

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia

Laboratório de Biologia Celular e Molecular

Avaliação dos Níveis de Autofagia e Morfometria Nuclear no Carcinoma
Epidermoide de Esôfago

RICARDO ISERHARD

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela

Coorientadora: Emily Ferreira Salles Pilar

Porto Alegre, junho de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia

Laboratório de Biologia Celular e Molecular

Avaliação dos Níveis de Autofagia e Morfometria Nuclear no Carcinoma
Epidermoide de Esôfago

Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em junho de 2018, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia

Porto Alegre, junho de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Iserhard, Ricardo
Avaliação dos Níveis de Autofagia e Morfometria Nuclear no Carcinoma Epidermoide de Esôfago / Ricardo Iserhard. -- 2018.

75 f.

Orientador: Eduardo Cremonese Filippi Chiela.

Coorientador: Emily Ferreira Salles Pilar.

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, 2018.

1. Carcinoma Epidermóide Esofágico. 2. Autofagia .
3. Morfometria Nuclear. 4. Marcadores Prognósticos .
5. TCGA. I. Cremonese Filippi Chiela, Eduardo,
orient. II. Ferreira Salles Pilar, Emily, coorient.
III. Título.

DEDICATÓRIA

À Juliana

AGRADECIMENTOS

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
- Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia
- Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)
- Centro de Pesquisas Experimental (CPE - HCPA)
- Unidade de Patologia Experimental
- Prof. Dr. Carlos Frederico de Magalhães Francisconi
- Dra. Patrícia Luciana da Costa Lopez (pesquisadora do HCPA)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	07
LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE TABELAS	09
APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	10
RESUMO/PALAVRAS-CHAVE	11
ABSTRACT/KEYWORDS	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. CÂNCER DE ESÔFAGO	13
1.1.1. Epidemiologia	13
1.1.2. Histopatologia e Tipos de Câncer Esofágico	14
1.1.3. Fatores de Risco para o ESCC	17
1.1.4. Diagnóstico e Rastreamento do ESCC	19
1.2. AUTOFAGIA	21
1.2.1. Conceitos básicos	21
1.2.2. Mecanismos moleculares no controle da autofagia	23
1.2.3. Papel da Autofagia no Câncer	26
1.2.4. Autofagia e Prognóstico em Câncer	29
2. REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO)	35
3. JUSTIFICATIVA e HIPÓTESE	43
3.1. Justificativa	43
3.2. Hipótese	44
4. OBJETIVOS	45
4.1. Objetivo Geral	45
4.2. Objetivos específicos	45
5. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	46
6. CONCLUSÃO e HIPÓTESES	73
7. PERSPECTIVAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ADO - Adenocarcinoma

AutoIndex – *Autophagic Index*

AMPK – *AMP-activated Protein Kinase*

ATG – *Autophagy-Related Genes*

Atg - *Autophagy-Related Proteins*

BECN1 – Beclin-1

CE – Carcinoma de Esôfago

EC – *Esophageal Carcinoma*

ESCC – *Esophageal Squamous Cell Carcinoma*

GLOBOCAN – *Global Cancer Statistics*

INCA – Instituto Nacional do Cancer

KM – Curva de Sobrevivência de Kaplan-Meier

LC3-I e LC3-II – Formas I e II da proteína MAP1LC3

LC3A, LC3B, LC3C – Isoformas A, B e C da proteína LC3

MAP1LC3A, MAP1LC3B, MAP1LC3C – Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 (isoformas A, B e C)

mTOR – *mammalian Target of Rapamycin*

mTORC1 - *mammalian Target of Rapamycin Complex 1*

NMA – *Nuclear Morphometric Analysis*

NMA_t – *Nuclear Morphometric Analysis in Tissue*

NII – *Nuclear Irregularity Index*

N nuclei – *Normal Nuclei*

OST – *Overall Survival Time*

SQSTM1 – Sequestosome 1

SR nuclei – Small and Regular Nuclei

TCGA – *The Cancer Genoma Atlas*

WHO – *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura I – Evolução histopatológica do câncer de esôfago	15
Figura II – Etapas do mecanismo de autofagia	22
Figura III – Mecanismos moleculares de controle da autofagia	24
Figura IV - Níveis de expressão das isoformas de MAP1LC3 e ATG4 no tecido esofágico não neoplásico.....	25
Figura V – Papel da autofagia no desenvolvimento do câncer	28
Figura VI – Cenários hipotéticos do papel da autofagia na carcinogênese	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento TNM do ESCC	16
Tabela 2 – Níveis dos marcadores de autofagia BECN1, SQSTM1 e MAP1LC3 em amostras tumorais, tecidos normais correspondentes e lesões pré-malignas	30
Tabela 3 – Potencial prognóstico das proteínas BECN1, MAP1LC3 e SQSTM1 em diferentes tipos de câncer.	32

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação está estruturada conforme segue. Inicialmente, uma **introdução** com considerações necessárias para entendimento dos objetivos, metodologias e resultados. Esta introdução está dividida em duas **seções principais**: (1) Câncer de Esôfago, com dados epidemiológicos, histopatológicos, fatores de risco, entre outras características do modelo de estudo, com destaque para o subtipo histológico epidermoide; e (2) Autofagia, onde são expostos conceitos básicos, mecanismos biológicos e o seu papel na oncogênese. As figuras da introdução e hipótese final estão ordenadas em numerais romanos, enquanto as figuras do artigo estão em números ordinais.

Após a introdução, serão descritas **justificativas e hipóteses**, seguidas dos **objetivos** geral e específicos. Finalmente, é apresentado um **artigo original** em inglês, a ser submetido ao periódico *Molecular Carcinogenesis*. O artigo contém abstract, introdução, materiais e métodos, resultados e discussão dos achados.

Por fim, a partir dos resultados obtidos, são descritas as **conclusões, hipóteses e perspectivas**.

RESUMO/PALAVRAS-CHAVE

O câncer de esôfago é a sexta causa de morte relacionada a neoplasias malignas no mundo. A taxa de sobrevida em 5 anos é inferior a 20 %, após o diagnóstico. O conhecimento da biologia básica e o desenvolvimento de novos marcadores diagnósticos e prognósticos podem contribuir para o manejo clínico desses tumores. A autofagia é um mecanismo fisiológico envolvido na degradação de organelas e proteínas disfuncionais ou envelhecidas. Perturbações na autofagia têm sido associadas à carcinogênese. Em nosso estudo: (a) comparamos os níveis de três indicadores de autofagia, SQSTM1, MAP1LC3B e BECN1 no epitélio esofágico não neoplásico e em amostras de carcinoma epidermoide de esôfago (ESCC); (b) analisamos a influência da idade, sexo e tabagismo no nível desses indicadores; (c) avaliamos a morfometria nuclear e sua correlação com a autofagia; e (d) examinamos a influência da autofagia na taxa de sobrevida e no estadiamento do ESCC. Para isso, selecionamos 32 biópsias de esôfago sem alterações associadas a neoplasia (grupo controle) e 53 amostras de ESCC. O material foi imunomarcado para SQSTM1, MAP1LC3B e BECN1, seguido da quantificação dos níveis proteicos e geração de um Índice Autofágico para cada amostra. Também foi realizada a análise morfométrica nuclear. A influência da autofagia nas taxas de sobrevida dos pacientes com ESCC foi estimada usando o banco de dados TCGA. Observamos um aumento nos níveis dos três indicadores de autofagia nas amostras de ESCC comparadas com o grupo controle. O AutoIndex, que acreditamos melhor representar o estado autofágico, comparado aos indicadores isolados, demonstrou diferença ainda maior entre os grupos. Encontramos uma redução na área nuclear no ESCC em comparação às amostras controle. Essa redução se correlacionou negativamente com o AutoIndex, sugerindo que alterações nucleares e na autofagia ocorrem concomitantemente ao longo da carcinogênese do ESCC. Utilizando o TCGA identificamos níveis elevados de MAP1LC3A/B, SQSTM1, Atg4A e Atg12 associados a um pior prognóstico e estadiamento avançado, sugerindo que a autofagia no ESCC contribua para a agressividade tumoral. Ainda usando o TCGA verificamos que a combinação de genes de autofagia dois a dois apresenta uma diferença ainda maior nas curvas de Kaplan-Meier entre pacientes com níveis elevados e baixos de autofagia. Ao final, a partir dos nossos resultados e dados da literatura, levantamos a hipótese de que quanto maior a diferença, para mais ou menos, da intensidade da autofagia em um tumor em relação ao tecido não neoplásico, pior o prognóstico. Em conclusão, observamos um aumento da autofagia no ESCC, e sugerimos que a combinação de indicadores deste mecanismo, mais do que o uso de marcadores isolados, tem potencial para uso na avaliação prognóstica no ESCC.

Keywords – Carcinoma Esofágico Escamoso, autofagia, morfometria nuclear, indicadores prognósticos

ABSTRACT/KEYWORDS

Esophageal cancer is the sixth leading cause of deaths by malignant neoplasias in the world. Less than 20 % of patients survive 5 years after diagnosis, so the knowledge of basic tumor biology as well as the development of new prognostic markers may contribute to the management of these tumors. Autophagy is a physiological mechanism involved in the degradation of aged or dysfunctional organelles and proteins. Disturbances in autophagy have been associated with the carcinogenesis. Here, we: (a) compared the levels of three autophagy markers, SQSTM1, MAP1LC3B and BECN1 in non-neoplastic esophagus and in Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) samples; (b) assessed the influence of age, gender and smoking in the level of these markers; (c) evaluate nuclear morphometry and its correlation with autophagy; and (d) examined the influence of autophagy genes expression in the survival and staging of ESCC. We select 32 non-neoplastic esophageal samples (control group) and 53 ESCC samples, which were immunostained to SQSTM1, MAP1LC3B and BECN1, followed by the quantification of these proteins levels and the generation of an Autophagic Index (AutoIndex) to each sample. Nuclear morphometry was assessed by the Nuclear Morphometric Analysis. The influence of autophagy in the overall survival time of ESCC patients was estimated using the TCGA database. We found that the three autophagy markers were significantly increased in ESCC samples in comparison to non-neoplastic samples. The AutoIndex, which we believe that better represents the autophagic status of a given sample, then single markers, showed an even higher difference between groups. We found a reduction in nuclear area in ESCC in comparison to controls. This reduction correlated negatively with AutoIndex, suggesting these alterations in the structure of the chromatin and autophagy occur concomitantly along the carcinogenesis of ESCC. Using the TCGA data bank we found that high levels of MAP1LC3 A/B, SQSTM1, Atg4A and Atg12 gene expression were associated with a poor prognosis and advanced staging, suggesting that autophagy contributes to tumor aggressiveness. The combination of autophagy gene markers two by two showed an even larger gap in Kaplan-Meier curves between patients with low and high levels of autophagy. Based on our data and those from the literature we raised the hypothesis that the greater the difference of autophagy in tumours compared to non-neoplastic tissue, the poorer the prognosis, regardless the alteration is up or down regulated. In conclusion, we found that an increase in autophagy may be involved in the progression of ESCC, and that the combination, more than a single marker analysis, has the potential to be used as a prognostic index in ESCC.

Keywords: Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC), autophagy, nuclear morphometry, prognostic markers

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER DE ESÔFAGO

1.1.1. Epidemiologia

As neoplasias malignas constituem a segunda principal causa de morte em países desenvolvidos, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Estima-se que cerca de 68 milhões de pessoas no mundo são portadoras de algum tipo de câncer, com aproximadamente 8,8 milhões de óbitos anuais. As perspectivas para os próximos anos apontam para um aumento da incidência anual, de 16 milhões em 2012 para mais de 22,2 milhões em 2030 (<http://www.who.int/cancer/en>; www.cancer.gov; Ferlay e col, 2015; Torre e col, 2012).

Entre os tipos de câncer os com maior incidência são o câncer de pulmão, colorretal, mama e próstata. Já considerando a mortalidade anual, destacam-se os cânceres de pulmão (1,69 milhões de mortes), fígado (788 mil mortes), colorretal (774 mil mortes), estômago (754 milhões de mortes) e mama (571 milhões de mortes) (<http://www.who.int/cancer/en>; www.cancer.gov). Neste contexto, o câncer de esôfago (CE) é a oitava neoplasia maligna mais frequente no mundo, com aproximadamente 456.000 novos casos anuais (3,2% do total), tendo maior incidência em homens (relação homens/mulheres 2,4:1). Apesar de todo avanço no diagnóstico e tratamento antitumoral, o prognóstico dos pacientes com ESCC tem melhorado pouco ou nada nas últimas décadas, com menos de 20% sobrevivendo 5 anos livres da doença. O CE é responsável por aproximadamente 415.000 óbitos anuais, correspondendo à sexta causa de morte por câncer (<https://www.cancer.org/cancer/esophagus-cancer/about/key-statistics.html>; Ferlay e col, 2015; Napier e col, 2014; Penatthur e col, 2013).

Considerando a distribuição geográfica, em torno de 80% dos casos de CE ocorrem em regiões menos desenvolvidas. Existem grandes variações na prevalência com índices de 0,8/100.000 habitantes na África Ocidental até 17/100.000 habitantes na Ásia Oriental, entre homens. Para mulheres, esta variação vai de 0,2/100.000 habitantes na Micronésia/Polinésia até 7,8/100.000 habitantes na África Oriental. Estas diferenças justificam-se tanto pela genética quanto por fatores de risco ambientais, os quais serão discutidos posteriormente. A mortalidade acompanha os padrões geográficos de incidência (Torre e col, 2012; Malhotra e col, 2017; Wong e col, 2018).

No Brasil o CE é a sexta neoplasia mais frequente entre os homens e a 13º entre as mulheres. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer do Brasil (INCA), em 2015 o número

de mortes foi de 7.930, sendo 6.203 homens e 1.727 mulheres, acompanhando o índice mundial de letalidade. Para 2018 o INCA estima que 10.790 novos casos de CE sejam diagnosticados, sendo 8.240 em homens e 2.550 em mulheres. Com incidência de 7,99/100.000 habitantes em homens e 2,28/100.000 mulheres (INCA estimativa 2018). O Rio Grande do Sul apresenta os maiores índices de CE da América do Sul, e mais de 90% dos casos são ESCC, porcentagem que tem se mantido constante nas últimas duas décadas (Fagundes e col, 2016). A perspectiva para 2018 é de 20,5/100.000 para homens e 6,91/100.000 para mulheres. A taxa de mortalidade por CE no Rio Grande do Sul, por sua vez, atinge valores de 18 e 5,2/100.000 habitantes em homens e mulheres, respectivamente. Algumas regiões do Rio Grande do Sul apresentam incidência e taxas maiores, associadas a consumo intensivo de mate quente (Victora e col, 1990; Prolla e col, 1993; INCA, 2012).

1.1.2. Histopatologia e Tipos de Câncer Esofágico

O CE apresenta-se como dois tipos histológicos principais. O carcinoma escamoso ou epidermoide (ESCC)¹ e o adenocarcinoma (ADO). O ESCC desenvolve-se a partir do epitélio de revestimento estratificado pavimentoso do esôfago, especialmente a partir de células do estrato basal germinativo. O ADO, por sua vez, desenvolve-se a partir do epitélio metaplásico tipo intestinal, no esôfago distal, geralmente relacionado a doença do refluxo gastresofágico. O ESCC e o ADO diferem não apenas na morfologia e histogenética, mas também no comportamento biológico, padrões de incidência, prevalência, populações afetadas e fatores de risco. Assim, as diferenças entre os dois tipos de câncer devem ser consideradas no desenvolvimento de opções diagnósticas e de tratamento (Napier e col, 2014; Malhotra e col, 2017; Coleman e col, 2018).

Assim como a maioria das neoplasias malignas, o CE é uma doença fortemente influenciada por fatores ambientais que se desenvolve por modificações estruturais e funcionais a nível molecular, que se refletem em alterações de comportamento celular (Mao e col, 2011). O ESCC evolui por vários estágios a partir da mucosa normal, progredindo para lesões precursoras (displasia), carcinoma in situ, invasão e disseminação. **(Figura I)**.

Conforme progride, a neoplasia invade as camadas histológicas que formam a estrutura do tubo esofágico. Estas camadas incluem: (1) uma camada mucosa formada por epitélio de revestimento estratificado pavimentoso, subjacente ao qual está a lâmina própria de tecido

¹ Em português, a abreviatura comumente utilizada para o carcinoma epidermoide esofágico é CEE. Aqui, utilizaremos a abreviatura ESCC, derivada do inglês *esophageal squamous cell carcinoma*, para uniformizar o termo ao longo de toda dissertação, inclusive no artigo original escrito na língua inglesa.

conjuntivo e uma camada muscular da mucosa constituída por músculo liso; (2) uma submucosa contendo glândulas exócrinas; (3) uma camada muscular externa composta por músculo liso, dividida em uma camada circular interna e uma camada longitudinal externa; (4) uma adventícia formada por tecido conjuntivo frouxo e células adiposas, que conecta o esôfago às estruturas adjacentes.

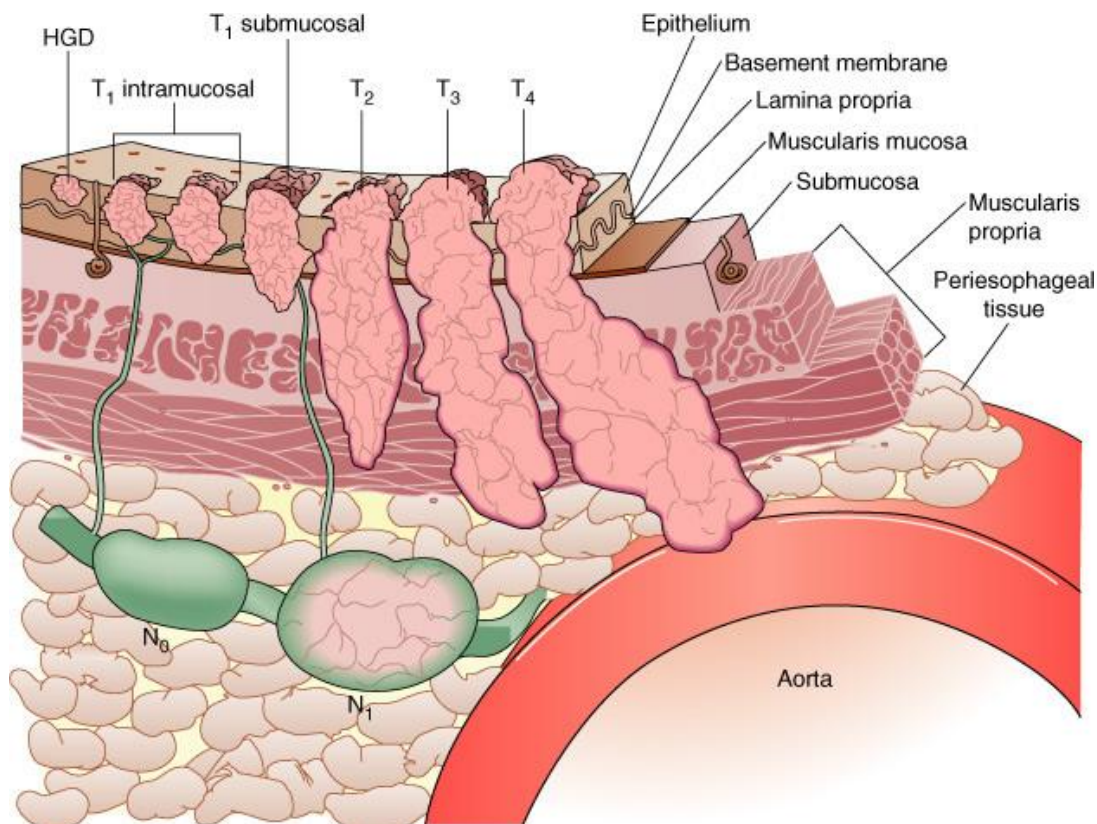


Figura I – Evolução histopatológica do câncer de esôfago. A partir do epitélio de revestimento normal, lesões pré-malignas como a displasia de alto grau (*High Grade Displasia*, HGD) podem se desenvolver e progredir ao longo das camadas histológicas subjacentes do órgão. A ausência de uma serosa revestindo o órgão facilita a progressão da neoplasia através do tecido periesofágico, de modo que a massa tumoral não aumenta para a luz do órgão, mas sim na direção intramural. Este aspecto faz com que a manifestação de sintomas como a disfagia apareçam apenas tardiamente, piorando o prognóstico dos pacientes. Este padrão de crescimento permite, ainda, que as células tumorais invadam o sistema circulatório sanguíneo e/ou linfático, podendo levar ao desenvolvimento de metástases. Reproduzido de Rice WR. *Diagnosis and staging of esophageal carcinoma*. In: Pearson, F.G., Cooper, J.D., Deslauriers, J. e col. *Esophageal Surgery*, 2nd ed, p. 687. Churchill Livingstone, New York.

A maioria dos estudos epidemiológicos até 1980 não fazia distinção entre os dois tipos de CE porque o ADO era um achado relativamente incomum neste período. Nos países em desenvolvimento o ESCC encontra uma prevalência de 4:1 ou até 90% dos casos de CE (Abnet e col, 2018; Wong e col, 2018). Esta situação tem se modificado em alguns países ocidentais onde tem-se observado uma redução do número de casos de ESCC (especialmente pela diminuição do consumo de tabaco, principal fator de risco para o ESCC). Em paralelo

observa-se o aumento da incidência do ADO (associado a dieta, obesidade e doença do refluxo gastro esofágico), com prevalência que pode atingir até 50% dos casos de CE (Napier e col, 2014, Coleman e col, 2017).

