivíduos, sendo 48 para cada grupo, para detectar uma diferença mínima de 12,5% nas percentagens médias de células LC3-II positivas entre os grupos de Leucoplasia Oral e Mucosa Oral Normal. Considerando um acréscimo de 10% para compensar possíveis perdas e recusas, o número necessário ajustado é de 56 indivíduos por grupo. Este cálculo foi realizado considerando um poder estatístico de 80%, um nível de significância de 5% e um desvio padrão de 21,8523% (de Lima *et al.*, 2017).

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise de dados da tNMA foi conduzida usando uma planilha Excel, acessível em www.ufrgs.br/labsinal. A elipse normal foi definida com base nos dados do grupo controle, utilizando dois desvios-padrão da área média e índice de irregularidade nuclear (NII) médio dos núcleos de controle para estabelecer a elipse. Limiares horizontais para classificar a área nuclear (pequena, normal e grande) foram definidos nos limites mínimo e máximo da elipse normal (média \pm 2 desvios-padrão), e limiares verticais para regularidade nuclear (regular ou irregular)

foram determinados por quatro desvios-padrão da média do NII. Esses limiares ajudaram a segregar populações nucleares com base em variações morfométricas, o que ilustra o gráfico de área versus NII.

Variáveis clínico-patológicas, incluindo idade, sexo, etnia, localização do tumor, grau de diferenciação, estadiamento TNM, diagnóstico histopatológico e *status* vital foram extraídas de prontuários médicos eletrônicos dos pacientes participantes. Para inclusão, os pacientes deveriam ter sido submetidos a exames de patologia anatômica dentro do prazo especificado e concordado com os termos de contato da LGPD do Brasil (Brasil, 2018).

As análises estatísticas foram conduzidas usando o *software* IBM SPSS *Statistics*, versão 18.0. A normalidade dos dados foi avaliada usando o teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors. Para dados que não apresentaram distribuição normal, testes não paramétricos foram utilizados. Especificamente, o teste de Kruskal-Wallis foi empregado para analisar características histopatológicas e avaliar os níveis de proteínas autofágicas e variáveis morfométricas nucleares. A proteína beclina-1, que mostrou uma distribuição normal, foi analisada usando ANOVA seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações detalhadas. Além disso, o coeficiente de correlação de Spearman foi empregado para explorar a relação entre autofagia e morfometria nuclear. Para todos os testes, um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo, indicando um nível de confiança de 95% de que os resultados não são devidos ao acaso.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CARCINOMA COLORRETAL

O CCR é um câncer que se origina no cólon ou no reto, sendo o terceiro tipo de câncer mais comum na população em geral (Roshandel; Ghasemi-Kebria; Malekzadeh, 2024). Ele geralmente se desenvolve a partir de pólipos adenomatosos, que são crescimentos anormais no revestimento do cólon ou reto, podendo evoluir para malignidade se não forem detectados e removidos precocemente (Aghabozorgi *et al.*, 2019). O CCR é globalmente o segundo câncer mais comum em mulheres e o terceiro em homens, sendo a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo (Fitzmaurice *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2020; Roshandel; Ghasemi-Kebria; Malekzadeh, 2024). Em termos de mortalidade no Brasil, em 2020, ocorreram 20.245 óbitos por carcinoma de cólon e reto, correspondendo a uma taxa de 9,56 por 100 mil habitantes. Entre os homens, foram registrados 9.889 óbitos (9,55 por 100 mil) e, entre as mulheres, 10.356 mortes (9,57 por 100 mil)(INCA, 2019). Um estudo de coorte retrospectivo realizado nos Estados Unidos entre 1975 e 2010 projetou que a incidência de CCR deve aumentar de 90% para 124,2% em pacientes de 20 a 34 anos até 2030 (Bailey *et al.*, 2015). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o CCR é a terceira neoplasia maligna mais comum no Brasil, com incidências mais altas nas regiões Sul e Sudeste, variando de 23,6 a 28,6 casos por 100.000 habitantes, enquanto as menores taxas foram observadas no Centro-Oeste (15,4/100 mil), Nordeste (8,9-10,8/100 mil) e Norte (5,3-6,5/100 mil) (INCA, 2019).

As neoplasias colorretais malignas são classificadas em dois grupos: de origem epitelial, incluindo principalmente o adenocarcinoma e, raramente, carcinoma de células escamosas, e de origem não-epitelial, como linfomas, lipossarcomas, carcinoides e leiomiossarcomas. O adenocarcinoma representa 95% de todos os tumores colorretais malignos (Diniz; Lacerda, 2004).

