

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul (UFRGS)
Programa De Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia

**ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DA AUTOFAGIA NA PATOGÊNESE
DA HEPATOPATIA SECUNDÁRIA À DEFICIÊNCIA DE ALFA-1 ANTITRIPSINA**

JÉSSICA ONOFRE DE BRITO LIMA

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Thadeu Schmidt Cerski

Colaborador: Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela

Porto Alegre

2024

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), vinculado à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) com recursos do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA.

CIP - Catalogação na Publicação

Onofre de Brito Lima, Jéssica
Estudo sobre a participação da autofagia na
patogênese da hepatopatia secundária à deficiência de
alfa-1 antitripsina / Jéssica Onofre de Brito Lima.
-- 2024.
72 f.
Orientador: Carlos Thadeu Schmidt Cerski.

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

1. CARM-1. 2. autofagossomas. 3. cirrose. 4.
mutação. 5. imunistoquímica. I. Thadeu Schmidt
Cerski, Carlos, orient. II. Título.

Apresentada ao Programa de Pós Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Gastroenterologia e Hepatologia em 16/05/2024.

Aprovado em: 16/05/2024

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Fernanda Visioli (UFRGS)

Professor Dr. Mário Reis Alvares da Silva (UFRGS)

Professor Dr. Venancio Avancini Ferreira Alves (FMUSP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador, pela sua atenção, dedicação e esforço em orientar este trabalho. Durante esses anos de residência e pós graduação, o **professor Thadeu** me fez entender, pelo exemplo diário, o que caracteriza um excelente professor: pensar que o mínimo é dar seu máximo e ser uma pessoa “constantemente constante” na busca do aperfeiçoamento da didática. Muito obrigada, professor, por ter me dado a honra de ser sua primeira orientanda!

Aos colaboradores, **Gabriela Remonatto e Eduardo Chiela**, pelos ajustes, ajuda com anticorpos e pela realização das mais belas lâminas de imuno-histoquímica. Lembrarei com carinho dos excelentes profissionais que vocês são.

Agradeço a minha família e amigos que acompanham meus bastidores ao longo deste trabalho. Seja de longe ou bem pertinho, a torcida e o apoio de vocês foi crucial! Não irei citar nomes, mas vocês sabem quem são. Gostaria também de agradecer à **equipe da Taura Crossfit** pelo modelo de excelência no trabalho diário e por serem a “melhor hora do dia”.

Ao time da Pós Graduação em Medicina: Ciências Em Gastroenterologia e Hepatologia, meu muito obrigado! Saio muito diferente da pessoa que entrou no

PPG, pois, com vocês, aprendi uma série de habilidades que possuem valores inestimáveis. **Ao FIPE e ao Laboratório de Patologia do HCPA**, por possibilitarem a concretização deste trabalho.

Agradeço aos **funcionários do Serviço de Patologia Cirúrgica**, pelos “bom dias” afetuosos, palavras de conforto e amizade ao longo desses cinco anos morando em Porto Alegre.

Agradeço, por fim, a **todos os pacientes** que contribuíram para que este estudo pudesse ser realizado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Patogênese da deficiência de alfa 1-antitripsina	13
2.2 Alterações genéticas da deficiência de alfa 1-antitripsina	16
2.3 Autofagia e autofagossomos	17
2.3.1 Beclina-1 (BECLIN-1)	21
2.3.2 MAP1LC3AB (LCA3B ou LC3)	22
2.3.3 p62 (SQSTM1)	23
2.3.4 EZH2	24
2.3.5 CARM-1	25
2.4 Autofagia Mediada por Chaperonas (CMA)	27
2.4.1 HSC70	29
2.4.2 LAMP-2A	29
2.5 Autofagia e doenças hepáticas	31
3. JUSTIFICATIVA	32
4. QUESTÃO DE PESQUISA	33
5. HIPÓTESES	33
5.1 Hipótese nula	33
5.2 Hipótese alternativa	33
6. OBJETIVOS	34
6.1 Objetivo Geral	34
6.2 Objetivos Específicos	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
8. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS (ARTIGO EXCLUÍDO)	45
9. CONCLUSÕES	60
10. PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FUTURAS	60
11. APÊNDICES	61
12. ANEXOS	69

RESUMO

A deficiência de alfa-1 antitripsina (DAAT) é caracterizada por uma mutação no gene *SERPINA1* que causa dobramento incorreto de proteínas, resultando em níveis séricos reduzidos e acúmulo anormal de alfa-1 antitripsina nos hepatócitos, desencadeando diversas manifestações clínicas. Sabe-se que a DAAT progride para cirrose de padrão biliar através de mecanismos pouco claros. Este estudo teve como objetivo investigar e descrever marcadores de autofagia em pacientes cirróticos secundários à deficiência de alfa-1 antitripsina. Analisamos retrospectivamente dados de 22 pacientes com explantes de fígado por DAAT (casos) ou colangite biliar primária e atresia biliar (controles), diagnosticados entre 2002 e 2022. Utilizamos imunohistoquímica para avaliar a expressão de proteínas envolvidas na autofagia precoce e tardia, além de reguladores epigenéticos da autofagia e da formação de autofagossomas. Os dados demográficos e clínicos dos pacientes foram recuperados dos prontuários médicos e associados aos marcadores de autofagia. Observamos uma combinação específica da mutação homozigótica alfa-1 ATZ (PiZZ) e arginina metiltransferase-1 associada ao coativador anormal (CARM-1) poderia estar associada à progressão da doença hepática AATD para cirrose. Houve diminuição significativa da expressão da proteína CARM-1 nos hepatócitos dos pacientes com DAAT em comparação aos hepatócitos dos controles ($p=0,02$). As

