UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Stefano Walter Agatti

Expressão diferencial e potencial prognóstico de genes de autofagia no Carcinoma Hepatocelular

Porto Alegre

2023

Stefano Walter Agatti

EXPRESSÃO DIFERENCIAL E POTENCIAL PROGNÓSTICO DE GENES DE AUTOFAGIA NO CARCINOMA HEPATOCELULAR

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Agatti, Stefano Walter
Expressão diferencial e potencial prognóstico de genes de autofagia no Carcinoma Hepatocelular / Stefano Walter Agatti. -- 2023.
70 f.
Orientador: Eduardo Cremonese Filippi Chiela.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. carcinoma hepatocelular. 2. autofagia. 3. expressão gênica. 4. progressão tumoral. 5. prognóstico. I. Filippi Chiela, Eduardo Cremonese, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Stefano Walter Agatti

EXPRESSÃO DIFERENCIAL E POTENCIAL PROGNÓSTICO DE GENES DE AUTOFAGIA NO CARCINOMA HEPATOCELULAR

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 18 de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Clévia Rosset – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

_____

Profª. Drª. Fernanda Visioli – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

_____

Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente meu pai e minha mãe, duas pessoas simples de uma cidade pequena, agradeço o apoio incondicional às minhas escolhas até aqui na vida, especialmente a de me dedicar aos estudos, mesmo em um contexto econômico pouco favorável no Brasil destes últimos anos. Nunca poderei agradecer o suficiente.

Ao meu orientador, querido professor Eduardo, por ser, além de um brilhante ensinador, uma pessoa paciente e sensível às questões individuais dos seus aprendizes, e pela confiança em prontamente aceitar a orientação deste trabalho quando eu o convidei. Também a todos os colegas (estudantes e professores) de grupos de pesquisa com quem convivi e aprendi ao longo da graduação, principalmente no LaBCM-HCPA, onde atuei grande parte do tempo da graduação.

A todos aqueles professores da Biomedicina e de outros cursos da UFRGS, além do IFRS, que incentivaram e cultivaram em nós alunos, mais do que qualquer coisa, a busca pelo pensamento científico e crítico, aliado ao humanismo necessário a todas as relações, profissionais ou afetivas. Também a eles pelo empenho em manter a excelência de uma universidade pública renomada, no ensino e na pesquisa.

Aos vários e incríveis amigas e amigos que ganhei durante essa jornada longa e árdua, pelo papel fundamental em resgatar e manter a motivação nos momentos difíceis, e também por compartilhar as boas lutas, descobertas e alegrias. Em especial: Thais, Gabriel, Luiza, Alessandra, Joice, Gabriel(zinho), Gustavo, Bruno.

Àqueles que já faziam parte da minha vida anteriormente à Universidade, e que não largaram minha mão em nenhum momento, atravessando pandemia, negacionismo, ignorância política e tudo o mais de adversidades e trazendo esperanças diversas, em especial Débora, Julia, Marcella. E ao João, por me dar o entusiasmo necessário para concluir o curso. Se esqueço de alguém, peço desculpas, já acostumadas à minha memória dos tempos de redes sociais digitais.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (e seus muitos trabalhadores), como instituição educativa tão excelente quanto é possível ser, pela oportunidade de vivenciar uma formação intelectual, acadêmica, social e política de raras abrangência e proporções num país periférico ao desenvolvimento socioeconômico mundial. Em especial à Thaís da Comgrad Biomedicina, pelo incessante suporte com as burocracias acadêmicas e demais necessidades de discente.

Às agências de fomento à pesquisa por garantirem financeiramente uma dignidade mínima para nós estudantes que muitas vezes precisamos passar mais do que 12 horas por dia fora da moradia para cumprir as tarefas relacionadas à faculdade.

Ao senhor atual Presidente da República Federativa do Brasil, o ex-operário Luís Inácio Lula da Silva, e suas equipes de governos, por terem apostado mais de uma vez no investimento no sistema público de ensino superior como política de emancipação popular e de desenvolvimento nacional soberano, e por estarem ao lado da Democracia quando os ventos infectos do despotismo e da intolerância sopravam novamente sobre estas terras tropicais abençoadas pela natureza. Afinal, Educação é uma ferramenta da sociedade, sociedade essa que que só existe em polis (cidade, organização), e portanto, não há Educação apolítica. Pois, então, lutemos pela Educação pública, gratuita, de qualidade, democrática, emancipatória e livre!

"Nós começamos a contemplar nossas origens: matéria estelar ponderando as estrelas; agrupamentos organizados de dez bilhões de bilhões de bilhões de átomos considerando a evolução dos átomos; traçando a longa jornada pela qual, pelo menos aqui, a consciência surgiu. [...] Nós somos uma forma do Cosmos se autoconhecer."

"Durante toda a sua vida, estudara o universo,
mas desprezara sua mais clara mensagem:
para criaturas tão pequenas como nós, a
vastidão só é suportável através do amor."

- Carl Sagan

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho apresenta inicialmente uma introdução mais ampla, contendo os principais conceitos necessários para entendimento do artigo científico. Este segundo foi estruturado com base nas instruções para autores do periódico *Liver International*, conforme anexo A ao final do documento. Nós optamos por incluir as figuras e suas legendas conjuntamente ao longo das respectivas seções para facilitar a leitura. A lista de abreviaturas foi inserida no início do trabalho, em ordem alfabética, compreendendo o trabalho por inteiro. Algumas referências são repetidas nas duas listas, pois estão presentes dentro e fora do artigo.

Boa leitura!

RESUMO

O Carcinoma Hepatocelular (HCC) é a principal neoplasia maligna que se desenvolve no fígado, alcançando mais de 900.000 pessoas e levando ao óbito mais de 800.000 pacientes a cada ano no mundo. A autofagia celular é um processo metabólico fundamental em que as células degradam seus próprios componentes internos para manter a homeostase, sendo importante especialmente em momentos de maior estresse e dano, como falta de nutrientes e envelhecimento. Apesar de a autofagia ser um conhecido mecanismo de proteção e escape à morte celular, o papel dos genes centrais da sua execução no desenvolvimento do HCC e seu potencial prognóstico na sobrevida dos pacientes é pouco esclarecido. Neste trabalho nós buscamos investigar esse potencial prognóstico através de dados biomédicos de um abrangente estudo publicizados online. Assim, foram identificados e coletados dados de expressão gênica, metilação do promotor do gene, valores de significância da variação e ainda quantidade de mutações dos 35 genes centrais para a autofagia estudados. A partir da estruturação e análise dos dados obtidos, nós observamos quatro perfis de variação da expressão (média) entre estágios tumorais, com a predominância de aumento da expressão do tecido hepático normal para o tecido tumoral de primeiro estágio. Já a variância da expressão se mostrou crescente ao longo dos estágios, indicando que há heterogeneidade crescente. De forma geral, houve baixa correlação entre as variações da expressão e da metilação gênica, suscitando, portanto, outros mecanismos de controle da expressão que expliquem sua variação. A baixa porcentagem de amostras com mutação também demonstrou não ser uma explicação para esse fenômeno. Dentre os genes investigados, encontramos 5 com expressão significativamente associada a maior sobrevida (*ATG4A, GABARAPL1, BCL2L13, ACBD5 e SQSTM1*). A assinatura de sobrevida gerada para o grupo dos 35 genes indicou que uma menor expressão autofágica é um fator ligado a maior sobrevida no médio prazo. Como nosso trabalho se diferencia das demais prospecções de assinatura e prognóstico desde a seleção dos genes investigados, nossos resultados trazem uma visão mais extensa e direcionada ao núcleo de genes da autofagia, e assim acreditamos na relevância do que mostramos neste trabalho, especialmente a identificação dos perfis de variação de expressão e a falta de correlação com a metilação (epigenética) e mutações (genética).

Palavras-chave: Carcinoma hepatocelular; autofagia; progressão tumoral; expressão gênica diferencial; prognóstico.

ABSTRACT

Hepatocellular Carcinoma (HCC) is the main malignant neoplasm that develops in the liver, affecting more than 900,000 people and leading to the death of more than 800,000 patients yearly. Cellular autophagy is a fundamental metabolic process in which cells degrade their internal components to maintain homeostasis. It is essential during more significant stress and damage, such as lack of nutrients and aging. Although autophagy is a known mechanism of protection and escape from cell death, the central genes' role in its execution in the development of HCC and its prognostic potential for patient survival is poorly understood. In this work, we sought to investigate this potential prognosis using biomedical data from a comprehensive study published online. Thus, data on gene expression, methylation of the gene promoter, variation significance values, and number of mutations of the 35 central autophagy genes studied were identified and collected. From the structuring and analysis of the data obtained, we observed four expression variation profiles between tumor stages, with a predominance of increased expression from normal liver tissue to stage I tumor tissue. The variance of expression increased throughout the stages, indicating increasing heterogeneity. In general, there was a low correlation between gene expression and methylation variations, therefore raising other expression control mechanisms that could explain that change. The low percentage of samples with gene mutations also proved not to be an explanation for this phenomenon. Among the 35 genes, we found 5 in which expression was significantly associated with greater survival (*ATG4A, GABARAPL1, BCL2L13, ACBD5, and SQSTM1*). The survival signature generated for the group of all genes indicated that lower autophagic expression is linked to greater survival in the short and medium term. As our work differs from other signature and prognosis surveys since the selection of the genes investigated, our results bring a more extensive and targeted view of the nucleus of autophagy genes. Thus, we believe in the relevance of what we showed in this work, especially the identification of expression variation profiles and the lack of correlation with methylation (epigenetics) and mutations (genetics).

Keywords: hepatocellular carcinoma; autophagy; tumor progression; differential gene expression; prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O processo de autofagia 14

Figura 2 – Proteínas da família ATG e seu papel na autofagia 15

Figura 3 – Papel da autofagia na transformação maligna celular e na progressão da massa tumoral 16

Figura 4 – Estágios clínicos da progressão e etiologia genética e histopatológica do HCC 18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARG – *Autophagy-Related Genes* (Genes relacionados à autofagia)

ATG/Atg – *Autophagy-related* (Relacionado à autofagia – família de genes/proteínas)

COSMIC – *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

ER – *Endoplasmic Reticulum* (Retículo Endoplasmático)

HADb – *Human Autophagy Database*

HCC – *Hepatocellular Carcinoma* (Carcinoma Hepatocelular)

ICGC – *International Cancer Genome Consortium*

KM – *Kaplan-Meier* (tipo de estimador-gráfico)

LIHC – *Liver Hepatocellular Carcinoma* (nomenclatura usada pelo TCGA)

mOS – *median Overall Survival* (mediana de Sobrevida Geral)

mRNA – *messenger Ribonucleic Acid* (RNA mensageiro)

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*

TME – *Tumor Microenvironment* (microambiente tumoral)

FPKM - *Fragments Per Kilobase Million*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA 13
1.1 Autofagia 13
1.2 Papel da autofagia no câncer 15
1.4 Carcinoma hepatocelular 16
2 JUSTIFICATIVA 19
3 OBJETIVOS 19
4 ARTIGO CIENTÍFICO 20
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 44
5.1 Conclusões 44
5.2 Perspectivas 45
REFERÊNCIAS 46
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA *LIVER INTERNATIONAL* . 48

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 Autofagia

Autofagia é o nome dado ao processo intracelular e fisiológico de degradação de organelas e outros componentes próprios da célula e que ocorre através dos fagossomos e lisossomos. É um processo basal e contínuo nas células humanas, que promove a manutenção da qualidade e o funcionamento das organelas, assim como pode atuar para a adaptação celular a condições microambientais adversas, suprindo a célula com moléculas precursoras à produção de energia e mantendo a homeostase celular (Mizushima et al, 2008; Galluzzi et al, 2015; Klionsky et al, 2021). O estresse celular causado por contextos como hipóxia, privação de nutrientes, danos genéticos, presença de toxinas exógenas etc. provoca o aumento generalizado da autofagia, disparando vias de sinalização que interrompem a divisão celular e ativam os mecanismos de adaptação (Russel et al, 2013, Russel & Guan, 2022).

Estruturalmente, a autofagia **(Figura 1)** inicia a partir da evaginação de membranas intracelulares, especialmente a partir do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER). Esta evaginação inicial recebe o nome de fagóforo, e envolve principalmente a participação das proteínas ATG9 e ATG2A. A membrana do fagóforo é então alongada em torno dos componentes a serem degradados, originando o autofagossomo. Esta etapa inteira é chamada de etapa inicial da autofagia. Após, o autofagossomo fusiona com lisossomos, organelas contendo diversas enzimas digestivas, formando o autofagolisossomo. Esta é considerada a etapa tardia da autofagia. No autofagolisossomo acontece a degradação dos conteúdos celulares, e os produtos da degradação são devolvidos para o citoplasma através de enzimas permeases presentes na membrana da organela (Galluzzi et al, 2015).

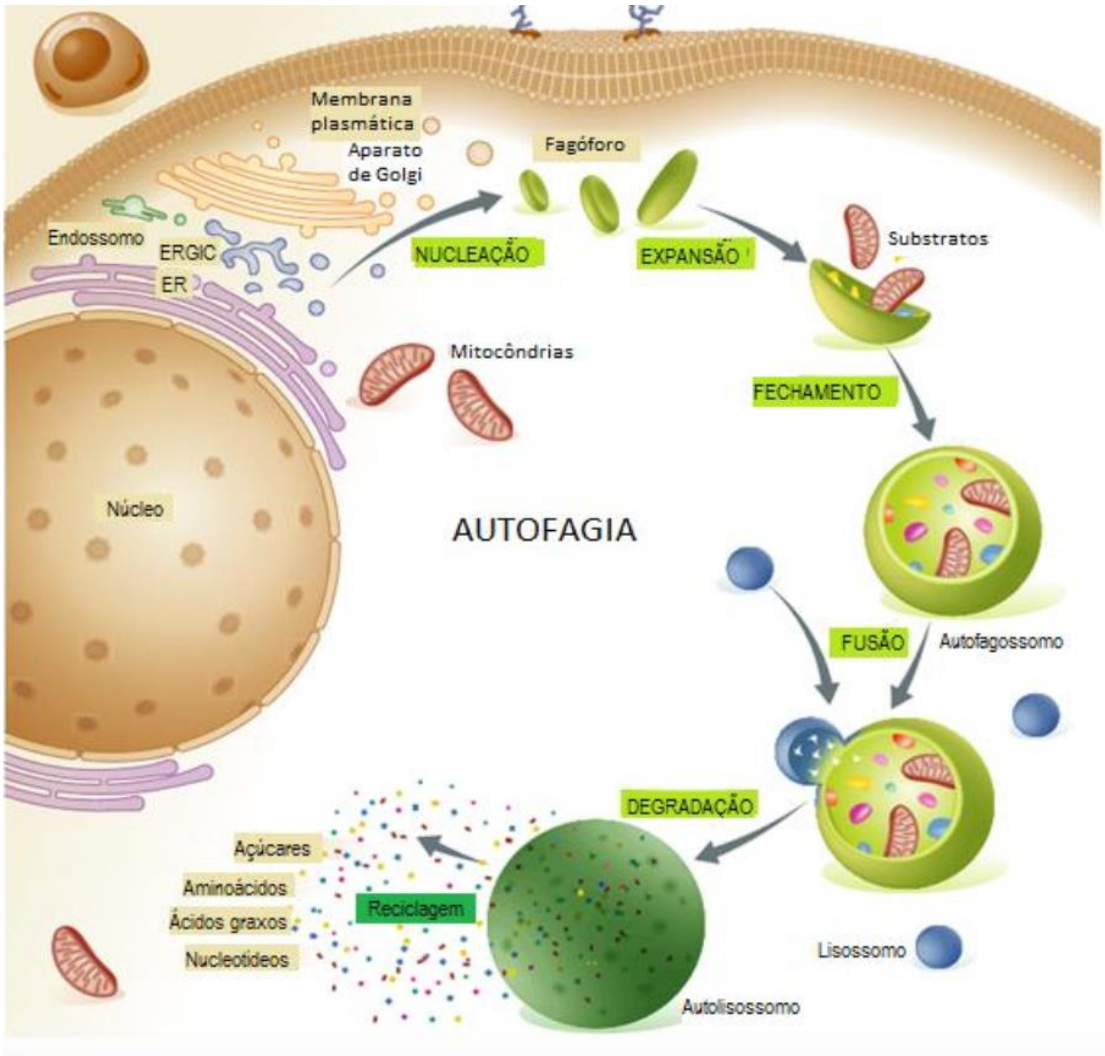

Figura 1 – O processo de autofagia. Os 5 eventos envolvidos no desenvolvimento da autofagia estão ilustrados: nucleação, expansão do fagóforo, fechamento do fagóforo, fusão ao lisossomo e degradação molecular. Imagem adaptada de Galluzzi *et al*, 2015.