Fatores como idade, genética e ambiente são determinantes no desenvolvimento do CCR(Li *et al.*, 2021; Thanikachalam; Khan, 2019), sendo a maioria (70-80%) dos casos esporádicos, ocorrendo em pessoas de médio risco (homens e mulheres acima de 50 anos, sem histórico pessoal ou familiar da doença)(Aghabozorgi *et al.*, 2019). Estima-se, no entanto, que mais de 35% dos casos de CCR em adultos jovens (20 a 54 anos, brancos) sejam relacionados a síndromes hereditárias ou familiares, causadas por mutações na linhagem germinativa (Jin *et al.*, 2020; Thanikachalam; Khan, 2019). As síndromes hereditárias do CCR incluem a polipose adenomatosa familiar (PAF), polipose associada à MUTYH (MAP), síndrome de Lynch (CCR

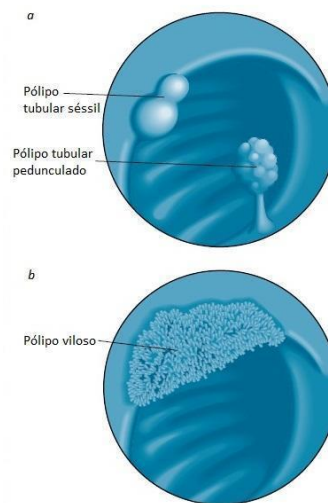
hereditário sem polipose), polipose serrilhada, síndrome Peutz-Jeghers, síndrome de polipose hamartomatosa e síndrome de polipose mista (Cardoso, 2020; Jin et al., 2020; Thanikachalam; Khan, 2019). Entre essas, a PAF é a mais incidente (Roshandel; Ghasemi-Kebria; Malekzadeh, 2024). Outros fatores de risco bem estabelecidos incluem doença inflamatória intestinal, obesidade, sedentarismo, tabagismo, consumo de álcool, diabetes mellitus e resistência à insulina, histórico de radiação abdominal, doença arterial coronariana, anastomose ureterocólica, acromegalia e transplante renal com uso de medicamentos imunossupressores (Roshandel; Ghasemi-Kebria; Malekzadeh, 2024).

3.2 LESÕES PRÉ-MALIGNAS

A progressão de adenomas para carcinoma é um processo fundamental para as estratégias de rastreamento do CCR. Adenomas, também conhecidos como pólipos adenomatosos, são lesões pré-malignas que se desenvolvem na parede interna do intestino grosso. Eles são caracterizados por protuberâncias da membrana da mucosa que formam estruturas glandulares visíveis, que podem ser classificadas em pedunculadas (fixadas por uma base estreita e pedúnculo longo), sésseis (com base ampla e achatada, sem pedúnculo) ou vilosos (compostos por projeções epiteliais digitiformes que se estendem além da superfície da mucosa intestinal) (Figura 1) (Levin, 2006). Esses adenomas frequentemente evoluem de pólipos pequenos para maiores, acima de 1 cm, e podem levar a displasia e câncer ao longo de aproximadamente uma década (Figura 2) (Mallmann *et al.*, 2017; INCA, 2019).

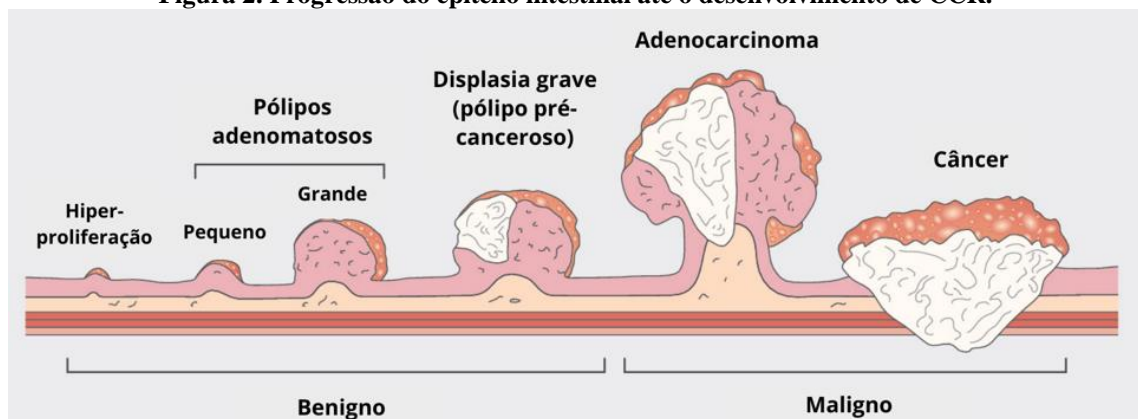
Alguns tipos de câncer também podem derivar de adenomas planos, que apresentam uma probabilidade maior de progressão para displasia. Os pólipos hiperplásicos, indistinguíveis dos adenomatosos por endoscopia convencional, exigem biópsia para diagnóstico preciso. É importante destacar que cerca de dois terços dos pólipos identificados durante endoscopias são adenomas. O risco de desenvolver CCR aumenta em função do tamanho, da quantidade e das características histológicas dos pólipos (Mallmann *et al.*, 2017).

Figura 1. Representação dos pólipos adenomatosos que podem ser (a) sésseis ou pedunculados e (b) vilosos.



Fonte: Adaptada de Levin *et al.*, 2006.

Figura 2. Progressão do epitélio intestinal até o desenvolvimento de CCR.



Fonte: Adaptado de Johns Hopkins Colon Cancer Center. Polyps 101.

www.hopkinscoloncancercenter.org/CMS/CMS_Page.aspx?CurrentUDV=59&CMS_Page_ID=744568E4-291E-4276-97C4-FA7A4EE02235).