A história natural do ESCC, com índice de letalidade de 88%, tem mau prognóstico principalmente devido à identificação tardia. Isto se deve, principalmente: (1) a características anatômicas e histológicas do esôfago com a ausência de uma adventícia envolvendo o órgão, como demonstrado na Figura I; (2) à natureza agressiva dos tumores; e (3) à complexidade molecular e celular de sua evolução. O estadiamento do ESCC é mostrado na **Tabela 1** (modificado de Strong e col, 2013) e afeta diretamente a sobrevida dos pacientes, independente da opção terapêutica (Berry, 2014).

Tabela 1 - Estadiamento TNM do ESCC (*American Joint Committee of Cancer, 2014*)

Estágio	T	N	M	Grau	Localização
0	Tis (HGD)	N0	M0	0	Qualquer
IA	T1	N0	M0	1	Qualquer
IB	T1	N0	M0	2-3	Qualquer
	T2-T3	N0	M0	1	Inferior
IIA	T2-T3	N0	M0	1	Sup, médio
	T2-T3	N0	M0	2-3	Inferior
IIB	T2-T3	N0	M0	2-3	Sup, médio
	T1-T2	N1	M0	Qualquer	Qualquer
IIIA	T1-T2	N2	M0	Qualquer	Qualquer
	T3	N1	0	Qualquer	Qualquer
	T4a	N0	0	Qualquer	Qualquer
IIIB	T3	N2	0	Qualquer	Qualquer
IIIC	T4a	N1-2	0	Qualquer	Qualquer
	T4b	Qualquer	0	Qualquer	Qualquer
	Qualquer	N3	0	Qualquer	Qualquer
IV	Qualquer	Qualquer	1	Qualquer	Qualquer

1.1.3. Fatores de Risco para o ESCC

Há muitas décadas diferentes autores utilizando recursos de radiologia e exames anatomopatológicos, associaram a presença de ESCC ao uso excessivo de tabaco e álcool, saúde bucal deficiente e consumo de bebidas em alta temperatura como o mate quente (Bullrich RA, 1923; Craveira LF, 1932; Watson WL, 1939). Anos após estes trabalhos pioneiros, comprovou-se o risco aumentado de desenvolvimento do ESCC em indivíduos consumidores de tabaco. O tabagismo está mais relacionado ao ESCC do que ao ADO, e 75% das mortes por CE são atribuídas ao tabaco (Risk e col, 1999; Hench e col, 2010).

Outras situações de risco foram posteriormente associadas ao ESCC, como mutações em enzimas que metabolizam o álcool, estresse térmico e antecedentes de radiação torácica (Ahsan e col, 1998; Risk, 1999; Freedman e col, 2007; Kamangar e col, 2008; Mao e col, 2011). Higiene oral inadequada e deficiências nutricionais também promovem o risco de ESCC. Neste contexto o aumento da inflamação e distúrbios do sistema imunológico, favorecidos pela má higiene oral e por deficiências nutricionais, podem favorecer a carcinogênese (Baylin e col, 1998; DeMarini, 2004; Messner e col, 2012). Estas condições explicam, pelo menos parcialmente, o maior risco de desenvolvimento de ESCC em populações com baixo nível socioeconômico (Guha e col, 2007; Brown e col, 2001; Taylor e col, 2003; Qiao e col, 2009; Islami e col, 2009). Como consequência destes fatores pode ocorrer a inativação de genes supressores tumorais e ativação de proto oncogenes em oncogenes através de alterações genéticas ou epigenéticas. As subseções abaixo discutem alguns aspectos relacionados aos fatores de risco citados.

Acetaldeído, Álcool e Tabaco

O consumo de álcool é fator de risco para o ESCC. O álcool ingerido sofre conversão no composto carcinogênico acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase (ADH), seguido da transformação deste em acetato pela enzima acetaldeído desidrogenase (ALDH). O acúmulo de acetaldeído pode favorecer a mutagênese, distúrbios na proliferação celular e inibição dos mecanismos de reparo do DNA. O álcool também é metabolizado em acetaldeído por microrganismos da cavidade oral, os quais são induzidos a produzir ainda mais acetaldeído quando da ingestão de álcool ou tabaco, criando um microambiente que favorece a carcinogênese. A fumaça do cigarro contém acetaldeído que se dissolve na saliva, que após

deglutida distribui o mesmo para o esôfago e o estômago (Wu, 2005; Yokoyama e col, 2005; Yang e col, 2007; Zhong e col, 2011).

Dieta, Tabaco e Nitrosaminas

Seres humanos estão expostos a uma grande quantidade de compostos N-nitrosos derivados do consumo de tabaco, dieta, fumaças do ambiente e na água para consumo. Nitrosaminas estão presentes em diversos alimentos, especialmente defumados, salgados e secos, além de produtos com aditivos para preservação, reconhecidamente fatores de risco para a oncogênese em vários modelos experimentais e em seres humanos. De fato, há uma associação entre o consumo de alimentos processados e o desenvolvimento de CE (Jakszyn e col, 2006; Choi e col, 2013b; Zhu e col, 2014), especialmente para o ESCC (Keszei e col, 2012). A redução de nitratos presentes na alimentação em nitritos por bactérias presentes na cavidade oral é outra fonte de nitrosaminas, o que pode explicar pelo menos parcialmente, a associação entre má higiene oral e o desenvolvimento do ESCC. Na inflamação crônica, como em condições pré-neoplásicas do esôfago, também ocorre aumento na produção de nitrosaminas (Jakszyn e col, 2006; IARC, 2008; Kamangar e col, 2009).

Estresse Térmico e Consumo de Mate Quente

Em áreas do Oriente Médio e Ásia a incidência do ESCC chega a mais de 100 casos por 100.000 habitantes e parece não estar relacionada apenas ao tabagismo ou consumo de álcool, mas à ingestão de chás aquecidos à alta temperatura (Roth e col, 1998; Umar e col, 2008; Islami, 2009; Andrici e col, 2015). Estudos prospectivos realizados nas províncias chinesas de Henan e Linxian, locais de alta incidência e prevalência do ESCC, avaliaram fatores de risco e lesões pré-malignas. Indivíduos diagnosticados como tendo alterações inflamatórias da mucosa esofágica, obtida a partir de esfregaço citológico, foram acompanhados prospectivamente. Várias alterações histológicas foram identificadas ao longo da observação. A displasia do epitélio escamoso revelou potencial evolutivo como lesão pré-maligna (Dawsey e col, 1997). Alterações como acantose, esofagite, hiperplasia celular basal e atrofia epitelial não foram associadas a um risco aumentado de neoplasia (Qiu e col, 1988; Wang e col, 2005).

A América do Sul também apresenta alta incidência de ESCC que, afora os fatores de risco comuns a outras regiões, tem sido atribuída ao consumo da infusão da erva *Ilex*

paraguayenses, ou erva mate, quente (Muñoz e col, 1987; Barros e col, 2000). A temperatura da água, o volume diário ingerido e o período de consumo são, por si só, fatores de risco independentes para desenvolvimento do ESCC (Rolón e col, 1995). A ingestão igual ou superior a três litros diários apresenta risco 3 para o ESCC (Castellsagué e col, 2000; Sewram e col, 2003). Efeitos diretos e indiretos do mate quente sobre a mucosa têm sido propostos, como fatores desencadeadores de processo inflamatório crônico associado à irritação térmica e formação endógena de compostos carcinogênicos presentes na infusão. Entre estes, destacam-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e outros compostos N-nitrosos como as nitrosaminas. Uma grande quantidade de HAP foi demonstrada nas folhas da erva mate, além de metabólitos de benzopirenos na urina de consumidores (Boström e col, 2002; Fagundes e col, 2006; Kamangar e col, 2008; Achten & Andersson, 2015). A concentração de HAP apresenta importante variação em diferentes processos de industrialização e comercialização da erva mate (Golzar e col, 2012). Molecularmente, mutações somáticas no gene TP53 associadas à atividade da enzima óxido nítrico sintase foram demonstradas em amostras de ESCC de pacientes expostos ao traumatismo térmico (Sepehr e col, 2002; Pütz e col, 2002).

A injúria térmica, por sua vez, altera a permeabilidade da mucosa e aumenta o risco de lesão epitelial causada por carcinógenos contidos na erva mate. Estudos em cobaias revelaram que o contato do líquido com temperaturas superiores a 40°C com a mucosa aumenta a permeabilidade da mesma, incluindo alterações no transporte ativo de íons. A ingestão de chá mate frio ou gelado não está relacionada a um aumento da incidência de ESCC (Rolón e col, 1995; Tobey e col 1999; Loomis e col 2016). Em 1990 a Agência Internacional para Pesquisa no Câncer (IARC) classificou o mate quente como um provável carcinógeno humano (grupo 2A), pelo traumatismo térmico de repetição (IARC, 1991).

1.1.4. Diagnóstico e Rastreamento do ESCC

O tratamento para o ESCC inclui a ressecção cirúrgica, quimio e radioterapia. A cirurgia, quando realizada em estágio inicial, oferece sobrevida em cinco anos de até 90%. Porém, na grande maioria dos casos o diagnóstico só é estabelecido quando sintomas como a disfagia já estão presentes, indicando doença avançada. Nesta fase, mais de 70% dos pacientes encontram-se em estágio 2 avançado ou metastático (Berry, 2014).

Apesar dos avanços no diagnóstico e terapia antitumoral, o que tem se refletido em melhor prognóstico para inúmeros tipos tumorais, o desfecho do ESCC permaneceu inalterado nas últimas décadas, com uma sobrevida de cinco anos em torno de 20% (Pennathur e col, 2013; Wang e col, 2009; <https://www.cancer.org/cancer/esophagus-cancer/about/key-statistics.html>). O estudo da carcinogênese celular e molecular destes tumores poderá permitir o desenvolvimento de novos marcadores diagnósticos e alvos terapêuticos, com melhor qualidade e maior sobrevida aos pacientes (Abnet e col, 2018; Chen e col, 2017).

Neste contexto, vários processos envolvidos no desenvolvimento e progressão tumorais, tais como resistência à morte celular, capacidade proliferativa autônoma, replicação ilimitada, angiogênese, invasão e metástases têm sido estudados. Estes mecanismos são agrupados nos chamados *hallmarks* (características) clássicos do câncer (Hanahan & Weinberg, 2011), cujas principais proteínas têm sido estudadas como biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e alvos terapêuticos antitumorais. Associada aos *hallmarks* do câncer, recebe destaque a autofagia, processo catabólico de componentes celulares fundamental à homeostase celular (Galluzzi e col, 2015), mas também envolvida na manutenção e desenvolvimento do ESCC (Hall e col, 2018).

Conforme já observado, o prognóstico de ESCC pouco se alterou nas últimas décadas. Estudar as alterações autofágicas neste tipo de tumor pode melhorar nosso entendimento da carcinogênese, padronizar marcadores diagnósticos e prognósticos, e modular este mecanismo com objetivos terapêuticos. A seção a seguir descreve os principais aspectos da autofagia no contexto do câncer e as bases teóricas para entendimento do objetivo central da presente dissertação.

1.2. AUTOFAGIA

1.2.1. Conceitos básicos

Autofagia é um mecanismo fisiológico para eliminação de componentes celulares não funcionais, envelhecidos ou malformados. Neste processo estruturas celulares defeituosas são marcadas, englobadas em uma organela citoplasmática transitória e degradadas, para serem reaproveitadas na ressíntese de novos componentes funcionais (Yorimitsu e col, 2005). A autofagia é um sistema catabólico basal utilizado pelas células eucariotas para eliminar componentes através da via lisossomal, contribuindo para a manutenção da homeostase celular (Galluzzi e col, 2015; Kenific e col, 2015; Green e col, 2011). Alterações ambientais (por ex., redução de nutrientes e oxigênio) ou celulares (por ex., dano a organelas ou defeitos no dobramento proteico) elevam os níveis da atividade autofágica para eliminação das estruturas alteradas e adaptação ao estresse. Dessa forma o processo autofágico também fornece precursores de ATP para as células se adaptarem à condição energética adversa (Choi e col, 2013a).

Existem 3 tipos de mecanismos de autofagia (Glick e col, 2010): **(a) Autofagia mediada por chaperonas:** ocorre pela entrega de proteínas mal dobradas, que permanecem com chaperonas ligadas à sua estrutura e aos lisossomos, onde acontece a degradação proteica; **(b) Microautofagia:** envolve o englobamento direto pelos lisossomos de componentes celulares, como complexos proteicos, ribossomos e proteossomos **(c) Macroautofagia:** principal processo de degradação autofágica, com formação de uma vesícula associada a lisossomos. A micro e a macroautofagia têm a capacidade de englobar estruturas celulares através de mecanismos seletivos ou não seletivos, enquanto a autofagia mediada por chaperonas degrada apenas proteínas solúveis por um sistema seletivo. A capacidade de degradação em grande escala do citoplasma é uma importante função autofágica, devendo ser finamente controlada para evitar desequilíbrios entre síntese e degradação (Eskelinen e col, 2009). Disfunções na intensidade da autofagia ou no conteúdo fagocitado podem estar associadas à carcinogênese, neurodegeneração, infecção microbiana e envelhecimento (Eskelinen e col, 2009; Choi e col, 2013a).

Deste momento em diante, nos referimos à macroautofagia apenas como autofagia, descrita a seguir e ilustrada na **Figura II**. Estruturalmente, a autofagia inicia-se com a nucleação, que envolve a formação do fagoforo, uma projeção da membrana do retículo endoplasmático rugoso. Este, se expande até formar uma vesícula de membrana dupla que

incorpora os componentes a serem degradados, o autofagossomo. A nucleação, expansão e fechamento do autofagossomo corresponde à 'etapa inicial' da autofagia. O autofagossomo, por sua vez, funde-se com lisossomos citoplasmáticos formando o autofagolisossomo, no qual ocorre a degradação dos componentes celulares através da atividade catalítica de hidrolases ácidas, com produção de açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e nucleotídeos. Os produtos do catabolismo são então transportados através de permeases presentes na membrana do autofagolisossomo de volta para o citoplasma, para serem reutilizados no metabolismo celular (He e col, 2009; Mizushima e col, 2011). A fusão do autofagossomo aos lisossomos bem como a degradação dos componentes celulares correspondem à 'etapa tardia' da autofagia.

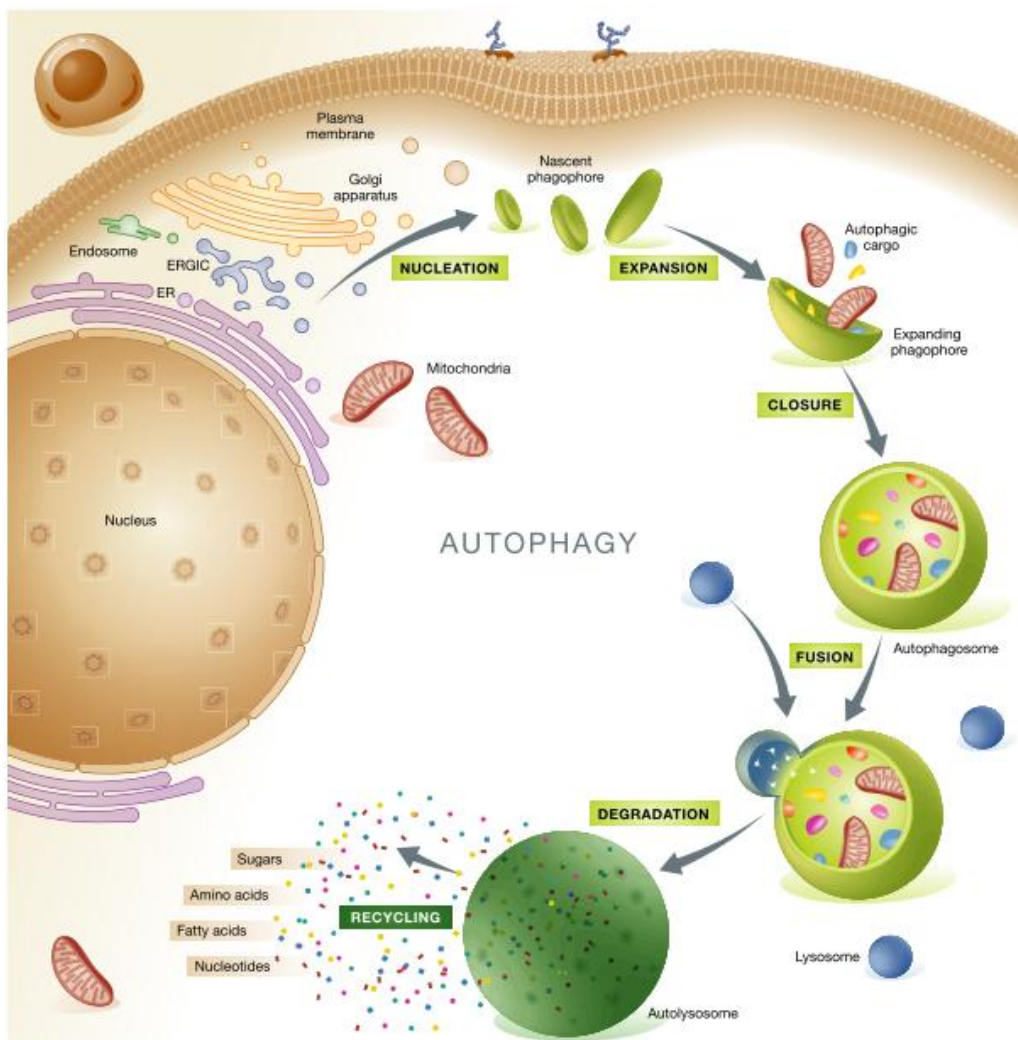


Figura II – Etapas do mecanismo de autofagia. Os 5 eventos envolvidos no desenvolvimento da autofagia são mostrados: (1) Nucleação; (2) Expansão; (3) Fechamento; (4) Fusão; (5) Degradação. Os eventos 1, 2 e 3 podem ser chamados de **etapa inicial** da autofagia, enquanto os eventos 4 e 5 podem ser chamados de **etapa tardia**. Imagem de Galluzzi e col, 2015.

1.2.2 Mecanismos moleculares no controle da autofagia

Os eventos relacionados à etapa inicial da autofagia são controlados, molecularmente, por uma via de sinalização específica formada pela família das proteínas Atg (a nomenclatura ATG em letras maiúsculas se refere aos genes enquanto Atg refere-se às proteínas envolvidas no processo) (Klionsky, 2012; Klionsky e col, 2016). Estas controlam a nucleação da membrana, a expansão e o fechamento do autofagossomo. O processo ocorre pela interação de complexos de proteínas Atg com a membrana do autofagossomo em formação (**Figura III**).

O mecanismo inicia-se em regiões do retículo endoplasmático rugoso enriquecidas com a proteína Atg9 (Karanasios e col, 2016). Sinais indutores de autofagia levam à formação do complexo ULK, formado pelas proteínas ULK (Atg1) + Atg13 + FIP200 (Atg17). Este interage com um segundo complexo chamado PI3K classe III, formado pelas proteínas Atg14 + Beclina 1 (Atg6) + PI3K classe III + p150 (subunidade catalítica da PI3K classe III). Estes compostos são importantes para a nucleação de um novo fagoforo a partir do retículo endoplasmático rugoso. A este fagoforo em formação associa-se um terceiro grupo de proteínas Atg, formado pelas proteínas Atg16L1 + Atg5 + Atg12. A formação desta estrutura ocorre pela ação de outras duas proteínas, Atg10 e Atg7, sendo estas o principal indutor do alongamento da membrana do autofagossomo (Yorimitsu e col, 2005; Boya e col, 2013; Glick e col, 2010).

Concomitante ao alongamento da membrana do autofagossomo inicia-se a sinalização que irá levar ao seu fechamento. Esta sinalização envolve a cadeia leve da proteína de ligação a microtúbulos 1 (MAP1LC3), ortóloga de Atg8 de levedura, deste momento em diante denominada apenas de LC3. Tão logo é expressa, a proteína LC3 é clivada pela proteína Atg4 na sua forma I (LC3-I), que permanece livre no citoplasma. Quando há um sinal indutor de autofagia na célula, a proteína LC3-I recebe um fosfolípido do tipo fosfatidiletanolamina (PE) através da atividade das proteínas Atg7 e Atg3. Assim forma-se a LC3-II, que passa a interagir com a membrana do autofagossomo em formação, levando ao seu fechamento (He e col, 2003; Hemelaar e col, 2003).

Além destas há o envolvimento de proteínas adaptadoras, entre as quais destaca-se a Sequestosome 1 (SQSTM1 ou p62). A SQSTM1 atua marcando molecularmente os componentes celulares que devem ser autofagocitados, interagindo com a proteína MAP1LC3 II presente na membrana do autofagossomo, carregando os componentes celulares para dentro do mesmo (Pankiv e col, 2007).

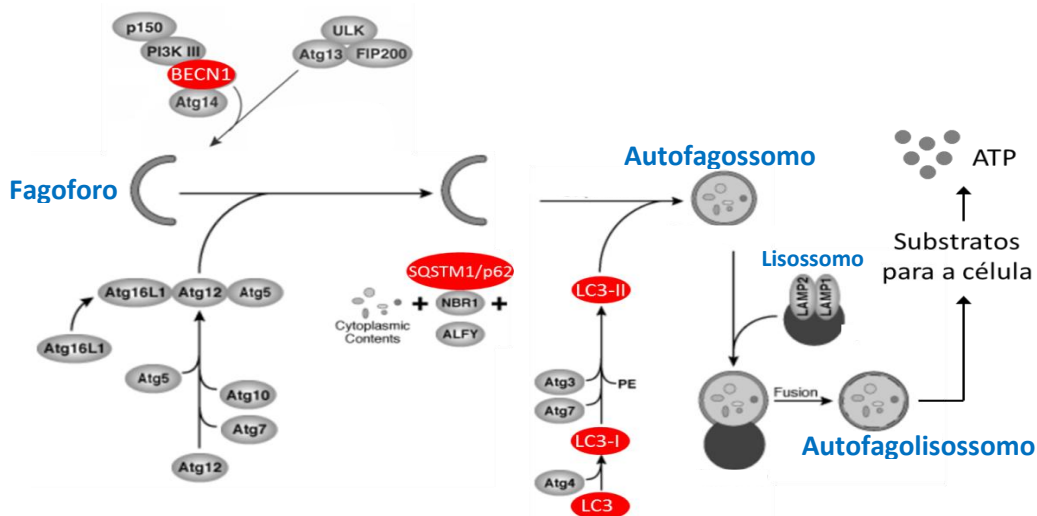


Figura III – Mecanismos moleculares de controle da autofagia. A autofagia é guiada pelas proteínas da família Atg, as quais formam complexos que vão conduzindo os eventos de formação do autogossomo. A etapa tardia (da fusão do autogossomo aos lisossomos) não envolve mais proteínas Atg, mas proteínas lisossomais LAMP1/2, que induzem a fusão do autogossomo com os lisossomos. Em vermelho estão destacadas as proteínas que serão avaliadas no presente trabalho. Adaptado de www.cellsignaling.com.