proteínas LAMP-2A e HSC70, envolvidas na autofagia mediada por chaperonas (CMA), não mostraram diferenças estatisticamente significativas na depuração de proteínas PiZZ mal dobradas.

Palavras-chave: CARM-1; autofagossomas; cirrose; mutação; imunistoquímica.

ABSTRACT

Alpha-1 antitrypsin deficiency (AATD) is characterized by a mutation in the *SERPINA1* gene which causes protein misfolding, resulting in reduced serum levels and abnormal accumulation of alpha-1 antitrypsin within hepatocytes, triggering various clinical manifestations. AATD is known to progress to biliary-pattern cirrhosis through unclear mechanisms. This study aimed to investigate and describe autophagy markers in cirrhotic patients secondary to alpha-1 antitrypsin deficiency. We retrospectively analyzed data from 22 patients with liver explants due to AATD (cases) or primary biliary cholangitis and biliary atresia (controls), diagnosed between 2002 and 2022, and used immunohistochemistry to evaluate the expression of proteins involved in early and late autophagy, beyond epigenetic regulators of autophagy and autophagosome formation. Patient demographics and clinical information were retrieved from medical records and associated with autophagy markers. We found that a specific combination of the homozygous alpha-1 ATZ mutation (PiZZ) and abnormal coactivator-associated arginine methyltransferase-1 (CARM-1) could be associated with progression of AATD liver disease to cirrhosis. There was a significant decrease in expression of the CARM-1 protein in the hepatocytes of patients with AATD compared to the hepatocytes of controls ($p=0.02$). The LAMP-2A and HSC70 proteins, involved in chaperone-mediated autophagy

(CMA), showed no statistically significant differences in clearance of misfolded PiZZ proteins.

Keywords: CARM-1; autophagosomes; cirrhosis; mutation, immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAT - Alfa-1 Antitripsina.

AVB - Atresia de Vias Biliares.

ATZ - Proteína Z mutada da alfa-1 antitripsina.

CARM-1 - Coativador Associado a Arginina Metiltransferase-1.

CBP - Colangite Biliar Primária.

CMA - Autofagia Mediada por Chaperonas.

DAAT - Deficiência de Alfa-1 Antitripsina.

mTOR - Via Mamífera do Alvo da Rapamicina.

PE - Fosfatidiletanolamina.

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

IHQ - Imuno-Histoquímica.

PAS - Ácido Periódico-Schiff.

RE - Retículo Endoplasmático.

LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1.** A correlação da fisiopatologia da deficiência de AAT na doença hepática.
- **Figura 2.** Exemplos de alelos mais frequentemente relacionados à deficiência de AAT, mutações envolvidas e implicações clínicas.
- **Figura 3.** Os estágios da autofagia.
- **Figura 4.** Os três tipos de autofagia.
- **Figura 5.** Proteínas Beclin-1 e LCE envolvidas no processo da autofagia.
- **Figura 6.** Os domínios de interação da p62.
- **Figura 7.** CARM-1 e a ativação da autofagia.
- **Figura 8.** A degradação de substratos proteicos via CMA.
- **Figura 9.** A participação da CMA na degradação da ATZ.
- **Figura 10.** Diagrama de pacientes incluídos no estudo.
- **Figura 11.** Ilustração da expressão nos hepatócitos dos casos de DAAT e grupos controle.
- **Figura 12.** Esquema da patogênese da autofagia.
- **Figura 13.** A expressão de CARM-1 nos casos de DAAT e casos controles de ambos os grupos de estudo.
- **Figura 14.** Ilustração da expressão nas células ductais dos casos de DAAT e grupos controle.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Dados de perfil demográfico da amostra.
- Tabela 2. Dados de perfil clínico da amostra.
- Tabela 3. Dados de perfil clínico - fenotípico da DAAT.

1. INTRODUÇÃO

A Deficiência de Alfa-1 Antitripsina (AATD) é caracterizada por uma mutação no gene SERPINA1, que leva a um mal dobramento proteico, resulta em níveis séricos reduzidos e desencadeia várias manifestações clínicas (1). Esta mutação proporciona um acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático (RE) dos hepatócitos, causando hepatopatia através de um mecanismo tóxico de ganho de função dos hepatócitos (2), sendo que o genótipo PiZZ está associado a uma apresentação clínica mais grave (3).