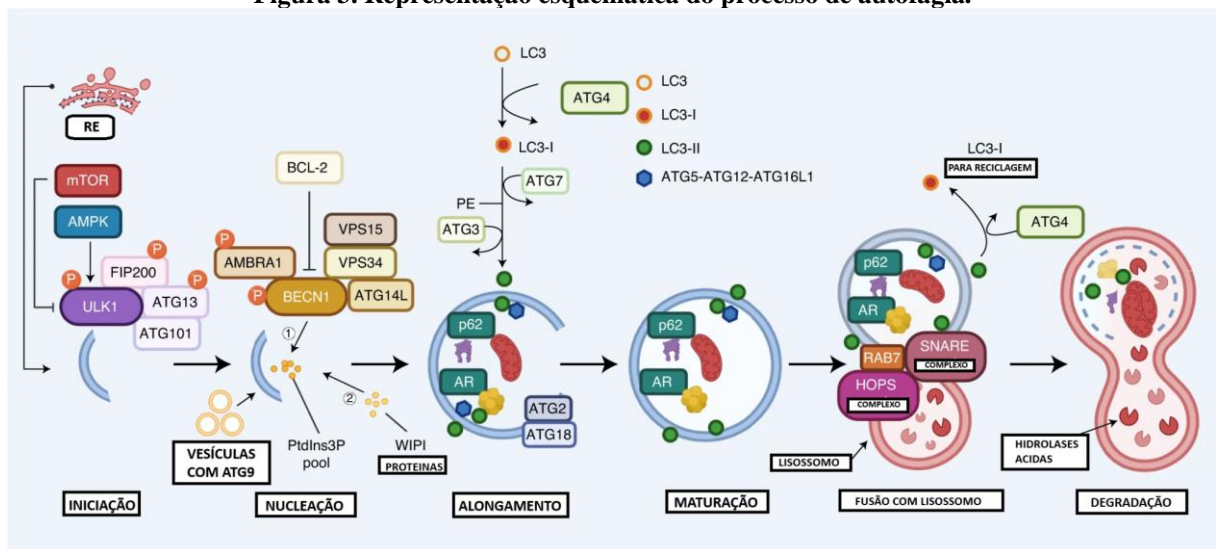
3.3 AUTOFAGIA

A autofagia é um processo celular dinâmico e evolutivamente conservado, envolvendo a degradação lisossomal e a reciclagem intracelular de organelas e proteínas. Esse processo é crucial para a manutenção da homeostase celular diante de diversos estressores, como falta de nutrientes, aglomeração de proteínas, infecção viral, estresse oxidativo e endoplasmático (Kim; Kim, 2014). A autofagia inicia-se com a formação de um fagóforo, uma estrutura vesicular que encapsula porções do citoplasma, formando o autofagossomo. Este é uma vesícula de dupla membrana responsável pelo sequestro da carga citoplasmática, que posteriormente se funde ao lisossomo, formando o autolisossomo. Dentro do autolisossomo, a carga é degradada por

enzimas lisossômicas, liberando aminoácidos e ácidos graxos que são reciclados para a biossíntese de novos componentes celulares ou para a produção de energia (Mokarram *et al.*, 2017; Niture *et al.*, 2021).

A Figura 3 ilustra as diferentes fases da autofagia, incluindo indução, nucleação, alongamento, conclusão e degradação (Aman *et al.*, 2021). Em condições de nutrientes suficientes, a via de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) inativa o complexo ULK1. Por outro lado, na ausência de nutrientes, AMPK inativa mTOR e ativa ULK1, desencadeando a biossíntese do fagóforo. Durante a maturação do autofagossomo, ocorre o recrutamento de ATGs, LC3 e p62, culminando na formação do autofagossomo maduro. A fusão do autofagossomo com o lisossomo é facilitada por proteínas como Rab7 e LAMP, resultando na degradação da carga e da membrana interna. Proteínas-chave na autofagia incluem a beclina-1 (BECN1), que participa da expansão e do fechamento do autofagossomo, e o fator de transcrição EB (TFEB), que regula a lipólise e a biogênese lisossômica através da regulação positiva da expressão gênica autofágica (Aman *et al.*, 2021; Niture *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2018).

Figura 3. Representação esquemática do processo de autofagia.



Fonte: Adaptado de Aman *et al.*, 2021.

Baseado nos estudos de Mokarram *et al.* e Koustas *et al.*, que destacam a importância da desregulação das proteínas LC3, TFEB, p62 e beclina-1 na progressão do CCR, o presente estudo terá como enfoque principal a análise dessas quatro proteínas (Koustas *et al.*, 2019; Mokarram *et al.*, 2017).

3.3.1 MAP1LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3*)

A proteína LC3, conhecida como *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3* (MAP1LC3), é fundamental para o processo de autofagia, sendo essencial para a manutenção da homeostase e da sobrevivência celular. LC3 é uma proteína tipo ubiquitina que, após ser clivada por ATG4, é convertida em LC3-I no citosol. Posteriormente, LC3-I é ativada por ATG7 e ATG3 e se transforma em LC3-II ao se ligar à fosfatidiletanolamina. Essa transformação é crucial para a formação e expansão dos autofagossomos (Kabeya, 2000; Mizushima *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2018). LC3-II se associa estreitamente às membranas pré-autofagossômicas, autofagossômicas e autolisossomais, desempenhando um papel vital na maturação dos fagóforos e no fluxo autofágico. A transição de LC3-I para LC3-II é amplamente utilizada como marcador para a detecção da atividade autofágica, com LC3 também facilitando a ligação à proteína p62 para a degradação de componentes celulares danificados ou desnecessários, regulando assim a qualidade das organelas e prevenindo o acúmulo de substâncias tóxicas (Figura 3) (Mokarram *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018).