O processo autofágico é conduzido principalmente por proteínas originadas de genes conhecidos como *Autophagy-related genes*, ou família ATG, para facilitar **(Figura 2)**. Os ATG foram nomeados numérica e sequencialmente conforme a caracterização em leveduras na década de 1990 (*ATG1*, *ATG2*, *ATG5* etc.), e posteriormente foi caracterizada a homologia com os genes humanos. Assim, algumas proteínas que participam do processo no organismo humano receberam outros nomes, como BCN1 (codificada por gene homólogo ao *ATG6*) e MAP1LC3 (gene *ATG8*). Mais recentemente, também, novas proteínas foram descritas como participantes diretas da autofagia, como *SQSTM1* e *NBR1* (Li et al, 2020).

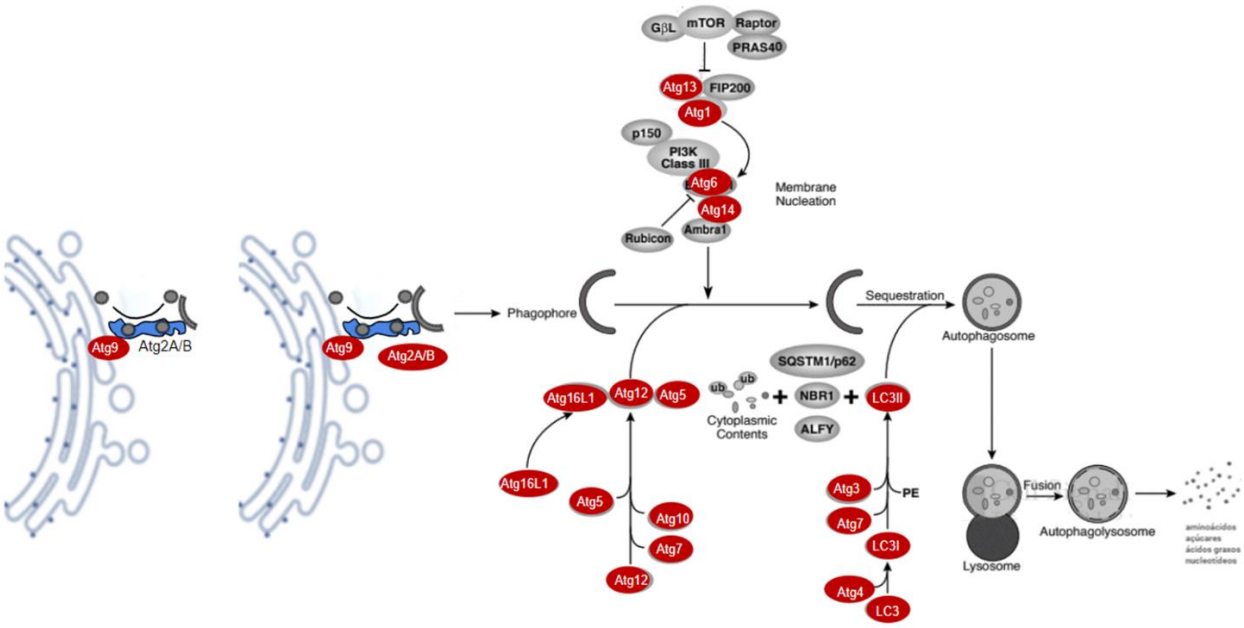

Figura 2 - Proteínas da família ATG e seu papel na autofagia. As proteínas da família ATG (ou mais amplamente ARG, no nosso trabalho) que formam complexos proteicos e estão envolvidas desde o isolamento das membranas até o fechamento dos autofagossomos, destacadas em vermelho na figura. Em vermelho, à direita, pode-se observar a conversão da proteína LC3 em LC3II, responsável por promover o fechamento do fagóforo. Imagem adaptada de *www.cellsignal.com/pathways/autophagy-signaling-pathway* (2020).

1.2 Papel da autofagia no câncer

Diversas patologias humanas apresentam alterações na autofagia basal, como condições neurodegenerativas, autoimunes, cardiovasculares e câncer (Jiang & Mizushima, 2014). O câncer, especialmente, é uma patologia originada no surgimento cumulativo de modificações genéticas e epigenéticas, causando alterações na homeostase, controle de proliferação e morte celular. As células transformadas (cancerosas) adquirem capacidade de sobrevivência, invasão tecidual e de geração de metástases no organismo portador (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan, 2022). Como a autofagia desempenha um papel importante na homeostase celular, nas células saudáveis ela parece agir diminuindo as chances de transformação celular (fator protetor contra o câncer), enquanto nas células já tumorais a autofagia pode funcionar como suporte para a sobrevivência da célula ao estresse intra e extracelular mais elevados de um tumor, permitindo a ocorrência da progressão tumoral (Yang et al, 2011; Galluzzi et al, 2015; Debnath et al, 2023) **(Figura 3)**.

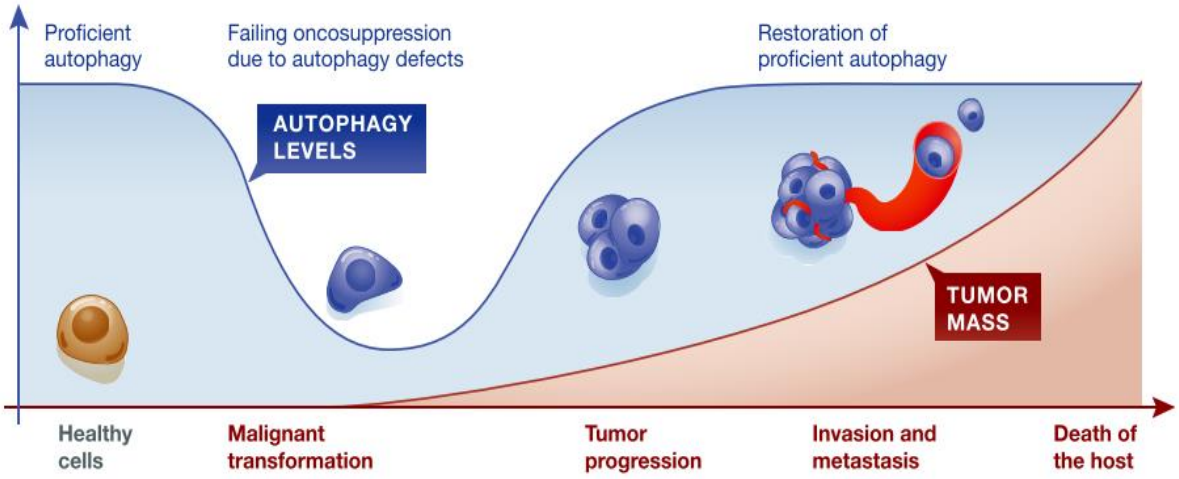

Figura 3. Papel da autofagia na transformação maligna celular e na progressão da massa tumoral. A autofagia proficiente mantém o estado normal e homeostático da célula saudável. Quando ocorre a redução da autofagia, a transformação maligna celular é favorecida, em conjunto com outros fatores (Yun & Lee, 2018), e há a formação de células pré-tumorais. Essas células pré-tumorais podem acabar por restabelecer sua autofagia funcional, permitindo sua adaptação ao ambiente estressor (do tumor) ao qual serão expostas e favorecendo a progressão tumoral. Imagem de Galluzzi *et al*, 2015.

Dados experimentais vêm demonstrando que o papel da autofagia na progressão tumoral pode ser dependente de contexto. Por exemplo, o *knock-out* de genes autofágicos essenciais ao processo acelerou o desenvolvimento de tumores. (Takamura et al, 2011; Cianfanelli et al, 2015). Apesar disso, outros experimentos com deleção e *knock-out* desses genes geraram neoplasias principalmente benignas, sem progressão maligna. A perda de gene supressor tumoral associada ao desligamento da autofagia também foi caracterizado como um acelerador da progressão tumoral (Poillet-Perez et al, 2015).

1.4 Carcinoma hepatocelular

Segundo dados do *Global Health Estimates,* da Organização Mundial da Saúde (OMS), para 2019 (ano anterior ao início da pandemia da Covid-19), neoplasias malignas causavam cerca de 17% das mortes humanas no mundo, sendo a 2ª causa geral mais comum de óbitos, atrás apenas das doenças cardiovasculares (32%), com ambas em pleno crescimento de incidência em números absolutos. Apesar disso, o

câncer não é uma doença única, possuindo grandes diferenças biológicas em seu desenvolvimento dependendo do seu tecido e órgão de origem, etiologia e mutações específicas, mecanismos funcionais complexos (*hallmarks*) além de outras características importantes no seu estudo como as possibilidades tecnológicas de diagnóstico e tratamento, por isso os cânceres são divididos em diversos tipos e subtipos (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011; Mathur et al, 2015).

Os cânceres originados nos órgãos do sistema gastrointestinal (SGI) estão entre os tipos mais incidentes nos humanos quando se leva em conta ambos os sexos biológicos. Segundo as estimativas do GLOBOCAN 2020 (Sung et al, 2021), a soma de novos casos anuais dos cânceres de cólon (6%), estômago (5,6%), fígado (4,7%), reto (3,8%), esôfago (3,1%) e pâncreas (2,6%) chega a 25,8% de todos os casos diagnosticados, estando todos eles, com exceção do câncer de pâncreas, entre os 10 tipos com maior incidência mundial. Em relação à mortalidade, a soma ultrapassa 35% de todas as mortes com diagnóstico prévio, sendo essa proporção ainda maior em pessoas do sexo masculino (40,2% contra 29,9% do sexo feminino). São cerca de 4.975.000 casos e 3.525.000 mortes a cada ano no mundo causadas somente por cânceres nesses sítios do SGI, números que devem crescer 58% e 73%, respectivamente, até 2040 (Ferlay et al, 2018).

Como visto, entre os tipos de cânceres do SGI mais incidentes e agressivos está o de fígado. Conforme o GLOBOCAN 2020, os 4,7% de todos os casos de câncer que as neoplasias de fígado significam são cerca de 906.000 novos casos, e 830.000 mortes (8,3% dos óbitos por câncer) ao ano. Em 2025 os casos novos registrados devem ultrapassar pela primeira vez 1 milhão, assim como as mortes. É o 3º tipo de câncer que mais tira vidas no mundo.

O Carcinoma Hepatocelular (HCC, conforme a sigla mais utilizada) é o principal subtipo de câncer que se desenvolve no fígado, correspondendo a cerca de 90% dos tumores nesse órgão (Llovet et al, 2021). No Brasil, um estudo (Carrilho et al, 2010) indicou que 78% dos pacientes diagnosticados eram do sexo masculino e 98% tinham cirrose previamente. A hepatite C era a etiologia responsável por 54% dos casos, seguida por hepatite B (16%) e álcool (14%). Aproximadamente 43% dos pacientes tinham carcinoma em estágio inicial, 35% em estágio intermediário e 22% contavam com o câncer em um estágio avançado **(Figura 4)**.

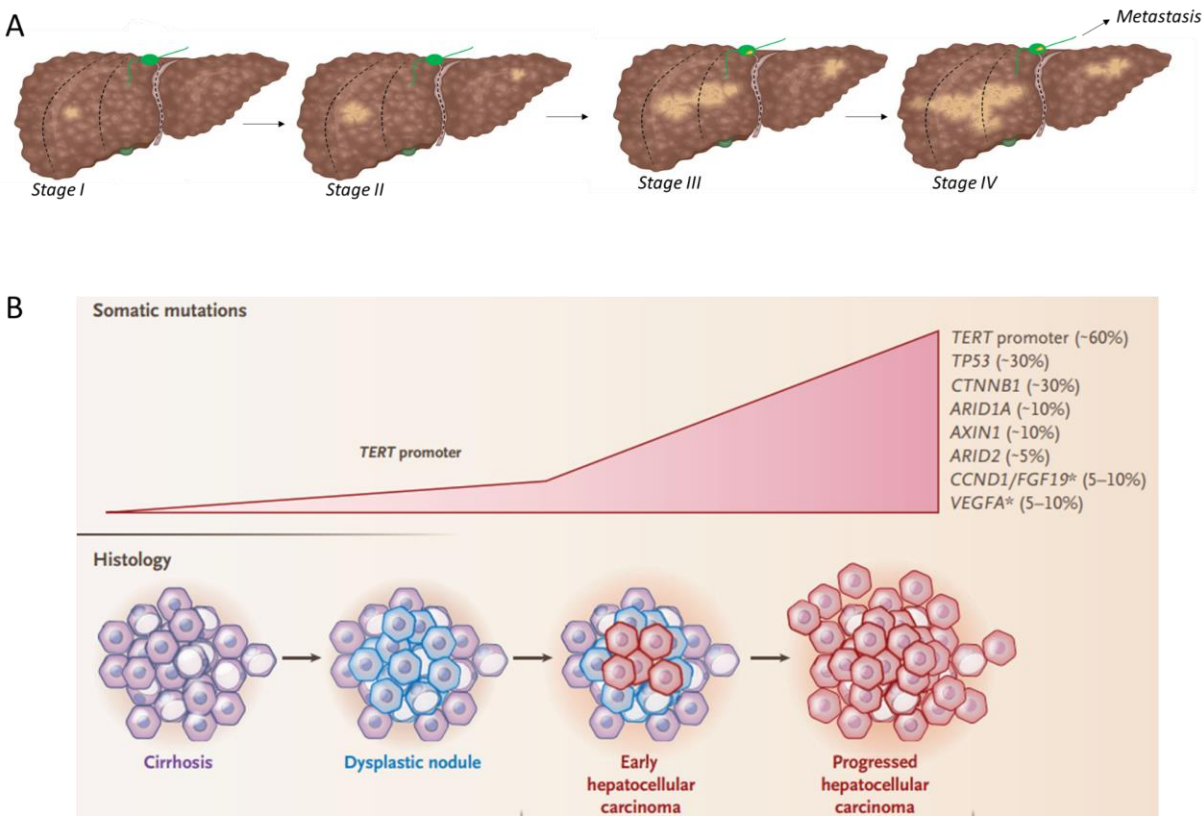

Figura 4 – Estágios clínicos da progressão e etiologia genética e histopatológica do HCC. (A) Estágio I - crescimento local unifocal. Estágio II - crescimento difuso multifocal sem metástase. Estágio III - crescimento difuso multifocal com metástase (amarelo) em linfonodo (verde). Estágio IV - crescimento difuso multifocal com metástase distal. (B) Genes marcadores moleculares mutados associados com a progressão do HCC (acima) e desenvolvimento histológico do HCC (abaixo). Adaptado de Llovet *et al*, 2021.

2 JUSTIFICATIVA

Este trabalho se justifica no contexto da pesquisa translacional em câncer, em que se busca marcadores biológicos para melhorar o estabelecimento e a diferenciação de prognósticos entre tumores de carcinoma hepatocelular (HCC) de pacientes diferentes, com a intenção de subsidiar ainda mais as decisões de tratamento e ainda, possivelmente, contribuir para o conjunto de evidências que irão embasar novos protocolos de tratamento baseados na modulação da autofagia tumoral.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o potencial prognóstico de genes relacionados à autofagia na sobrevida de pacientes com HCC.

Os objetivos específicos desenvolvidos foram:

a) Avaliar o impacto dos níveis de expressão dos genes na sobrevida geral (mOS) dos pacientes;

b) Avaliar a expressão diferencial (DE) entre tecido normal e amostra tumoral;

c) Avaliar a expressão diferencial ao longo da progressão dos tumores, em diferentes estágios de desenvolvimento e metástases;

d) Avaliar o perfil de mutações nos genes relacionados à autofagia no HCC.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Elaborado segundo as normas da revista ***Liver International*** (Anexo A).

Tipo de artigo: Pesquisa original (*Original Article*).

Alterações de expressão e potencial prognóstico de genes de autofagia no Carcinoma Hepatocelular

Stefano Walter Agatti[1], Eduardo Cremonese Filippi-Chiela[1,2,3]

1 Grupo de Pesquisa em Biologia Celular e Molecular (LaBCM), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

2 Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

3 Departamento de Ciências Morfológicas, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

Autor correspondente:

Eduardo Cremonese Filippi-Chiela

Address: Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre

Phone number: +55 51 3308 4421

E-mail: echiela@hcpa.edu.br

Palavras: 4.642

Figuras: 4 principais + 4 suplementares

Tabelas: 0

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses para este artigo.

Suporte Financeiro

Este trabalho recebeu financiamento do Edital Universal 2021 CNPq e FIPE-HCPA.

Agradecimentos

Agradecemos às agências de fomento à pesquisa CNPq e FIPE-HCPA.