Além do seu papel na degradação das proteínas, a autofagia é crucial na eliminação de organelas e proteínas disfuncionais (3). As principais vias de degradação da proteína Alfa-1 Antitripsina (AAT) mal dobrada incluem o proteassoma, que degrada a maior parte da AAT mal dobrada, e a autofagia, que degrada os polímeros PiZZ da AAT. A autofagia inclui a macroautofagia, a microautofagia e a Autofagia Mediada por Chaperonas (CMA). Nesta última via, as proteínas mal dobradas são conduzidas pelo LAMP-2A com a ajuda de chaperonas citosólicas, como a HSC70, para a degradação no interior dos lisossomos (2,4).

A macroautofagia desempenha um papel crucial na degradação celular e na reciclagem de componentes danificados. Proteínas como p62 (SQSTM1) atuam como adaptadores, facilitando a seletividade na degradação. MAP1LC3 forma

LC3-II, essencial para a formação do autofagossomo, enquanto Beclin-1 é fundamental para sua nucleação. EZH2 pode ser associada à regulação autofágica em neoplasias, e o Coativador Associado com a Arginina Metiltransferase 1 (CARM-1) é uma proteína envolvida em processos epigenéticos e regulação transcricional, com estudos que indicam que possa influenciar a atividade autofágica por meio de suas funções associadas à regulação genética (5).

Considerando a relação complexa entre autofagia e a patogênese da DAAT, este estudo tem como objetivo aprofundar a compreensão da hepatopatia associada a essa condição. Buscamos explorar o papel dos autofagossomos na degradação de proteínas mal dobradas e suas consequências na árvore biliar, na qual o intuito é obter uma visão abrangente da interação entre a autofagia e a patogênese hepática na DAAT através da análise da expressão de biomarcadores relacionados à formação dos autofagossomos e à via da autofagia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Patogênese da deficiência de alfa 1-antitripsina

A alfa 1-antitripsina (AAT) é uma enzima do grupo das serinas antiproteases. Sendo assim, ela inibe proteases neutrofílicas, como a elastase neutrofílica, catepsina G e proteinase (6). É codificada pelo gene SERPINA1, que está localizado

no braço longo do cromossomo 14 (14q31-32) e é produzida majoritariamente por hepatócitos, podendo ainda ter sua produção através dos monócitos, macrófagos alveolares e células epiteliais (7).

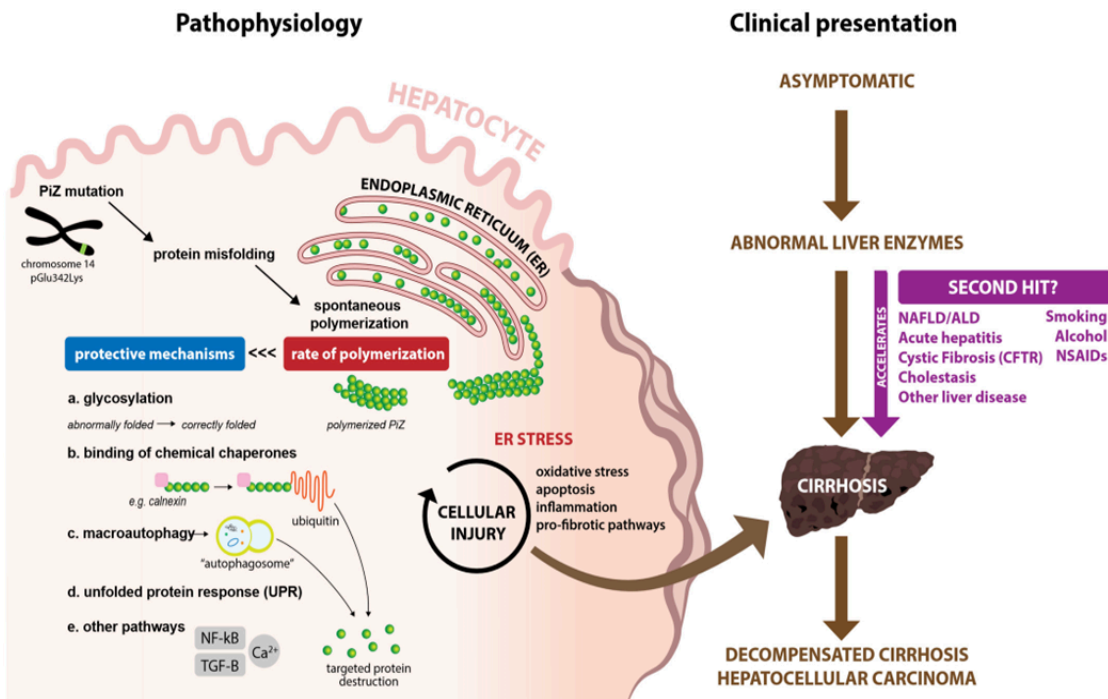
Clinicamente, a deficiência de AAT é uma doença que exibe grande heterogeneidade, com o genótipo PiZZ (mais comum) correspondendo a pior apresentação clínica (8). Na maioria dos casos, o mal dobramento da proteína ocasiona a diminuição dos níveis séricos com consequente dificuldade de secreção hepática - ocorrendo, assim, um acúmulo anormal nos hepatócitos e diminuição da quantidade sérica (9).