A família das proteínas Atg é formada mais de 30 subtipos. Na presente dissertação o potencial de biomarcação de 3 destas proteínas será estudado.

a. Atg6 ou Beclina-1 (BECN1) - atua como uma proteína estrutural para a formação do complexo PI3K, um dos primeiros componentes de recrutamento durante o desenvolvimento dos autogossomos. Sua ação ocorre na nucleação e expansão da membrana do fagoforo, em fases iniciais do processo (Kang e col, 2011). Inúmeros trabalhos têm sugerido a BECN1 como marcador prognóstico em câncer (He e col, 2014). Além disso, a BECN1 interage com a família das proteínas controladoras do apoptose, Bcl-2, atuando como um componente molecular que conecta morte celular e autofagia (Kang e col, 2011).

b. Atg8 ou MAP1LC3 (LC3 ou LC3) – A MAP1LC3 é a proteína ortóloga da Atg8 de leveduras, e atua como um marcador importante do processo de autofagia. A proteína MAP1LC3 apresenta 3 isoformas (A, B ou C), com distribuição variável nos tecidos humanos (He e col, 2003), incluindo o esôfago (**Figura IV A**). A MAP1LC3 é clivada quando que expressa, pela proteína Atg4 (cujas isoformas B e D são as mais abundantes no esôfago – **Figura IV B**). Assim, é formada a MAP1LC3-I citoplasmática. Esta é transformada na sua forma ativa (MAP1LC3-II) a partir da adição de um fosfolípido a fosfatidiletanolamina (PE). Com isso, MAP1LC3-II acopla-se à membrana do autogossomo crescente e promove o seu alongamento e fechamento. Esta

proteína também interage com os adaptadores de autofagia que marcam os componentes celulares a serem degradados, entre os quais destaca-se a SQSTM1 (citada abaixo), contribuindo para o carregamento destes para dentro do autofagossomo. Vários fatores de estresse celular como hipóxia, desnutrição e quimioterapia estimulam a conversão de MAP1LC3-I em MAP1LC3-II (Shpilka e col, 2011; Lee e col, 2016).

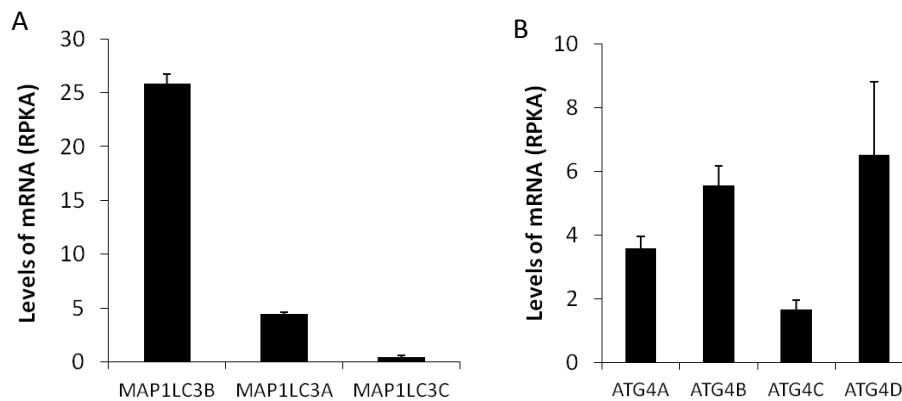


Figura IV – Níveis de expressão das isoformas de MAP1LC3 e ATG4 no tecido esofágico normal. (A) MAP1LC3 e (B) ATG4. Dados obtidos a partir de estudo realizado para determinação dos níveis de expressão gênica em diferentes tecidos humanos. (Fagerber e col, 2014).

c. SQSTM1 (Sequestosome 1 ou p62) - A SQSTM1 é uma proteína dita 'adaptadora' no contexto da autofagia, marcando os componentes celulares que devem ser incorporados ao autofagossomo e metabolizados. Durante o processo, a proteína é catabolizada junto com as demais estruturas contidas no autofagossomo, levando a uma redução dos seus níveis (Pankiv e col, 2007). Na ativação crônica da autofagia, entretanto, ocorre uma sinalização para ressíntese e os níveis de SQSTM1 voltam a aumentar (Sahani e col, 2014). Células com níveis elevados da proteína possuem capacidade autofágica aumentada e maior adaptação a situações de estresse (Bjørkøy e col, 2009; Bartolome e col, 2017; Carrol e col, 2018).

Upstream à sinalização específica da autofagia, as principais vias de proliferação e morte celular modulam os complexos Atg a fim de controlar os níveis de autofagia. A principal proteína que recebe estes sinais e controla diretamente o complexo ULK é a proteína mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*). A mTOR forma o Complexo I da mTOR (mTORC1), o qual atua mantendo a autofagia basal em níveis controlados. Sinais de estresse celular, como a ativação da via da proteína TP53 (por ex., dano ao DNA) ou a ativação da proteína controladora do metabolismo AMPK (por ex., ativada após redução da razão de ATP/ADP),

suprimem o mTORC1 e disparam a autofagia. Por outro lado, a ativação de vias de sobrevivência e proliferação celular, como a via das MAPK ou da PI3K/AKT mantém o mTORC1 ativado e os níveis de autofagia basais baixos (He e col, 2009; Yu e col, 2018).

1.2.3. Papel da Autofagia no Câncer

O papel da autofagia no câncer deve ser entendido nas diferentes etapas da carcinogênese, a qual pode ser dividida em 3 momentos consecutivos (Pilot, 1993; Hanahan & Weinberg, 2011): **(1) Iniciação:** envolve as primeiras alterações moleculares irreversíveis (mutações genéticas ou alterações epigenéticas) que acometem as células saudáveis, modificando sua homeostase. Apesar de não estar em uma condição plenamente saudável, a célula submetida a estas primeiras alterações não é, por definição, uma célula cancerosa, uma vez que ainda não possui a capacidade de proliferar e gerar uma estrutura tumoral. **(2) Promoção:** o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas vai progressivamente afastando a célula transformada da condição normal (ou saudável). Durante a promoção, há um aumento da massa tumoral. **(3) Progressão:** as células transformadas adquirem a capacidade de invasão aos tecidos adjacentes. A invasividade é a principal diferença entre tumores benignos e malignos. A partir deste ponto, as células (agora chamadas de células cancerosas) podem alcançar a circulação sanguínea e linfática e gerar metástases.

Considerando o papel da autofagia neste processo (**Figura IV**), nas células normais, a autofagia atua como um mecanismo quimiopreventivo, contribuindo para a manutenção da integridade do genoma e eliminação dos pró-carcinógenos. Dessa forma, este mecanismo auxilia na manutenção das células normais no seu estado saudável (Steeves e col, 2010; Vessoni e col, 2013). A autofagia contribui também na: (a) manutenção do metabolismo energético normal, (b) degradação de proteínas potencialmente oncogênicas, (c) sobrevivência de células imunes e imunovigilância antitumoral e (d) controle dos níveis inflamatórios teciduais (Galluzzi e col, 2015). Em diversos modelos murinos, defeitos no funcionamento da autofagia, devido ao *knockout* tecido-específico ou sistêmico, aceleram a oncogênese, dando origem a tumores diversos, como carcinomas, adenocarcinomas, linfomas e sarcomas (Zhi e col, 2015; Galluzzi e col, 2015).

Várias proteínas do grupo Atg, como Atg5, BECN1, Atg7 e Atg4, exercem função supressora tumoral (Liang & Jung, 2011). Além disso, outras proteínas que reprimem o desenvolvimento tumoral, como TP53, LKB1 e PTEN estimulam a autofagia, enquanto proteínas oncogênicas a suprimem, como a Bcl-2 e a via Akt/PI3k (Kimmelman, 2011; Maiuri e

col, 2009). A função citoprotetora da autofagia é geralmente considerada adaptativa e homeostática. Modelos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram que durante a iniciação tumoral ocorre a perda ou desligamento temporário da autofagia, por sinais ambientais ou alterações epigenéticas, favorecendo a transformação celular (Galluzzi e col, 2015). Nestes modelos a transformação pré-maligna inicial está associada à redução da capacidade autofágica. Durante a promoção e progressão tumorais, a autofagia reativada passa a atuar como mecanismo de adaptação, favorecendo a manutenção e o crescimento celular. Isto ocorre especialmente pela oferta de substratos energéticos derivados dos produtos de degradação da autofagia, que contribuem para a adaptação à hipóxia e ao déficit de nutrientes causados pela elevada demanda metabólica e angiogênese incipiente (Kondo e col, 2005; He e col, 2009; Rosenfeldt e col, 2011; Yang e col, 2011). A indução da autofagia em lesões pré-malignas parece acelerar o crescimento e malignização das mesmas (Kowalik e col, 2016; Tang e col, 2016). Este é um aspecto relevante, pois vários cânceres se desenvolvem a partir de lesões pré-malignas. Além da adaptação metabólica, a autofagia exerce outras duas funções igualmente importantes que permitem a progressão tumoral: (a) resistência à morte celular desencadeada pelo desprendimento da matriz tumoral, permitindo que células neoplásicas possam invadir o tecido saudável e desenvolver metástases; (b) sobrevivência de células-tronco tumorais, subpopulação envolvida na iniciação, manutenção e recorrência neoplásica (Galluzzi e col, 2015). Assim é possível inferir que o monitoramento dos níveis de autofagia poderia oferecer um potencial preditivo diagnóstico e prognóstico, tanto no tecido saudável de grupos de risco quanto em lesões pré-malignas.

Portanto, conforme mostrado na **Figura V** a transformação celular parece ser favorecida pelo desligamento da autofagia, seguido da sua reativação em etapas subsequentes. Enquanto a ativação aguda (poucas horas) da autofagia envolve basicamente os componentes citoplasmáticos e a formação dos complexos Atg, a estimulação mais prolongada (a partir de 12h), como ocorre durante a carcinogênese, envolve a modulação da expressão gênica (Shin e col, 2016; Baek e col, 2017). Estudos sugerem que eventos epigenéticos estão envolvidos neste processo. Pacientes acometidos por gastrite causada pela bactéria *Helicobacter pylori*, por exemplo, apresentam silenciamento epigenético do gene MAP1LC3A e redução da autofagia nas células da mucosa gástrica preservada. Este processo está associado à transformação do epitélio normal, uma vez que este silenciamento leva ao aumento da proliferação, migração e invasão celulares (Muhammad e col, 2017).

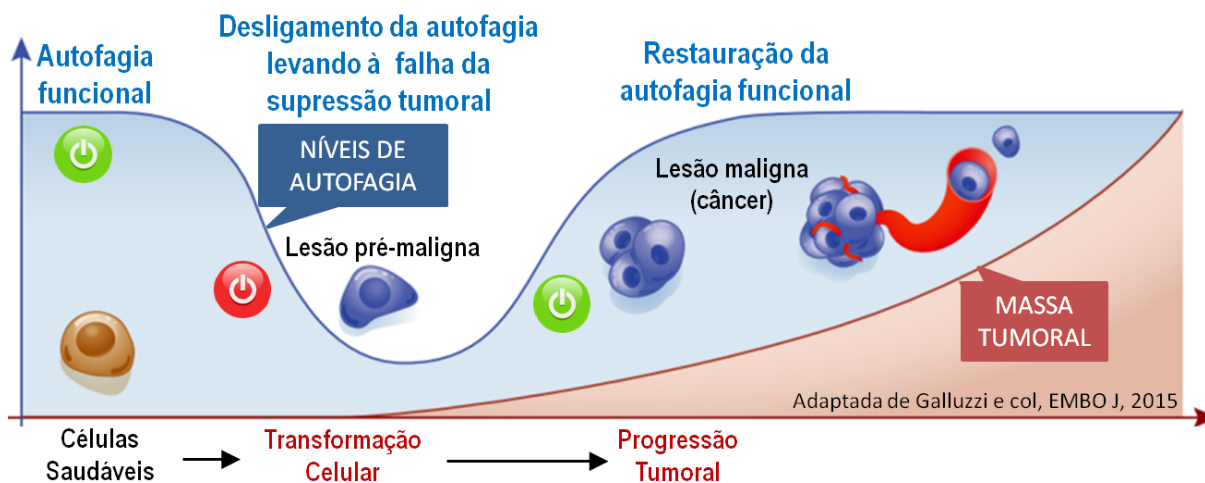


Figura V. Papel da autofagia no desenvolvimento do câncer. A autofagia proficiente mantém as células saudáveis no seu estado normal e homeostático (à esquerda na Figura). A redução da autofagia, neste contexto, favorece a transformação maligna, com a formação de células pré-tumorais (central na Figura). A partir de uma lesão pré-maligna ou precursora tumoral, o reestabelecimento da autofagia funcional é fundamental para a adaptação ao estresse metabólico a que estas células serão expostas. *Adaptada de Galluzzi e col, 2015.*

A manifestação de sinais clínicos nos pacientes ocorre durante a progressão tumoral. É neste momento, portanto, que são aplicados os tratamentos quimio e radioterápico. Considerando o papel da autofagia na resposta terapêutica, na maioria dos cenários este mecanismo protege as células tumorais da morte celular, devido à própria função fisiológica exercida pela autofagia de controle de qualidade dos componentes celulares (Galluzzi e col, 2015; Das e col, 2018). A morte celular apoptótica pela via mitocondrial é induzida por estresses celulares, como danos ao DNA ou à própria mitocôndria. A partir da sinalização do dano ao DNA, citoesqueleto ou mitocôndrias, ocorre a ativação de uma sequência de eventos que leva a alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial. Isto causa a liberação de moléculas intra mitocondriais para o citoplasma, ativando o sistema de morte celular por apoptose (Estaquier e col, 2012). A rápida e elevada capacidade de formação de autofagossomos para eliminação das mitocôndrias permeabilizadas (processo chamado de mitofagia), evita a morte celular e promove a resistência à quimioterapia (Villa e col, 2017; Yan e col, 2017). A autofagia também favorece a resistência à morte celular através da manutenção dos níveis de ATP intracelulares, necessários para processos de reparação e manutenção de funções básicas (Corrado e col, 2016; Guo e col, 2016; Villa e col, 2017).

Nosso grupo de pesquisa tem contribuído, nos últimos anos, para o entendimento do papel da autofagia como mecanismo inibidor da morte celular em resposta à quimioterapia, especialmente considerando o crosstalk com mecanismos celulares como a apoptose, o controle do ciclo celular e a senescência. De fato, o nível de autofagia disparado por uma célula

tumoral após a exposição a um quimioterápico define o destino das células tumorais, se para apoptose ou para senescência (Filippi-Chiela e col, 2015). Neste contexto, foi demonstrado que a modulação racional da autofagia aumenta a sensibilidade das células de glioma à quimioterapia com Temozolomida (Filippi-Chiela e col, 2015). Na última década estudos básicos e pré-clínicos descrevendo o potencial da inibição da autofagia induzida por quimioterápicos forneceram suporte para mais de 50 ensaios clínicos que avaliaram a combinação de quimioterápicos com inibidores de autofagia. Estes ensaios culminaram, em 2017, com o primeiro caso de sucesso terapêutico na clínica oncológica, com a associação de quimioterápicos e inibidores da autofagia aumentando a resposta de células de câncer de cérebro (Levy e col, 2017b).

1.2.4. Autofagia e Prognóstico em Câncer

A proteína BECN1 (homólogo da proteína de levedura Atg6) foi a primeira proteína Atg descrita, em 2007 (Cao e col, 2007). Na última década foram descritas alterações no funcionamento da autofagia em vários tipos tumorais de diferentes origens. Na **Tabela 2** nós resumimos uma série de artigos que avaliaram os níveis dos 3 principais marcadores de autofagia (BECN1, MAP1LC3 e SQSTM1) em amostras tumorais em comparação ao tecido normal parental e, em alguns casos, em lesões pré-malignas.

A partir da Tabela 2 podemos observar que não existe um padrão nos níveis dos marcadores de autofagia utilizados. Este aspecto pode ser devido a inúmeros fatores, entre os quais: o tipo celular de origem; o estadiamento tumoral; características do tecido onde se originou o câncer (por ex, intensidade da vascularização, reparação tecidual e perfil inflamatório), entre outras. No CE do tipo adenocarcinoma foi observada uma redução dos níveis de BECN1 em comparação com a mucosa normal e com o tecido displásico presente no Esôfago de Barrett. Por outro lado, em carcinomas escamosos orais e de cabeça e pescoço se observou aumento dos níveis de SQSMT1 e MAP1LC3.

Tabela 2 – Níveis dos marcadores de autofagia BECN1, SQSTM1 e MAP1LC3 em amostras tumorais, tecidos normais correspondentes e lesões pré-malignas.

INDICADOR	TIPO TUMORAL	N AMOSTRAL	RESULTADO	Ref
BECN1	Adenocarcinoma esofágico	62 tumores 62 Barrett displásicos	Níveis de BECN1 semelhantes no epitélio escamoso normal e no esôfago de Barrett, e reduzidos no tecido displásico e adenocarcinoma.	Roesly e col, 2016
BECN1	Estômago	75 tumores (16 estágio I 40 estágio II 19 estágio III)	Tumores em estágio I e II: níveis maiores de BECN1 do que o tecido adjacente; estágio III: níveis menores de BECN1 do que o tecido adjacente	Fei e col, 2016
BECN1	Carcinoma Hepatocelular	10 normais 35 tumores	Níveis menores de BECN1 nas amostras tumorais	Al-Shenawy e col, 2015
BECN1	Mama	24 normais 24 tumores	Não foi observada diferença nos níveis de expressão de BECN1	Mutee e col, 2009
SQSTM1	Carcinoma de Células Escamosas Oral	14 normais 14 displasias 54 tumores	Níveis semelhantes entre tecido normal e tecido displásico. Níveis aumentados de SQSTM1 nas amostras tumorais.	Inui e col, 2013
SQSTM1	Carcinoma Escamoso de Cabeça e Pescoço	76 normais 87 displasias 199 tumores	Níveis semelhantes entre tecido normal e tecido displásico. Níveis aumentados de SQSTM1 nas amostras tumorais.	Kuo e col, 2014
SQSTM1 MAP1LC3B	Carcinoma de Células Escamosas Oral	37 normais 47 hiperplasias verrucosas 195 tumores	Níveis maiores de SQSTM1 e LC3B nos tumores em comparação ao tecido normal; níveis intermediários em lesões verrucosas hiperplásicas	Liu e col, 2014
BECN1 MAP1LC3B	Carcinoma Escamosas Hipofaríngeo	54 mucosa adjacente 82 tumores	Nível menor de BECN1 e LC3B nos tumores em comparação ao tecido normal	Wang e col, 2013
BECN1 SQSTM1	Carcinoma de Ovário	13 normais 39 tumores	Nível menor de BECN1 e LC3B nos tumores	Ju e col, 2016
BECN1 MAP1LC3	Carcinoma de Ovário	25 normais 25 tumores benignos 75 tumores	Níveis menores de BECN1 e LC3B nos tumores em comparação ao tecido normal e aos tumores benignos	Shen e col, 2008

Outra questão central que vem sendo estudada nos últimos anos diz respeito à influência dos níveis destes indicadores de autofagia na sobrevida dos pacientes. Tais estudos procuram investigar o potencial das proteínas de autofagia como marcadores prognósticos em diferentes tipos tumorais. Uma meta-análise incluindo 23 estudos avaliou o valor prognóstico dos genes BECN1 e MAP1LC3B em cânceres humanos, com destaque para o câncer gástrico, linfomas e câncer de mama. O estudo revelou que níveis elevados de BECN1 estão associados a uma maior sobrevida mediana no câncer gástrico e linfomas, enquanto níveis aumentados de MAP1LC3B indicam uma menor sobrevida para pacientes com câncer de mama (He e col, 2014). O potencial prognóstico destes indicadores também tem sido estudado em outros tipos tumorais. A **Tabela 3** sumariza os principais estudos que avaliaram os níveis de BECN1, MAP1LC3 e SQSTM1 na sobrevida dos pacientes.