Resumo

Contexto e objetivos: O Carcinoma Hepatocelular (HCC) é a principal neoplasia maligna de fígado. O papel dos genes de autofagia no desenvolvimento e prognóstico do HCC é pouco esclarecido. Nós investigamos o perfil de expressão e potencial prognóstico destes genes no HCC.
Métodos: nós geramos uma lista dos 35 principais genes de autofagia. Para estes genes, a partir de dados públicos do TCGA, nós analisamos: a) expressão gênica para tecido normal e HCC (incluindo diferentes estágio tumorais); b) metilação do promotor; c) associação com prognóstico; d) incidência de mutações.
Resultados: a análise de expressão diferencial mostrou aumento dos níveis de 28 dos 35 genes no HCC comparado ao tecido normal. Considerando a expressão diferencial na carcinogênese, observamos quatro perfis de variação da expressão, sendo o perfil mais prevalente (49%) o de aumento da expressão até o grau III seguido de redução do grau III para o IV. A variância da expressão se mostrou crescente ao longo dos estágios, indicando maior heterogeneidade em tumores avançados. Houve uma baixa correlação geral entre variação da expressão e metilação dos promotores. Quatro genes apresentaram expressão elevada associada a maior sobrevida (*ATG4A*, *GABARAPL1*, *BCL2L13*, *ACBD5*), e um gene apresentou o perfil oposto (*SQSTM1*).
Conclusões: observamos aumento de genes de autofagia ao longo da carcinogênese do HCC a partir do tecido normal especialmente até tumores de grau III. Níveis elevados de autofagia parecem estar associados a maior sobrevida. Estes dados podem contribuir no melhor entendimento da progressão, desenvolvimento de marcadores prognósticos e alvos terapêuticos no HCC.

Palavras-chave: carcinoma hepatocelular, autofagia, progressão tumoral, expressão gênica diferencial, prognóstico

Destaques

- Genes ARG estão superexpressos (*upregulated*) no carcinoma hepatocelular, especialmente comparando-se tecido normal e tumores de estágio 3;
- A dinâmica de expressão dos ARG é variável ao longo dos estágios de progressão tumoral a partir do tecido normal;
- Para a maioria dos ARG estudados não foi encontrada correlação entre níveis de expressão e metilação do promotor;
- Níveis baixos de *ATG4A*, *GABARAPL1*, *BCL2L13* e *ACBD5* estão associados à pior sobrevida dos pacientes com carcinoma hepatocelular; enquanto níveis altos de *SQSTM1* estão associados à pior sobrevida dos pacientes.

1 Introdução

Autofagia é um processo celular constituinte, de degradação de componentes intracelulares, geralmente danificados ou em desuso, para reutilização das moléculas base. Molecularmente, o mecanismo é controlado pela família de genes ATG (*autophagy-related genes)* (Levine et al, 2018). Além dos genes ATG, outras proteínas como as adaptadoras, entre as quais destaca-se a SQSTM1, também participam do controle do mecanismo (Galluzzi et al, 2017). No câncer, o papel da autofagia é complexo e varia de acordo com o tipo tumoral. De fato, alterações no funcionamento da autofagia têm sido descritas para todos os principais tipos de cânceres em humanos. Além disso, inúmeras evidências têm sugerido um papel da autofagia na progressão tumoral, permitindo a adaptação das células tumorais ao estresse metabólico presente durante o estabelecimento de um tumor (Galluzzi et al, 2015; Levy et al, 2019).

Segundo o GLOBOCAN 2020 (Sung et al, 2021), 4,7% de todos os casos de câncer diagnosticados têm sua origem no fígado, contabilizando cerca de 905.000 novos casos e 830.000 mortes por ano (8,3% do total). É o 3º sítio de câncer que mais causa óbitos no mundo. O carcinoma hepatocelular (HCC) é o principal câncer que se desenvolve no fígado, correspondendo a cerca de 90% dos tumores nesse órgão (Ringelhan et al, 2017). A sobrevivência média em 5 anos para pacientes de HCC é cerca de 18%, o tornando o segundo tipo de câncer mais letal. (European Association for the Study of the Liver, 2019). No Brasil, estudo indicou que 78% dos pacientes diagnosticados eram do sexo masculino e 98% tinham cirrose. A hepatite C era a etiologia responsável por 54% dos casos, seguida por hepatite B (16%) e álcool (14%). Aproximadamente 43% dos pacientes tinham tumor em estágio inicial, 35% estágio intermediário e 22% contavam com carcinoma em estágio avançado (Carrilho et al, 2010). A carcinogênese do HCC envolve alterações em genes drivers como *TERT*, *TP53* e *CTNNB1* (Llovet et al, 2021). Porém, muitos aspectos da biologia e progressão do HCC não são entendidos. Neste contexto, um mecanismo celular que vem sendo estudado e que parece estar alterado na carcinogênese do HCC é a autofagia, e atualmente seu papel é entendido como duplo, sendo antitumoral em hepatócitos normais e promotor da sobrevivência das células do HCC após a carcinogênese (Yang et al, 2019). Os mecanismos moleculares específicos do controle da autofagia ao longo do desenvolvimento tumoral ainda são pouco entendidos, embora a via principal seja bem conhecida e envolva principalmente a família de genes ATG (*Autophagy-related genes*).

Neste trabalho, utilizando os dados produzidos pelo *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA) e disponíveis publicamente online, nós avaliamos a expressão diferencial de genes de autofagia entre tecido hepático normal e amostras de HCC. Nós também segregamos os tumores nos diferentes estágios de progressão para avaliar as diferenças de expressão ao longo da carcinogênese destes tumores. Por fim, nós investigamos o impacto dos níveis de expressão na sobrevida geral (OS) dos pacientes, além do perfil de mutações nestes genes.

2 Métodos

2.1 Seleção dos Genes

A pré-seleção dos genes investigados envolveu um cruzamento entre as entradas disponíveis no *Human Autophagy Database* (HADb) em dezembro de 2022, a publicação *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy* (Klionsky et al, 2021) e o *Autophagy Signaling Pathway* da *Cell Signaling Technology* (2020). Não foram incluídos genes com abrangência de ações muito diversa ou majoritariamente relacionadas a outras vias moleculares bem definidas. Ao final da seleção, os genes selecionados que dispunham de dados em todos os *browsers online* utilizados foram os seguintes: *ULK1, ULK2, ATG2A, ATG2B, ATG3, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, ATG5, BECN1, ATG7, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, MAP1LC3A, MAP1LC3B, ATG9A, ATG9B, ATG10, ATG12, ATG16L1, ATG16L2, RB1CC1, WIPI1, WIPI2, SNX30, SNX4, BCL2L13, ACBD5, SQSTM1, NBR1, WDFY3, AMBRA1, BCL2*.

2.2 Expressão Diferencial

A análise de expressão diferencial de mRNA (via RNA-seq) dos genes foi elaborada a partir dos dados coletados pelo TCGA disponíveis no *University of Alabama at Birmingham Cancer data analysis Portal* (UALCAN) (Chandrashekar et al, 2017, Chandrashekar et al, 2022), assim como a análise de metilação de promotor. Os dados extraídos nessa etapa incluem expressão média em Transcritos Por Milhão e quantificação de metilação (em valor Beta) de cada gene no tecido normal e para cada estágio tumoral e o valor *p* de significância da variação desses valores entre os estágios.

2.3 Análise de Sobrevida

A análise de sobrevida para grupos de alta e baixa expressão foi desenvolvida com o *Kaplan-Meier Plotter* (KMplot) (Lánczky et al, 2021), que desenha as curvas Kaplan-Meier (probabilidade de sobrevivência x tempo), medianas de sobrevida e valores *p* e HR (*Hazard ratio*) de acordo com os parâmetros escolhidos. Os dados são de RNA-seq e também provêm do TCGA. A separação amostral utilizada foi a de tercil inferior e tercil superior de valores de expressão das amostras tumorais.

2.4 Análise de Alterações Genéticas

A análise complementar de alterações genéticas foi feita utilizando o portal do *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* (COSMIC) (Tate et al, 2019), que possui dados obtidos do TCGA, ICGC e artigos publicados na literatura. Os dados se referem à quantidade de amostras tumorais com mutação identificadas para cada gene.

2.5 Geração de assinaturas multigênicas

A plataforma *Gene Expression Profiling Interactive Analyses* 2 (GEPIA2) (Tang et al, 2019) foi usada na busca por assinaturas relevantes de genes agrupados na sobrevida dos pacientes.

3 Resultados

3.1 Expressão diferencial e carcinogênese do HCC

A análise da expressão gênica diferencial dos 35 genes ao longo dos estágios tumorais em comparação com o tecido normal demonstrou um perfil diverso de comportamentos, embora a maioria dos genes tenha tido perfil de aumento da expressão, especialmente no estágio inicial da carcinogênese **(Figura 1A)**. Dezessete genes (49%) apresentaram um perfil de aumento transitório, ou seja, com aumento do tecido normal para o tumoral, mas diminuição ao longo dos demais estágios de progressão tumoral. Onze genes (31%) mostraram aumento progressivo ao longo dos estágios tumorais e 4 genes (11%) apresentaram diminuição contínua ao longo da progressão. Por fim, restaram 3 genes (9%) classificados como variáveis, pois o comportamento da expressão não obedeceu às características das classificações anteriores.

Considerando as variações de expressão estatisticamente significativas ($p<0,05$) entre os diferentes estágios da progressão do HCC, 30 dos 35 genes apresentaram diferença entre o tecido normal e o tumor em estágio 1, sendo 25 deles *upregulated* e 5 *downregulated* no tumor **(Figura 1B)**. Do estágio 1 para o estágio 2, apenas 4 genes estavam *upregulated* no segundo. Do estágio 2 para o estágio 3 foram 6 genes com diferença estatística e todos também *upregulated*. Entretanto, na mudança para o último estágio (estágio 4), dos 6 genes significativos 4 foram *downregulated* e apenas 2 *upregulated*, denotando uma mudança no padrão observado nos estágios antecessores.

Uma das *hallmarks* clássicas do câncer é a heterogeneidade tumoral, a qual sugere que cânceres apresentam diferenças moleculares e fenotípicas entre si. Esta heterogeneidade é crescente conforme os tumores progridem, estando associada com pior prognóstico e resposta à terapia, inclusive no HCC (Liu et al, 2018). Nós então investigamos a variância nos níveis de expressão dos genes de autofagia ao longo da progressão do HCC. A variância da expressão gênica calculada entre os 35 genes para o tecido normal e cada estágio tumoral mostrou uma tendência de aumento consistente ao longo da evolução do carcinoma hepatocelular, com um pequeno desvio para baixo no estágio 3 **(Figura 1C).**

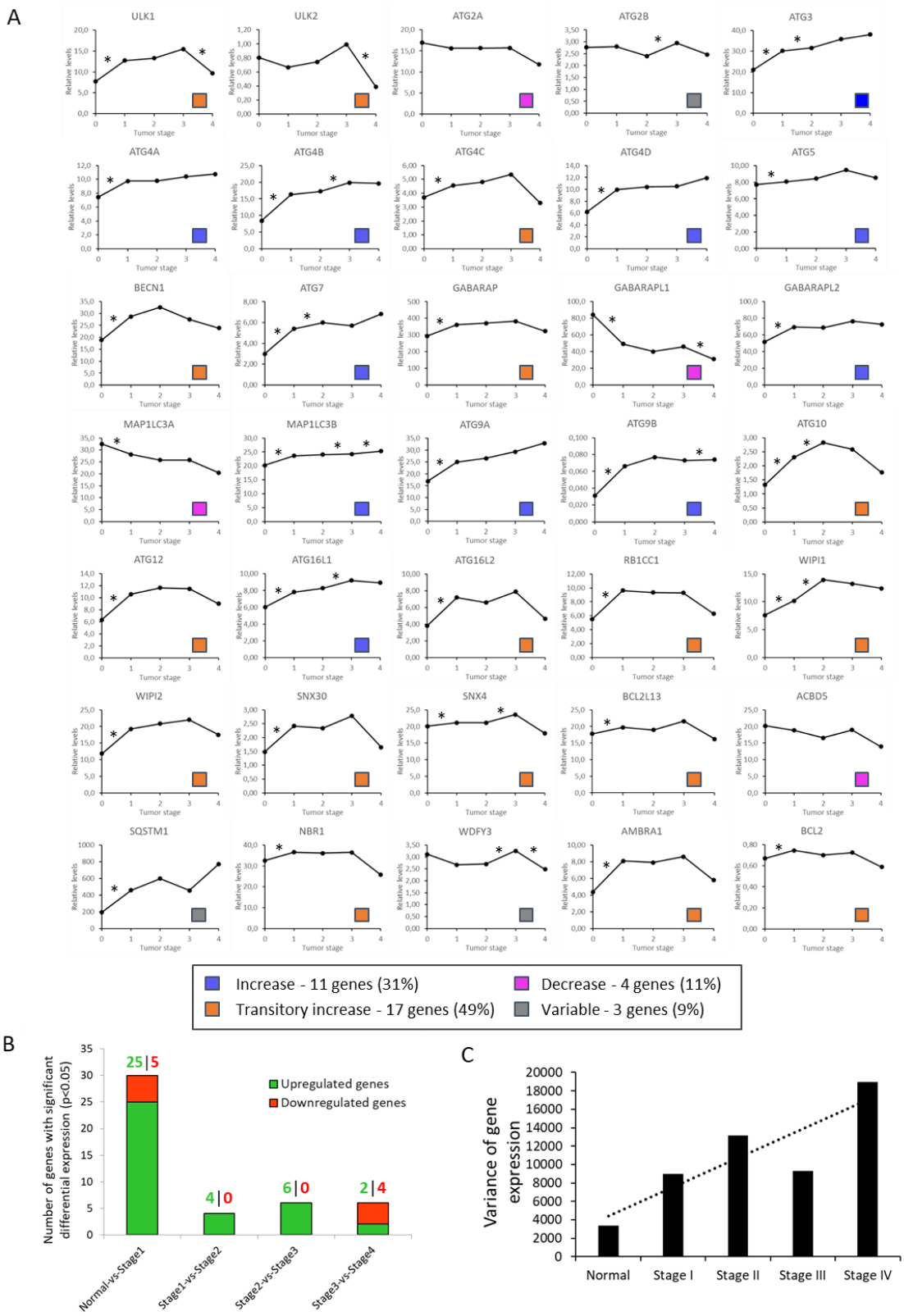

Figura 1 – Expressão diferencial e variância dos níveis de genes de autofagia na progressão do carcinoma hepatocelular. (A) Perfis de expressão diferencial dos ARG na progressão do HCC. As cores representam os 4 perfis de expressão diferencial identificados. *****diferença entre estágios com $p \leq 0{,}05$. (B) Número de genes com expressão diferencial estatisticamente significativa entre os estágios tumorais. (C) Variância dos níveis de expressão de todos os genes em cada estágio tumoral e tecido normal.

3.2 Perfil de metilação dos promotores dos genes de autofagia no HCC

Entre os principais mecanismos de controle da expressão gênica estão alterações epigenéticas, especialmente metilações em promotores. Em alguns tipos tumorais, este processo sofre alterações diretamente relacionadas ao processo carcinogênico (Nishiyama et al, 2021). Os níveis de metilação foram avaliados a partir do valor Beta, que varia de 0 (totalmente não-metilado) a 1 (totalmente metilado). Valores abaixo de 0,3 são considerados hipometilação, e valores acima de 0,7 são considerados hipermetilação (Shinawi et al, 2013). Com base nesses critérios, nós observamos a hipometilação de 25 genes e hipermetilação de 2 genes (**Figura 2A**). Estes dados sugerem que os promotores de genes da via da autofagia estão disponíveis para transcrição. Além disso, assim como para os níveis de expressão, o desvio padrão da variação relativa aumentou entre os genes no estágio 4 em comparação com os demais estágios (**Figura 2A**). Finalmente, o status de metilação apresentou um perfil mais homogêneo do que a expressão gênica (**Figura S2**).

Após, nós correlacionamos os níveis de metilação com os níveis de expressão gênica. O cálculo do coeficiente de correlação de Pearson feito entre os valores de expressão gênica e a metilação para cada gene resultou em um intervalo de valores desde -0,945 até 0,986 (correlações fortes, negativa e positiva respectivamente). Quanto à significância estatística dessas correlações, apenas 5 das 35 correlações analisadas mostraram $p<0,05$; correlações negativas: *ATG4B*, *ATG12*, *WIPI1* e *SNX4*; correlação positiva: *MAP1LC3A* (**Figura 2B**). Os gráficos das correlações significativas são mostrados na **Figura 2B.** Estes dados sugerem que, para a maioria dos principais genes de autofagia, não há correlação entre níveis de expressão gênica e status de metilação dos promotores. Portanto, é possível esperar que outros mecanismos, epigenéticos ou não, participem da regulação da expressão desses genes.

Por fim, nós avaliamos a variação de metilação entre os estágios da progressão tumoral. Valores entre 0,2 e 0,8 podem ser utilizados para esta análise, baseando-se em um valor de limiar de diferença mínima *(minimum difference threshold)* de 0,05 a 0,15 (Du et al, 2010). Através desta base de análise, nós observamos um aumento da metilação do promotor de *AMBRA-1* na transição do estágio III para estágio IV (**Figura 2A, retângulo vermelho**).