Os mecanismos que levam a doenças pulmonar e hepática pela deficiência de AAT são diferentes: enquanto, nos pulmões, a falta de AAT permite que a elastase neutrofílica funcione sem qualquer mecanismo de oposição, ocasionado uma atividade inflamatória no interstício pulmonar exacerbada; no fígado, há um dobramento incorreto e acúmulo indevido da enzima no Retículo Endoplasmático Rugoso (RE) dos hepatócitos (10).

Quando ocorre a mutação de ponto no gene SERPINA1 e forma-se o alelo anormal PiZ, há mal dobramento e polimerização dentro do RE dos hepatócitos. Porém, quando a AAT mutada supera os mecanismo protetores dos hepatócitos de

fazer o reconhecimento, degradar e exportar as proteínas dobradas de forma eficaz, leva a uma desregulação que desencadeia um processo inflamatório, podendo chegar à fibrose, cirrose ou mesmo ao Carcinoma Hepatocelular (Figura 1) (11).

Figura 1: a correlação da fisiopatologia da deficiência de AAT na doença hepática



Fonte: adaptado de Narayan & Mistry (2020).

Dessa forma, deficiência de AAT é um distúrbio reconhecido por sua associação com doença pulmonar grave e cirrose hepática, afetando aproximadamente 10% a 15% dos casos (12). Apenas 8 -10% dos indivíduos

homozigotos PiZZ, desenvolvem doença hepática grave durante as primeiras quatro décadas de vida (13). Tal observação sugere a existência de outros fatores ou modificadores de doença que ainda não foram compreendidos ou identificados (14).

2.2 Alterações genéticas da deficiência de alfa 1-antitripsina

A deficiência de AAT é uma desordem genética com herança autossômica codominante (15) em que há a expressão de mais de 100 alelos com implicações clínicas diversas. A variante M corresponde aos alelos mutados que possuem níveis séricos de AAT normais e exibe manifestações clínicas ainda desconhecidas (16).

Assim, com base nos níveis séricos de AAT e função molecular, as variantes são classificadas em quatro grupos: a variante normal é a PiM; enquanto as variantes que exibem doenças associadas são a PiS; PiZ, Alelo Nulo e Genes disfuncionais. Além disso, o alelo deficiente mais comumente encontrado em deficiência de AAT é o alelo Z, com cerca de 95% dos casos no Brasil (7) (Figura 2).

Figura 2: exemplos de alelos mais frequentemente relacionados à deficiência de AAT, mutações envolvidas e implicações clínicas

Alelos	Tipos de mutação	Doença(s) associadas
Variantes normais		
M (vários subtipos)	Substituição (1 par de bases)	Nenhuma
Variantes deficientes		
S	Substituição (1 par de bases)	Pulmonar
Z*	Substituição (1 par de bases)	Pulmonar, Hepática
M _{malton}	Deleção (3 pares de bases)	Pulmonar, Hepática
S _{iiyama}	Substituição (1 par de bases)	Pulmonar, Hepática
Alelos nulos		
Q0 (subtipos)	Deleção ou Substituição	Pulmonar, eventualmente Hepática
Alelos disfuncionais		
Pittsburgh	Substituição (1 par de bases)	Diátese Hemorrágica
Z*	Substituição (1 par de bases)	Pulmonar, Hepática

*O alelo Z é deficiente e também disfuncional

Fonte: adaptado de Camelier (2008).