Tabela 3 – Potencial prognóstico das proteínas BECN1, MAP1LC3 e SQSTM1 em diferentes tipos de câncer

INDICADORES e TIPO DE ESTUDO ¹	TIPO TUMORAL	N AMOSTRAL	RESULTADO	OBSERVAÇÕES	Ref
BECN1 R	HCC	35	Correlação negativa entre níveis de BECN1 com grau e estadiamento tumoral	Níveis maiores de autofagia em tumores menores / iniciais	Al-Shenawy e col, 2015
BECN1 MAP1LC3B R	Carcinoma epidermoide hipofaríngeo	83	Tumores BECN1 negativos e tumores com baixos níveis de MAP1LC3B = pior prognóstico	Utiliza (+) (-) para BECN1 e high/low para MAP1LC3B	Wang e col, 2013
BECN1 MAP1LC3B R	Astrocitoma	106	MAP1LC3B aumentado = pior prognóstico.	MAP1LC3B elevado = resistência a quimio e radioterapia. Níveis elevados de MAP1LC3e CD133 = pior prognóstico	Winardi e col, 2014
BECN1 MAP1LC3 R	Ovário	61	Baixos níveis de BECN1 e MAP1LC3 = pior prognóstico. Tumores de grau III possuem níveis mais baixos de BECN1 do que tumores grau I e II	Correlação positiva de BECN1 e MAP1LC3; baixos níveis de autofagia = melhor resposta à terapia com carboplatina e paclitaxel	Valente e col, 2014
MAP1LC3B R	HCC	190	Grupo MAP1LC3B negativo = pior prognóstico, apenas em estágio avançado (TNM II-III)	-	Lee e col, 2013
MAP1LC3A R	Ovário (células claras)	485	MAP1LC3A positivo = pior prognóstico (menor sobrevida mediana, menor sobrevida livre de doença)	Classificam em positivo e negativo	Spowart e col, 2012
MAP1LC3B SQSTM1 R	Carcinoma Oral de Células Escamosas	195	Aumento de MAP1LC3B, SQSTM1 elevada no citoplasma e baixa no núcleo = prognóstico desfavorável.	Baixa SQSMT1 nuclear = fator prognóstico independente	Liu e col, 2014

Tabela 1 (continuação)

INDICADORE e TIPO DE ESTUDO ¹	TIPO TUMORAL	N AMOSTRAL	RESULTADO	OBSERVAÇÕES	Ref
MAP1LC3B SQSTM1 R	NSCLC	466	Níveis reduzidos de SQSTM1 tanto citoplasmática quanto nuclear = sobrevida mais longa e menor estadiamento	Ausência de correlação entre SQSTM1 e MAP1LC3 e estágio, idade ou gênero.	Schläfli e col, 2016
SQSTM1 P	Carcinoma de Células Escamosas Oral	54	SQSTM1 elevado = pior prognóstico	-	Inui e col, 2013
SQSTM1 R	NSCLC	72 ADO 31 CCE 6 CCG	SQSTM1 positivo = pior prognóstico no adenoca. Sem diferença no CCE	30% dos Adeno e 30% dos CCG positivos para SQSTM1 52% dos CCE positivos para SQSTM1	Inoue e col, 2012
SQSTM1 P	Carcinoma de Ovário	266	Tumores com alta expressão citoplasmática e baixa expressão nuclear = pior prognóstico e associação com estágios avançados	Avalia a localização subcelular. Elevada SQSTM1 citoplasmática e baixa nuclear = fator prognóstico independente para sobrevida	Iwadate e col, 2014
SQSTM1 R	HCC ESCC Carcinoma Gástrico CCR	40 22 17 21	Níveis elevados de SQSTM1 em tumores de estômago e colorretal = correlacionados positivamente com grau histológico, e inversamente em HCC; sem correlação em carcinoma esofágico	Correlação entre níveis de SQSTM1 e porcentagem de células Ki67+	Qian e col, 2005

¹ P – Prospectivo; R – Retrospectivo;

HCC – Carcinoma Hepatocelular; NSCLC – Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células

CCR – Carcinoma Colorretal

Um aspecto importante relacionado à maior parte destes estudos diz respeito à forma de avaliação dos níveis de expressão das proteínas de autofagia. Grande parte deles avalia os níveis das proteínas através de um perfil binário que classifica cada paciente em 'low' e 'high'. Entretanto, esta classificação traz alguns problemas de subjetividade e de perda da sensibilidade considerando que os níveis de autofagia se distribuem em um intervalo amplo de intensidade. Além disso, nenhum trabalho investigou a alteração dos níveis de indicadores de autofagia de maneira integrada (por ex., combinando indicadores da etapa inicial e etapa tardia como uma estratégia para determinação do real estado autofágico de uma amostra). Este aspecto tem se mostrado importante em estudos in vitro e em modelos animais uma vez que a autofagia é um mecanismo que segue um fluxo de eventos, o chamado fluxo autofágico. Assim, acreditamos que a avaliação integrada de indicadores de diferentes etapas do mecanismo possa fornecer uma informação mais precisa acerca do estado autofágico de uma amostra. E, finalmente, são raros os estudos que avaliam a associação de indicadores de autofagia, de forma que se explique a ativação ou redução da autofagia ao longo do processo carcinogênico. A observação deste aspecto tem importância tanto no entendimento da biologia celular básica do câncer quanto no desenvolvimento de marcadores prognósticos, inclusive para lesões pré-malignas.

2. REFERÊNCIAS

- Abnet CC, Arnold M, Wei WQ. Epidemiology of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Gastroenterology*. 2018;154(2):360-373.
- Achten C, Andersson JT. Overview of Polycyclic Aromatic Compounds (PAC). *Polycycle Aromat Compd*. 2015;35(2-4):177-186.
- Ahsan H, Neugut AI. Radiation therapy for breast cancer and increased risk for esophageal carcinoma. *Ann Intern Med*. 1998;128(2):114-7.
- Al-Shenawy HA. Expression of Beclin-1, an autophagy-related marker, in chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma and its relation with apoptotic markers. *APMIS*. 2015;124(3):229-37.
- Andrici J, Eslick GD. Hot Food and Beverage Consumption and the Risk of Esophageal Cancer: A Meta-Analysis. *Am J Prev Med*. 2015 Dec;49(6):952-60.
- Baek SH, Kim KI. Epigenetic Control of Autophagy: Nuclear Events Gain More Attention. *Mol Cell*. 2017;65(5):781-785.
- Barros SG, Ghisolfi ES, e col. High temperature "mate" infusion drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Arq Gastroenterol*. 2000; 37(1): 25-30.
- Bartolome F, Esteras N, e col. Pathogenic p62/SQSTM1 mutations impair energy metabolism through limitation of mitochondrial substrates. *Sci Rep*. 2017;7(1):1666.
- Baylin SB, Herman JG, e col. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*; 72:141-96.
- Berry MF. Esophageal cancer: staging system and guidelines for staging and treatment. *J Thorac Dis*. 2014;6 Suppl 3: S289-97.
- Bjørkøy G, Lamark T, e col. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*. 2009; 452:181-97.
- Boström CE, Gerde P, e col. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect*. 2002; 110 Suppl 3:451-88.
- Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol*. 2013;15(7):713-20.
- Brown LM, Hoover R, e col. Excess incidence of squamous cell esophageal cancer among US Black men: role of social class and other risk factors. *Am J Epidemiol*. 2001;153(2):114-22.
- Bullrich RA. Nueva nota sobre un factor determinante del cancer del esofago, *Semana med*. 30: 683 1923. See also *Semana m6d*. 27: 15, 1920.
- Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res*. 2007;17(10):839-49.
- Carroll B, Otten EG, e col. Oxidation of SQSTM1/p62 mediates the link between redox state and protein homeostasis. *Nat Commun* 2018; n 9(1):256.
- Castellsagué X, Muñoz N, e col. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. *Int J Cancer*. 2000; 88(4):658-64.
- Chen MF, Chen PT, e col. Survival benefit of surgery to patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2017; 7:46139.
- Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*. 2013a;368(7):651-62.

Choi Y, Song S, e col. Consumption of red and processed meat and esophageal cancer risk: Meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2013b; 19(7): 1020–1029.

Coleman HG, Xie SH, Lagergren J. The Epidemiology of Esophageal Adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2018;154(2):390-405.

Corrado M, Campello S. Autophagy inhibition and mitochondrial remodelling join forces to amplify apoptosis in activation-induced cell death. *Autophagy*. 2016;12(12):2496-2497.

Craver LF. Clinical study of etiology of gastric and esophageal carcinoma. *Am J Cancer*. 1932; 16(1):68–102.

Das CK, Mandal M, Kögel D. Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2018; (1);1-18

Daudt AW, Lissowska J, e col. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol*. 2007;166(10):1159-73.

Dawsey SM, Shen Q, e col. Studies of esophageal balloon cytology in Linxian, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997 Feb; 6(2):121-30.

DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res*. 2004;567(2-3):447-74.

Denlinger CE, Thompson RK. Molecular basis of esophageal cancer development and progression. *Surg Clin North Am*. 2012;92(5):1089-103.

Domper Arnal MJ, Ferrández Arenas Á, Lanás Arbeloa Á. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. *World J Gastroenterol*. 2015;21(26):7933-43.

Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(4):664-73.

Estaquier J, Vallette F, e col. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 942:157-83.

Fagundes RB, Abnet CC, e col Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking maté in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. *BMC Cancer*. 2006; 6:139.

Fagundes RB, de Carli D, e col. Unchanging pattern of prevalence of esophageal cancer, overall and by histological subtype, in the endoscopy service of the main referral hospital in the central region of Rio Grande do Sul State, in Southern Brazil. *Dis Esophagus*. 2016;29(6):603-6.

Fei B, Ji F, e col. Expression and clinical significance of Beclin-1 in gastric cancer tissues of various clinical stages. *Oncol Lett*. 2016;11(3):2271-2277.

Ferlay J, Soerjomataram I, e col. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5): E359-86.

Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, e col. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One*. 2012;7(8): e42522.

Filippi-Chiela EC, Thomé MP, e col. Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer*. 2013; 13:147.

Filippi-Chiela EC, Bueno e Silva MM, e col. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy*. 2015;11(7):1099-113.

Freedman ND, Abnet CC, e col. A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes. *Am J Epidemiol.* 2007; 165(12):1424-33.

Galluzzi L, Pietrocola F, e col. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 2015;34(7):856-80.

Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kroemer G. Autophagy Mediates Tumor Suppression via Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* 2016;26(1):1-3.

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010;221(1):3-12.

Golozar A, Fagundes RB, e col. Significant variation in the concentration of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in yerba maté samples by brand, batch, and processing method. *Environ Sci Technol.* 2012; 46(24):13488-93.

Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science.* 2011;333(6046):1109-12.

Guha N, Boffetta P, e col. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol.* 2007;166(10):1159-73.

Guo JY, Teng X, e col. Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. *Genes Dev.* 2016;30(15):1704-17.

Hall TM, Tétreault MP, e col. Autophagy as a cytoprotective mechanism in esophageal squamous cell carcinoma. *Curr Opin Pharmacol.* 2018; 41:12-19.

Hanahan D & Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.

He H, Dang Y, e col. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem.* 2003;278(31):29278-87.

He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009; 43: 67–93

He Y, Zhao X, e col. The prognostic value of autophagy-related markers beclin-1 and microtubule-associated protein light chain 3B in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35(8):7317-26.

Hecht SS, Yuan JM, Hatsukami D. Applying tobacco carcinogen and toxicant biomarkers in product regulation and cancer prevention. *Chem Res Toxicol.* 2010;23(6):1001-8.

Hemelaar J, Lelyveld VS, e col. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem.* 2003;278(51):51841-50.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.1991; 51:1-513.

Inoue D, Suzuki T, e col. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2012;103(4):760-6.

Inui T, Chano T, e col. Association of p62/SQSTM1 excess and oral carcinogenesis. *PLoS One.* 2013;8(9): e74398.

Islami F, Pourshams A, e col. Tea drinking habits and oesophageal cancer in a high-risk area in northern Iran: population based case-control study. *BMJ.* 2009; 338: b929.

Iwadata R, Inoue J, et al. High Expression of SQSTM1/p62 Protein Is Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Acta Histochem Cytochem*. 2014;47(6):295-301.

Jakszyn P, Gonzalez CA. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol*. 2006;12(27):4296-303.

Kamangar F, Schantz MM, et al. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17(5):1262-8.

Kang R, Zeh HJ, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2011 Apr;18(4):571-80.

Karanasios E, Walker SA, et al. Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles. *Nat Commun*. 2016; 7:12420.

Kenific CM, Debnath J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. *Trends Cell Biol*. 2015;25(1):37-45

Keszei AP, Schouten LJ, et al. Red and processed meat consumption and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes in The Netherlands Cohort Study. *Ann Oncol*. 2012;23(9):2319-26.

Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev*. 2011;25(19):1999-2010.

Klionsky DJ. Look people, "Atg" is an abbreviation for "autophagy-related." That's it. *Autophagy*. 2012; 8(9): 1281–1282.

Klionsky DJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.

Kondo Y, Kanzawa T, et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):726-34.

Kowalik MA, Perra A, et al. Induction of autophagy promotes the growth of early preneoplastic rat liver nodules. *Oncotarget*. 2016;7(5):5788-99.

Kuo WL, Sharifi MN, et al. p62/SQSTM1 accumulation in squamous cell carcinoma of head and neck predicts sensitivity to phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibitors. *PLoS One*. 2014;9(3): e90171.

Kwong KF. Molecular biology of esophageal cancer in the genomics era. *Surg Clin North Am*. 2005 Jun;85(3):539-53.

Lao Y, Xu N. Autophagy in Cancer Chemoprevention: Identification of Novel Autophagy Modulators with Anticancer Potential. *Methods Mol Biol*. 2016; 1379:151-63.

Lee YJ, Hah YJ, et al. The autophagy-related marker LC3 can predict prognosis in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(11): e81540.

Lee YK, Lee JA. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep*. 2016;49(8):424-30.

Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017a;17(9):528-542.

Levy JMM, Zahedi S, et al. Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF inhibition in brain tumours. *eLife*. 2017b; 6: e19671.

Liang C and Jung JU. Autophagy Genes as Tumor Suppressors *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22(2): 226–233.

Liu JL, Chen FF, e col. Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and MAP1LC3B in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2014;111(5):944-54.

Loomis D, Guyton KZ, e col. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of drinking coffee, mate, and very hot beverages. *Lancet Oncol.* 2016;17(7):877-878.

Lopes AB, Müller LB, e col. Detecting p53 immunoexpression in esophageal mucosa with exfoliative cytology in individuals at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Acta Cytol.* 2010; 54(1):31-8.

Lopes AB, Fagundes RB. Esophageal squamous cell carcinoma - precursor lesions and early diagnosis. *World J Gastrointest Endosc.* 2012; 4(1):9-16.

Maiuri MC, Malik SA, e col. Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2. *Cell Cycle.* 2009;8(10):1571-6.

Malhotra GK, Yanala U, e col. Global trends in esophageal cancer. *J Surg Oncol.* 2017;115(5):564-579.

Mao WM, Zheng WH and Long ZQ. Epidemiologic risk factors for esophageal cancer development. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011; 12, 2461–2466

Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011; 147: 728–741

Muñoz N, Victora CG, e col. Hot maté drinking and precancerous lesions of the oesophagus: an endoscopic survey in southern Brazil. *Int J Cancer.* 1987; 39(6):708-9.

Muhammad JS, Nanjo S, e col. Autophagy impairment by Helicobacter pylori-induced methylation silencing of MAP1LC3Av1 promotes gastric carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2017;140(10):2272-2283.

Mutee AF, Kaur G, e col. Immunohistochemical Evaluation of mTOR and Beclin-1 Protein Expression in Human Breast Cancer and Adjacent Normal Tissues, A Study in Malaysian Patients. *The Open Pathology Journal,* 2009, 3, 111-117

Napier KJ, Scheerer M, Misra S. Esophageal cancer: A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. *World J Gastrointest Oncol.* 2014;6(5):112-20.

Pankiv S, Clausen TH, e col. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007;282(33):24131-45.

Pennathur A, Gibson MK, e col. Oesophageal carcinoma. *Lancet.* 381, 400–412 (2013).

Pilot H. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer.* 1993. (72-S3); 962-970.

Prolla JC, Dietz J, da Costa LA. Geographical differences in esophageal neoplasm mortality in Rio Grande do Sul. *Rev Assoc Med Bras.* 1993; 39(4):217-20. Portuguese.

Pütz A, Hartmann AA, e col. TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high-risk area (Southern Brazil): role of life style factors. *Int J Cancer.* 2002; 98(1): 99-105

Qian HL, Peng XX, e col. p62 Expression in primary carcinomas of the digestive system. *World J Gastroenterol.* 2005;11(12):1788-92.

Qiao YL, Dawsey SM, e col. Total and cancer mortality after supplementation with vitamins and minerals: follow-up of the Linxian General Population Nutrition Intervention Trial. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(7):507-18.

Qiu SL, Yang GR. Precursor lesions of esophageal cancer in high-risk populations in Henan Province, China. *Cancer*. 1988; 62(3):551-7.

Risk JM, Mills HS, et al. The tylosis esophageal cancer (TOC) locus: more than just a familial cancer gene. *Dis Esophagus*. 1999;12(3):173-6.

Roesly HB, Khan MR, et al. The decreased expression of Beclin-1 correlates with progression to esophageal adenocarcinoma: the role of deoxycholic acid. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(8): G864-72.

Rolón PA, Castellsagué X, et al. Hot and cold mate drinking and esophageal cancer in Paraguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995; 4(6):595-605.

Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis*. 2011;32(7):955-63.

Roth MJ, Strickland KL, et al. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons present within food from Linxian, China may contribute to that region's high incidence of oesophageal cancer. *Eur J Cancer*. 1998; 34(5):757-8.

Sahani MH, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy*. 2014;10(3):431-41.

Sakuray T, Okumura H, et al. The expression of LC-3 is related to tumor suppression through angiogenesis in esophageal cancer. *Med Oncol*. 2013;30(4):701.

Schläfli AM, Adams O, et al. Prognostic value of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(26):39544-39555.

Sepehr A, Tanière P, et al. Distinct pattern of TP53 mutations in squamous cell carcinoma of the esophagus in Iran. *Oncogene*. 2001 Nov 1; 20(50):7368-74. Erratum in: *Oncogene* 2002 Feb 28; 21(10):1632.

Sewram V, De Stefani E, et al. Maté consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003; 12(6):508-13.

Shin HR, Kim H, et al. Epigenetic and transcriptional regulation of autophagy. *Autophagy*. 2016;12(11):2248-2249.

Shpilka T, Weidberg H, et al. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol*. 2011;12(7):226.

Spowart JE, Townsend KN, et al. The autophagy protein LC3A correlates with hypoxia and is a prognostic marker of patient survival in clear cell ovarian cancer. *J Pathol*. 2012;228(4):437-47.

[M, Dorsey F and Cleveland JL. Targeting the Autophagy Pathway for Cancer Chemoprevention. *Curr Opin Cell Biol*. 2010; 22(2): 218–225.

Strong VE, D'Amico TA, et al. Impact of the 7th Edition AJCC staging classification on the NCCN clinical practice guidelines in oncology for gastric and esophageal cancers. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013;11(1):60-6.

Tang DY, Ellis RA, Lovat PE. Prognostic Impact of Autophagy Biomarkers for Cutaneous Melanoma. *Front Oncol*. 2016; 6:236.

Taylor PR, Qiao YL, et al. Prospective study of serum vitamin E levels and esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(18):1414-6.

Tobey NA, Sikka D, et al. Effect of heat stress on rabbit esophageal epithelium. *Am J Physiol*. 1999; 276(6 Pt 1): G1322-30.

Torre LA, Bray F, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.

Umar SB, Fleischer DE. Esophageal cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008;5(9):517-26.

US Department of Health, Education and Welfare (DHEW). Smoking and health: A report of the Surgeon General Washington, DC: US Government Press Office.; 1979

US Department of Health and Human Services (USDHHS) Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress: A report of the Surgeon General Press Office.; 1989

Valente G, Morani F, et al. Expression and clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer. *Biomed Res Int*. 2014; 462658.

Vessoni AT, Filippi-Chiela EC, et al. Autophagy and genomic integrity. *Cell Death Differ*. 2013;20(11):1444-54.

Victoria CG, Muñoz N, et al. Patterns of maté drinking in a Brazilian city. *Cancer Res*. 1990; 50(22):7112-5.

Villa E, Proïcs E, et al. Parkin-Independent Mitophagy Controls Chemotherapeutic Response in Cancer Cells. *Cell Rep*. 2017;20(12):2846-2859.

Wang GQ, Abnet CC, et al. Histological precursors of oesophageal squamous cell carcinoma: results from a 13-year prospective follow up study in a high-risk population. *Gut*. 2005; 54(2):187-92.

Wang VS, Hornick JL, et al. Low prevalence of submucosal invasive carcinoma at esophagectomy for high-grade dysplasia or intrabuccal adenocarcinoma in Barrett's esophagus: a 20-year experience. *Gastrointest Endosc*. 2009;69(4):777-83.

Wang J, Pan XL, et al. Aberrant expression of Beclin-1 and MAP1LC3 correlates with poor prognosis of human hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013(7): e69038.

Watson WL. Cancer of the esophagus: some etiological considerations. *Am J Roentgen*. 1939; 41(3): 420-4.

Winardi D, Sai HP, et al. Correlation of altered expression of the autophagy marker MAP1LC3B with poor prognosis in astrocytoma. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:723176.

Wong MCS, Hamilton W, Whiteman DC, Jiang JY, Qiao Y, Fung FDH, Wang HHX, Chiu PWY, Ng EKW, Wu JCY, Yu J, Chan FKL, Sung JY. Global Incidence and mortality of oesophageal cancer and their correlation with socioeconomic indicators temporal patterns and trends in 41 countries. *Sci Rep*. 2018 Mar 14;8(1):4522.

Wu CF, Wu DC, et al. Relationship between genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and esophageal squamous cell carcinoma risk in males. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(33):5103-8.

Yan C, Luo L, et al. Doxorubicin-induced mitophagy contributes to drug resistance in cancer stem cells from HCT8 human colorectal cancer cells. *Cancer Lett*. 2017; 388:34-42.

Yang SJ, Wang HY, et al. Genetic polymorphisms of ADH2 and ALDH2 association with esophageal cancer risk in southwest China. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(43):5760-4.

Yang ZJ, Chee CE, et al. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(9):1533-41.

Yokoyama A, Omori T. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and risk for esophageal and head and neck cancers. *Alcohol*. 2005; 35(3):175-85.

Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 2005;12 Suppl 2:1542-52.

Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy.* 2018;14(2):207-215.

Zhang J, Wang K, et al. Using proteomic approach to identify tumor-associated proteins as biomarkers in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Proteome Res.* 2011; 10(6):2863-72.

Zhi X, Zhong Q. Autophagy in cancer. *F1000Prime Rep.* 2015; 7:18.

Zhong Y, Carmella SG, et al. Immediate consequences of cigarette smoking: rapid formation of polycyclic aromatic hydrocarbon diol epoxides. *Chem Res Toxicol.* 2011;24(2):246-52.

Zhu HC, Yang X, Xu LP. Meat consumption is associated with esophageal cancer risk in a meat- and cancer-histological-type dependent manner. *Dig Dis Sci.* 2014;59(3):664-73.

3. JUSTIFICATIVA e HIPÓTESE

3.1. Justificativa

Alterações na autofagia parecem estar envolvidas no desenvolvimento de diferentes tipos tumorais. Os tecidos humanos respondem a diferentes tipos de estresses através da modulação de diversos mecanismos entre os quais destaca-se a autofagia. Órgãos e tecidos expostos a sinais estressores ambientais frequentes podem ser mais dependentes da autofagia para manter seu estado homeostático. Entre estes está o esôfago, cujo epitélio de revestimento estratificado pavimentoso pode se transformar a ESCC. Este tipo de câncer possui alta prevalência no Rio Grande do Sul, provavelmente devido a hábitos alimentares, consumo de mate quente e tabagismo elevados. Estes fatores podem causar estresse crônico ao epitélio, favorecendo a transformação celular. Avaliar a expressão de indicadores de autofagia de maneira integrada pode contribuir para o entendimento do papel deste mecanismo na carcinogênese do ESCC. Esta estratégia também oferece a possibilidade de embasar o uso clínico de proteínas e genes de autofagia como marcadores prognósticos e terapêuticos nesta neoplasia.

Além disso, mecanismos de modulação epigenética têm sido propostos como participando da modulação da autofagia ao longo da carcinogênese. No processo fisiológico a autofagia contribui para a manutenção do estado homeostático e a ruptura deste equilíbrio está associada a transformação celular. Em células transformadas (mas ainda não tumorais) a reaquisição da capacidade autofágica passa a favorecer o desenvolvimento tumoral. Este processo de redução e reaquisição da capacidade autofágica parece envolver um controle epigenético. Alterações epigenéticas, por sua vez, alteram a estrutura da cromatina e, conseqüentemente, a forma e tamanho nucleares. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um sistema chamado de Análise Morfométrica Nuclear (NMA), originalmente utilizado para células em cultura e, posteriormente, validado, em cortes histológicos (NMA em tecido – tNMA). Associando-se a avaliação de indicadores de autofagia com a morfometria nuclear, esperamos contribuir para o entendimento básico do papel da autofagia na carcinogênese do ESCC.

3.2. Hipótese

A hipótese da presente dissertação é que a expressão dos indicadores de autofagia SQSTM1, BECN1 e MAP1LC3 sofre modificações no ESCC quando comparada ao grupo controle. Estas alterações podem ter relação com a agressividade e sobrevida dos pacientes. Também acreditamos que modificações no mecanismo de autofagia ocorrem concomitantemente a mudanças estruturais da cromatina, que acarretam transformações morfométricas nucleares. Finalmente é possível inferir que a avaliação combinada de indicadores, em um índice autofágico, oferece uma informação biológica mais ampla acerca do papel da autofagia na carcinogênese e de seu potencial uso como biomarcador diagnóstico e prognóstico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar os níveis de indicadores de autofagia e a morfometria nuclear em amostras de carcinoma epidermoide de esôfago em comparação com o tecido esofágico não neoplásico.

4.2. Objetivos específicos

i. Comparar os níveis de 3 indicadores de autofagia, SQSTM1, BECN1 e MAP1LC3, em amostras de biópsias de ESCC e tecido esofágico não tumoral.

ii. Avaliar diferenças nos níveis de SQSTM1, BECN1 e MAP1LC3 relacionadas à idade, gênero e tabagismo.

iii. Realizar a Análise Morfométrica Nuclear em tecido (tNMA) e associar alterações morfológicas nucleares à autofagia.

iv. Avaliar a associação entre níveis de expressão de SQSTM1, BECN1 e MAP1LC3 e estadiamento do ESCC no banco de dados do *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*.

iv. Avaliar a influência da expressão de genes de autofagia, isolados ou combinados dois a dois, na sobrevida de pacientes com ESCC no banco de dados do *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*.

5. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

A ser submetido para o periódico Molecular Carcinogenesis

Autophagy is increased and associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma

Ricardo Iserhard¹; Emily Sales Pilar^{1,2}; Francine Hein^{1,2}; Sída Maria Callegari-Jacques³; Paula Ferst²; Eduardo Cremonese Filippi-Chiela^{1,*}

1 – Graduate Program Science in Gastroenterology and Hepathology, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil;
2 – Clinicas Hospital of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil; 3 – Genetics Department, UFRGS;

* corresponding author: echiela@hcpa.edu.br

Graduate Program Sciences in Gastroenterology and Hepathology, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Zip code: 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil; Phone: +55 51 3359 8852

Abstract

Less than 20 % of patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) survive 5 years after diagnosis. Advances in basic tumor biology and new prognosis biomarkers may contribute to the clinical management and the development of therapies to these tumors. Autophagy is a physiological mechanism involved in the degradation of aged or malfunctional organelles and proteins. Disturbs in autophagy have been associated with the carcinogenesis. Here, we compare the levels of three autophagy markers, SQSTM1, MAP1LC3B and BECN1 in ESCC and non-neoplastic mucosa. We also evaluate the influence of autophagy gene expression in the survival and staging of ESCC in TCGA database. Finally, we correlate nuclear morphometry with autophagy. The three markers were significantly increased in ESCC samples in comparison to control. We calculate an Autophagic Index (AutoIndex) and purpose its use as better picture of the autophagic status. AutoIndex displayed an even higher difference, between ESCC and control, than single autophagy markers. ESCC samples showed a reduction in nuclear area, which correlated negatively with the increase of autophagy. Using the TCGA database we discovered that high levels of MAP1LC3 A/B, SQSTM1, Atg4A and Atg12 expression were associated with a poor prognosis and advanced staging, suggesting that autophagy contributes to ESCC aggressiveness. In conclusion, we found that an increase of autophagy may be involved in the progression of normal esophageal epithelia to ESCC. The combination of autophagy markers, instead of its single values, has a great potential to be used as a prognostic tool in the strategy to diagnose and treat the ESCC.

Keywords

Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC), autophagy markers, prognosis, nuclear morphometry

1. INTRODUCTION

Esophageal cancer (EC) is the eighth more frequent type of cancer, with around 460.000 new cases annually. From this, less than 20 % survive 5 years free of disease. EC has two more common presentations, the squamous-cell carcinoma (ESCC) and the adenocarcinoma. Eighty percent of the ECs occur in world less developed regions, where the ESCC represents 90% of the cases.¹ ESCC is related to tobacco, alcohol, hot beverages, poor oral hygiene and low vitamins consumption.² The oncogenesis of the ESCC evolves from normal mucosa to dysplasia, carcinoma *in situ*, invasion and dissemination. Its identification normally occurs in later phases with limited therapeutic options. In the last decades, few advances have been achieved in diagnosis, treatment and prognosis of the ESCC.³

The cellular and molecular carcinogenesis involves alterations in cell growth, death and metabolism.⁴ A process that has gained much attention in last decade as playing a key role in both carcinogenesis and response to therapy is autophagy.⁵ Autophagy is a self-catabolic system involved in the degradation of old, dysfunctional or excessive cellular components such as organelles and protein complexes. It is a pro-survival, adaptive mechanism increased in response to DNA damage, hypoxia, pathogens and nutritional starvation.⁶ Molecularly, autophagy is mediated by the Atg family of proteins, which mediates the formation of a double-membrane structure called autophagosome.^{7,8} This step is called early autophagy. At this stage key markers are Beclin-1(Atg6), which forms a protein complex to initiate the formation of autophagosome, and MAP1LC3(Atg8), that mediates the closure of autophagosome.^{9,10} Autophagosome englobes cellular components marked to degradation by adaptor proteins such as Sequestosome 1 (SQSTM1 or p62).¹¹ Then, the autophagosome fuses with lysosomes to form the autolysosome where cell components are degraded. This step is called late autophagy, where levels of SQSTM1 or p62 are commonly used as a marker.¹² The products of degradation are then released through lysosomal permeases back to the cytoplasmic environment. Through this, basal autophagy contributes to the maintenance of the quality of cellular components and, therefore, to cell homeostasis.¹³ The induction of autophagy, in turn, contributes to the adaptation of cells to stressful conditions.¹⁴

In cancer, the role of autophagy depends on the step of carcinogenesis and the tumour type. As a rule, autophagy contributes to the homeostasis maintenance of healthy cells, avoiding their transformation.¹⁵ The mechanisms underlying this role involve the maintenance of DNA integrity, control of organelles quality and maintenance of cell metabolism.^{5,16} Thus, loss of autophagy is strongly associated with cell transformation and carcinogenesis. This has been shown in animal models deficient to various ATG genes, the key players in autophagy

induction.¹⁷ In different cancer types the promotion and progression involves the reactivation of autophagy, allowing the tumor cells to adapt to the metabolic stress associated with tumor growth.⁵ The reactivation of autophagy probably involves epigenetics, but the mechanisms beyond this connection are not clear.^{18,19} Autophagy is also associated to chemotherapy resistance through catabolism of cellular components damaged by the therapeutic compounds.²⁰ The inhibition of autophagy increases the toxicity of anticancer drugs, from cells to animal models²¹ and, as recently shown, in a clinical trial.²²

The role of autophagy in the carcinogenesis of ESCC needs to be study. Here, we evaluate the levels of three autophagy markers (SQSTM1, Atg8/MAP1LC3 and Atg6/BECLIN-1) in non-neoplastic esophageal mucosa in comparison to ESCC samples. We generated an “Autophagic Index”, and associated the autophagic status of each case with nuclear morphometry. We also avliated the influence of autophagy genes expression in the prognosis of ESCC through the analysis of TCGA data.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study design

This is an observational, transversal and retrospective study.

2.2. Samples recruitment

Our study has two groups: control (i.e. non-neoplastic related mucosa) and ESCC. Samples were recruited from the archive of endoscopic biopsies of the Pathology Service of Clinicas Hospital of Porto Alegre (HCPA), Brazil, from 2013 to 2015. The inclusion criterion for the ESCC group was the diagnosis of ESCC, which was confirmed by two blinded pathologists. The control group consisted of endoscopic biopsies of non-neoplastic origin: nonspecific findings, esophagitis without squamous epithelial dysplasia or intestinal metaplasia related to gastroesophageal reflux disease. Patients with neoplastic lesions and pre-neoplastic lesions such as Barrett's esophagus, squamous epithelium dysplasia, intestinal metaplasia and HPV infection were excluded.

We segregate individuals by gender, age and tobacco consumption to assess the interference of these variables on autophagy levels.

2.3. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was done for SQSTM1, MAP1LC3B and BECN1. To this, four 4µm sections from control and ESCC samples were dewaxed and rehydrated. The antigens retrieval was done by water bath treatment of the cuts in 50 mM TrisEDTA (pH 9.0) for 20 minutes. Endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide for 15 minutes at room temperature. Non-specific binding was blocked adding a 5% solution of nonfat dry milk for 15 minutes. The slides were incubated at 4°C for 12 h with the anti-BECN1 (ab55878), anti-SQSTM1 (ab56416) and anti-MAP1LC3B (ab128025) antibodies, all from Abcam (Cambridge, MA, US). The sections were then incubated with a secondary antibody at 37°C for 1 hour. The chromatographic reaction was performed on 3,3'-diaminobenzadine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) for 5 min. After the immunohistochemical reaction cuts were stained with hematoxylin.

Then, we acquired at least five photographs from each sample, and the intensity of DAB staining was quantified in the ImageJ free software through the color deconvolution method. We also generated an 'Autophagic Index' (AutoIndex) through the sum of the intensity of the three autophagy markers to each sample.

2.4. Nuclear Morphometric Analysis in Tissue (tNMA)

The Nuclear Morphometric Analysis (NMA) is a tool developed by our group to assess biological information from nuclear morphometry.²³ Initially developed to eukaryotic cells in vitro, we padronized NMA to HE images from tissue sections (tissue NMA or tNMA). To this, at least 5 images from HE slides were acquired to each control or ESCC sample in an Olympus BX51 microscope. Using the magic wand tool from Image Pro Plus 6.0 software, we acquired 5 variables related to nuclear size and shape from at least 50 nuclei from everyone. The variable of nuclear size is *Area*, and the variables from nuclear shape are *AreaBox*, *Roundness*, *RadiusRatio* e *Aspect*, which are used to determine an index that measure nuclear shape, the Nuclear Irregularity Index (NII). Data were analysed in an Excel datasheet available at www.ufrgs.br/labsinal. The plot of Area and NII separate different nuclear populations based on their morphometry.

From these primary variables (i.e. Area and NII) we calculated secondary variables, as described in the results section.

2.5. TCGA Data

To determine the prognosis value of ATG genes in the survival of ESCC patients, we used data from The Cancer Genoma Atlas (TCGA) database. We search for the influence of the levels of the following autophagy genes in the survival of ESCC: ATG1 (ULK1), ATG2, ATG3, ATG4A/B/C, ATG5, BECLIN-1 (ATG6), ATG7, MAP1LC3 (ATG8; isoforms A, B and C), ATG9A/B, ATG12 and SQSTM1. For this, we used the TCGA Browser, developed by Phil Cheng, from the University of Zurich.²⁴ TCGABrowser is a simple and objective tool in which the user selects the cancer type and a list of the genes of interest. We choose the first and fourth quartile to set the groups of patients expressing, respectively, 'low' and 'high' levels of each marker. From this, the browser calculated the Kaplan-Meier survival curve to these groups (low and high). In addition to survival data, the browser also provides the distribution of gender, age and cancer stage in the two groups.

2.6. Ethical Considerations

The project was approved in the Ethical Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA, project number 16-0233). The risk of confidentiality break was controlled by the signature of Responsibility Term for use of biological material, where researchers compromise not to use references that identify the patient in the study.

2.7. Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted in SPSS 18.0. For comparison between the levels of autophagy markers, AutoIndex and nuclear measurements between control and ESCC groups we performed a non-parametric Mann-Whitney test. We also performed a non-parametric Spearman correlation to match autophagy with nuclear morphometry. P values under 0.05 were considered as significant.

3. RESULTS

3.1. Patient characteristics

Our study included 32 non-neoplastic esophageal samples (hereafter called as 'control' group) and 53 ESCC samples, both obtained from biopsies (**Table 1**). The average age for control and ESCC groups was, respectively, 45 ± 27 and 64 ± 10 . Considering the gender, we found a prevalence of male in ESCC group (67%), which agrees with the incidence rate

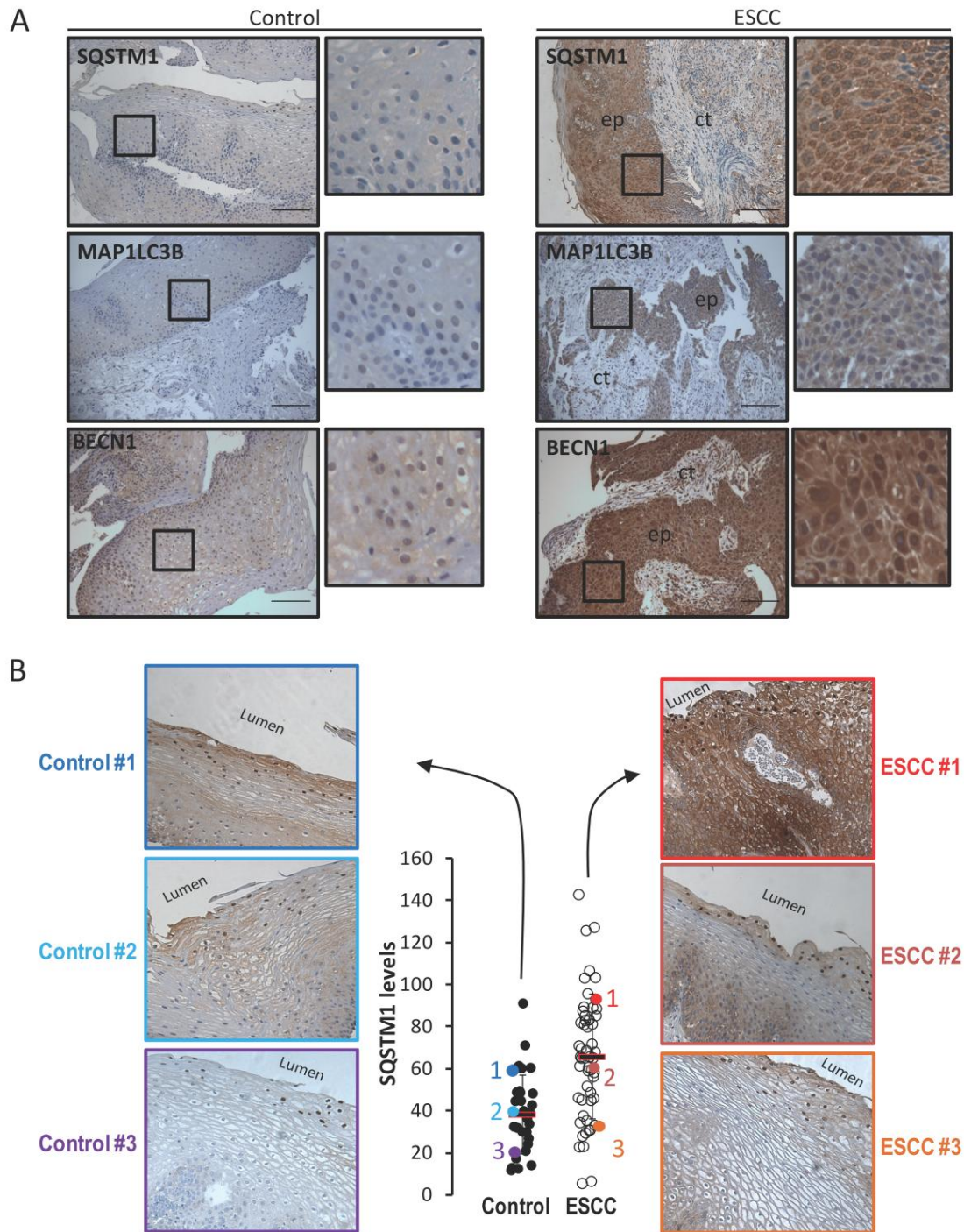
worldwide, while in control group the distribution was similar (53% male / 47% female). The percentages of smokers were 22% and 83% in control and ESCC, respectively.

Table 1 – Epidemiological data of the study

	Controls	ESCC
N of patients	32	53
Gender (M/F)	53% / 47%	67% / 23%
Age (average \pm sd)	44.6 \pm 26.8	64 \pm 10.1
Smokers (%)	22%	83%

3.2. Autophagy is increased in ESCC in relation to non-neoplastic esophageal tissue

We firstly measured the levels of 3 main autophagy markers SQSTM1, MAP1LC3B (the mammalian homologue of the yeast autophagy-related gene 6, ATG6) and BECN1 (the mammalian homologue of the yeast autophagy-related gene 8, ATG8), in Control and ESCC samples through immunohistochemistry. Representative images are shown in **Fig. 1A**. We observed an increase in the intensity of the three autophagy markers in ESCC epithelia in relation to control mucosa. As expected, staining for MAP1LC3B and SQSTM1 showed a punctiform pattern, which represents the autophagosomes (**Fig. 1A** – see inserts in ESCC samples). Considering the subcellular localization, BECN1 and MAP1LC3B were localized almost exclusively in the cytoplasm (**Fig. 1A**). On the other hand, SQSTM1 varies along the epithelium, being localized in the cytoplasm in the basal layer, while it was abundant in the nucleus of superficial epithelial cells (**Fig. 1B**). This pattern of subcellular distribution was independent on the total levels of the protein (**Fig. 1B** – see representative images).



Then we quantified the intensity of autophagy markers in each sample using the ImageJ software through color deconvolution method.²⁵ We found that all markers were increased in ESCC in comparison to controls (**Fig. 2A**). Considering that autophagy involves several steps, we determined the autophagic status of each sample through the generation of an autophagic index, hereafter called as AutoIndex, corresponding to the sum of the intensity of autophagy markers. Compared to single autophagy markers, the difference of AutoIndex was even higher between ESCC and controls (**Fig. 2B**).

We next determined the most prevalent profiles of expression of autophagy markers in our samples. To achieve this, we initially classified each ESCC sample as 'low' or 'high' to SQSTM1, MAP1LC3B and BECN1 in relation to the averaged expression of these markers in control, indicated by the red marker in control group (**Fig. 2A – see the red marker in control group**). As expected, the percentage of controls classified as low (**Fig. 2A - purple area**) or high (**Fig. 2A - blue area**) was around 50% to the three markers. On the other hand, the percentage of ESCC with high levels of SQSTM1, MAP1LC3B and BECN1 was 91%, 81% and 77% respectively (**Fig. 2A – blue area**). Considering the AutoIndex, 100% of ESCC samples were classified as high in relation to control (**Fig. 2B – blue area**).

We observed that several ESCC samples showed levels of expression that, in relation to control, surpass the value of average plus one standard deviation. Then, we determined the percentage of 'very low' and 'very high' samples, which corresponds to samples with expression levels that were lower or higher than the average of control ± 1 standard deviation. We found that the percentage of 'very low' cases was around 2 to 4% in ESCC group to the three autophagy markers (**Fig. 2C – orange area**). The percentages of samples with very high levels, on the other hand, were 81% (BECN1), 57% (MAP1LC3) and 38% (SQSTM1) (**Fig. 2C – light pink area**). The percentages of very high cases were much lower in control group. Finally, 96% of ESCC samples showed a 'very high' AutoIndex (**Fig. 2D**). Altogether, our data show that autophagy is increased in ESCC samples in relation to control esophageal samples.