A

ULK1	ULK2	ATG2A	ATG2B	ATG3	ATG4A**	ATG4B	ATG4C	ATG4D	ATG5	BECN1	ATG7	GABARAP	GABARAPL1	GABARAPL2	MAP1LC3A	MAP1LC3B	ATG9A	ATG9B
0,27	0,69	0,053	0,023	0,037	0,048	0,033	0,095	0,427	0,223	0,03	0,362	0,046	0,098	0,084	0,385	0,031	0,074	0,822
0,26	0,73	0,055	0,022	0,033	0,048	0,031	0,085	0,426	0,221	0,032	0,341	0,047	0,078	0,086	0,37	0,031	0,072	0,63
0,27	0,72	0,053	0,023	0,034	0,053	0,031	0,075	0,423	0,208	0,033	0,338	0,048	0,077	0,078	0,353	0,032	0,073	0,608
0,27	0,72	0,052	0,023	0,035	0,049	0,03	0,071	0,425	0,213	0,031	0,342	0,048	0,08	0,077	0,357	0,032	0,072	0,593
0,27	0,67	0,052	0,024	0,034	0,31	0,031	0,071	0,427	0,205	0,034	0,355	0,044	0,085	0,069	0,338	0,032	0,073	0,755

ATG10	ATG12	ATG16L1	ATG16L2	RB1CC1	WIPI1	WIPI2	SNX30	SNX4	BCL2L13	ACBD5	SQSTM1	NBR1	WDFY3	AMBRA1	BCL2
0,055	0,088	0,387	0,034	0,033	0,477	0,436	0,179	0,11	0,043	0,07	0,135	0,094	0,386	0,482	0,05
0,064	0,071	0,378	0,032	0,032	0,474	0,43	0,154	0,12	0,046	0,062	0,123	0,12	0,379	0,516	0,05
0,062	0,073	0,378	0,034	0,032	0,471	0,434	0,136	0,11	0,044	0,066	0,119	0,134	0,383	0,508	0,05
0,063	0,074	0,379	0,034	0,031	0,468	0,434	0,139	0,11	0,043	0,061	0,121	0,125	0,391	0,494	0,05
0,06	0,084	0,379	0,034	0,032	0,471	0,437	0,254	0,12	0,04	0,052	0,122	0,111	0,399	0,577	0,05

Hypomethylated
Hypermethylated

B

ULK1	ULK2	ATG2A	ATG2B	ATG3	ATG4A	ATG4B	ATG4C	ATG4D	ATG5	BECN1	ATG7	GABARAP	GABARAPL1	GABARAPL2	MAP1LC3A	MAP1LC3B	ATG9A	ATG9B
1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
0,989	1,057	1,038	0,957	0,892	1,000	0,939	0,895	0,998	0,991	1,067	0,942	1,022	0,796	1,024	0,961	1,000	0,973	0,766
1,000	1,051	1,000	1,000	0,919	1,104	0,939	0,789	0,991	0,933	1,100	0,934	1,043	0,786	0,929	0,917	1,032	0,986	0,740
1,000	1,039	0,981	1,000	0,946	1,021	0,909	0,747	0,995	0,955	1,033	0,945	1,043	0,816	0,917	0,927	1,032	0,973	0,721
1,008	0,968	0,981	1,043	0,919	6,458	0,939	0,747	1,000	0,919	1,133	0,981	0,957	0,867	0,821	0,878	1,032	0,986	0,918

ATG10	ATG12	ATG16L1	ATG16L2	RB1CC1	WIPI1	WIPI2	SNX30	SNX4	BCL2L13	ACBD5	SQSTM1	NBR1	WDFY3	AMBRA1	BCL2
1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
1,164	0,807	0,977	0,941	0,970	0,994	0,986	0,860	1,018	1,070	0,886	0,911	1,277	0,982	1,071	1,000
1,127	0,830	0,977	1,000	0,970	0,987	0,995	0,760	0,982	1,023	0,943	0,881	1,426	0,992	1,054	0,962
1,145	0,841	0,979	1,000	0,939	0,981	0,995	0,777	0,965	1,000	0,871	0,896	1,330	1,013	1,025	0,943
1,091	0,955	0,979	1,000	0,970	0,987	1,002	1,419	1,053	0,930	0,743	0,904	1,181	1,034	1,197	1,000

MÉDIA	DP	CV
1,00	0,00	0,0
0,98	0,10	0,1
0,97	0,12	0,1
0,96	0,11	0,1
1,14	0,93	0,8

C

Gene	Correlação	Signif.
ATG4B	-0,945	0,015
ATG12	-0,917	0,028
WIPI1	-0,917	0,029
SNX4	-0,901	0,037
ATG16L1	-0,840	ns
SQSTM1	-0,786	ns
ATG9B	-0,748	ns
SNX30	-0,733	ns
RB1CC1	-0,683	ns
ATG3	-0,639	ns
ATG9A	-0,563	ns
ATG5	-0,533	ns
GABARAPL2	-0,532	ns
ATG7	-0,530	ns
ATG2B	-0,508	ns
WIPI2	-0,446	ns
BCL2	-0,424	ns
ATG16L2	-0,378	ns
ULK1	-0,318	ns
ATG4C	-0,304	ns
ATG4D	-0,280	ns
AMBRA1	-0,101	ns
WDFY3	-0,098	ns
ATG2A	0,394	ns
BECN1	0,459	ns
ATG4A	0,493	ns
NBR1	0,512	ns
ULK2	0,584	ns
BCL2L13	0,609	ns
MAP1LC3B	0,740	ns
GABARAP	0,743	ns
ACBD5	0,776	ns
GABARAPL1	0,786	ns
ATG10	0,841	ns
MAP1LC3A	0,986	0,002

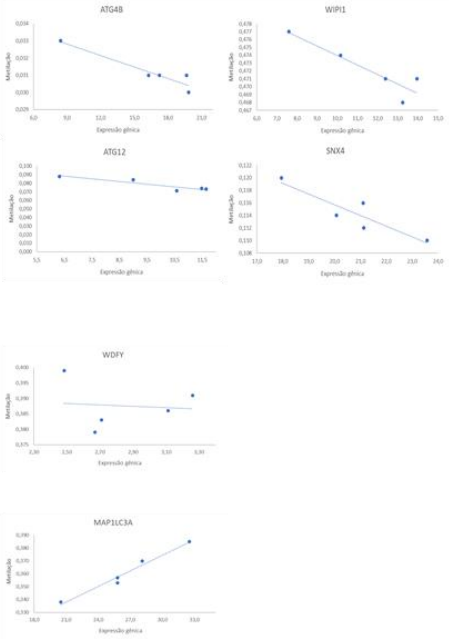

Figura 2 – Quantificação da metilação do promotor gênico e correlação expressão-metilação. (A) Valores de metilação para cada gene e estágio tumoral, sendo a primeira linha para o tecido normal, a segunda para o estágio 1, a terceira para o estágio 2, a quarta para o estágio 3 e a quinta para o estágio 4. (B) Variação da metilação de cada estágio em relação ao tecido normal, as linhas seguem a mesma lógica em A. DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação. (C) Valores de correlação de Pearson entre os níveis de expressão e de metilação dos estágios para cada gene, com gráficos demonstrativos.

3.3 Impacto dos níveis de expressão dos genes de autofagia na sobrevida no HCC

Em seguida, nós analisamos a influência dos níveis de expressão dos genes na sobrevida dos pacientes com HCC. Para isso, foi realizada a construção de Kaplan-Meier de todos os 35 genes já mencionados para a análise da diferença de sobrevida, segregando os pacientes dos terços superior (grupo *high*) e inferior (grupo *low*) dos da curva de expressão (em FPKM). Na análise da mediana de sobrevida total (mOS) obtida a partir disso, retornaram cinco genes com valor de p significativo (<0,05) **(Figuras 3A e S3)**. Foram eles: *ATG4A*, *GABARAPL1*, *BCL2L13* e *ACBD5*, cuja alta expressão foi associada a maior sobrevida; e *SQSTM1*, cuja alta expressão foi associada à menor sobrevida **(Figuras 3A e 3B)**. Para fins de validação, nós incluímos também a análise de prognóstico de *MMP9*, gene sabidamente associado à sobrevida no HCC (Nart et al, 2010).

Nós também separamos os pacientes em baixo grau (estágios 1+2) e alto grau (estágios 3+4) para análise da sobrevida. A partir dessa segregação, nós observamos que altos níveis de expressão de *BCL2L13* e baixos níveis de *ATG10* e *ATG12* associaram-se à maior sobrevida em tumores de baixo grau. Para os tumores de alto grau, altos níveis de *ATG4A* e *ACBD5* e baixos níveis de *ATG9B* associaram-se a melhor sobrevida **(Figura S4)**.

Por fim, nós buscamos avaliar a associação entre sobrevida total e assinaturas de expressão gênica contendo todos os 35 genes **(Figura 3C - esquerda)**, ou os 5 genes com resultado significativo **(Figura 3C - meio)**, ou ainda apenas os 4 genes com alta expressão associada à sobrevida maior **(Figura 3C - direita)**. Na análise com todos os 35 genes, o grupo *low* obteve uma sobrevida maior do que o grupo *high*. Por outro lado, considerando as demais assinaturas não observamos diferença significativa na sobrevida.

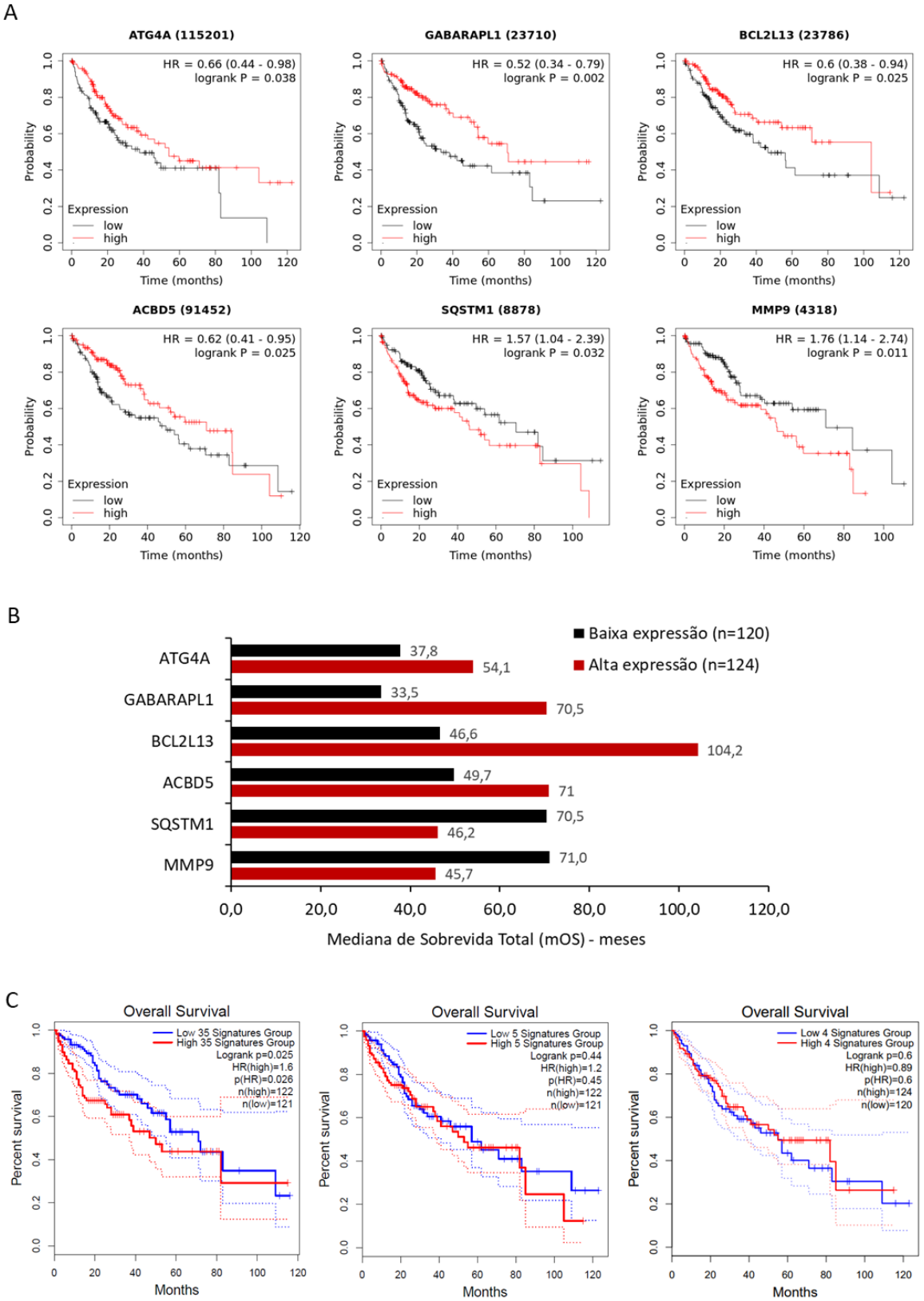

Figura 3 – Curvas KM de sobrevida e mOS dos genes com *p* significativo e assinaturas gênicas para grupos de genes. (A) Kaplan-Meier dos genes com diferença significativa entre os grupos de mais alta e mais baixa expressão. *MMP9* foi adicionado como controle positivo semelhante a *SQSTM1*. (B) Medianas de sobrevida total após o primeiro tratamento correspondentes aos mesmos genes em A. (C) Assinaturas geradas para os 35 genes do trabalho, para os 5 genes significativos em A (exceto *MMP9*) e para os 4 genes significativos em A cujo grupo de alta expressão teve mOS maior.

3.4 Prognóstico e Células do sistema Imunológico

A composição do microambiente tumoral do HCC pode influenciar no prognóstico dos pacientes (Chew et al, 2009, Xue et al, 2022). Entre os mecanismos que afetam o fenótipo de células imunológicas, incluindo atividade, perfil secretor e infiltração no microambiente tumoral está a autofagia (Jiang et al, 2019, Hashemi et al, 2023). Porém, a relação entre o processo autofágico e células imunológicas no prognóstico do HCC ainda não é compreendida. Assim, nós investigamos de forma preliminar a influência da infiltração de células citotóxicas (linfócitos T CD8+ e células NK) no papel prognóstico dos genes de autofagia anteriormente encontrados como associados à maior sobrevida no HCC (*ATG4A, GABARAPL1, ACBD5, BCL2L13 e SQSTM1*).

Em relação a quantidade de células citotóxicas no microambiente tumoral, nós analisamos a sobrevida dos pacientes estratificando os mesmos para maior e menor presença de linfócitos T CD8+ e linfócitos *Natural Killers* (NK) **(Figura S3)**. Para o gene *ATG4A*, entre os pacientes com tumores enriquecidos em linfócitos T CD8+, maiores níveis de expressão foram associados com maior sobrevida, assim como observado para todos os pacientes, sem estratificação. Para *GABARAPL1*, os tumores com menor infiltração de linfócitos T CD8+ ou maior infiltração de NK apresentaram maior sobrevida no grupo com maior expressão do gene. Ainda, para *SQSTM1*, os pacientes com microambientes mais pobres em linfócitos T CD8+ tiveram maior sobrevida no grupo de baixa expressão do gene. Da mesma forma, pacientes com maior quantidade de células NK infiltrantes tiveram maior sobrevida no grupo de baixa expressão do gene. Para as demais condições, não houve diferença significativa de prognóstico para os pacientes levando-se em consideração os níveis de infiltração de linfócitos T CD8+ e células NK. Por fim, para os genes *BCL2L13* e *ACBD5*, os níveis de infiltração de células citotóxicas não influenciaram no fator prognóstico dos genes.

3.5 Alterações genéticas em genes de autofagia no HCC

Apesar da relevância, a genética de genes de autofagia é muito pouco conhecida no câncer (Li et al, 2020, Debnath et al, 2023). Nós então avaliamos a frequência de alterações genéticas nos genes de autofagia em cerca de 1015 amostras disponíveis no banco de dados COSMIC (acesso em 06/2023). Nós incluímos os 3 genes com maior frequência de mutações no HCC (*TP53*, *CTNNB1* e *AXIN1*) a título de comparação. Como mostrado na **Figura 4**, 21 dos nossos genes apresentaram frequência de mutações abaixo de 1%. Dos demais, o gene com maior frequência de mutações foi o *WDFY3* (3,5%), seguido dos genes *ATG5* (2,8%) e *ATG2B* (2,6%). Nenhum ARG pesquisado apresentou frequência superior a 4% de mutações. Este resultado demonstra uma baixa frequência de alterações genéticas em genes centrais de autofagia em HCC.