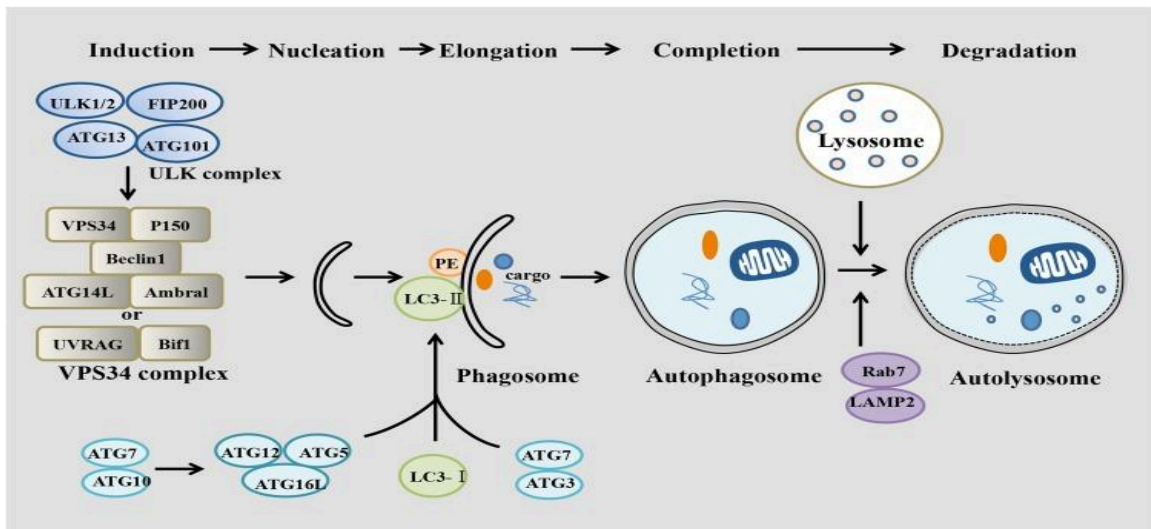
2.3 Autofagia e autofagossomos

A autofagia é um processo celular catabólico dinâmico, no qual organelas e macronutrientes são degradados por autofagossomos, que se fundem com lisossomos para manter a homeostase celular (17). Esse mecanismo desempenha um papel crucial na neutralização de danos causados por eventos estressantes,

como lesões em organelas, defeitos no dobramento proteico e alterações na disponibilidade de nutrientes e/ou oxigênio (18).

A autofagia compreende cinco estágios. A iniciação ocorre com a ativação do complexo quinases 1 do tipo Unc-51 (ULK1); a nucleação se desencadeia quando o complexo ULK1 é ativado pelo complexo PI3K classe III, que inclui a Beclina-1; a formação do autofagossomo envolve a conjugação dos complexos ATG5-ATG12 e ATG16, seguida pela ligação de LC3-I com Fosfatidiletanolamina (PE) para formar LC3I e LC3-II; o autofagossomo então se funde ao lisossomo, formando o autolisossomo e completando o último estágio da degradação (19).

Figura 3: os estágios da autofagia



Fonte: Wu et al., (2018).

A autofagia pode influenciar a ocorrência da senescência celular (parada irreversível do ciclo celular), na medida em que a capacidade das células de realizar a autofagia diminui com a idade (20). Ou seja, quando a autofagia não funciona corretamente, os materiais danificados se acumulam e podem levar à senescência celular (21).

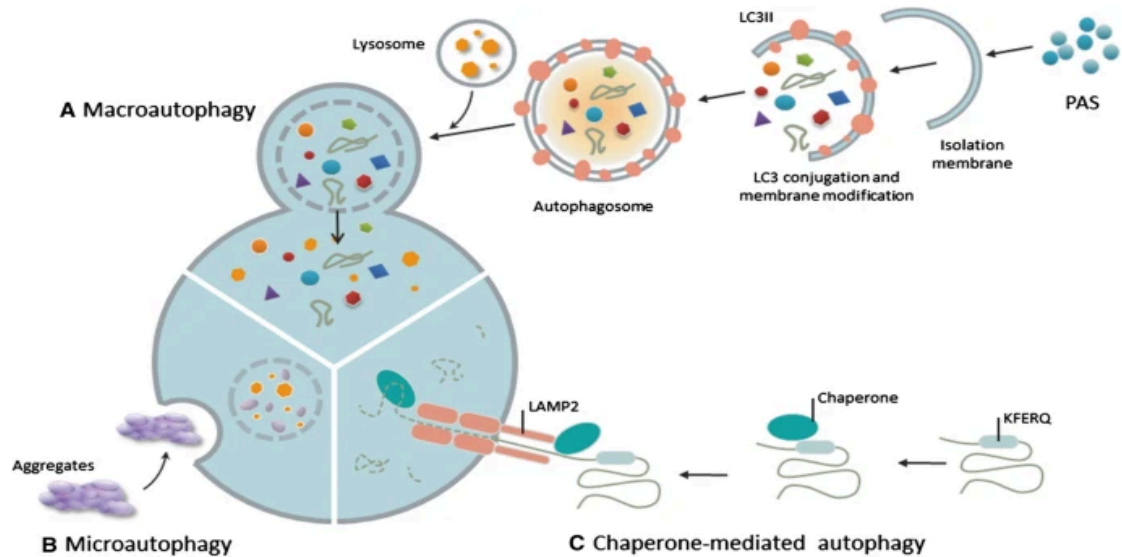
A relação entre a autofagia e a progressão da cirrose biliar em pacientes com Colangite Biliar Primária (CBP) ou Atresia de Vias Biliares (AVB) está sendo investigada, e estudos sugerem que a senescência das células epiteliais dos ductos biliares pode estar relacionada a uma regulação anormal da autofagia na CBP e na AVB (22,23).

Além de degradar proteínas, a autofagia desempenha um papel crucial na eliminação de organelas disfuncionais ou danificadas. Há três tipos principais de autofagia, cada um com um método distinto de entrega do substrato: macroautofagia, microautofagia e Autofagia Mediada por Chaperonas (CMA) (24).

Na macroautofagia, o material citosólico é envolvido pela membrana de isolamento, formando o autofagossomo, que posteriormente se une ao lisossomo, originando o autolisossomo, onde ocorre a degradação da proteína. Já na microautofagia, as proteínas ou organelas disfuncionais são entregues diretamente ao lúmen endossômico através da membrana lisossomal. Na CMA, um mecanismo

altamente seletivo de autofagia, ocorre um processo de reconhecimento do substrato, culminando na degradação das proteínas-alvo com o auxílio de proteínas do lúmen, como a HSC70 (25).