No contexto do CCR, a proteína LC3 desempenha um papel dual. Em alguns cenários, a autofagia induzida por LC3-II pode promover a sobrevivência das células tumorais, fornecendo nutrientes e energia essenciais em ambientes hipóxicos ou de privação nutricional típicos de tumores sólidos (Degenhardt *et al.*, 2006). No entanto, em fases iniciais da carcinogênese, a autofagia pode atuar como um mecanismo supressor de tumor, eliminando organelas danificadas e proteínas agregadas que poderiam contribuir para mutações e instabilidade genômica. Pesquisas indicam que alterações na expressão de LC3 em tecidos de CCR estão associadas a uma diminuição da atividade autofágica, correlacionando-se com prognóstico desfavorável e maior agressividade tumoral (Levy; Towers; Thorburn, 2017). Portanto, a manipulação da autofagia, seja aumentando ou inibindo sua atividade, surge como uma estratégia terapêutica promissora no tratamento do CCR, destacando a complexidade e importância da LC3 nesse contexto (Devenport; Shah, 2019; Koustas *et al.*, 2019; Mokarram *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021).

3.3.2 TFEB (*Transcription factor EB*)

A proteína TFEB (*Transcription Factor EB*) é um fator de transcrição que desempenha um importante papel na regulação da expressão de genes envolvidos na autofagia e na biogênese e depuração lisossomal. Esses processos são essenciais para a manutenção da homeostase celular, especialmente em resposta ao estresse nutricional e ambiental (Roczniak-Ferguson *et al.*, 2012; Settembre *et al.*, 2012). TFEB coordena a autofagia e o anabolismo ao promover a

degradação de macromoléculas e a reciclagem de componentes celulares, o que é vital para a adaptação e sobrevivência celular sob condições adversas. Normalmente retido no citoplasma em sua forma fosforilada (inativa), TFEB é desfosforilado e translocado para o núcleo em condições de estresse, como privação de nutrientes ou distúrbios lisossomais, onde ativa a transcrição de genes ligados à autofagia e funções dos lisossomos (Napolitano; Ballabio, 2016; Zhang *et al.*, 2020).

Em um estudo realizado em 2018, observou-se que TFEB apresentava níveis mais baixos em tecidos de CCR do que em tecidos não tumorais. No entanto, correlações positivas foram observadas entre a expressão de TFEB em tecidos cancerosos e a progressão maligna do CCR. Nos tumores com superexpressão de TFEB, houve uma maior taxa de metástase linfática e infiltração mais profunda do tumor. Além disso, pacientes com altos níveis de TFEB tiveram uma sobrevida reduzida, sugerindo que a expressão elevada de TFEB pode ser um fator prognóstico negativo e um possível alvo terapêutico no tratamento do CCR (Liang *et al.*, 2018).

No contexto do CCR, a autofagia mediada por TFEB pode ter um papel duplo, atuando tanto como mecanismo de sobrevivência das células tumorais quanto como um supressor de tumor, dependendo do estágio da doença e do microambiente tumoral (White, 2015). A superexpressão de TFEB em células de CCR está associada a uma maior capacidade de autofagia, o que pode contribuir para a resistência a terapias tradicionais, como quimioterapia e radioterapia (Perera *et al.*, 2015). Por outro lado, a inibição direcionada de TFEB ou da autofagia mediada por TFEB está sendo explorada como uma estratégia terapêutica potencial para aumentar a sensibilidade das células tumorais aos tratamentos e reduzir a resistência à apoptose. Assim, TFEB emerge como um alvo promissor para a modulação da autofagia em tratamentos mais eficazes do CCR (White, 2015).

3.3.3 p62 (SQSTM1, Sequestosome 1)

A proteína p62, também conhecida como sequestossoma 1 (SQSTM1), é uma proteína adaptadora multifuncional essencial no processo de autofagia. Ela atua como um receptor seletivo que identifica e direciona proteínas ubiquitinadas e organelas danificadas para degradação no lisossomo (Mokarram *et al.*, 2017). p62 possui domínios que se ligam à ubiquitina e à proteína LC3, facilitando a incorporação de substratos ubiquitinados nos autofagossomos que, subsequentemente, se fundem com os lisossomos para a degradação (Figura 3) (Bjørkøy *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2013). Além de sua função na autofagia, p62 regula importantes vias de sinalização celular, como NF- κ B, envolvida em respostas inflamatórias e

sobrevivência celular, e Nrf2, que protege contra estresse oxidativo. Normalmente, p62 é continuamente degradada pela autofagia; contudo, sua acumulação devido à inibição ou disfunção autofágica ativa diversas vias de sinalização, promovendo sobrevivência celular e inflamação (Bjørkøy *et al.*, 2005).