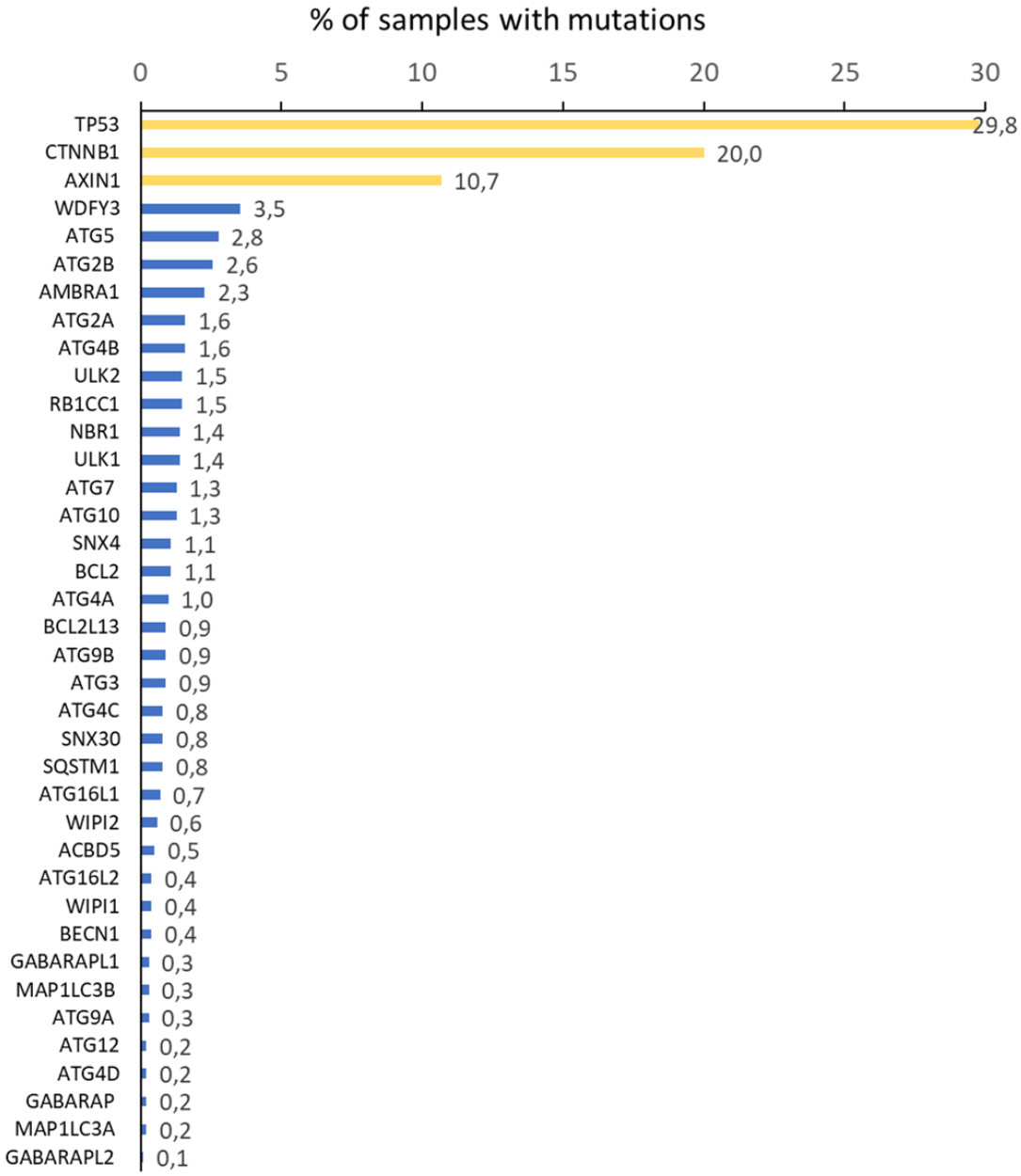

Figura 4 – Alterações genéticas dos ARG. Valor percentual de amostras com mutações genéticas para cada um dos ARG estudados em comparação com os genes *TP53*, *CTNNB1* e *AXIN1*, genes conhecidamente com alta taxa de mutações com relevância em HCC.

4 Discussão

O HCC é a principal neoplasia maligna de fígado e representa quase 10% das mortes por câncer. O papel do funcionamento dos genes da autofagia no desenvolvimento do HCC e potencial prognóstico na sobrevida dos pacientes não é bem esclarecido (Chao et al, 2020). Neste trabalho nós buscamos investigar o potencial prognóstico de genes envolvidos na autofagia na sobrevida de pacientes de HCC através de dados públicos validados, disponíveis online. Para isso, nós combinamos análises de expressão gênica diferencial, metilação diferencial, sobrevida associada à expressão e perfil de alterações genéticas dos 35 principais genes envolvidos no controle e execução da autofagia (ARG). Nós observamos uma baixa taxa de mutações para os genes investigados, muito menor do que as taxas de genes *drivers* conhecidos do HCC. Considerando a expressão diferencial, observamos variados perfis para os genes investigados. De modo geral, o perfil mais prevalente foi de aumento da expressão entre tecido normal e primeiro estágio tumoral. A partir de lesões estágio I até lesões de Estágio IV, de modo geral observamos uma redução na quantidade de alterações significativas níveis de expressão. É importante ressaltar que tumores de estágios mais avançados apresentaram maior variância nos níveis de expressão dos genes, sugerindo maior heterogeneidade tumoral ao longo da progressão tumoral. Observamos ainda uma baixa correlação entre a variação da expressão e a da metilação do promotor dos genes, e 5 genes com expressão significativamente associada a maior sobrevida dentre os 35 ARG estudados.

Considerando a expressão diferencial ao longo da progressão tumoral, observamos uma grande variação entre os genes considerando que no primeiro estágio a maioria teve aumento significativo em relação ao tecido normal. Apenas um gene, MAP1LC3B, mostrou diferença significativa de expressão entre pelo menos três estágios. Em 2008, Ding et al. encontraram expressão gênica, e sua correspondente atividade autofágica, diminuída em genes da autofagia (especialmente *BECN1* e *ATG5*) em linhagens celulares de HCC em comparação com linhagem celular hepática normal. A expressão também se mostrou menor no grupo de tumores de alto grau em relação aos de baixo grau, se assemelhando ao que encontramos nas nossas análises para *BECN1*. Al-Shenawy (2016) e Qiu et al. (2014) também encontraram menor expressão de *BECN1* em tumores primários de HCC em comparação ao tecido normal, embora estivesse aumentada em casos de hepatite crônica, condição que comumente antecede e aumenta o risco de desenvolvimento do HCC. Entretanto, esses resultados foram obtidos *in vitro* ou com amostras pequenas. Estudos mais recentes, com maior número de indivíduos e abrangendo mais genes da via autofágica, vêm mostrando resultados diferentes. Uma metanálise de Meng et al. (2020) demonstrou que a expressão de LC3 se correlaciona positivamente com o tamanho do tumor (HCC) e *overall survival*, mas não foi encontrada associação com cirrose ou grau histológico. Huo et al. (2020) e Zhu et al. (2020) encontraram 62 ARG diferencialmente expressos em tecido hepático normal e HCC (de 232 analisados) nos

dados do TCGA, incluindo 58 *upregulated* e 4 *downregulated*. Já Feng et al. (2021) acharam 42 ARG diferencialmente expressos entre 222 analisados, estando 37 *upregulated* e 5 *downregulated*. Nossos resultados corroboram em parte os dados destes 3 trabalhos, indicando aumento da expressão na via autofágica para a maioria dos genes analisados. Porém, é importante ressaltar que na nossa análise foram incluídos somente genes envolvidos diretamente no controle da autofagia. Além disso, nós segregamos as amostras de acordo com os estágios tumorais e analisamos a expressão diferencial ao longo da progressão tumoral.

Apesar de relevantes, as análises de expressão diferencial utilizam majoritariamente valores médios de expressão, negligenciando um aspecto fundamental da biologia do câncer que é a heterogeneidade intertumoral. De fato, no HCC esta característica é ainda pouco descrita, mesmo sendo de grande importância clínica, assim como a heterogeneidade intratumoral, ainda mais complexa de ser explorada (Liu et al, 2018; Losic et al, 2020; Chan et al, 2022). Neste contexto, nós observamos uma variância claramente crescente nos níveis de expressão dos genes de autofagia ao longo da progressão tumoral, sugerindo maior heterogeneidade da autofagia entre os tumores de estágio IV. De nosso conhecimento, nosso trabalho é o primeiro a demonstrar heterogeneidade nos níveis de genes de autofagia na progressão do HCC. Em câncer gástrico, Yoon et al. (2021) não observaram diferença significativa na heterogeneidade de níveis de *SQSTM1* e *LAMP2* entre mucosa gástrica normal, mucosa gástrica displásica e adenocarcinoma gástrico (Yoon e col, 2021 - doi.org/10.3389/fonc.2021.555614).

Adicionalmente às análises de expressão diferencial, nós também analisamos a incidência de alterações genéticas no HCC. Porém, ao contrário da grande variação na expressão gênica, a taxa de mutações encontrada foi baixa. Essa observação reforça a importância do papel de mecanismos de controle da expressão (como por ex. metilação) nas variações da autofagia ao longo da progressão do HCC. De fato, mecanismos epigenéticos permitem maior plasticidade e adaptabilidade das células tumorais a condições adversas do microambiente tumoral e resposta à terapia (Easwaran et al, 2014). Pelo que sabemos, este é o primeiro trabalho que investigou o perfil de metilação de genes de autofagia ao longo a progressão do HCC. Considerando os 35 ARG analisados, somente para 4 deles (*ATG4B, ATG12, WIPI1* e *SNX4*) nós observamos importante correlação negativa entre níveis de expressão e metilação do promotor, sugerindo um possível papel da metilação no controle da expressão destes genes. Corroborando esta hipótese, o controle epigenético da autofagia envolve especialmente as metiltransferases EZH2 e CARM1, que remodelam a cromatina modulando a expressão dos genes autofágicos, como em casos de privação de glicose. Enquanto a ativação de CARM1 leva à autofagia sustentada por meio da via da AMPK, a ativação de EZH2 suprime a autofagia (Wei et al, 2015; Shin et al, 2016). A mTORC1, assim como AMPK, são os dois sensores principais de mudanças no ambiente celular que determinam a resposta autofágica da célula. Ainda assim, apesar da importância regulatória, o controle epigenético desta via no contexto da autofagia é pouco entendido (Shi et al, 2021). Mais recentemente, outras proteínas envolvidas no controle epigenético da autofagia em HCC foram

descritas. Lin et al. (2020) observaram uma relação positiva entre a ativação de vias da autofagia, resistência a sorafenib e angiogênese com a depleção da metiltransferase METTL3 sob hipóxia, contexto sabidamente pró-autofágico. Este mecanismo envolve a metilação do mRNA de *FOXO3* pela enzima, alterando sua estabilidade. Esta mesma enzima promove o crescimento e metástase do câncer de pâncreas pela modificação de E2F5 (Tang et al, 2022), um inibidor de autofagia (Li H et al, 2021). De forma parecida, em HCC, a metilação do promotor de *BCL2L10* (*Bcl-2-like protein 10*) está associada com a expressão diminuída de BCL2L10, de modo que a superexpressão dessa proteína em células de hepatoma restauraram a autofagia via AMPK e inibiu a proliferação celular e crescimento tumoral em modelos murinos (He et al, 2019).

Para os demais genes em que não observamos correlação entre níveis de metilação e níveis de expressão gênica, é plausível inferirmos que outros mecanismos epigenéticos que não a metilação participem dessa regulação gênica, como a acetilação. De fato, depleção de HDAC1 em células de HCC provoca diminuição da proliferação celular e ativação de morte celular induzida por autofagia (Xie et al, 2012). SAHA ou OSU-HDAC42, dois inibidores de HDAC, também induziram autofagia e morte celular autofágica em células de carcinoma hepatocelular, reprimindo a via de sinalização AKT/mTOR. De fato, a morte celular induzida por iHDAC foi limitada pelo inibidor de autofagia 3-MA ou pela inibição da expressão de *ATG5*. Corroborando esta observação, a inibição da autofagia usando siBECN1 em linhagens celulares de hepatoma aumentou a apoptose induzida pelo cotratamento SAHA-sorafenibe**.** Concluindo, é possível concluir que múltiplos mecanismos epigenéticos contribuam para o status autofágico do HCC, tanto em condições basais quanto em contextos estressores (Peixoto et al, 2019). Apesar das evidências citadas, nenhum trabalho investigou experimentalmente se os genes centrais do controle da autofagia (por ex. da família ATG) são modificados epigeneticamente pelas enzimas citadas acima ou outras.

Nos nossos resultados, apesar da baixa quantidade relativa de genes significativamente associados à sobrevida (14%), dentre estes preponderou a alta expressão gênica como indicador de maior sobrevida (4 dos 5), ao contrário do que poderia ser esperado segundo a lógica reatada acima. Dentre os poucos artigos que exploraram o papel prognóstico dos ARG até então, todos que nós encontramos utilizaram a base de dados do TCGA e foram publicados desde 2020. Ainda, os genes incluídos em basicamente todos os artigos foram os 232 que estão descritos no HADb como genes com alguma evidência de atuação na autofagia. Apesar de todos os genes do nosso estudo estarem contidos no HADb, a maioria dos 232 genes não tem ação direta demonstrada na via principal da autofagia, tendo também relações com diversos outros processos celulares, como a via de sinalização da apoptose, resposta celular a estímulos externos e regulação da atividade de quinases. Zhu et al. (2020) identificaram 32 ARG correlacionados com a sobrevida (mOS), por meio de regressão univariada e, dentre esses, 8 foram identificados como fatores independentes de risco por regressão multivariada para compor o modelo de prognóstico. Apenas *ATG4B*, *ATG10* e *SQSTM1* estavam tanto neste conjunto de genes quanto nos genes que nós

investigamos. Qin et al. (2021) encontraram resultados bastante similares a partir de uma estratégia semelhante de análise, com 34 ARG correlacionados à OS, sendo 3 deles fatores independentes de risco (*PRKCD*, *BIRC5* e *ATIC*). Os mesmos 3 genes encontrados no nosso estudo citados acima aparecem na lista de 34 genes do estudo de Qin et al. Já Huo et al. (2020) obtiveram os mesmos 34 ARG correlacionados à OS, dos quais 5 (*HDAC1, RHEB, ATIC, SPNS1* e *SQSTM1*) entraram no modelo de prognóstico final. Estudos parecidos em dados de adenocarcinoma pancreático (Deng et al, 2022) e carcinoma esofágico (Du et al, 2021) do TCGA não retornaram nenhum ARG associado à sobrevida em comum com a nossa lista. Fica claro que as análises feitas nesses trabalhos partiram de uma seleção de genes bastante ampla com o objetivo de escanear bons candidatos de predição do prognóstico. Porém, essa amplitude implica que a maioria dos genes encontrados como tal ou modulam a autofagia de maneira indireta ou tem funções pleiotrópicas, agindo tanto sobre a autofagia quanto em outros processos celulares importantes. Como exemplos, podemos citar a proteína TP53, que controla inúmeros processos como reparo de DNA, progressão no ciclo celular, apoptose e senescência, e as proteínas da família BCL-2, controladoras da apoptose. Desse modo, genes com este perfil possuem pouco potencial como alvos de intervenção com o intuito de modular a autofagia. Da mesma forma, a associação entre os níveis destes genes e a atividade ou potencial de autofagia de uma amostra é frágil. Por fim, outro aspecto limitante destes trabalhos diz respeito à separação dos pacientes nos grupos ‘alta expressão’ e ‘baixa expressão’, uma vez que ou segregam os mesmos a partir da mediana (o que cria um limiar de separação matemático, porém com limitação biológica) ou aplicaram a melhor separação estatística (*best cut-off*), o que dificulta uma translação clínica compreensível do resultado.