Figura 4: os três tipos de autofagia



Fonte: Xu et al., (2020).

2.3.1 Beclina-1 (BECLIN-1)

A proteína Beclina-1 desempenha um papel essencial na iniciação e promoção da autofagia (26) devido à sua interação com o complexo PI3K por meio do domínio BH3 (27).

A ativação desse complexo resulta na formação do fagóforo, uma membrana de isolamento que envolve organelas e proteínas destinadas à degradação. Esse conjunto é denominado autofagossomo e, quando se funde com o lisossomo, é chamado de autolisossomo (28).

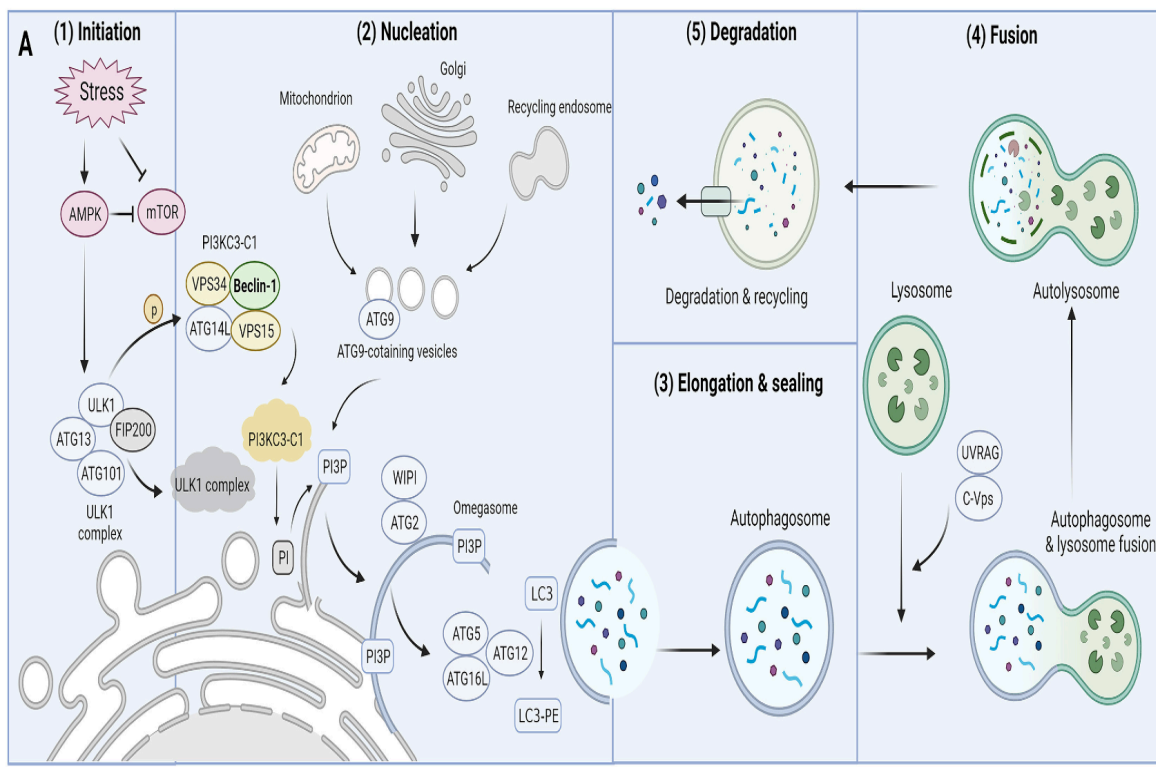
Assim, a Beclina-1 é um marcador importante para sinalizar a nucleação e a expansão da membrana do fagóforo. Ela interage com diversas outras proteínas para mediar as funções da autofagia e também no tráfego de proteínas efetoras (29).

2.3.2 MAP1LC3AB (LCA3B ou LC3)

A cadeia leve 3 da proteína 1 associada aos microtúbulos (MAP1LC3/LC3) atua como um marcador útil na avaliação de processos de autofagia (30).

A etapa inicial de nucleação do fagóforo ocorre dentro do RE, que, juntamente com PI3P, facilita o recrutamento dos complexos necessários para a conjugação das proteínas LC3, fundamentais no processo autofágico. Essas proteínas desempenham um papel crucial como locais de reconhecimento para os receptores de cargas de autofagia, como SQSTM1/p62, que também desempenham funções significativas nas fases subsequentes da autofagia (31).