No CCR, p62 exerce um papel complexo, influenciando a progressão do tumor e a resposta ao tratamento. A superexpressão de p62 tem sido associada à progressão de diversas neoplasias, incluindo o CCR, onde promove a sobrevivência celular e resistência a terapias. Estudos mostram que altos níveis de p62 em células de CCR estão ligados à ativação de vias que favorecem a proliferação celular e a resistência ao estresse oxidativo, contribuindo significativamente para a progressão tumoral (Gatica; Lahiri; Klionsky, 2018; Mathew *et al.*, 2009). Além disso, a p62 está envolvida na regulação da inflamação no microambiente tumoral, o que pode promover a agressividade do CCR. A inibição da autofagia, que leva ao acúmulo de p62, foi correlacionada com um aumento na resistência à apoptose induzida por medicamentos, destacando um papel protetor da autofagia contra o estresse celular e morte celular programada. Por outro lado, alguns estudos sugerem que a p62 pode ter um papel antitumoral em certos contextos ao promover a degradação de proteínas oncogênicas ou componentes celulares danificados que, se acumulados, poderiam levar a mutações e instabilidade genômica (Mathew *et al.*, 2009). Portanto, a modulação da expressão de p62 e da atividade autofágica representa uma estratégia potencial no tratamento do CCR, visando reduzir a resistência a terapias e controlar a progressão tumoral. A regulação positiva de p62 pode ser interpretada como inibição da digestão lisossomal de autofagossomos, sugerindo que a desregulação da p62 pode ser um biomarcador útil para a autofagia prejudicada no CCR (Mokarram *et al.*, 2017; Koustas *et al.*, 2019).

Além disso, a p62 está envolvida na regulação da inflamação no microambiente tumoral, o que pode promover a agressividade do CCR. A inibição da autofagia, que leva à acumulação de p62, foi correlacionada com um aumento na resistência à apoptose induzida por drogas, destacando um papel protetor da autofagia contra o estresse celular e morte celular programada. Por outro lado, alguns estudos sugerem que a p62 pode ter um papel antitumoral em certos contextos ao promover a degradação de proteínas oncogênicas ou componentes celulares danificados que, se acumulados, poderiam promover mutações e instabilidade genômica (Mathew *et al.*, 2009). Portanto, a modulação da expressão de p62 e da atividade autofágica representa uma estratégia potencial no tratamento do CCR, visando reduzir a resistência a terapias e controlar a progressão tumoral.

3.3.4 Beclina-1 (BECN1)

Beclina-1, ou BECN1, é uma proteína fundamental no processo de autofagia, onde atua na degradação e reciclagem de componentes intracelulares para manter a homeostase celular. Esta proteína foi a primeira proteína humana relacionada à autofagia a ser descoberta e desempenha um papel fundamental na formação de autofagossomos. Beclina-1 faz parte do complexo fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e é essencial para a nucleação da membrana autofágica, interagindo com várias proteínas para formar um complexo chave na iniciação da autofagia (Figura 3) (Kang *et al.*, 2011; Levine; Kroemer, 2008; Yang *et al.*, 2015).

Em condições normais, beclina-1 ajuda na remoção de organelas danificadas e patógenos intracelulares, contribuindo para a sobrevivência celular sob estresse ambiental e nutricional (Kang *et al.*, 2011). A sua função é regulada por fatores de crescimento e sinais de estresse, que modulam sua atividade por meio de modificações pós-traducionais como fosforilação e ubiquitinação (Levine; Kroemer, 2008). No CCR, beclina-1 exerce um papel complexo que influencia tanto a progressão do tumor quanto a resposta ao tratamento (Aita *et al.*, 1999). A perda de função ou a expressão reduzida de beclina-1, frequentemente observada em tumores colorretais, está associada a uma diminuição da atividade autofágica e ao aumento da agressividade tumoral (Aita *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 1999). A beclina-1 é considerada um marcador de bom prognóstico para CCR, sugerindo que ela atue na supressão tumoral do carcinoma (Kousta *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2015). Juntamente com o sistema de estadiamento TNM (utilizado para previsão do prognóstico de CCR), a expressão de beclina-1 aumentaria a sensibilidade e a especificidade de predição do prognóstico de pacientes com CCR (Yang *et al.*, 2015).

REFERÊNCIAS

- AGHABOZORGI, A. S. *et al.* Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. **Biochimie**, [s. l.], v. 157, p. 64–71, 2019.
- AITA, V. M. *et al.* Cloning and Genomic Organization of Beclin 1, a Candidate Tumor Suppressor Gene on Chromosome 17q21. **Genomics**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 59–65, 1999.
- AMAN, Y. *et al.* Autophagy in healthy aging and disease. **Nature Aging**, [s. l.], v. 1, n. 8, p. 634–650, 2021.
- BAILEY, C. E. *et al.* Increasing Disparities in the Age-Related Incidences of Colon and Rectal Cancers in the United States, 1975-2010. **JAMA Surgery**, [s. l.], v. 150, n. 1, p. 17, 2015.
- BJØRKØY, G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. **The Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 171, n. 4, p. 603–614, 2005.
- BORGES, R. B. *et al.* Power and Sample Size for Health Researchers: uma ferramenta para cálculo de tamanho amostral e poder do teste voltado a pesquisadores da área da saúde. **Clinical & Biomedical Research**, [s. l.], 2021.
- BRENNER, H.; KLOOR, M.; POX, C. P. Colorectal cancer. **The Lancet**, [s. l.], v. 383, n. 9927, p. 1490–1502, 2014.
- BRODY, H. Colorectal cancer. **Nature**, [s. l.], v. 521, n. 7551, p. S1–S1, 2015.
- CARDOSO DM. **Síndromes de polipose colorretal**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://endoscopiaterapeutica.com.br/assuntosgerais/sindromes-de-polipose-colorretal/>. Acesso em: 29 abr. 2022.
- DE LIMA, T. B. *et al.* Autophagy analysis in oral carcinogenesis. **Pathology Research and Practice**, [s. l.], v. 213, n. 9, p. 1072–1077, 2017.