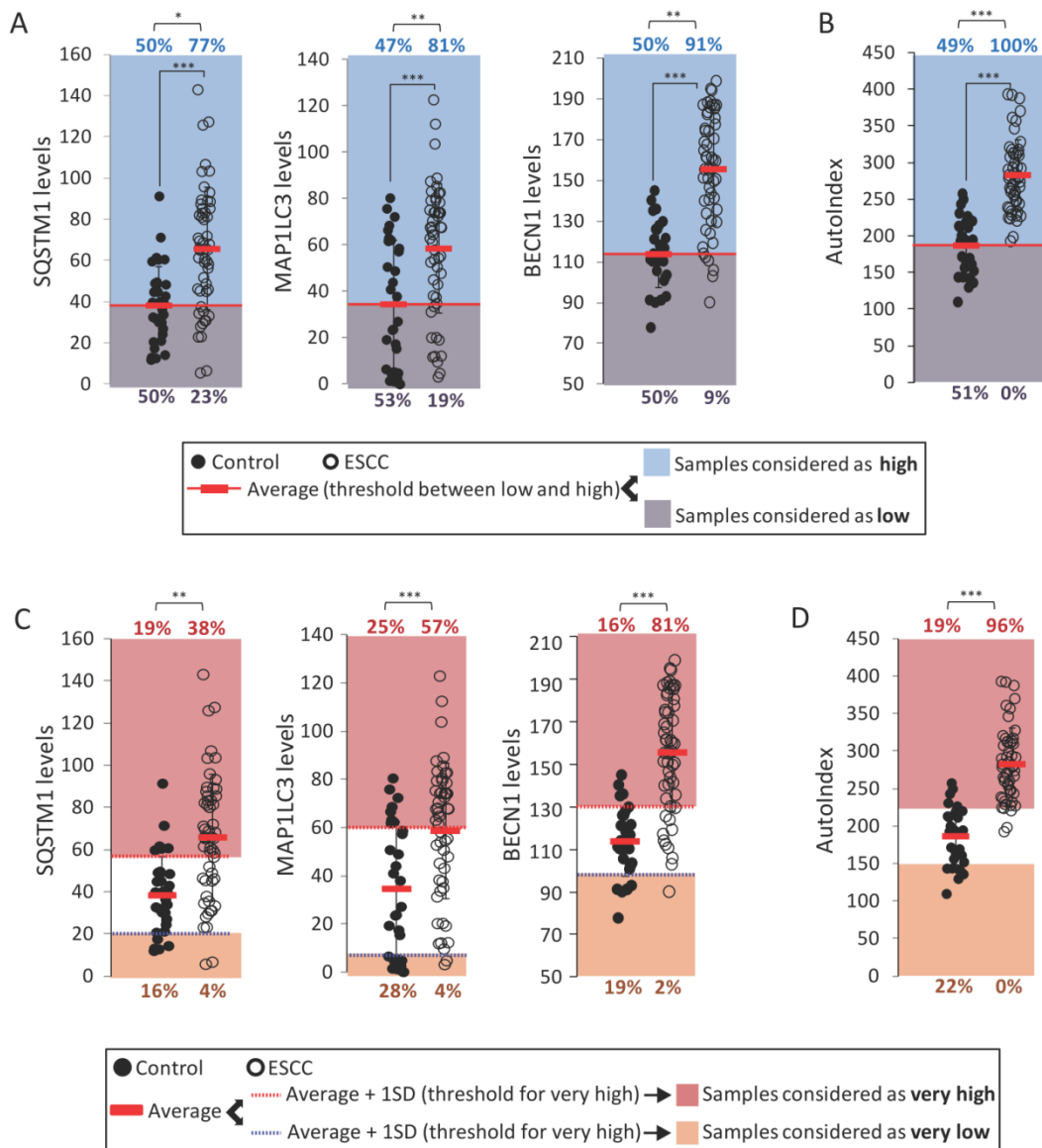


Figure 2 – SQSTM1, MAP1LC3 and BECN1 are increased in ESCC in comparison to non-neoplastic esophageal mucosa. (A) We classified individuals as high or low to each autophagy marker based on the average of control group (red line). Blue area represents the ‘high’ area, while purple area delimits controls and ESCC classified as low. The percentage of individuals classified as low (bottom, in purple) or high (top, in blue) is shown. In **(B)** is shown the Autophagic Index, for which we also classified everyone as low (purple area) or high (blue area). **(C)** We also determined the percentage of individuals classified as very low or very high. Patients with levels of autophagy markers below the average of control – 1SD were classified as very low (orange area, delimited by blue dashed line) while patients with levels of autophagy markers higher than the average of control + 1SD (red area, delimited by red dashed line). **(D)** Percentage of very low and very high individuals for Autophagic Index (AutoIndex).

3.3. Profiles of expression of SQSTM1, MAP1LC3 and BECN1 in single samples

We next determined the profile of expression of the three autophagy markers in each sample based on the classification of `low` and `high` (**Fig. 3A**). We found that the percentage of samples classified as `high` for all the three autophagy markers was 19% for controls and 53% for ESCC. Corroborating this data, 22% of controls were classified as `low` to the three autophagy markers, while no ESCC showed this profile (**Fig. 3B**). Furthermore, 41% of controls had at least 2 autophagy markers considered as low, while this percentage was 6% in ESCC. On the other hand, 94% of ESCC showed at least 2 autophagy markers as high, while in non-neoplastic tissue this percentage was 59%. Despite the differences in the percentage, both control and ESCC showed the same profiles as the most prevalent: `BECN1 high + SQSTM1 high` and `BECN1 high + MAP1LC3 high` (**Fig. 3C**). These two groups represent more than 70% of double-high patients in each group.

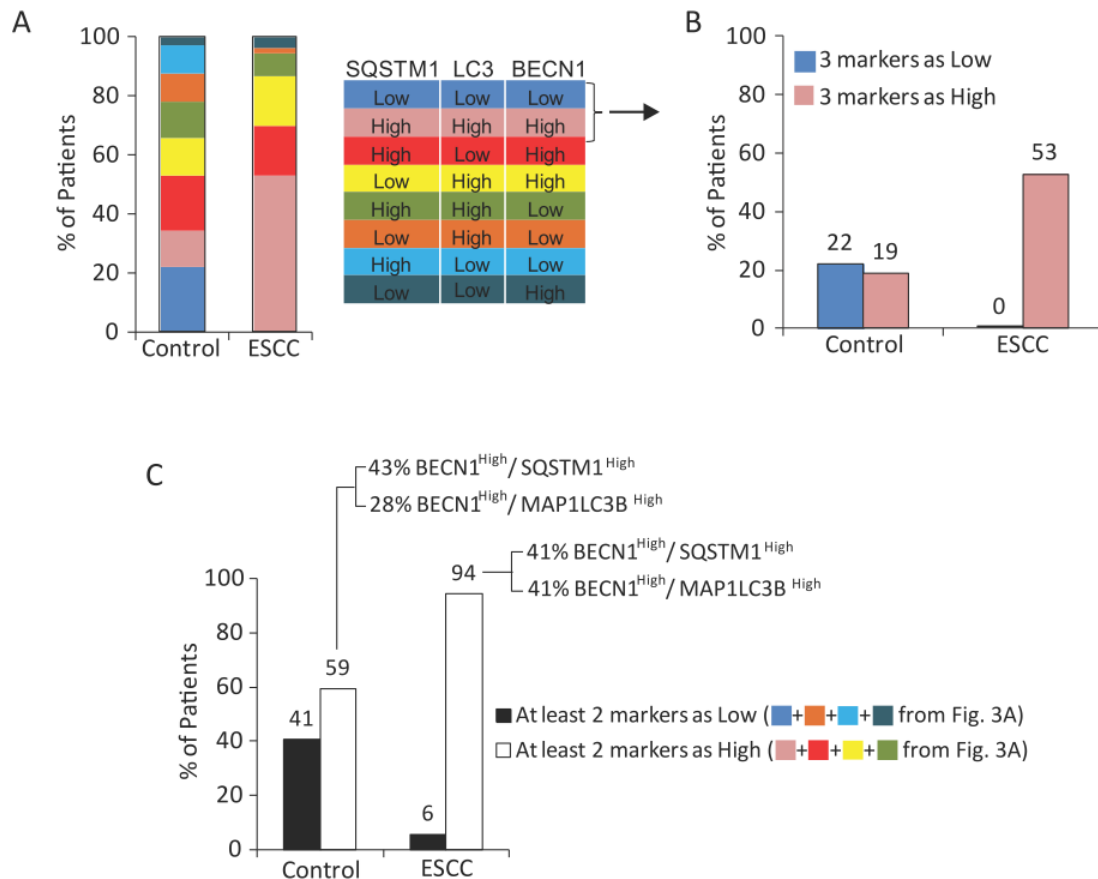


Figure 3 – Profiles of expression of SQSTM1, MAP1LC3B and BECN1 in control and ESCC in single samples. We check for the profiles of expression of autophagy markers in control and ESCC cases. **(A)** Percentage of patients included in each molecular profile considering the levels (low or high) of the autophagy markers. **(B)** Percentage of patients showing 3 autophagy markers as Low or High. **(C)** Percentage of patients showing at least 2 markers as low or as high. On the top is shown the most prevalent molecular profiles among patients with at least two markers classified as high.

3.4. Autophagy level is not affected by age, gender or smoking

The effect of clinical characteristics on autophagy is usually neglected in the literature. To check for differences in the intensity of autophagy according to age, gender and smoking we stratified our sample and evaluate the intensity of expression of the three autophagy markers and the AutoIndex. We did not find differences between male and female (**Supp Fig. 1A**) neither between 'young' and 'old' individuals (based on the median of each group) (**Supp. Fig. 1B**). Finally, we also did not find differences in the level of autophagy between smokers and non-smokers (**Supp. Fig. 1C**).

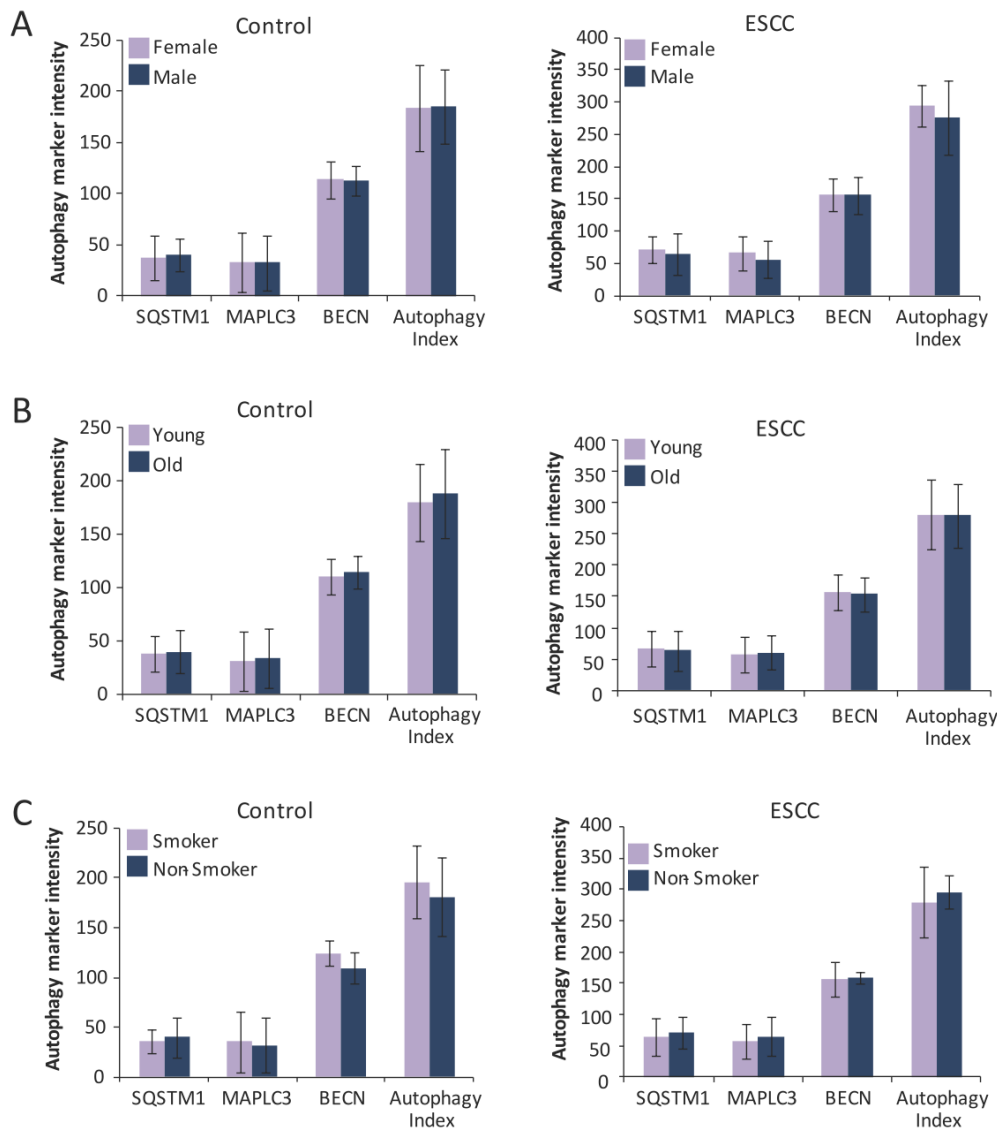


Figure S1 – Age, gender and smoking do not affect autophagy intensity. We segregate patients according to (A) gender, (B) age and (C) smoking and measured the intensity of each autophagy marker as well as the Autophagic Index in the groups. In (B) we separated the groups in 'young' and 'old' based on the median age.

3.5. High levels of autophagy proteins are associated with poor prognosis in ESCC in TCGA database

Our data show that autophagy is increased in ESCC in comparison to control in our population of study. We wondered whether the levels of autophagy markers, both alone or combined two by two, influence the survival of patients through the analysis of TCGA data. We found that high levels of SQSTM1 and MAP1LC3 (considering its most prevalent isoforms in esophagus, MAP1LC3A and MAP1LC3B) were associated with poor prognosis (**Fig. 4A and 4B**). Considering the prognostic potential of the combination of SQSTM1, MAP1LC3 and BECN1 two by two we found that patients with high levels of two markers showed a worse prognosis in comparison to patients with low levels of these proteins. It is important to note that we found a larger difference between double-low and double-high groups in the Kaplan-Meier curves than in the Kaplan-Meier curves for single genes (**Fig. 4C, 4D and 4E – compare black and blue lines**).

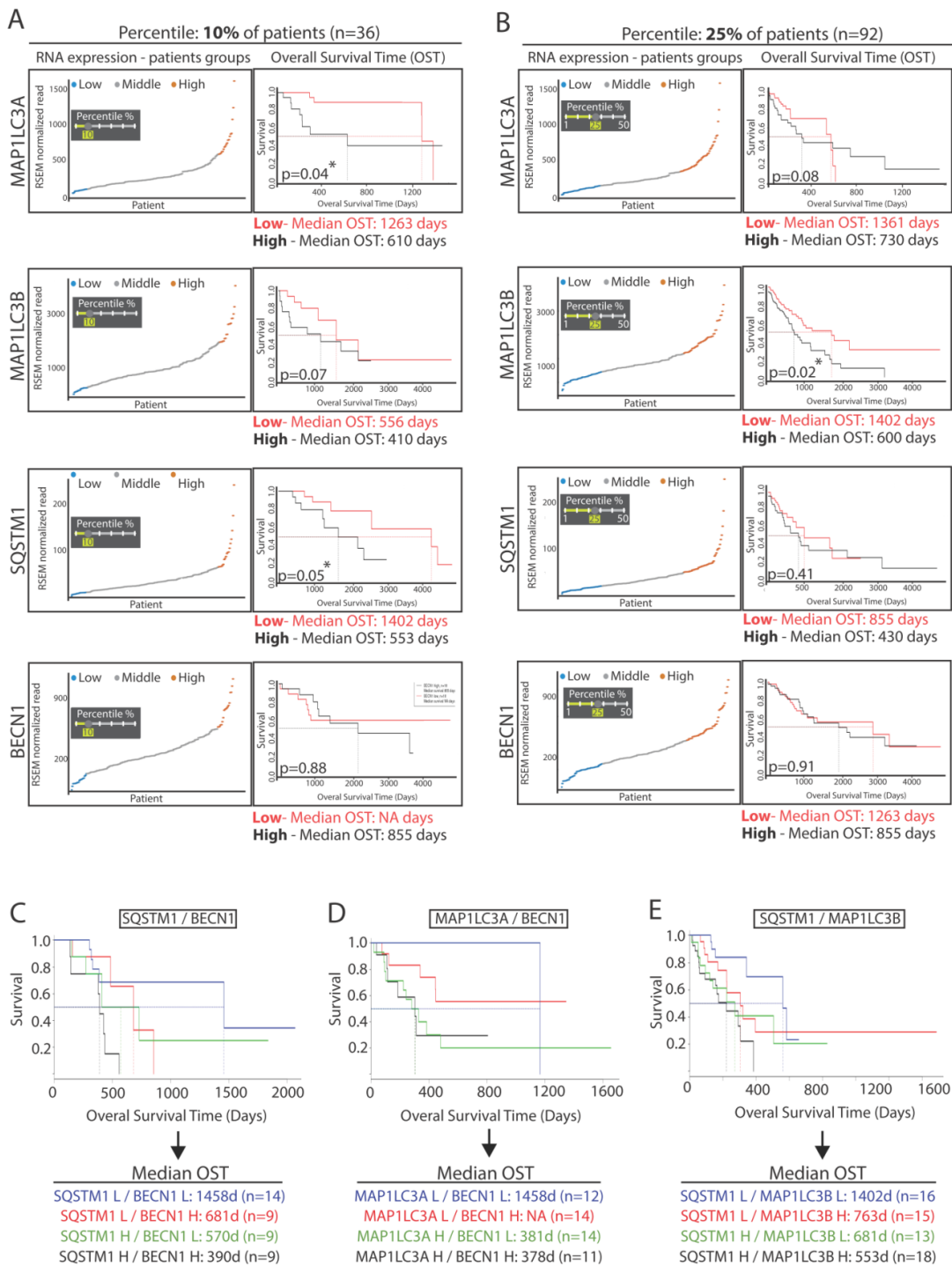


Figure 4 – High levels of SQSTM1 and MAP1LC3 are associated with poor prognosis in ESCC. On the left column of (A) and (B) are shown the distributions of patients according to the levels of expression of each marker, as indicated (y axis). On the right column of both (A) and (B) are shown the Kaplan-Meier survival plots for patients that express high or low levels of autophagy markers. Below the Kaplan-Meier plots is shown the median Overall Survival Time (OST), i.e. the number of days necessary to reduce the population of patients in 50%. In (A) we considered the 10% extreme patients as ‘low’ and 10% as ‘high’, while in (B) we considered the extreme quartiles to separate ‘low’ and ‘high’ levels. (C), (D) and (E) show the influence of autophagy markers, combined two by two, in the survival of patients.

We also associated the ESCC staging with the expression of autophagy genes in TCGA database. Through this, we found an increase in grade III and IV tumors in those groups showing high expression of autophagy markers (**Fig. S2**).

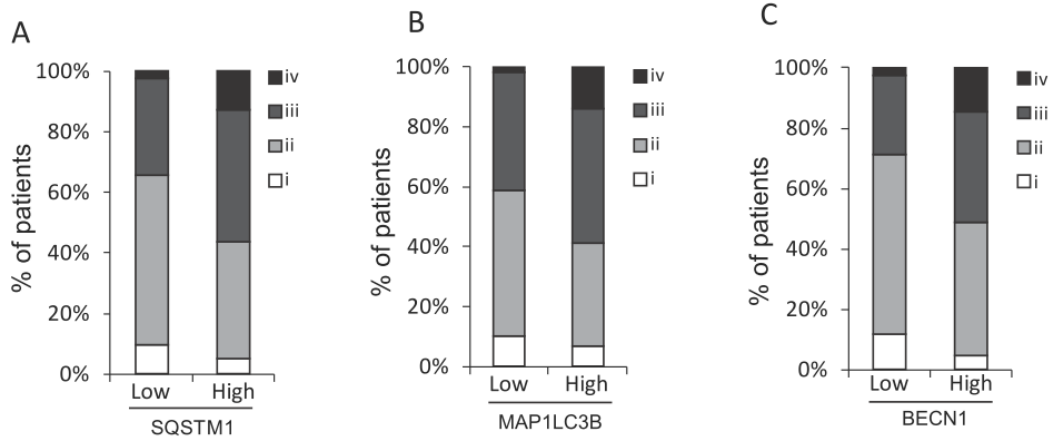


Figure S2– High levels of SQSTM1, MAP1LC3B and BECN1 are associated with high tumor grade. The distribution of grades i-iv according to the levels of autophagy markers. **(A)** SQSTM1; **(B)** MAP1LC3B; **(C)** BECN1.

We then check for the influence of expression levels of other key autophagy genes in the survival of ESCC in TCGA data. We found that high levels of ATG4A and high levels of ATG12 were associated with poor prognosis (**Fig. 5A and 5B**). Then, we evaluate the influence of ATG4A and AT12 levels in association with SQSTM1, MAP1LC3A/B or BECN1 in the median OST of patients. Like data from Fig. 4C-E, we found that patients with high levels of two autophagy markers had a lower OST than patients showing high expression of a single autophagy gene or low expression of two autophagy genes (**Fig. 5C-G – compare blue and black curves**).