Figura 5: proteínas Beclin-1 e LC3 envolvidas no processo da autofagia



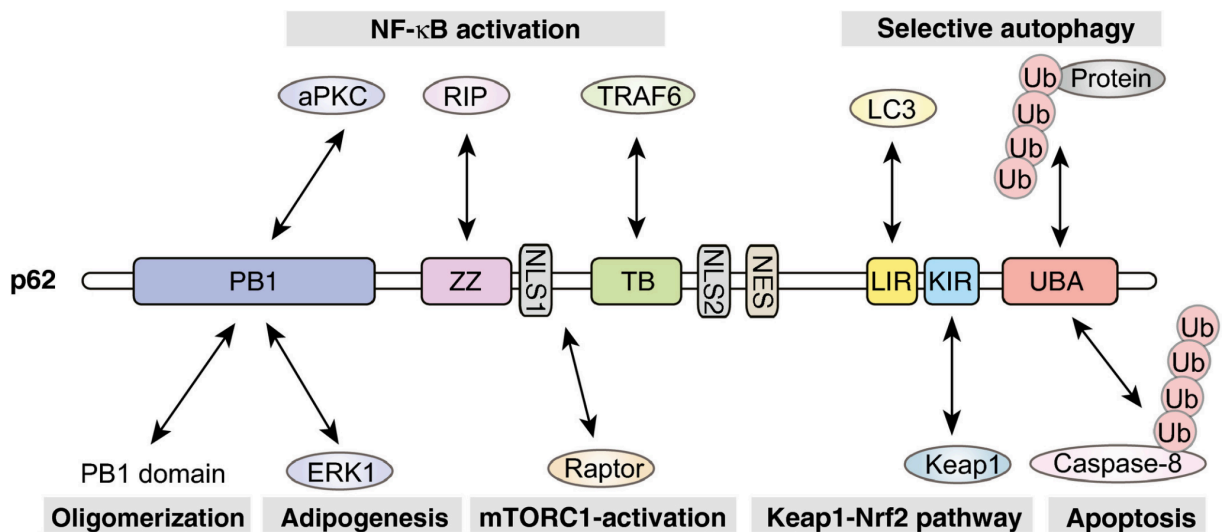
Fonte: Ye et al., (2023).

2.3.3 p62 (SQSTM1)

A proteína p62, codificada pelo gene SQSTM1, possui domínios de interação distintos que facilitam o recrutamento e fornecimento de substratos intracelulares destinados à degradação (32) através da sinalização de ubiquitina (33).

Além de reconhecer agregados de proteínas ubiquitinadas em várias doenças neurodegenerativas e hepatopatias, a p62 (SQSTM1) também interage com o complexo LC3, desempenhando um papel no recrutamento de membranas para a formação de autofagossomos (26).

Figura 6: os domínios de interação da p62 (SQSTM1)



Fonte: Gómez-Virgilio et al., (2022).

2.3.4 EZH2

A proteína EZH2, codificada pelo gene da subunidade 2 do complexo repressivo zeste 2 polycomb, desempenha papéis em vários processos celulares,

incluindo diferenciação celular, apoptose e autofagia, entre outros (34). Estudos indicam que um aumento na expressão de EZH2 pode comprometer a autofagia (35).

Isso ocorre por meio da supressão da expressão de genes da Via Mamífera do Alvo da Rapamicina (mTOR), um mediador essencial na regulação do crescimento celular, proliferação e outros mecanismos associados à autofagia. Além disso, a interação com a LC3B-II, ao reduzir seus níveis, impacta a formação de autofagossomos (36).

2.3.5 CARM-1

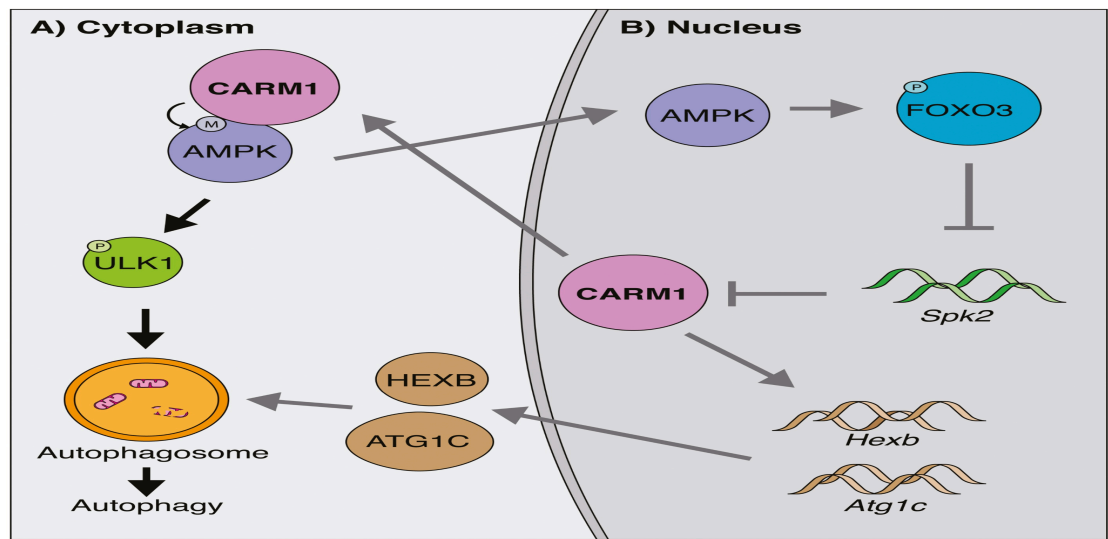
A enzima Coativador Associado a Arginina Metiltransferase-1 (CARM-1) desempenha o papel de co-ativador de transcrição, participando em diversas vias celulares, incluindo a ativação transcricional de genes relacionados à proliferação e diferenciação (37).