Referências

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):229-237. doi:10.1111/apm.12498

Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, et al. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics*. 2010;65(12):1285-1290. doi:10.1590/S1807-59322010001200010

Chan LK, Tsui YM, Ho DW, Ng IO. Cellular heterogeneity and plasticity in liver cancer. *Semin Cancer Biol*. 2022;82:134-149. doi:10.1016/j.semcancer.2021.02.015

Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, et al. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*. 2017;19(8):649-658. doi:10.1016/j.neo.2017.05.002

Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*. 2022; 25:18-27. doi:10.1016/j.neo.2022.01.001

Chao X, Qian H, Wang S, Fulte S, Ding WX. Autophagy and liver cancer. *Clin Mol Hepatol*. 2020;26(4):606-617. doi:10.3350/cmh.2020.0169

Chew V, Tow C, Teo M, et al. Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol*. 2010;52(3):370-379. doi:10.1016/j.jhep.2009.07.013

Ding ZB, Shi YH, Zhou J, et al. Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008;68(22):9167-9175. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1573

Debnath J, Gammoh N, Ryan KM. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2023, 24, 560–575. doi:10.1038/s41580-023-00585-z

Deng J, Zhang Q, Lv L, et al. Identification of an autophagy-related gene signature for predicting prognosis and immune activity in pancreatic adenocarcinoma. *Sci Rep 2022,* 12, 7006. doi:10.1038/s41598-022-11050-w

Du H, Xie S, Guo W, Che J, Zhu L, Hang J, Li H. Development and validation of an autophagy-related prognostic signature in esophageal cancer. *Ann Transl Med* 2021;9(4):317. doi:10.21037/atm-20-4541

Du P, Zhang X, Huang CC, et al. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics* 2010. 11, 587 . doi:10.1186/1471-2105-11-587

Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell*. 2014;54(5):716-727. doi:10.1016/j.molcel.2014.05.015

European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma [published correction appears in J Hepatol. 2019 Apr;70(4):817]. *J Hepatol*. 2018;69(1):182-236. doi:10.1016/j.jhep.2018.03.019

Feng R, Li J, Xuan W, et al. An Autophagy-Related Gene-Based Prognostic Risk Signature for Hepatocellular Carcinoma: Construction and Validation. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2021, vol. 2021, Article ID 5770228, 11 pages. doi:10.1155/2021/5770228

Hashemi M, Nadafzadeh N, Imani MH, et al. Targeting and regulation of autophagy in hepatocellular carcinoma: revisiting the molecular interactions and mechanisms for new therapy approaches. *Cell Commun Signal* 2023. 21, 32. doi:10.1186/s12964-023-01053-z

He J, Deng L, Liu H, et al. *BCL2L10/BECN1* modulates hepatoma cells autophagy by regulating PI3K/AKT signaling pathway. *Aging* (Albany NY) 2019;11(2):350-370. doi:10.18632/aging.101737

Huo X, Qi J, Huang K, et al. Identification of an autophagy-related gene signature that can improve prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *BMC Cancer* 2020. 20, 771. doi:10.1186/s12885-020-07277-3

Jiang GM, Tan Y, Wang H, et al. The relationship between autophagy and the immune system and its applications for tumor immunotherapy. *Mol Cancer* 2019. 18(17). doi:10.1186/s12943-019-0944-z

Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 2021;17(1):1-382. doi:10.1080/15548627.2020.1797280

Lánczky A, Győrffy B. Web-Based Survival Analysis Tool Tailored for Medical Research (KMplot): Development and Implementation. *J Med Internet Res*. 2021;23(7):e27633. Published 2021 Jul 26. doi:10.2196/27633

Li H, Zhao S, Shen L, et al. E2F2 inhibition induces autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway in gastric cancer. *Aging* (Albany NY) 2021 Apr 21; 13:13626-13643. doi:10.18632/aging.202891

Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer* 2020. 19, 12. doi:10.1186/s12943-020-1138-4

Lin Z, Yi N, Arabella W, et al. RNA m6A methylation regulates sorafenib resistance in liver cancer through FOXO3-mediated autophagy. *EMBO J.* 2020;39(12):0261-4189. doi:10.15252/embj.2019103181

Liu J, Dang H, Wang X. The significance of intertumor and intratumor heterogeneity in liver cancer. *Exp Mol Med* 2018. 50, e416. doi:10.1038/emm.2017.165

Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2021 7(6). doi:10.1038/s41572-020-00240-3

Losic B, Craig AJ, Villacorta-Martin C, et al. Intratumoral heterogeneity and clonal evolution in liver cancer. *Nat Commun* 2020. 11, 291. doi:10.1038/s41467-019-14050-z

Meng YC, Lou XL, Yang LY, et al. Role of the autophagy-related marker LC3 expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2020. 146, 1103–1113. doi:10.1007/s00432-020-03174-1

Nart D, Yaman B, Yılmaz F, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Liver Transpl* 2010, 16: 621-630. doi:10.1002/lt.22028

Nishiyama A, Nakanishi M. Navigating the DNA methylation landscape of cancer. *Trends Genet.* 2021 Nov;37(11):1012-1027. doi: 10.1016/j.tig.2021.05.002.

Peixoto P, Grandvallet C, Feugeas J-P, Guittaut M, Hervouet E. Epigenetic Control of Autophagy in Cancer Cells: A Key Process for Cancer-Related Phenotypes. *Cells*. 2019; 8(12):1656. doi:10.3390/cells8121656

Qin F, Zhang J, Gong J, Zhang W. Identification and Validation of a Prognostic Model Based on Three Autophagy-Related Genes in Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Research International* 2021, vol. 3(1)111:114. doi:10.1155/2021/5564040

Qiu DM, Wang GL, Chen L et al. The expression of beclin-1, an autophagic gene, in hepatocellular carcinoma associated with clinical pathological and prognostic significance. *BMC Cancer* 2014;14, 327. doi:10.1186/1471-2407-14-327

Ringelhan M, McKeating JA, Protzer U. Viral hepatitis and liver cancer [published correction appears in Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2018 Jan 5;373(1737):]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;372(1732):20160274. doi:10.1098/rstb.2016.0274

Shi Y, Shen H-M, Gopalakrishnan V and Gordon N. Epigenetic Regulation of Autophagy Beyond the Cytoplasm: A Review. *Front. Cell Dev. Biol* 2021. 9:675599. doi: 10.3389/fcell.2021.675599

Shin HJR, Kim H, Kim KI, Baek SH Epigenetic and transcriptional regulation of autophagy. *Autophagy* 2016;12:11, 2248-2249, doi:10.1080/15548627.2016.1214780

Shinawi T, Hill VK, Krex D, et al. DNA methylation profiles of long- and short-term glioblastoma survivors. *Epigenetics* 2013;8(2):149-156. doi:10.4161/epi.23398

Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Laversanne, M, Soerjomataram, I, Jemal, A, Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021: 71: 209-249. doi:10.3322/caac.21660

Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D941-D947. doi:10.1093/nar/gky1015

Tang Y, Gao G, Xia WW, Wang JB. METTL3 promotes the growth and metastasis of pancreatic cancer by regulating the m6A modification and stability of E2F5. *Cellular Signalling* 2022, 110440, ISSN 0898-6568, doi:10.1016/j.cellsig.2022.110440

Tang Z, Kang B, Li C, et al. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis, *Nucleic Acids Research 2019*; 47(1)W556–W560, doi:10.1093/nar/gkz430

Xie HJ, Noh JH, Kim JK, Jung KH, Eun JW, Bae HJ, et al. HDAC1 Inactivation Induces Mitotic Defect and Caspase-Independent Autophagic Cell Death in Liver Cancer. *PLoS ONE* 2012.7(4): e34265. doi:10.1371/journal.pone.0034265

Xue JS, Ding ZN, Meng GX, et al. The Prognostic Value of Natural Killer Cells and Their Receptors/Ligands in Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* 2022;13:872353. doi: 10.3389/fimmu.2022.872353

Wei FZ, Cao Z, Wang X, et al. Epigenetic regulation of autophagy by the methyltransferase EZH2 through an MTOR-dependent pathway. *Autophagy* 2015; 11:12, 2309-2322, doi:10.1080/15548627.2015.1117734

Yang S, Yang L, Li X, et al. New insights into autophagy in hepatocellular carcinoma: mechanisms and therapeutic strategies. *Am J Cancer Res*. 2019;9(7):1329-1353.

Yoon JY, Brezden-Masley C, Streutker CJ. Autophagic Heterogeneity in Gastric Adenocarcinoma. *Front. Oncol.* 2021; 11:555614. doi: 10.3389/fonc.2021.555614

Zhu Y, Wang R, Chen W, Chen Q, Zhou J. Construction of a prognosis-predicting model based on autophagy-related genes for hepatocellular carcinoma (HCC) patients. *Aging* (Albany NY) 2020; 12:14582-14592. doi:10.18632/aging.103507

FIGURAS SUPLEMENTARES

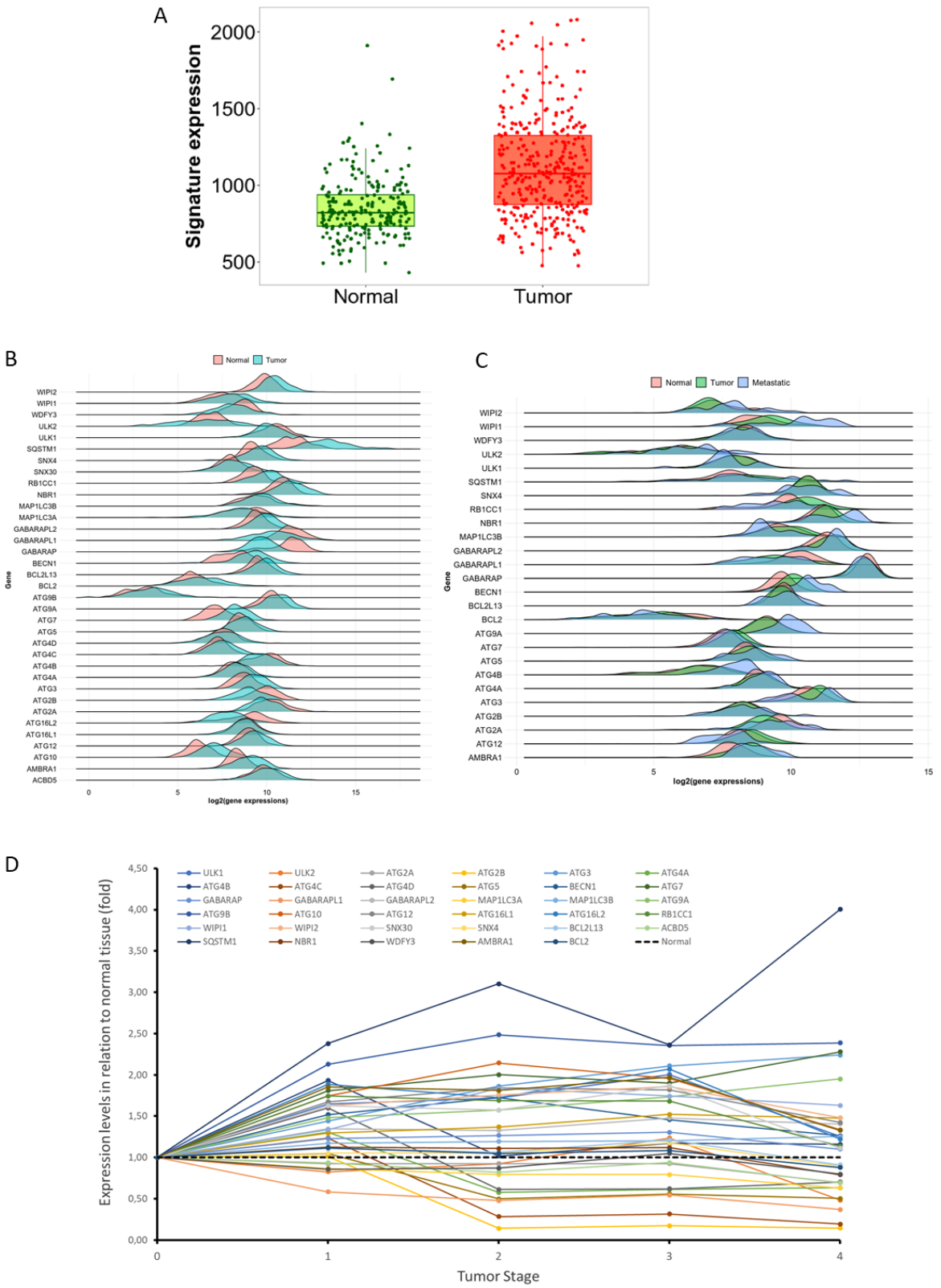

Figura S1 – Expressão (A) Assinatura das expressões de todos os 35 ARG no tecido hepático normal e tumoral. (B) Distribuição dos valores amostrais (log2) de expressão gênica (RNA-seq) no tecido normal e tumoral. (C) Distribuição dos valores amostrais (log2) de expressão gênica (*gene chip*) no tecido normal, tumoral e metástase. (D) Dinâmica dos níveis relativos de expressão dos 35 ARG em relação ao valor médio no tecido normal. Obtenção dos gráficos em A, B e C via GEPIA2.

Estágio	ULK1	ULK2	ATG2A	ATG2B	ATG3	ATG4A**	ATG4B	ATG4C	ATG4D	ATG5	BECN1	ATG7	GABARAP	GABARAPL1	GABARAPL2	MAP1LC3A	MAP1LC3B	ATG9A
0	0,265	0,689	0,053	0,023	0,037	0,048	0,033	0,095	0,427	0,223	0,03	0,362	0,046	0,098	0,084	0,385	0,031	0,074
1	0,262	0,728	0,055	0,022	0,033	0,048	0,031	0,085	0,426	0,221	0,032	0,341	0,047	0,078	0,086	0,37	0,031	0,072
2	0,265	0,724	0,053	0,023	0,034	0,053	0,031	0,075	0,423	0,208	0,033	0,338	0,048	0,077	0,078	0,353	0,032	0,073
3	0,265	0,716	0,052	0,023	0,035	0,049	0,03	0,071	0,425	0,213	0,031	0,342	0,048	0,08	0,077	0,357	0,032	0,072
4	0,267	0,667	0,052	0,024	0,034	0,31	0,031	0,071	0,427	0,205	0,034	0,355	0,044	0,085	0,069	0,338	0,032	0,073

Estágio	ATG9B	ATG10	ATG12	ATG16L1	ATG16L2	RB1CC1	WIPI1	WIPI2	SNX30	SNX4	BCL2L13	ACBD5	SQSTM1	NBR1	WDFY3	AMBRA1	BCL2
0	0,822	0,055	0,088	0,387	0,034	0,033	0,477	0,436	0,179	0,114	0,043	0,07	0,135	0,094	0,386	0,482	0,053
1	0,63	0,064	0,071	0,378	0,032	0,032	0,474	0,43	0,154	0,116	0,046	0,062	0,123	0,12	0,379	0,516	0,053
2	0,608	0,062	0,073	0,378	0,034	0,032	0,471	0,434	0,136	0,112	0,044	0,066	0,119	0,134	0,383	0,508	0,051
3	0,593	0,063	0,074	0,379	0,034	0,031	0,468	0,434	0,139	0,11	0,043	0,061	0,121	0,125	0,391	0,494	0,05
4	0,755	0,06	0,084	0,379	0,034	0,032	0,471	0,437	0,254	0,12	0,04	0,052	0,122	0,111	0,399	0,577	0,053

Figura S2 – Metilação. Valores absolutos de metilação (valor Beta), coloridos em gradação, do mais baixo (VERDE VIVO) ao mais alto (LARANJA VIVO).

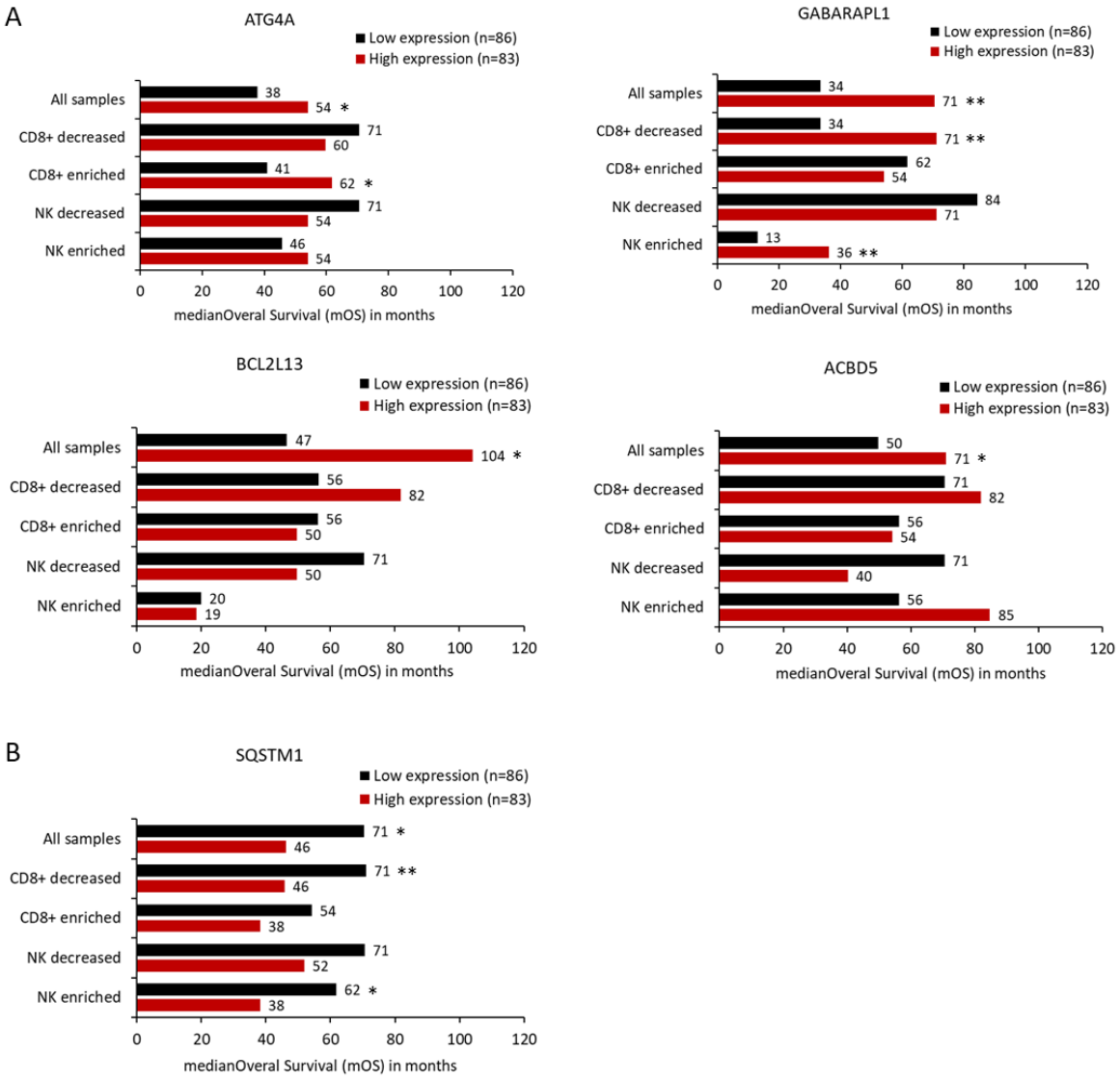

Figura S3 – Sobrevida e microambiente tumoral. Valores medianos de sobrevivência (mOS) dos grupos de alta e baixa expressão conforme categorização do microambiente tumoral como empobrecido ou enriquecido em células imunológicas T CD8+ e *Natural Killers*. (A) Genes com associação significativa entre expressão alta e maior sobrevida. (B) Gene com associação significativa entre expressão baixa e maior sobrevida. *diferença entre grupos com $p \leq 0{,}05$; **diferença entre grupos com $p \leq 0{,}01$.