DEGENHARDT, K. *et al.* Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 51–64, 2006.

DEVENPORT, S. N.; SHAH, Y. M. **Functions and implications of autophagy in colon cancer**. [S. l.]: MDPI, 2019.

DINIZ B; LACERDA A. **PREVENÇÃO SECUNDÁRIA DO CÂNCER COLORRETAL EM INDIVÍDUOS ASSINTOMÁTICOS DE BAIXO RISCO**. Belo Horizonte: [s. n.], 2004.

DOS SANTOS, J. B. *et al.* Nuclear morphometry and chromatin texture changes in hepatocellular carcinoma samples may predict outcomes of liver transplanted patients. **BMC Gastroenterology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 189, 2022.

FILIPPI-CHIELA, E. C. *et al.* Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Senescence, Apoptosis and Nuclear Irregularities. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. e42522, 2012.

FINLAY A MACRAE, M. *et al.* **Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors**. [S. l.], 2022.

FITZMAURICE, C. *et al.* The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA Oncology**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 505, 2015.

GALLUZZI, L. *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 856–880, 2015.

GATICA, D.; LAHIRI, V.; KLIONSKY, D. J. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 233–242, 2018.

HOLMES, D. A disease of growth. **Nature**, [s. l.], v. 521, n. 7551, p. S2–S3, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Como surge o câncer: Estadiamento**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer/estadiamento>. Acesso em: 31 ago. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Serviço de Educação e Informação Técnico-Científica**, [s. l.], 2019.

ISERHARD, R. *et al.* Autophagy and nuclear morphometry are associated with histopathologic features in esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 39–52, 2024.

JIN, K. *et al.* An update on colorectal cancer microenvironment, epigenetic and immunotherapy. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 89, p. 107041, 2020.

KABEYA, Y. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 19, n. 21, p. 5720–5728, 2000.

KANG, R. *et al.* The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 571–580, 2011.

KIM, K. M.; KIM, S. G. Autophagy and microRNA dysregulation in liver diseases. **Archives of Pharmacal Research**, [s. l.], v. 37, n. 9, p. 1097–1116, 2014.

KOSUMI, K. *et al.* Tumor SQSTM1 (p62) expression and T cells in colorectal cancer. **OncoImmunology**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. e1284720, 2017.

KOUSTAS, E. *et al.* Autophagy-related Proteins as a Prognostic Factor of Patients With Colorectal Cancer. **American Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 767–776, 2019.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. **Cell**, [s. l.], v. 132, n. 1, p. 27–42, 2008.

LEVY, J. M. M.; TOWERS, C. G.; THORBURN, A. Targeting autophagy in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 528–542, 2017.

LI, N. *et al.* **Incidence, mortality, survival, risk factor and screening of colorectal cancer: A comparison among China, Europe, and northern America.** [*S. l.*]: Elsevier Ireland Ltd, 2021.

LIANG, J. *et al.* High expression of TFEB is associated with aggressive clinical features in colorectal cancer. **OncoTargets and Therapy**, [*s. l.*], v. Volume 11, p. 8089–8098, 2018.

LIANG, X. H. *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. **Nature**, [*s. l.*], v. 402, n. 6762, p. 672–676, 1999.

LIN, X. *et al.* Interaction Domains of p62: A Bridge Between p62 and Selective Autophagy. **DNA and Cell Biology**, [*s. l.*], v. 32, n. 5, p. 220–227, 2013.

MATHEW, R. *et al.* Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62. **Cell**, [*s. l.*], v. 137, n. 6, p. 1062–1075, 2009.

MIZUSHIMA, N. *et al.* Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, [*s. l.*], v. 451, n. 7182, p. 1069–1075, 2008.

MOKARRAM, P. *et al.* New frontiers in the treatment of colorectal cancer: Autophagy and the unfolded protein response as promising targets. **Autophagy**, [*s. l.*], v. 13, n. 5, p. 781–819, 2017.

NAPOLITANO, G.; BALLABIO, A. TFEB at a glance. **Journal of Cell Science**, [*s. l.*], 2016.

NITURE, S. *et al.* Emerging Roles of Impaired Autophagy in Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. **International Journal of Hepatology**, [*s. l.*], v. 2021, p. 1–19, 2021.

NUNES, T. W. N. *et al.* Nuclear morphometric analysis in tissue as an objective tool with potential use to improve melanoma staging. **Melanoma Research**, [*s. l.*], v. 29, n. 5, p. 474–482, 2019.