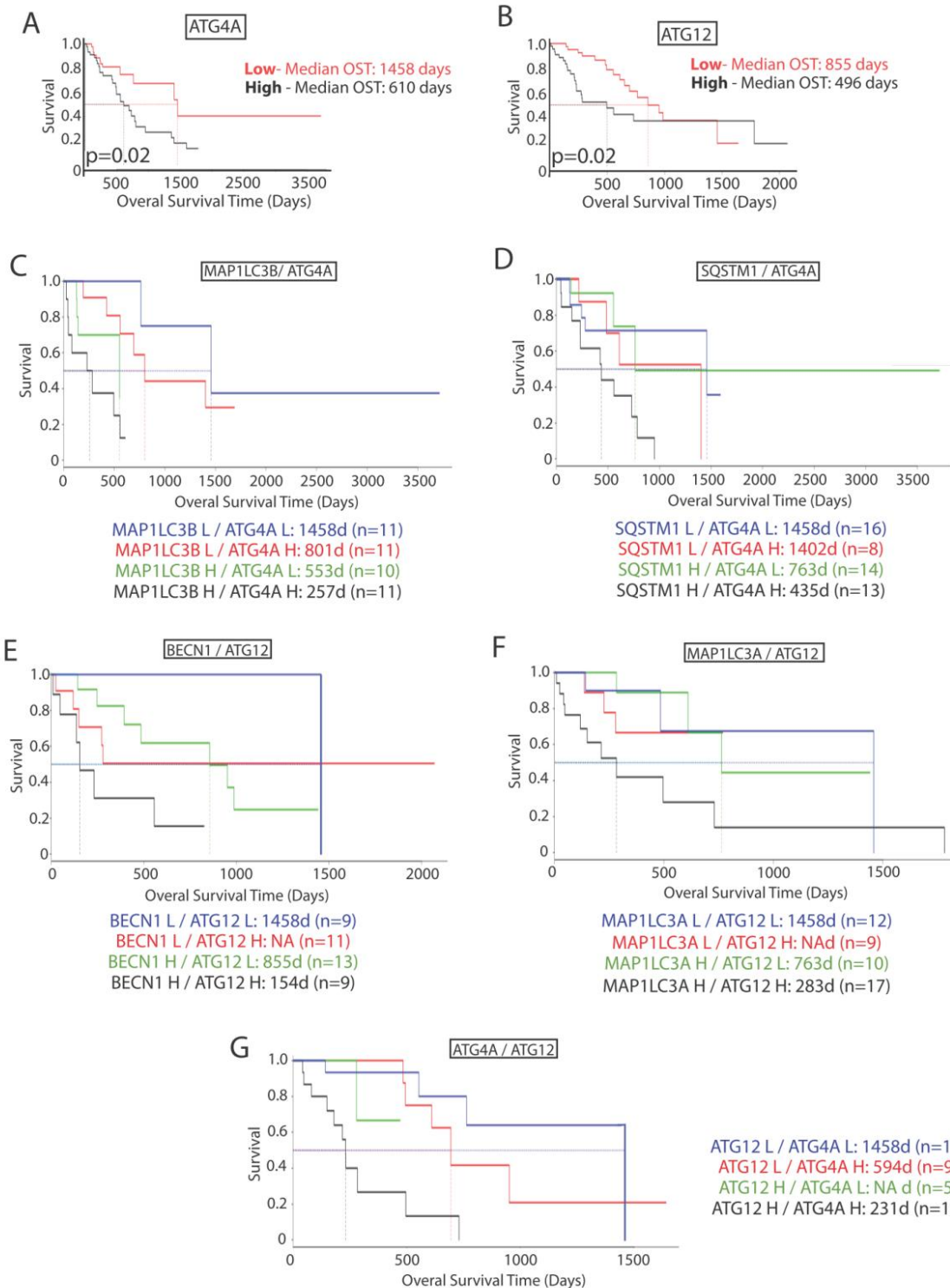


Figure 5 – High levels of ATG4A and ATG12, alone or in combination with SQSTM1, MAP1LC3 and BECN1 are associated with poor prognosis in ESCC. Kaplan-Meier curves are shown. We considered the extreme quartiles (Q1 and Q4) to classify individuals as expressing low or high levels of markers, reaching 50% of patients in the analysis. Influence of levels of **(A)** ATG4A and **(B)** ATG12 in the survival of ESCC. From **C** to **G** are shown the effect of autophagy genes combined two by two. **(C)** MAP1LC3B and ATG4A; **(D)** SQSTM1 and ATG4A; **(E)** BECN1 and ATG12; **(F)** MAP1LC3A and ATG2; **(G)** ATG4A and ATG12.

Altogether, our data showed that high levels of autophagy were associated with poor prognosis and high staging in ESCC. Furthermore, these data suggested that the combination of autophagy markers is more accurate and have a great potential to be used as a prognosis marker in ESCC. In this sense, the AutoIndex proposed here may be a better way to define the autophagic status than single markers.

3.6. Nuclei from ESCC are smaller than nuclei from non-neoplastic esophageal tissue

The size and shape of nuclei provides some useful information about the outcome of cancers, including prognosis and diagnosis.²⁶ Furthermore, recent data suggest that epigenetics may play a central role in the control of autophagy through the modulation of chromatin remodeling.¹⁹ Epigenetics and chromatin organization, in turn, may affect nuclear morphometry,^{27,28} which can switch back epigenetics in tumor cells, in a relevant crosstalk.²⁹ Indeed, several proteins involved in the epigenetic control of gene expression were found as being differentially expressed in concomitance to ATG genes in TCGA (data not shown). Then, we evaluated nuclear morphometry in association with autophagy intensity to each sample. We observed that nuclei from ESCCs were smaller and more regular (i.e. rounded) than control nuclei (**Fig. 6A**). Using HE images we applied the Nuclear Morphometric Analysis (NMA), which objectively determine the size and the shape of each nucleus. We found a reduction of 40% in the average nuclear area in ESCC in relation to controls (**Fig. 6B and C – top**). This reduction was concomitant with an increase in the percentage of ‘Small and Regular’ (SR) nuclei (**Fig. 6B – SR population, Fig. 6C – middle**) and a decrease in those nuclei considered as normal (**Fig. 6B – N population; Fig. 6C - bottom**).

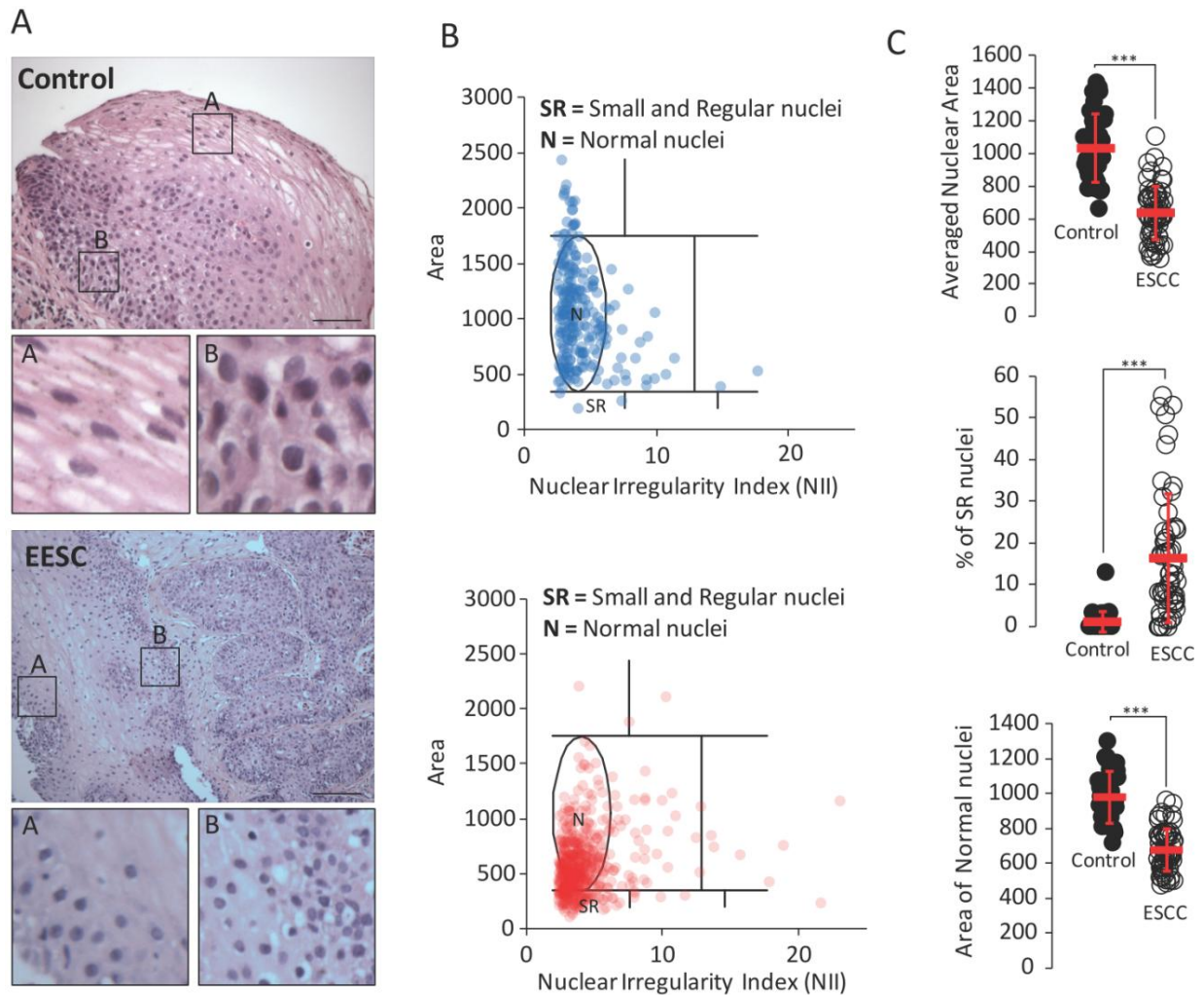


Figure 6 - Nuclei from ESCC are smaller than nuclei from non-neoplastic esophageal tissue. From HE images we evaluated nuclear morphometry. In **(A)** is shown a representative image from controls (top) and ESCC (bottom). Inserts are shown in detail. In **(B)** are shown the results of Nuclear Morphometric Analysis in tissue (tNMA) for control (top) and ESCC (bottom). Area x Nuclear Irregularity Index (NII) plot. SR – quadrant of Small Regular nuclei; N – quadrant of normal nuclei. In **(C)** are shown the graphs of three variables related to nuclear area, i.e. the average of nuclear area (top), the percentage of SR nuclei (middle) and the average area of those nuclei considered as normal (N).

3.7. Autophagy and nuclear morphometry are strongly correlated in the esophageal tissue

Autophagy and nuclear morphometry are both affected by cell stress and transformation. Furthermore, chromatin remodeling affects both nuclear morphometry and the expression of autophagy genes, as mentioned above. We evaluated the correlation between autophagy variables (levels of each autophagy marker and AutoIndex) and NMA variables (i.e. Averaged Nuclear Area, %SR, %N, Average Area of N nuclei, Median Area). We did not find significant

correlations between single autophagy markers and any nuclear variable, as exemplified in **Fig. S3**.

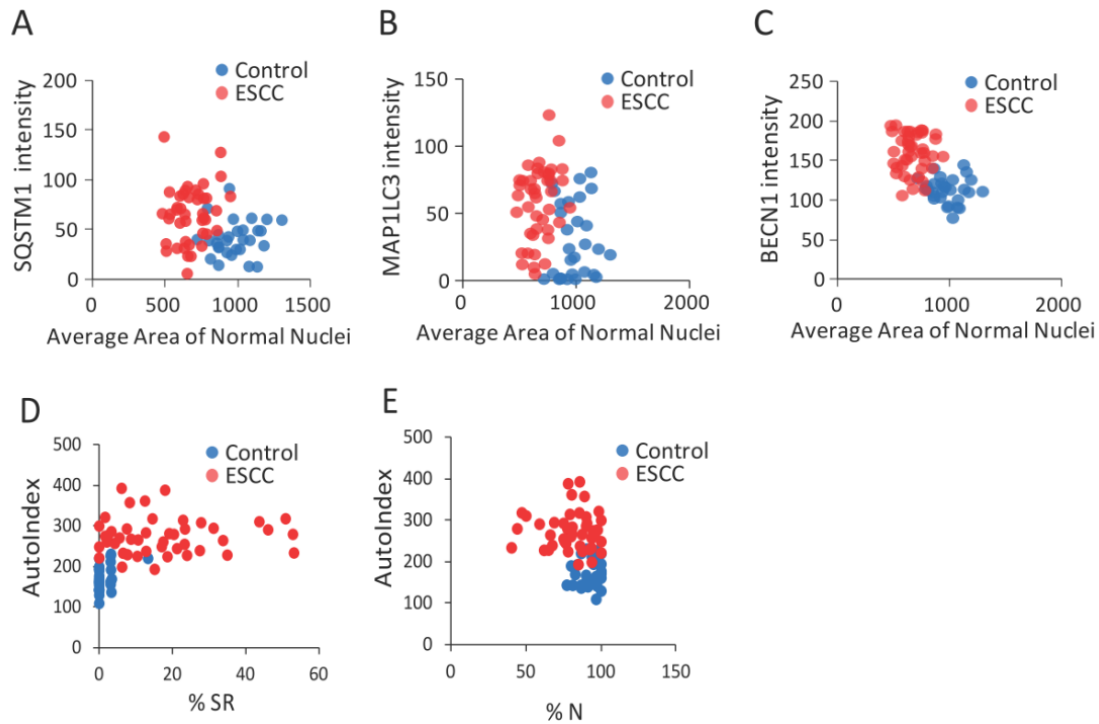


Figure S3 – Absence of correlation between autophagy markers and variables of nuclear morphometry in ESCC and control. (A) to (E) show several combinations of variables of autophagy levels and nuclear morphometry. Note that no combination of variables correlated.

However, we found a significant correlation between AutoIndex and three nuclear variables: Average Nuclear Area (**Fig. 7A**), Median Nuclear Area (**Fig. 7B**) and Average Area of normal Nuclei (**Fig. 7C**), being the last one the most significant. We concluded that the smaller the nucleus, the higher the AutoIndex. It is important to note that some controls showed nuclear characteristics that resemble ESCC and two ESCC cases that resemble control characteristics, which can be clearly seen in **Fig. 7C**.

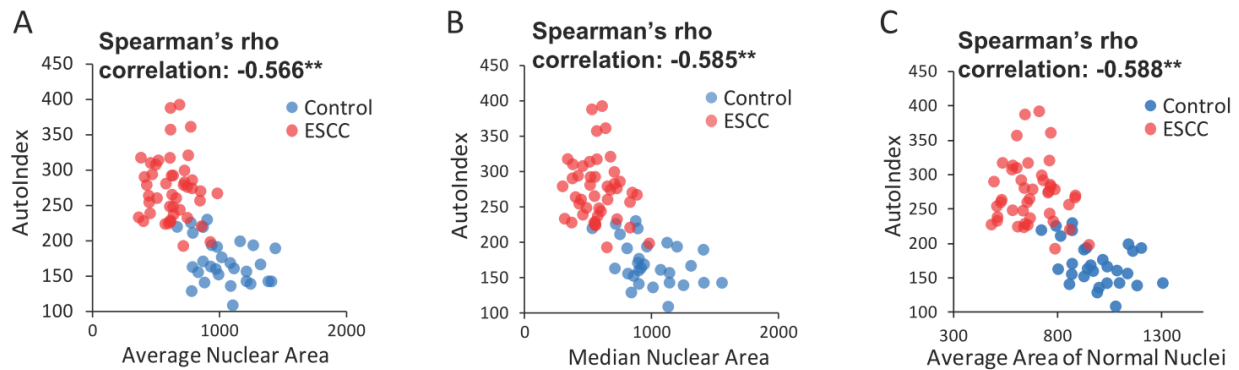


Figure 7 – Autophagy negatively correlates with nuclear area in ESCC carcinogenesis. (A), (B) and (C) show the combinations of AutoIndex (y axis) with variables of nuclear area (x axis). The spearman coefficients are also shown on the top of graphs; ** $p > 0.01$.

4. DISCUSSION

Autophagy is a physiologic molecular mechanism involved in cellular homeostasis. The imbalance of this process may favour the transformation of healthy into altered cells. According to animal models,⁵ after an initial disruption, modified cells may reacquire the autophagic capacity and progress with carcinogenesis. The autophagy reduction in healthy cells may promote its transformation, while its reactivation may allow the neoplastic development. In our study, we found elevated levels of three autophagy proteins responsible for distinct phases of the autophagic process (BECN1, MAP1LC3 e SQSTM1) in ESCC primary samples. We did not find differences on the levels of these markers when related to gender, age or tobacco consumption history. These data matches with those observed in lung cancer.³⁰ We proposed an association of these markers as an AutoIndex, which showed even greater differences comparing the two groups. The AutoIndex had a negative correlation with the nuclear area, suggesting structural modifications in the chromatin along with the increase of autophagy. We also found that high expressions of MAP1LC3A/B, SQSTM1, ATG4A and ATG12 genes were associated with a shorter OST on the TCGA database. The survival analysis using autophagy genes combined two by two had a strong potential to discern the prognosis of patients with tumours expressing low or high levels of autophagy. We also observed at the TCGA an association of advanced tumor staging and higher levels of autophagy markers.

Many other investigators have noticed differences in autophagic proteins between neoplastic samples and non-neoplastic related tissue, especially for BECN1, MAP1LC3 and SQSTM1. BECN-1 is responsible for the initiation of autophagosome formation. We found higher levels of BECN-1 in the ESCC compared to the non-neoplastic samples. Similar results were observed in the squamous cell carcinoma of the head and neck, which has the same

embryologic origin of the esophagus.^{31,32} Tumours with different embryologic nature, like the hepatocarcinoma and cervical cancer, have lower levels of BECN-1 compared to non-neoplastic tissue.^{33,34} Considering these findings it is possible to suggest that the embryological origin could explain those differences. In agreement with this hypothesis, in the Barrett esophagus with dysplasia and in the esophagus adenocarcinoma a reduced level of BECN-1 was observed, compared with non-neoplastic tissue.³⁵ The same reduction was observed in gastric adenocarcinomas.³⁶ It is a fact that coating epithelium is more exposed to external stressing agents. In this situation, it is possible that these tissues may have developed with greater autophagic capacity and stress tolerance.

Considering the influence of BECN-1 expression in the prognosis, high levels of BECN-1 were associated with poor prognosis in oral squamous carcinomas³⁷ and hypopharyngeal squamous cell carcinoma.³⁸ In opposite, in hepatocarcinoma and cervical cancer lower levels of BECN-1 were associated with advanced staging, lymph nodes metastasis and poor differentiation.^{33,34} Similar findings were observe in ovarian carcinoma, where a decrease in BECN1 levels in comparison normal tissue is observed³⁹ and the greater the tumor grade, the lower the levels of BECN1.^{40,41} With these findings in mind it is possible to propose that the greater the difference in BECN-1 level in the tumor compared to the non-neoplastic tissue, the poorer the prognosis, regardless of whether the alteration is for more or less (**Fig. 8**). This hypothesis is also valid to MAP1LC3, as discussed below.

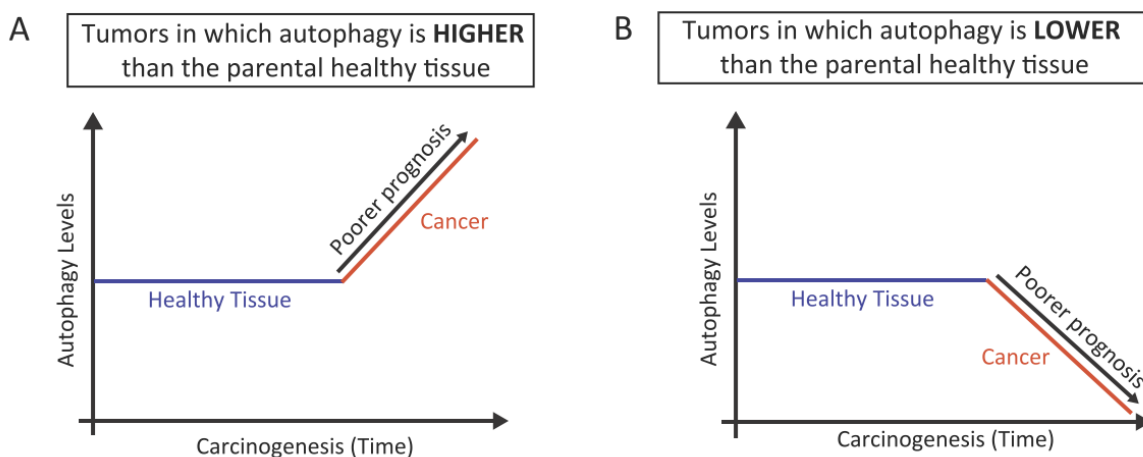


Figure 8 – Final hypothesis considering the effect of autophagy levels in the prognosis of cancer patients. According to our hypothesis, the greater the difference in autophagy compared to the non-neoplastic tissue, the poorer the prognosis, regardless of whether the autophagy alteration is for more (A) or less (B).

The MAP1LC3 protein participates in the formation and closure of the autophagosome. In our study, we observed higher levels of MAP1LC3B in ESCC samples than in non-neoplastic tissue, in agreement to oral squamous cell carcinoma.³⁷ Another study with ESCC found moderate to high levels of MAP1LC3 in 71% of the tumour samples.⁴² In a different way, MAP1LC3B and BECN1 levels were lower in squamous cell carcinoma of hypopharyngeal compared to non-neoplastic tissue. In this cancer type, lower levels of MAP1LC3B were associated with neoplastic invasion, lymph node metastasis and poor prognosis.³⁸ Using the TCGA database we observed an association of high expression of MAP1LC3 (in both isoforms A and B) and a worse prognosis in ESCC. Similarly, in astrocytoma, high levels of MAP1LC3B were linked to a poor outcome.⁴³ On the opposite, in hepatocellular carcinoma a reduction of MAP1LC3 levels was observed, when compared to non-neoplastic tissue, and the lower the levels of this protein the shorter the survival time.⁴⁴ In general, this data from MAP1LC3 reinforces our hypothesis raised for BECN1 (Fig. 8).