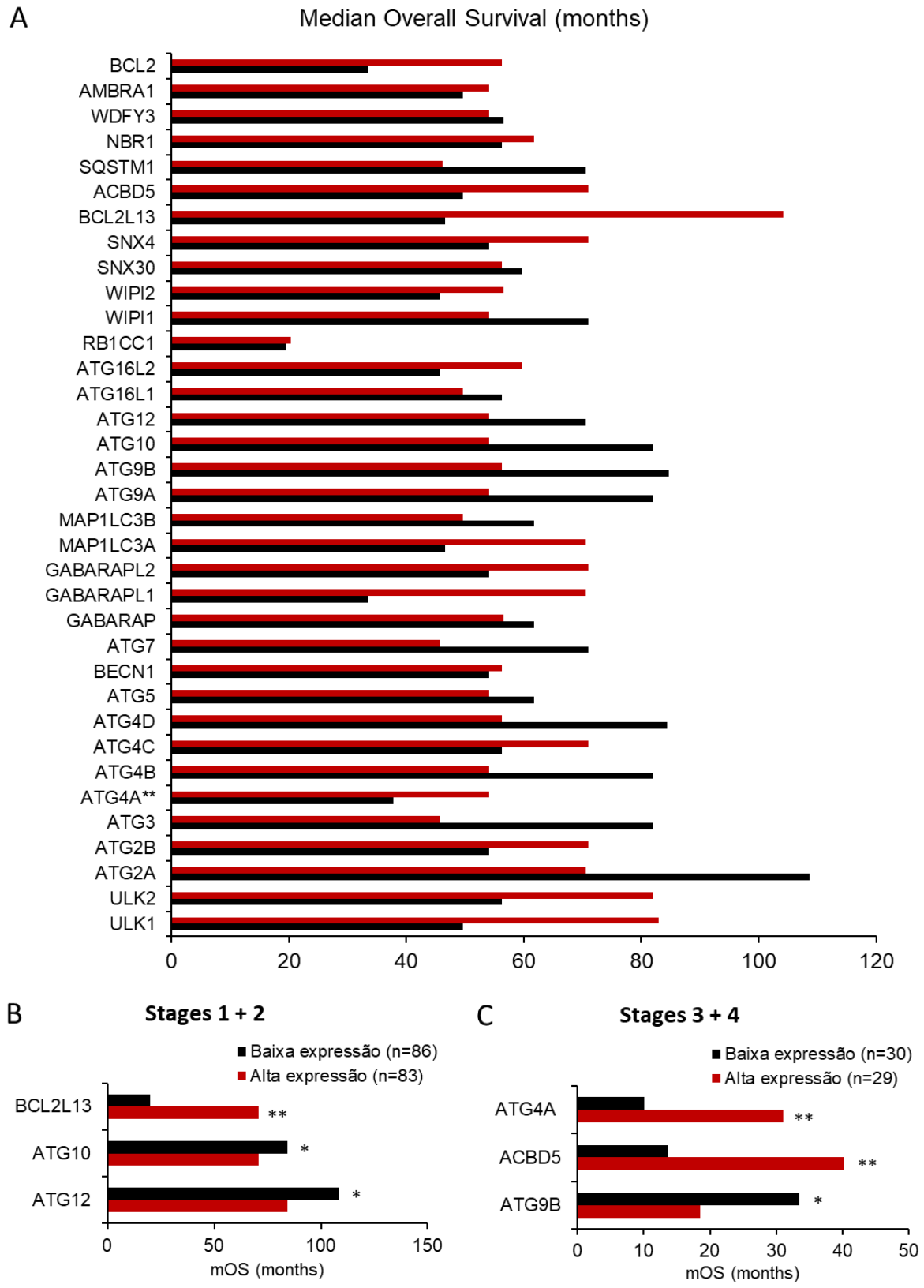

Figura S4 – Sobrevida geral nos ARG e divisão por estágios. (A) Medianas de sobrevivência (mOS) dos grupos de alta e baixa expressão para cada ARG estudado. (B) Genes com diferença significativa entre mOS dos grupos de alta e baixa expressão apenas nos estágios 1 e 2 (C) Genes com diferença significativa entre mOS dos grupos apenas nos estágios 3 e 4. *diferença entre grupos com $p \leq 0{,}05$; **diferença entre grupos com $p \leq 0{,}01$.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Conclusões

O propósito inicial do projeto de iniciação científica que originou este trabalho era prospectar informações biológicas de autofagia de uma amostra clínica relevante de pacientes com neoplasias, especialmente do sistema gastrointestinal, de uma forma simples e relativamente rápida, a fim de buscar confrontar informações e testar algumas relações experimentais encontradas anteriormente em outros trabalhos do grupo de pesquisa na área. Os resultados primários demonstraram que o tipo tumoral mais promissor em relação à associação de expressão da autofagia e sobrevida dos pacientes era, de longe, o carcinoma hepatocelular. De fato, a literatura e os dados produzidos e mostrados neste trabalho indicam que grande parte dos genes da autofagia têm sua expressão em tumores de HCC alterada em relação ao tecido hepático normal, sem neoplasia, sendo esta alteração majoritariamente para maior expressão e mais significativamente nos tecidos em estágios iniciais de progressão do câncer. Entretanto, ainda é difícil definir de forma mais abrangente e clara as causas e consequências dessa alteração, em parte porque os dados usados são limitados a valores amostrais médios, não denotando diretamente a dinâmica molecular que ocorre entre o tecido não neoplásico e o neoplásico e também entre os tecidos em diferentes estágios de progressão do câncer dentro do órgão de cada paciente. Como foi dito no texto, a heterogeneidade entre tumores é um fator relevante e desafiador na compreensão de qualquer tipo de câncer. Assim, em se tratando de estudo de dados de expressão gênica e seu controle epigenético, fatores consideravelmente mais voláteis e, por enquanto, menos esclarecidos sistematicamente do que alterações genéticas como mutações, com base em amostras clínicas que não necessariamente são representativas, embora da maior qualidade e importância até então, podemos dizer que atingimos as limitações técnicas dentro dos objetivos propostos para o trabalho. Essas limitações foram previstas em sua maioria, considerando o tempo disponível para a execução e acessibilidade e viabilidade de ferramentas e do conhecimento delas. Mesmo assim, foi possível estabelecer alguns parâmetros de análise e comparar com a literatura específica, reforçando achados comuns, como a expressão aumentada dos genes relacionados à autofagia no carcinoma hepatocelular, e trazendo novas percepções para a metodologia e para a interpretação dos dados biométricos disponíveis de forma simplificada em plataformas de análise compartilhadas publicamente *online* (como *browsers*).

5.2 Perspectivas

Ao longo do desenvolvimento da pesquisa, algumas novas questões surgiram a partir de certas análises disponíveis, como, por exemplo, em relação ao microambiente tumoral e as células do sistema imunológico (como CD8 positivas e *Natural Killers*, conforme Figura Suplementar 3), que não discutimos em maiores detalhes por limitação de tempo para pesquisa bibliográfica de um tema que não fazia parte dos objetivos iniciais e não conseguimos prever. Este é um tema que acreditamos ter potencial relevante de resultados se analisado mais detalhadamente em conjunto com os achados deste trabalho.

Outras análises mais individualizadas dos dados fornnecidos pelo TCGA por meio das ferramentas de bioinformática programáveis, de forma customizada às questões de pesquisa, são certamente um caminho propício para se alcançar novas informações valiosas que podem ter impacto na conduta clínica com os pacientes de carcinoma hepatocelular e eventualmente de outros tipos de câncer. Apesar disso, é necessária uma boa fundamentação teórica prévia à aplicação destes métodos para se obter resultados racionalizáveis e de aplicação factível dentro dos sistemas de saúde, em especial nos sistemas públicos como o Sistema Único de Saúde (SUS).

REFERÊNCIAS

Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, et al. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics*. 2010;65(12):1285-1290. doi: 10.1590/S1807-59322010001200010

Cianfanelli V, Fuoco C, Lorente M, et al. AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation [published correction appears in Nat Cell Biol. 2015 May;17(5):706]. *Nat Cell Biol*. 2015;17(1):20-30. doi:10.1038/ncb3072

Debnath J, Gammoh N, Ryan KM. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24, 560–575 (2023). doi:10.1038/s41580-023-00585-z

Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J*. 2015;34(7):856-880. doi:10.15252/embj.201490784

Galluzzi L, Baehrecke E, Ballabio A, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. EMBO J 2017. 36(13):1811–1836. doi: 10.15252/embj.201796697

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, Volume 144, Issue 5, 646 – 674 (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Klionsky, DJ, Petroni G, Amaravadi RK, et al. Autophagy in major human diseases. *EMBO J*. 2021;40(19):0261-4189. doi:10.15252/embj.2021108863

Levine B and Kroemer G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. Cell 2019; 176(1):11-42, doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048.

Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer* 19, 12 (2020). doi:10.1186/s12943-020-1138-4

Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **7**, 6 (2021). doi:10.1038/s41572-020-00240-3

Mathur G, Nain S & Sharma PK. Cancer: an overview. *Acad. J. Cancer Res*, *8*(1) (2015). doi:10.5829/idosi.ajcr.2015.8.1.9336

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-1075. doi:10.1038/nature06639

Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol*. 2015;4:184-192. doi:10.1016/j.redox.2014.12.003

Russell RC, Yuan HX, Guan KL. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res.* 2013;24:42-57. doi:10.1038/cr.2013.166

Russell RC, Guan KL. The multifaceted role of autophagy in cancer. *EMBO J*. 2022;41(13):e110031. doi:10.15252/embj.2021110031

Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Laversanne, M, Soerjomataram, I, Jemal, A, Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021: 71: 209-249. doi:10.3322/caac.21660

Takamura A, Komatsu M, Hara T, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*. 2011;25(8):795-800. doi:10.1101/gad.2016211

Yang S, Wang X, Contino G, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev*. 2011;25(7):717-729. doi:10.1101/gad.2016111

Yun CW, Lee SH. The Roles of Autophagy in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(11):3466. doi:10.3390/ijms19113466

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA *LIVER INTERNATIONAL*

Author Guidelines

Sections

1. Submission
2. Aims and Scope
3. Manuscript Categories and Requirements
4. Preparing the Submission
5. Editorial Policies and Ethical Considerations
6. Author Licensing
7. Publication Process After Acceptance
8. Post Publication
9. Editorial Office Contact Details

1. SUBMISSION

Authors should kindly note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

Once the submission materials have been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online at https://wiley.atyponrex.com/journal/liv

Click here for more details on how to use ScholarOne.

Data protection

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html.

Preprint policy

Please find the Wiley preprint policy here.

This journal accepts articles previously published on preprint servers.

Liver International will consider for review articles previously available as preprints. Authors may also post the submitted version of a manuscript to a preprint server at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

For help with submissions, please contact: LIVeditorialoffice@wiley.com

2. AIMS AND SCOPE

Liver International promotes all aspects of the science of hepatology from basic research to applied clinical studies. Providing an international forum for the publication of high-quality original research in hepatology, it is an essential resource for everyone working on normal and abnormal structure and function in the liver and its constituent cells, including clinicians and basic scientists involved in the multi-disciplinary field of hepatology. The journal welcomes articles from all fields of hepatology, which may be published as original articles, brief definitive reports, reviews, mini-reviews, images in hepatology and letters to the Editor.

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

i. Original Articles

Liver International publishes both clinical and experimental research in all areas of normal and abnormal liver function and disease. Purely descriptive research or methodology papers will not be considered for publication. Basic science manuscripts will be considered for publication only if they have translational significance.

Word limit: 5,000 words maximum, including title page, abstract, lay summary and main text. References, figures and tables (including legends) should be excluded from the word count.

Abstract: 250 words maximum; must be structured, under the sub-headings: Background & Aims, Methods, Results, Conclusions.

References: Maximum of 50 references.

Figures/Tables: Total of no more than 8 figures and/or tables with up to 6 individual panels each.

Lay Summary: Please provide Two or three sentences summarizing the main message of the article expressed in plain English to describe your findings to a non-medical audience. The submission of the lay summary is mandatory when submitting a revised manuscript, however, the authors are encouraged to include it at submission.

ii. Systematic Reviews and/or Meta-Analysis

Authors submitting systematic reviews and/or meta-analyses should submit as Original Articles and must use PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) check list. A copy of the completed checklist should be uploaded as supplementary information. Failure to do that will result in automatic rejection of the manuscript.

Word limit: 6,000 words maximum, including title page, abstract, key points and main text. References, figures and tables should be excluded from the word count.

Abstract: 250 words maximum; must be structured, under the sub-headings: Background & Aims, Methods, Results, Conclusions.

References: Maximum of 50 references.

Figures/Tables: Authors can include up to 4 figures and/or tables.

Key Points: Key points must be organized in a box, with a maximum of 5 bullet points that briefly summarize the content of the review. Please ensure that they do not exceed 100 words in total.

iii. Brief Definitive Reports

Brief Definitive Reports are shorter than Original Articles and present observations of immediate impact that require a limited space to convey a clear and complete message. Brief Definitive Reports will undergo regular peer-review as original manuscripts.

Word limit: 3,000 words maximum, including title page, abstract, main text and references. Figures and tables (including legends) should be excluded from the word count.

Abstract: 150 words maximum, unstructured.

References: Maximum of 20 references.

Figures/Tables: Total of no more than 2 figures or tables.

Lay Summary: Not required.

iv. Review Articles

Review articles on selected clinical and basic topics of interest for the readers of Liver International are generally commissioned by the Editors. While unsolicited reviews will be considered, authors are encouraged to contact the Editors before submitting a review. Review articles are reviewed by the Editors and are normally sent out for peer review. Invitation to write a review article does not imply automatic acceptance. Review articles are expected to be clear, concise, insightful and updated.

Word limit: The recommended length is 5,000 words with an upper limit of 6,000 words, including title page, abstract, key points and main text. References, which should not exceed 150, figures and tables (including legends) should be excluded from the word count.

Abstract: 250 words maximum; unstructured.

Figures/Tables: The inclusion of tables and figures to summarize critical points is highly desirable.

Key Points: Key points must be organized in a box, with a maximum of 5 bullet points that briefly summarize the content of the review. Please ensure that they do not exceed 100 words in total.

v. Mini-Reviews

Narrative mini-reviews on more focused topics.

Word limit: 4,000 words maximum, including title page, unstructured abstract, key points and main text. References, figure legends and tables should be excluded from the word count.

Abstract: 250 words maximum; unstructured.

References: Maximum of 30 references.

Figures/Tables: Total of no more than 2 figures or tables.

Key Points: Key points must be organized in a box, with a maximum of 5 bullet points that briefly summarize the content of the review. Please ensure that they do not exceed 100 words in total.

vi. Research Letters

Research letters should address a recently published paper (within the last six months) on an urgent or hot topic. The journal will publish maximum one research letter per issue.

Word limit: 1,500 words maximum.

Abstract: Not required.

References: Maximum of 10 references.

Figures/Tables: Maximum of two figures/tables.

Authors: Maximum of 10 authors.

vii. Editorials

Editorials are commissioned by the Editors.

Word limit: 1,500 words maximum.

Abstract: Not required.

References: Maximum of 20 references.

Figures/Tables: One figure or table is highly recommended.

Lay Summary/Key Points: Not required.

A title page must be provided and authors should include a specific title for the editorial.

viii. Letters to the Editor

Only letters concerning papers published in Liver International will be considered for publication. Case reports shall be automatically rejected.

Word limit: 400 words maximum (main text).

References: Maximum of 5 references.

Authors: Maximum of 4 authors.

Figures/Tables: One figure or table can be included.

A title page should be provided, and the paper being commented upon should be included as the first reference. Upon acceptance the authors of the original manuscript will be invited to respond to the comments raised in the letter and the two will be published together.

IX. Liver International Images

Word limit: The short description of the image(s) should not exceed 250 words (main text).

References: Maximum of 5 references.

Authors: Maximum of 4 authors.

A title page should be provided.

4. PREPARING THE SUBMISSION

Article Preparation Support

Wiley Editing Services offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for Preparing Your Article for general guidance about writing and preparing your manuscript.

New submissions should be made via the Research Exchange submission portal wiley.atyponrex.com/journal/liv. For technical help with the submission system, please review our FAQs or contact submissionhelp@wiley.com.

Free Format submission

Liver International now offers Free Format submission for a simplified and streamlined submission process.