PALLIYAGURU, N.; PALLIYAGURU, D.; LIYANAGE, S. Geographical Mapping of Biological and Environmental Risk Factors of Colorectal Cancer in the United States. **JCO Global Oncology**, [s. l.], v. 10, n. Supplement_1, p. 87–87, 2024.

PERERA, R. M. *et al.* Transcriptional control of autophagy–lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. **Nature**, [s. l.], v. 524, n. 7565, p. 361–365, 2015.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA SECRETARIA-GERAL SUBCHEFIA PARA ASSUNTOS JURÍDICOS. **LEI Nº 13.709, DE 14 DE AGOSTO DE 2018/ Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais (LGPD)**. [s. l.], 2019.

ROCZNIAK-FERGUSON, A. *et al.* The Transcription Factor TFEB Links mTORC1 Signaling to Transcriptional Control of Lysosome Homeostasis. **Science Signaling**, [s. l.], v. 5, n. 228, 2012.

ROSHANDEL, G.; GHASEMI-KEBRIA, F.; MALEKZADEH, R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. **Cancers**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 1530, 2024.

SETTEMBRE, C. *et al.* A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 1095–1108, 2012.

SIMON, R.; MIRLACHER, M.; SAUTER, G. Immunohistochemical Analysis of Tissue Microarrays. *In*: [S. l.: s. n.], 2010. p. 113–126.

THANIKACHALAM, K.; KHAN, G. Colorectal Cancer and Nutrition. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 164, 2019.

WANG, L. *et al.* Prognostic implications of an autophagy-based signature in colorectal cancer. **Medicine**, [s. l.], v. 100, n. 13, p. e25148, 2021.

WHITE, E. The role for autophagy in cancer. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 125, n. 1, p. 42–46, 2015.

WISNER, L.; LARSEN, B.; MAGUIRE, A. Manual Construction of a Tissue Microarray using the Tape Method and a Handheld Microarrayer. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 184, 2022.

WU, Y. *et al.* The role of autophagy in colitis-associated colorectal cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 31, 2018.

YANG, Z. *et al.* High expression of Beclin-1 predicts favorable prognosis for patients with colorectal cancer. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 98–106, 2015.

ZHANG, C. *et al.* Hepatitis B Virus X Protein (HBx) Suppresses Transcription Factor EB (TFEB) Resulting in Stabilization of Integrin Beta 1 (ITGB1) in Hepatocellular Carcinoma Cells. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1181, 2021.

ZHANG, W. *et al.* Regulation of TFEB activity and its potential as a therapeutic target against kidney diseases. **Cell Death Discovery**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 32, 2020.

ZINK, D.; FISCHER, A. H.; NICKERSON, J. A. Nuclear structure in cancer cells. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 677–687, 2004.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- i. Este estudo identificou uma significativa desregulação nos níveis dos marcadores de autofagia (p62, beclina-1 e LC3) no CCR, caracterizada por um aumento no p62 e uma diminuição no LC3. Este padrão sugere um processo autofágico comprometido que potencialmente contribui para a progressão do tumor e destaca o papel dual da autofagia na dinâmica do câncer.
- ii. O papel da autofagia no CCR parece complexo, demonstrando sua participação tanto na supressão quanto na progressão do tumor. As funções protetoras iniciais da autofagia podem se alterar para apoiar a sobrevivência e proliferação celular em estágios avançados do CCR, necessitando de mais investigações sobre os mecanismos moleculares envolvidos e as implicações para a terapia do câncer.
- iii. A expressão aumentada do marcador de proliferação celular Ki67 em amostras de CCR e pólipos corrobora a alta atividade proliferativa observada nos estágios avançados da doença, alinhando-se com o comportamento agressivo do tumor.
- iv. A prevalência significativa do perfil p62^{Alto}, beclina-1^{Baixo} e LC3^{Baixo} nas amostras de CCR sugere uma resposta autofágica disfuncional, que pode facilitar a progressão do tumor ao permitir o acúmulo de material celular danificado.
- v. O estudo identificou uma maior prevalência de homens nos grupos controle (61%) e CCR (53%), enquanto o grupo de pólipos foi predominantemente composto por mulheres (70%). Esses achados sugerem possíveis influências hormonais e de dieta/estilo de vida no desenvolvimento de pólipos e CCR, indicando a necessidade de estudos específicos para cada gênero em pesquisas futuras.
- vi. Alterações de morfometrias nucleares significativas, como aumento do tamanho nuclear, foram observadas em amostras de CCR em comparação aos demais grupos. Essas mudanças estão associadas à malignidade avançada e instabilidade genômica, sugerindo seu potencial como marcadores de doença agressiva e mau prognóstico.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- i. Ampliar o número de amostras do grupo pólipos a fim de aumentar o poder estatístico.
- ii. Avaliar os níveis de inflamação nas amostras incluídas neste estudo para compreender o contexto inflamatório que circunda o CCR e suas lesões precursoras.
- iii. Realizar análise de morfometria nuclear em todas as amostras de CCR e tecido não tumoral incluídas no estudo para confirmar as mudanças celulares que ocorrem conforme o CCR se desenvolve e progride.
- iv. Analisar os dados de sobrevivência dos pacientes a partir dos prontuários médicos para correlacionar os desfechos clínicos com marcadores moleculares e celulares, aprimorando a compreensão de como esses marcadores afetam o prognóstico e as respostas ao tratamento em pacientes com CCR.
- v. Avaliar os níveis de expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à autofagia, como p62, beclina-1 e LC3, para elucidar seus papéis na patofisiologia do CCR.
- vi. Realizar análise por sequenciamento de nova geração no DNA de amostras de tecido de CCR e não tumoral para identificar mutações em genes relacionados à autofagia.