The SQSTM1 marks the defective cellular components holding the cell trash into the autophagosome. Therefore, the SQSTM1 is also catabolized by autolysosome and its level tends to be reduced in the acute phase of the autophagic process. In chronic situations, like carcinogenesis, expression of SQSTM1 is re-increased as an adaptive system to guarantee the fullness autophagic capacity of cells.⁴⁵ We found elevated SQSTM1 levels in ESCC samples, compared to non-neoplastic esophageal tissue. Our data is consonant with those of the squamous cell carcinomas of head and neck compared to normal samples.^{31, 32, 37} It is interesting to note, that in the dysplastic tissue of the oral epithelium, no elevation of the SQSTM1 was observed compared to the normal mucosa.^{31, 32} In this situation, the increase of SQSTM1 only occurred when the dysplastic mucosa evolves to a neoplastic condition. This model reinforces the hypothesis that the rising of the autophagic activity favours the precursor lesions to evolve to malignant tumours.

Considering the prognostic value of SQSTM1, high levels of the protein were associated to lower life expectancy in squamous cell oral carcinomas.³¹ Confirming these results, our TCGA analysis showed that high SQSTM1 expression lead to a worse prognosis compared to low expression. The association of high SQSTM1 with poor prognosis was also demonstrated in the non-small cell lung cancer,³⁰ gastric and colorectal adenocarcinomas.⁴⁶ High SQSTM1 levels have also being related to a poor response to radio and chemotherapy in head and neck squamous cell carcinomas^{31,32} and in ovarian carcinomas.⁴⁰ Finally, it is important to consider the subcellular localization of the SQSTM1 and its prognostic role in different tumours. In ovarian carcinoma, high levels of cytoplasmic SQSTM1 and low levels of nuclear SQSTM1 are independent risk factors.⁴⁷ In the squamous cell oral carcinomas, elevated cytoplasmic and

reduced nuclear SQSTM1 levels are related to a short life expectancy and more aggressive histopathologic cancer behaviour. Here, we did not find differences in the levels of nuclear SQSTM1 between ESCC and control.

In parallel to the quantification of autophagic markers we created an autophagic index (AutoIndex), by summing the levels of the three-individual protein. The AutoIndex showed even larger differences between both groups. We believe that the combination of the three markers is more confident to analyse the autophagic status of a given sample. Autophagy is a dynamic process dependent on a sequence of events, from initiation (BECN-1 levels), formation and closure of the autophagosome (MAP1LC3 levels) and degradation of the vesicle content (SQSTM1 levels). The examination of any of these markers individually may not have the same biological information of the AutoIndex. Beyond this, the arbitrary quantification of “low or high” and “positive or negative” from the immunohistochemical analysis may not represent the intensity of the dynamic autophagic flow.

The gain of biological information related to the autophagy status when combining two autophagy genes in relation to one was also confirmed in the analysis of survival using the TCGA database. We found that high expression of two autophagy markers were always associated with a worse prognosis. Notably, the Kaplan-Meier curves obtained from combined analysis showed a larger gap between groups in comparison to single genes analysis. These data are clinically relevant since 94% of our ESCC samples presented high levels of at least two autophagy markers. Therapeutically, this is important since the inhibition of autophagy induced by chemo and radiotherapy sensitizes cancer cells and increases the efficacy of anti-cancer treatments.⁴⁸

Finally, we correlated autophagy and nuclear morphometry. Epigenetics is involved in autophagy “turn on, turn off” along the carcinogenesis, through the activity of methyltransferases such as EZH2 and CARM1.^{19,49} One of the morphologic arrangements influenced by the epigenetics is the nuclear morphometry.^{50,51} Nuclear size and shape, in turn, can influence the epigenetic control of gene expression, in a crosstalk that may be involved in several aspects of the carcinogenesis.²⁹ We observed a strong negative correlation between AutoIndex and reduction of the nuclear size. These findings suggest an increase in the autophagic flux associated to tumour progress. Studies revealed that the smaller the nucleus the worst is the prognosis in breast cancer,^{52,53} colorectal adenocarcinoma^{54,55} and lung adenocarcinoma.⁵⁶ The nuclear morphometry can also predict tumour recurrence.⁵⁵ The analysis of AutoIndex and nuclear morphometry, associated with the EZH2 and CARM1 could be used as a diagnostic and prognostic tool in groups of risk and in pre-malignant lesions.

In conclusion, we observed increased levels of BECN-1, SQSTM1 and MAP1LC3B and reduced nuclear size in ESCC compared with the non-neoplastic samples. Autophagy may be involved in the progression of transformed cells from normal esophagus to ESCC. AutoIndex, nuclear morphometry and survival curves using multiple autophagy genes have potential to be used as prognostic biomarkers in the ESCC. The pro-survival context conferred by autophagy to tumour cells could support the design of schedules combining autophagy inhibitors with chemotherapy in the management of ESCC.

List of Abbreviations:

AutoIndex – Autophagic Index; **ATG or Atg** – Autophagy-Related Genes or Proteins; **BECN1** – Beclin-1; **ESCC** – *Esophageal Squamous Cell Carcinoma*; **EC** – *Esophageal Carcinoma*; **MAP1LC3A/B/C (LC3A/B/C)** Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 (isoforms A, B and C); **NMA** – Nuclear Morphometric Analysis; **NMA_t** – Nuclear Morphometric Analysis in Tissue; **NII** – Nuclear Irregularity Index; **N nuclei** – Normal Nuclei; **OST** – Overall Survival Time; **SQSTM1** – Sequestosome 1; **SR nuclei** – Small and Regular Nuclei; **TCGA** – The Cancer Genoma Atlas

Competing interests. The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements. This work was supported by the Research and Event Incentive Fund (FIPE) of the Clinicas Hospital of Porto Alegre (HCPA), project number: 16-0233.

References

1. Pennathur A, Gibson MK, et al. Oesophageal carcinoma. *Lancet*. 2013; 381, 400–412.
2. Mao WM, Zheng WH and Long ZQ. Epidemiologic risk factors for esophageal cancer development. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12, 2461–2466.
3. Napier KJ, Scheerer M and Misra S. Esophageal cancer: A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. *World J Gastrointest Oncol* 2014; 6(5): 112–120
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
5. Galluzzi L, Pietrocola F, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J* 2015; Apr 1;34(7):856-80.
6. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011; 147: 728–741
7. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 2005;12 Suppl 2:1542-52.
8. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 67–93
9. He H, Dang Y, et al. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem* 2003.;278(31):29278-87.
10. Hemelaar J, Lelyveld VS, et al. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem* 2003;278(51):51841-50.
11. Pankiv S, Clausen TH, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007;282(33):24131-45.
12. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016;12(1):1-222.
13. Murrow L, Debnath J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol* 2013; 8:105-37.
14. Ravanan P, Srikumar IF and Talwar P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci* 2017; 188:53-67.
15. Liang C and Jung JU. Autophagy Genes as Tumor Suppressors. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(2): 226–233.
16. Vessoni AT, Filippi-Chiela EC, et al. Autophagy and genomic integrity. *Cell Death Differ* 2013;20(11):1444-54.
- 17, Zhi X, Zhong Q. Autophagy in cancer. *F1000 Prime Rep* 2015; 7:18.
18. Sui X, Zhu J, et al. Epigenetic modifications as regulatory elements of autophagy in cancer. *Cancer Lett* 2015;360(2):106-13.
19. Baek SH, Kim KI. Epigenetic Control of Autophagy: Nuclear Events Gain More Attention. *Mol Cell* 2017;65(5):781-785.

20. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, et al. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(7): 487–511.
21. Thorburn A, Thamm D and Gustafson DL. Autophagy and Cancer Therapy. *Mol Pharmacol* 2014; 85(6): 830–838
22. Levy JM, Zahedi S, et al. Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF inhibition in brain tumors. *eLife* 2017; 6: e19671.
23. Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, et al. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One* 2012;7(8): e42522.
24. Cheng PF, Dummer R, Levesque MP. Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. *Swiss Med Wkly* 2015;145: w14183.
25. Lobet G, Pagès L, Draye X. A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiol* 2011;157(1):29-39.
26. Webster M, Witkin KL, Cohen-Fix O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 10):1477-86.
27. Espada J, Esteller M. Epigenetic control of nuclear architecture. *Cell Mol Life Sci* 2007;64(4):449-57.
28. Mukherjee RN, Chen P, Levy DL. Recent advances in understanding nuclear size and shape. *Nucleus* 2016;7(2):167-86.
29. Easwaran HP and Baylin SB. Role of Nuclear Architecture in Epigenetic Alterations in *Cancer Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2010; 75: 507–515.
30. Schläfli AM, Adams O, et al. Prognostic value of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2016;7(26):39544-39555.
31. Inui T, Chano T, et al Association of p62/SQSTM1 excess and oral carcinogenesis. *PLoS One* 2013;8(9): e74398.
32. Kuo WL, Sharifi MN, et al. p62/SQSTM1 accumulation in squamous cell carcinoma of head and neck predicts sensitivity to phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibitors. *PLoS One* 2014;9(3): e90171.
33. Shen MX, Ding JB. Expression levels and roles of EMC-6, Beclin1, and Rab5a in the cervical cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21(13):3038-3046.
34. Al-Shenawy HA. Expression of Beclin-1, an autophagy-related marker, in chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma and its relation with apoptotic markers. *APMIS* 2016; 124(3):229-37.
35. Roesly HB, Khan MR, et al. The decreased expression of Beclin-1 correlates with progression to esophageal adenocarcinoma: the role of deoxycholic acid. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302(8): G864-72.
36. Fei B, Ji F, et al. Expression and clinical significance of Beclin-1 in gastric cancer tissues of various clinical stages. *Oncol Lett* 2016;11(3):2271-2277.
37. Liu JL, Chen FF, et al. Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and MAP1LC3B in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2014;111(5):944-54.
38. Wang J, Pan XL, et al. Aberrant expression of Beclin-1 and MAP1LC3 correlates with poor prognosis of human hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2013;8(7): e69038.

39. Ju LL1, Zhao CY, et al. Expression and clinical implication of Beclin1, HMGB1, p62, surviving, BRCA1 and ERCC1 in epithelial ovarian tumor tissues. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(10):1993-2003.
40. Valente G, Morani F, et al. Expression and clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer. *Biomed Res Int.* 2014; 462658.
41. Minamoto T, Nakayama K, Nakamura K, et al. Loss of beclin 1 expression in ovarian cancer: A potential biomarker for predicting unfavourable outcomes. *Oncol Lett.* 2018;15(1):1170-1176.
42. Sakuray T, Okumura H, et al. The expression of LC-3 is related to tumor suppression through angiogenesis in esophageal cancer. *Med Oncol* 2013 Dec;30(4):701.
43. Winardi D, Tsai HP, et al. Correlation of altered expression of the autophagy marker MAP1LC3B with poor prognosis in astrocytoma. *Biomed Res Int* 2014; 723176.
44. Lee YJ, Hah YJ, et al. The autophagy-related marker LC3 can predict prognosis in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2013; 8(11): e81540.
45. Sahani MH, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy* 2014; 10(3):431-41.
46. Qian HL, Peng XX, et al. p62 Expression in primary carcinomas of the digestive system. *World J Gastroenterol* 2005; 28;11(12):1788-92.
47. Iwadate R, Inoue J, et al. High Expression of SQSTM1/p62 Protein Is Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Acta Histochem Cytochem* 2014; 47(6):295-301.
48. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2017; 17(9):528-542.
49. Shin HR, Kim H, et al. Epigenetic and transcriptional regulation of autophagy. *Autophagy* 2016; 12(11):2248-2249.
50. Veltri RW, Christudass CS. Nuclear morphometry, epigenetic changes, and clinical relevance in prostate cancer. *Adv Exp Med Biol* 2014; 773:77-99.
51. Bártoová E, Krejčí J, et al. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* 2008; 56(8):711-21.
52. Miyamoto H, Isobe H, et al. The flow cytometric nuclear-DNA content, tumor-origin, nuclear size and prognosis in squamous-cell lung-cancer. *Int J Oncol* 1992; 1(3):325-9.
53. Wolberg WH, Street WN, Mangasarian OL. Importance of nuclear morphology in breast cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5(11):3542-8.
54. Buhmeida A, Algars A, et al. Nuclear size as prognostic determinant in stage II and stage III colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2006b; 26(1B):455-62.
55. Buhmeida A, Algars A, et al. DNA image cytometry is a useful adjunct tool in the prediction of disease outcome in patients with stage II and stage III colorectal cancer. *Oncology* 2006a; 70(6):427-37.
56. Nakazato Y, Minami Y, et al. Nuclear grading of primary pulmonary adenocarcinomas: correlation between nuclear size and prognosis. *Cancer* 2010; 116(8):2011-9.

CONCLUSÕES e HIPÓTESES

- i. Observamos um aumento dos níveis de BECN1, SQSTM1 e MAP1LC3B no epitélio tumoral em relação ao epitélio esofágico não neoplásico.
- ii. Nenhum paciente do grupo ESCC demonstrou níveis baixos (*low*) para os 3 indicadores, enquanto 53% apresentaram níveis elevados (*high*) dos 3 indicadores.
- iii. Propomos um Índice Autofágico (AutoIndex) que acreditamos representar de maneira mais evidente o estado de autofagia de uma amostra. Em nosso estudo o AutoIndex apresentou maior poder de diferenciação entre os grupos controle e ESCC do que os indicadores isolados.
- iv. Níveis aumentados de expressão de genes de autofagia (MAP1LC3A/B, SQSTM1, ATG4A e ATG12) se associaram a um pior prognóstico através da análise do banco de dados TCGA.
- v. A análise do banco de dados TCGA mostrou que a combinação de 2 genes teve maior capacidade prognóstica do que a avaliação individual dos mesmos genes. Este aspecto é importante uma vez que em nas nossas amostras 94% dos pacientes do grupo ESCC apresentaram níveis elevados de pelo menos dois indicadores de autofagia, destacando-se os perfis BECN1^{High}+SQSTM1^{High} e BECN1^{High}+MAP1LC3B^{High}.
- vi. Observamos uma redução do tamanho nuclear nas amostras de ESCC em comparação às amostras controle.
- vii. Observamos uma correlação negativa entre tamanho nuclear e autofagia na progressão do epitélio não neoplásico para o epitélio esofágico maligno.
- viii. A partir dos nossos resultados e os dados da literatura, observamos diferentes cenários considerando o estado da autofagia em diferentes processos carcinogênicos (**Figura VI**). Observamos que alguns tipos tumorais mostram aumento dos níveis de autofagia com relação ao tecido não neoplásico (**Fig. VIA**), enquanto em outros tipos há redução destes níveis (**Fig. VIB**). Por outro lado, em ambos os casos quanto maior a diferença nos níveis da autofagia entre câncer e o tecido normal, pior o prognóstico. É importante notar que muitos dados obtidos de amostras primárias não confirmam a hipótese de Galluzzi e col mostrada na Fig. IV (introdução), a qual foi proposta a partir de dados de carcinogênese em modelos animais. Nestes modelos, é possível realizar o acompanhamento desde o tecido normal passando por lesões pré-malignas ou precursoras até chegar no câncer. Entretanto, muitos destes modelos são induzidos e não necessariamente reproduzem a biologia da carcinogênese que ocorre em um indivíduo. De qualquer forma, estudos que incluam grupos de lesões pré-malignas ou precursoras, incluindo grupos de risco, podem fornecer informações importantes acerca do papel da autofagia na carcinogênese.)

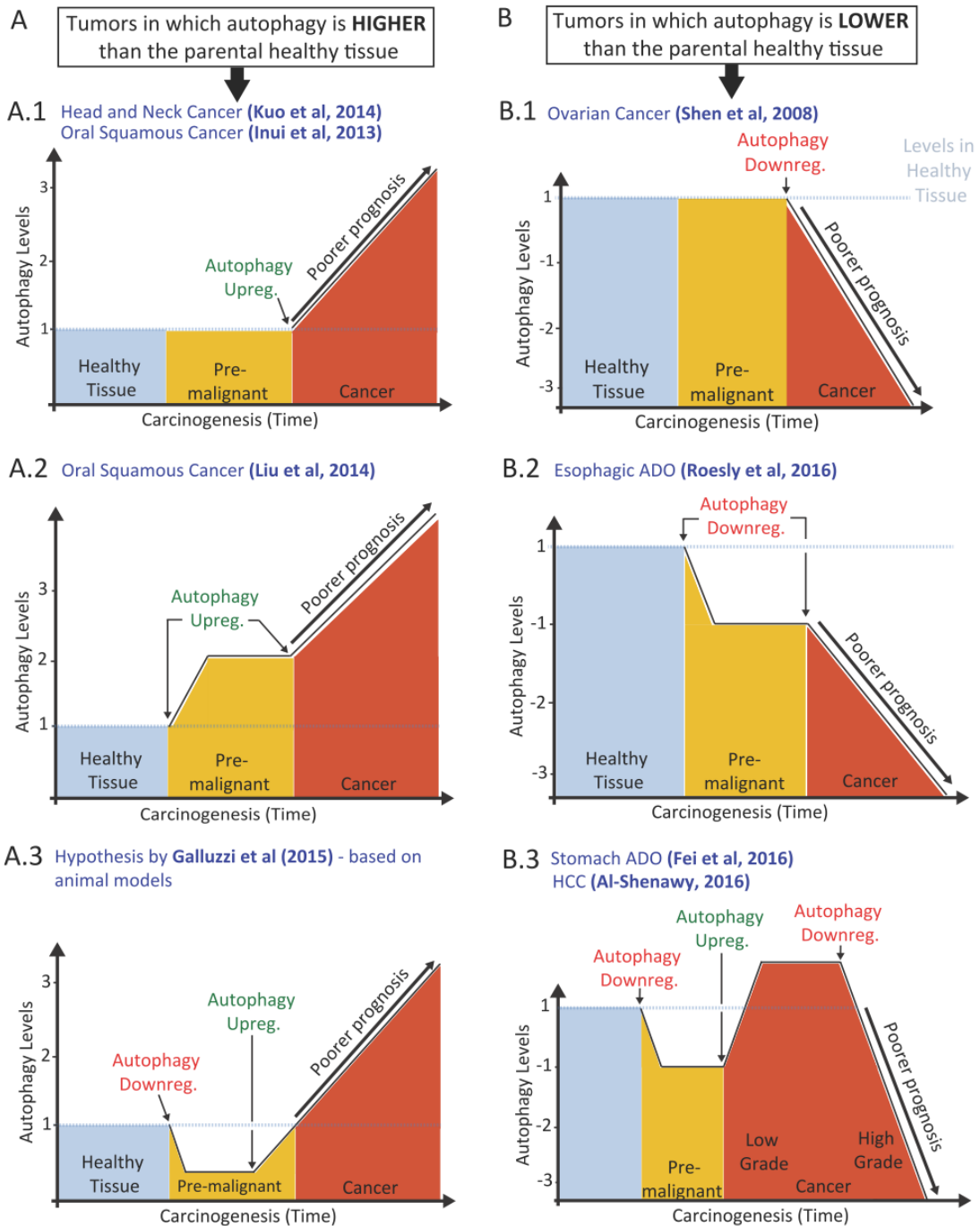


Figura VI – Cenários hipotéticos da variação da autofagia na carcinogênese. Em (A) e (B) são mostrados, respectivamente, modelos nos quais há níveis maiores ou menores da autofagia no câncer do que no tecido parental não neoplásico. **A.1 e B.1)** há aumento ou redução da autofagia apenas no câncer, e não em lesões pré-malignas ou precursoras. **A.2 e B.2)** há alteração no nível da autofagia em lesões pré-malignas ou precursoras, e variações ainda maiores no tecido maligno. **A.3 e B.3)** há redução seguida da reativação da autofagia no desenvolvimento da lesão maligna. No modelo apresentado em B.3 há, após a formação do câncer, uma redução dos níveis de autofagia em tumores avançados. Azul = referências representativas de cada modelo (presentes nas Tabelas 2 e 3).

6. PERSPECTIVAS

- Avaliar marcadores histopatológicos como taxa mitótica, presença de necrose, níveis de vascularização, presença de infiltrado inflamatório e imuno-histoquímica para Ki67 nas mesmas amostras utilizadas no presente trabalho e associar estes marcadores aos níveis de autofagia e a morfometria nuclear.
- Avaliar os 2 marcadores de controle epigenético da autofagia, CARM1 e EZH2, nas mesmas amostras utilizadas no presente trabalho.
- Avaliar parâmetros clínicos e histológicos das amostras presentes na área de transição no gráfico de *AutoIndex x Average Area of Normal Nuclei*.
- Realizar a avaliação imuno-histoquímica de marcadores de autofagia (BECN1, SQSTM1 e MAP1LC3) e epigenética (CARM1 e EZH2) em tecido não neoplásico, grupo intermediário (lesões pré-malignas ou alterações precursoras) e lesões malignas relacionadas em outros modelos de carcinogênese gastrointestinal, tais como: adenocarcinoma colorretal (empregando adenomas como grupo intermediário), adenocarcinoma pancreático (utilizando PanINs como grupo intermediário) e carcinoma hepatocelular (tendo fígados cirróticos como grupo intermediário).
- Elaborar um artigo de revisão embasado nas Tabelas 2 e 3 (pág. 32 e 34) e na Figura VI (Pág. 74) da presente dissertação.