Before you submit, you will need:

Your manuscript: this can be a single file including text, figures, and tables, or separate files – whichever you prefer. All required sections should be contained in your manuscript, including abstract, introduction, methods, results, and conclusions. Figures and tables should have legends. References may be submitted in any style or format, as long as it is consistent throughout the manuscript. If the manuscript, figures or tables are difficult for you to read, they will also be difficult for the editors and reviewers. If your manuscript is difficult to read, the editorial office may send it back to you for revision.
The title page of the manuscript, including statements relating to our ethics and integrity policies:
data availability statement
funding statement
conflict of interest disclosure
ethics approval statement
patient consent statement
permission to reproduce material from other sources
clinical trial registration
(Why is this important? We need to uphold rigorous ethical standards for the research we consider for publication.)

Your co-author details, including affiliation and email address. (Why is this important? We need to keep all co-authors informed of the outcome of the peer review process.)
An ORCID ID, freely available at https://orcid.org. (Why is this important? Your article, if accepted and published, will be attached to your ORCID profile. Institutions and funders are increasingly requiring authors to have ORCID IDs.)

To submit, login at https://mc.manuscriptcentral.com/liverint and create a new submission. Follow the submission steps as required and submit the manuscript.

If you are invited to revise your manuscript after peer review, the journal will also request the revised manuscript to be formatted according to journal requirements as described below.

Cover Letters

A cover letter must be uploaded with all manuscripts. The letter may be used to outline the strengths of the manuscript. All commercial relationships (i.e. consultancies, patent-licensing agreements) that might pose a conflict of interest in connection with the submitted manuscript must be included in the letter. In case of possible conflicts of interest, the letter must include a detailed description of the nature of the conflict of interest, the full name of the entity with which there is a conflict, as well as address, telephone number, webpage address, a detailed financial disclosure, and any other important, relevant details.

Parts of the Manuscript

Manuscripts can be uploaded either as a single document (containing the main text, tables and figures), or with figures and tables provided as separate files. Should your manuscript reach revision stage, figures and tables must be provided as separate files. The main manuscript file can be submitted in Microsoft Word (.doc or .docx) or LaTex (.tex) format.

If submitting your manuscript file in LaTex format via Research Exchange, select the file designation “Main Document – LaTeX .tex File” on upload. When submitting a Latex Main Document, you must also provide a PDF version of the manuscript for Peer Review. Please upload this file as “Main Document - LaTeX PDF.” All supporting files that are referred to in the Latex Main Document should be uploaded as a “LaTeX Supplementary File.”

Main Text File

The text file should be presented in the following order:

1 A short informative title (maximum 130 characters) containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's best practice SEO tips);
2 The full names of all the authors;
3 The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author’s present address if different from where the work was conducted;
4 An electronic word count for main body of manuscript;
5 The total number of figures and tables;
6 A list of abbreviations in the order of appearance;
7 A conflict of interest declaration for all authors;
8 A statement of financial support;
9 Trial registration number, if applicable;
10 Acknowledgments;

11 Abstract and keywords;
12 Lay Summary/Key Points
13 Main text;
14 References;
15 Tables (each table complete with title and footnotes);
16 Figure legends;
17 Appendices (if relevant).

Figures and supporting information must be supplied as separate files and should not be embedded in the main body text.

Authorship

Please refer to the journal's authorship policy the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on eligibility for author listing.

Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship (including study groups) should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Authors are required to describe the role of the study sponsor(s), if any, in the study design; in collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the supporting source had no such involvement, the authors should state so. Also, if no specific funding was obtained, this should be stated. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the section 'Conflict of Interest' in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Abstract

Abstracts should not exceed 250 words, and depending on the manuscript type, should be structured as: Background & Aims, Methods, Results, and Conclusions . Abstracts should not include abbreviations, footnotes or references. An electronic word count of the abstract should be provided at the end of the abstract.

Keywords

Please provide 3-6 keywords. Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at www.nlm.nih.gov/mesh.

References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. For more information about AMA reference style please consult the AMA Manual of Style.

Sample references follow:

Journal article
1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. J Comp Neurol 1998;390:537-551.

Book
2. Voet D, Voet JG. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Internet document
3. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2003. http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2003PWSecured.pdf Accessed March 3, 2003

If there are more than 6 author names in a reference, the first three author names are retained followed by ‘et al’.

Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings. Please note PDF, TIFF and JPG files are not acceptable for table submission. Tables should contain a maximum of 10 columns and should include a title, table legend, and if necessary footnotes. Tables must be in portrait orientation for production.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement. Please list figure legends at the end of the manuscript.

Figures

Please submit your figures as high resolution .eps format, minimum 800dpi (for graphs and charts) or .tiff format, minimum 300dpi (for photographs or a combination of images and text). Figures with multiple parts (A, B, C) should be provided as separate files. Please note all graphics submitted should be sent at their actual size, which is 100% of their print dimension and in portrait orientation. Two standard widths are used and figures should fit in one (8.5 x 23.5 cm) or two (17.5 x 23.5 cm) columns.

Please include the number of figures and tables on the title page.

Please ensure that you refer to Figure X/Table X (complete) within your manuscript text.

Color Figures. Figures submitted in color may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white.

Data Citation

Please review Wiley's data citation policy here.

Additional Files

Appendices

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

Click here for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

General Style Points

The following points provide general advice on formatting and style.

● Approved nomenclature for gene and protein names and symbols should be used, including appropriate use of italics (all gene symbols and loci should be in italics) and capitalization as it applies for each organism's standard nomenclature format, in text, tables, and figures. Full gene names are generally not in italics and Greek symbols are not used. Proteins should not be italicized.
● Drugs and chemicals: Drugs and chemicals should be used by generic name. If trademarks are mentioned, the manufacturer's name and city should be given. All funding sources supporting the work, either public or private, especially those from pharmaceutical companies, must be provided.
● Abbreviations, symbols and nomenclature: Should be standardised and in accordance with ELLIS G (ed.). Units, symbols and abbreviations. The Royal Society of Medicine, 1 Wimpole Street, London Wl M 8AE, 1975.
● For mathematical symbols, Greek letters, and other special characters, use normal text.
● American or British English are equally acceptable as far as they are used consistently in the text.

Wiley Author Resources

Manuscript Preparation Tips: Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available here. In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on Writing for Search Engine Optimization.

Article Preparation Support: Wiley Editing Services offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.
Also, check out our resources for Preparing Your Article for general guidance about writing and preparing your manuscript.

Guidelines for Cover Submissions: If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please follow these general guidelines.

5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to journal readership. Manuscripts are single-blind peer reviewed.
Authors should be aware that manuscripts will be screened upon submission. Only the manuscripts which fully comply with the submission requirements outlined and in which the level of English is of an acceptable standard will enter the peer review process.

As a rule, original manuscripts will be evaluated by two independent reviewers and by the Editors. The Editors reserve the right of early rejection without further external review if the manuscript is judged unlikely to be accepted. Manuscripts requiring extensive revision will be at a disadvantage for publication and will be rejected. Authors shall be responsible for the quality of language and style and are strongly advised against submitting a manuscript which is not written in grammatically correct English. American or British English are equally acceptable as far as they are used consistently in the text. The Editors reserve the right to reject poorly written manuscripts even if their scientific content is qualitatively suitable for publication.

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is available here.

This journal is participating in a pilot on Peer Review Transparency and you have the choice to opt-out during the submission process. By submitting to this journal, you agree that the reviewer reports, their responses, and the editor’s decision letter will be linked from the published article to where they appear on Publons in the case that the article is accepted. Reviewers can choose to remain anonymous unless they would like to sign their report.

Refer and Transfer Program

Wiley believes that no valuable research should go unshared. This journal participates in Wiley’s Refer & Transfer program. If your manuscript is not accepted, you may receive a recommendation to transfer your manuscript to another suitable Wiley journal, either through a referral from the journal’s editor or through our Transfer Desk Assistant.

Resubmission of manuscripts

In some cases, Authors will be invited to submit a revised version of the manuscript for further review. This invitation does not imply, in any case, that the revised version will be accepted for publication. In general, revised manuscripts must be received in the Editorial Office within five months of the date of the first decision.

Authors should submit both a marked and unmarked version of the revised manuscript, with all changes in the marked copy underlined. The resubmitted manuscript should be accompanied by a cover letter stating that the manuscript has been revised according to the comments made by the Editor and the Reviewers. Figures and tables must be uploaded in the

recommended formats. Revised manuscripts should be accompanied by a point-by-point reply to the critiques, specifying the changes made in the revised version, which should be highlighted. Please do not send revised manuscripts to the Editorial Office via e-mail. Revised manuscripts should be uploaded on the ScholarOne website.

Human Studies and Subjects

For manuscripts reporting medical studies that involve human participants, a statement identifying the ethics committee that approved the study and confirmation that the study conforms to recognized standards is required, for example: Declaration of Helsinki; US Federal Policy for the Protection of Human Subjects; or European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice. It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

Patient anonymity should be preserved. When detailed descriptions, photographs, or videos of faces or identifiable body parts are used that may allow identification, authors should obtain the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher; however, in signing the author license to publish, authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a standard patient consent form available for use. Where photographs are used they need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized; black eye bars should not be used as they do not sufficiently protect an individual’s identity).

Animal Studies

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, as well as the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. Authors are encouraged to adhere to animal research reporting standards, for example the ARRIVE guidelines for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals:

● US authors should cite compliance with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.
● UK authors should conform to UK legislation under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations (SI 2012/3039).
● European authors outside the UK should conform to Directive 2010/63/EU.

Clinical Trial Registration

The journal requires that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Authors are asked to include the name of the trial register and the clinical trial

registration number at the end of the abstract. If the trial is not registered, or was registered retrospectively, the reasons for this should be explained. Trials that are not registered will not be accepted.

Research Reporting Guidelines

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. Authors are encouraged to adhere to recognised research reporting standards. The EQUATOR Network collects more than 370 reporting guidelines for many study types, including for:

● Randomised trials : CONSORT
Any paper that is a randomised control trial should adhere to the guidelines that can be found at the following web-site: www.consort-statement.org. The checklist should be downloaded, completed and uploaded with your submission. The trial registration number must be included on the title page of the manuscript reporting a registered clinical trial. Failure to do so will prevent entry to the peer review process.
● Observational studies : STROBE
● Systematic reviews : PRISMA
Authors submitting systematic reviews and/or meta-analyses must use PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) check list. A copy of the completed checklist should be uploaded as supplementary information. Failure to do that will result in automatic rejection of the manuscript.
● Qualitative research : SRQR
● Diagnostic / prognostic studies : STARD
● Quality improvement studies : SQUIRE
● Economic evaluations : CHEERS
● Animal pre-clinical studies : ARRIVE
● Study protocols : SPIRIT
● Clinical practice guidelines : AGREE

We also encourage authors to refer to and follow guidelines from:

● Future of Research Communications and e-Scholarship (FORCE11)
● National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines
● The Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues
● Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities (MIBBI) website
● FAIRsharing website

Species Names

Upon its first use in the title, abstract, and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species, and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, only the scientific name should be used.

Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see varnomen.hgvs.org, where examples of acceptable nomenclature are provided.

Sequence Data

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL, or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL, and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'. Addresses are as follows:

● DNA Data Bank of Japan (DDBJ): www.ddbj.nig.ac.jp
● EMBL Nucleotide Archive: ebi.ac.uk/ena
● GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

Proteins sequence data should be submitted to either of the following repositories:

● Protein Information Resource (PIR): pir.georgetown.edu
● SWISS-PROT: expasy.ch/sprot/sprot-top

Structural Data

For papers describing structural data, atomic coordinates and the associated experimental data should be deposited in the appropriate databank (see below). Please note that the data in databanks must be released, at the latest, upon publication of the article. We trust in the cooperation of our authors to ensure that atomic coordinates and experimental data are released on time.

● **Organic and organometallic compounds:** Crystallographic data should not be sent as Supporting Information, but should be deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) at ccdc.cam.ac.uk/services/structure%5Fdeposit.
● **Inorganic compounds:** Fachinformationszentrum Karlsruhe (FIZ; fiz-karlsruhe.de).
● **Proteins and nucleic acids:** Protein Data Bank (rcsb.org/pdb).
● **NMR spectroscopy data:** BioMagResBank (bmrb.wisc.edu).

Conflict of Interest

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed

when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

Funding

Authors should list all funding sources on the title page of the manuscript. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: https://www.crossref.org/services/funder-registry/

Authorship

The journal follows the ICMJE definition of authorship, which indicates that authorship be based on the following 4 criteria:

● Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
● Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
● Final approval of the version to be published; AND
● Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

In addition to being accountable for the parts of the work he or she has done, an author should be able to identify which co-authors are responsible for specific other parts of the work. In addition, authors should have confidence in the integrity of the contributions of their co-authors.

All those designated as authors should meet all four criteria for authorship, and all who meet the four criteria should be identified as authors. Those who do not meet all four criteria should be acknowledged. These authorship criteria are intended to reserve the status of authorship for those who deserve credit and can take responsibility for the work. The criteria are not intended for use as a means to disqualify colleagues from authorship who otherwise meet authorship criteria by denying them the opportunity to meet criterion #s 2 or 3. Therefore, all individuals who meet the first criterion should have the opportunity to participate in the review, drafting, and final approval of the manuscript.

Data Sharing and Data Accessibility

Please review Wiley’s policy here. This journal encourages and peer review data sharing.

The journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.
All accepted manuscripts may elect to publish a data availability statement to confirm the presence or absence of shared data. If you have shared data, this statement will describe how the data can be accessed, and include a persistent identifier (e.g., a DOI for the data, or an accession number) from the repository where you shared the data. Sample statements are available here. If published, statements will be placed in the heading of your manuscript.

Human subject information in databases. The journal refers to the World Health Medical Association Declaration of Taipei on Ethical Considerations Regarding Health Databases and Biobanks.

Publication Ethics

This journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley'sTop 10 Publishing Ethics Tips for Authors here. Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found here.

Correction to Authorship

In accordance with Wiley's Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics and the Committee on Publication Ethics' guidance, Liver International will allow authors to correct authorship on a submitted, accepted, or published article if a valid reason exists to do so. All authors – including those to be added or removed – must agree to any proposed change. To request a change to the author list, please complete the Request for Changes to a Journal Article Author List Form and contact either the journal's editorial or production office, depending on the status of the article. Authorship changes will not be considered without a fully completed Author Change form. [Correcting the authorship is different from changing an author's name; the relevant policy for that can be found in Wiley's Best Practice Guidelines under "Author name changes after publication."]

Author Name Change Policy

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

ORCID

As part of the journal's commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. Find more information here.

6. AUTHOR LICENSING

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or open access under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available here. To review the Creative Commons License options offered under open access, please click here. (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please click here.)

Self-Archiving definitions and policies. Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please click here for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: If you choose to publish open access you will be charged a fee. You can read more about APCs and whether you may be eligible for waivers or discounts, through your institution, funder, or a country waiver.

Funder Open Access: Please click here for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

First Look

After your paper is accepted, your files will be assessed by the editorial office to ensure they are ready for production. You may be contacted if any updates or final files are required. Otherwise, your paper will be sent to the production team.

Wiley Author Services

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with Wiley Author Services. You will be asked to sign a publication license at this point as well as pay for any applicable APCs.

Accepted article received in production

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with Wiley Author Services. The author will be asked to sign a publication license at this point.

Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online shortly after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance and appear in PDF format only. They are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked and are indexed by PubMed. After the final version article is published (the article of record), the DOI remains valid and can still be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is accurate for indexing. Subsequently, the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will update automatically.

Proofs

Once the paper is typeset, the author will receive an email notification with full instructions on how to provide proof corrections.

Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process – authors should check proofs carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt of first proof.

Publication Charges

Page Charges. Any article that exceeds 9 published pages will be charged. Excess pages must be paid for at a rate of GBP 100 per page unless specific written arrangements have been negotiated with the Editors. Invited papers are as a rule not charged for excess pages. In case an article exceeds 9 pages including references the author will be invoiced after publication.

Early View

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. Early View (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as Editors also need to review proofs. Once the article is published on Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

8. POST PUBLICATION

Access and sharing

When the article is published online:

● The author receives an email alert (if requested).
● The link to the published article can be shared through social media.
● The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
● The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Promoting the Article

To find out how to best promote an article, click here.

Article Promotion Support

Wiley Editing Services offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

Author Name Change Policy

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

Correction to authorship

In accordance with Wiley's Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics and the Committee on Publication Ethics' guidance, Liver International will allow authors to correct authorship on a submitted, accepted, or published article if a valid reason exists to do so. All authors – including those to be added or removed – must agree to any proposed change. To request a change to the author list, please complete the Request for Changes to a Journal Article Author List Form and contact either the journal's editorial or production office, depending on the status of the article. Authorship changes will not be considered without a fully completed Author Change form. [Correcting the authorship is different from changing an author's name; the relevant policy for that can be found in Wiley's Best Practice Guidelines under "Author name changes after publication."]

Measuring the Impact of an Article

Wiley also helps authors measure the impact of their research through a specialist partnership with Altmetric.

9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

For queries about submissions, please contact LIVeditorialoffice@wiley.com

Author Guidelines Updated 31 March 2022

Extraído de https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14783231/homepage/forauthors.html em 16 de agosto de 2023.

Contracapa