APÊNDICE A – ROTEIRO DE LIGAÇÃO TELEFÔNICA

Projeto Diretoria de Pesquisa número: 2022-0406

Bom dia/Boa tarde, o meu nome é Amanda Cristofoli Camargo, sou pesquisadora do projeto que está sendo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre com o título: “NÍVEIS DIFERENCIAIS DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA NA CARCINOGENESE COLORRETAL ”.

Poderia falar com o Sr/a Sra [Inserir o nome do paciente/potencial participante]

O objetivo do projeto é avaliar o nível de proteínas marcadoras envolvidas em diferentes estágios do processo de autofagia celular em amostras primárias de lesões pré-malignas e de tecido tumoral de carcinoma colorretal para associar à progressão do tumor.

Estou entrando em contato para convidar o senhor (a) a participar desta pesquisa, pois verificamos que você realizou atendimento no Serviço de Gastroenterologia.

Se tiver interesse em participar, você concordará que tenhamos acesso ao seu prontuário médico do HCPA para que tenhamos acesso a informações sobre você, e sobre sua lesão colorretal. Você permitirá também que tenhamos acesso à parte da lesão que ficou armazenada no arquivo do hospital.

Informar que a ligação não está sendo gravada.

Gostaríamos de ressaltar que caso não tenha interesse em participar, isto não interfere em seu atendimento ou em consultas e exames já agendados.

Se o paciente estiver de acordo, perguntar em qual contato gostaria de receber o Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (TCLE) do projeto, onde constam as informações detalhadas.

Contato para envio do TCLE (email/Whatsapp):

E-mail:

Whatsapp com DDD:

Você gostaria de participar:

Sim

Não

Em caso de concordância, aplicar o instrumento.

Se aceitar, mas preferir responder por telefone em outro momento:

Pedir qual o melhor momento para realizar a conversa por telefone.

Retorno em _____

Se não aceitar, agradecer pelo tempo e atenção.

Perguntar se o paciente possui mais alguma dúvida e ressaltar que os contatos dos pesquisadores e do CEP estão no Termo enviado.

Pesquisador responsável: Marina Siebert

Contato disponibilizado: (51) 998405551 Amanda / (51) 983315312 Marina

Observação: Este roteiro é apenas um guia para a ligação, sendo que os pesquisadores tomarão todo o cuidado necessário para evitar qualquer constrangimento e responderão perguntas ou dúvidas adicionais que se apresentem durante a ligação.

Dados a serem preenchidos pelo pesquisador depois da ligação:

1. Participante:
2. Dia da ligação:
3. Hora da ligação:
4. Pesquisador que realizou a ligação:
5. Assinatura do pesquisador:

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: NÍVEIS DIFERENCIAIS DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA NA CARCINOGENESE COLORRETAL.

Você está sendo convidado a participar da pesquisa cujo objetivo é avaliar o nível de proteínas associadas ao processo de autofagia em amostras primárias de lesões benignas e tumores malignos que fazem parte da progressão do carcinoma colorretal. Esta pesquisa está sendo realizada pelo serviço de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar em participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos são: o acesso a sua ficha clínica, ao laudo da sua biópsia, utilização de parte da sua amostra de biópsia que está armazenada na forma de bloco de parafina para realização das análises dos níveis de proteínas e morfometrias do tecido.

Este estudo apresenta riscos mínimos. Sendo o risco potencial relacionado à confidencialidade dos dados pessoais. Para minimizar este risco os dados serão armazenados anonimizados e somente os pesquisadores pertencentes à equipe terão acesso. A equipe também assinará um termo de compromisso para utilização de dados atendendo a Lei Geral de Proteção de Dados (Lei Nº 13.709, de 14 de agosto de 2018).

Os possíveis benefícios da sua participação na pesquisa são indiretos, ou seja, a sua participação na pesquisa não trará benefícios individuais diretos. Porém, irá contribuir para a melhor compreensão sobre o assunto estudado, que poderá beneficiar futuros pacientes e a comunidade acadêmica.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar, ou ainda, desistir da participação e retirar sua autorização, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis Prof. Dra. Marina Siebert pelo telefone (51) 983315312 e com a pesquisadora, Amanda Cristofoli Camargo pelo telefone (51) 998405551 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo e-mail cep@hcpa.edu.br, telefone (51) 3359.6246 ou no endereço Av. Protásio Alves, 211 - Portão 4 - 5º andar do Bloco C - Rio Branco - Porto Alegre/RS, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Este Termo foi enviado aos participantes por meio eletrônico. Os pesquisadores armazenarão registro eletrônico (arquivo, imagem ou áudio) da concordância em participar do estudo. Sugere-se que os participantes armazenem este arquivo eletrônico (salvar imagem ou arquivo em pdf) ou ainda imprimam este Termo.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____