Recentemente, investigou-se a conexão dessa proteína com a cascata de regulação da macroautofagia/autofagia (38, 39). Descobriu-se que, no citoplasma, a CARM-1 pode realizar a metilação da AMPK, uma proteína diretamente envolvida na

ativação da autofagia, resultando na fosforilação de ULK1 e, por conseguinte, na formação de autofagossomos (40).

No núcleo, a AMPK, por sua vez, pode fosforilar o FOXO3, promovendo a estabilidade de CARM-1. Essa regulação positiva da expressão de Atg1c e Hexb, ambas envolvidas na formação de autofagossomos, têm implicações diretas no processo de autofagia (40).

Figura 7: CARM-1 e a regulação da autofagia



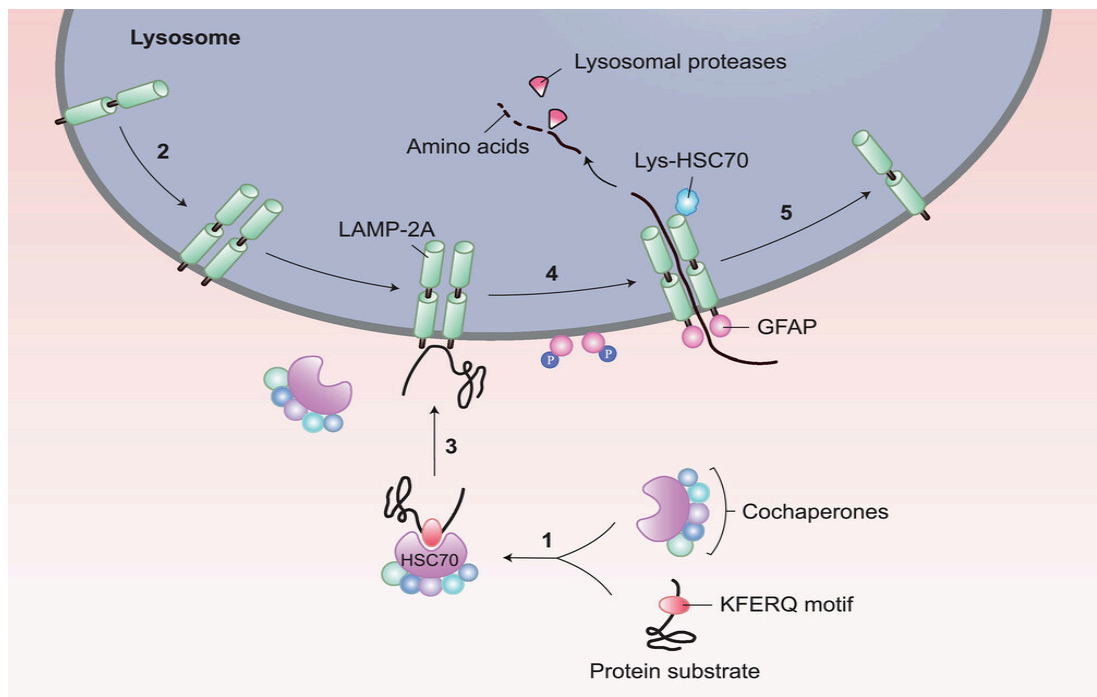
Fonte: adaptado de Saber & Rudnicki (2022).

2.4 Autofagia Mediada por Chaperonas (CMA)

As chaperonas moleculares são proteínas que auxiliam outras proteínas no processo de dobramento/desdobramento, assegurando a manutenção de sua funcionalidade (40). No contexto da CMA, uma das vias de autofagia, ocorre o reconhecimento seletivo do substrato e sua subsequente translocação para a membrana lisossomal, um processo mediado pela LAMP-2A (41).

Nesse cenário, os lisossomos desempenham um papel crucial na CMA, onde a HSC70 reconhece uma sequência específica denominada KFERQ em um substrato. Em seguida, o substrato é conduzido ao lisossomo, desdoblado e translocado para o seu interior, facilitado pela associação da HSC70 com a proteína LAMP-2A multimerizada. Em resumo, a interação entre HSC70 e LAMP-2A impulsiona o processo autofágico (42).

Figura 8: a degradação de substratos proteicos via CMA



Fonte: adaptado de YAO & SHEN (2023).

2.4.1 HSC70

A Heat Shock Cognate 70 (HSC70) é proteína chaperona que pertence à família das Heat Shock Protein 70 (43), e exibe a importante função de manter a homeostase proteica dentro do ambiente celular (44).

No contexto da autofagia, a HSC70 desempenha um papel importante na CMA, onde identifica uma sequência específica conhecida como KFERQ em substratos e os encaminha para a degradação lisossomal (45).

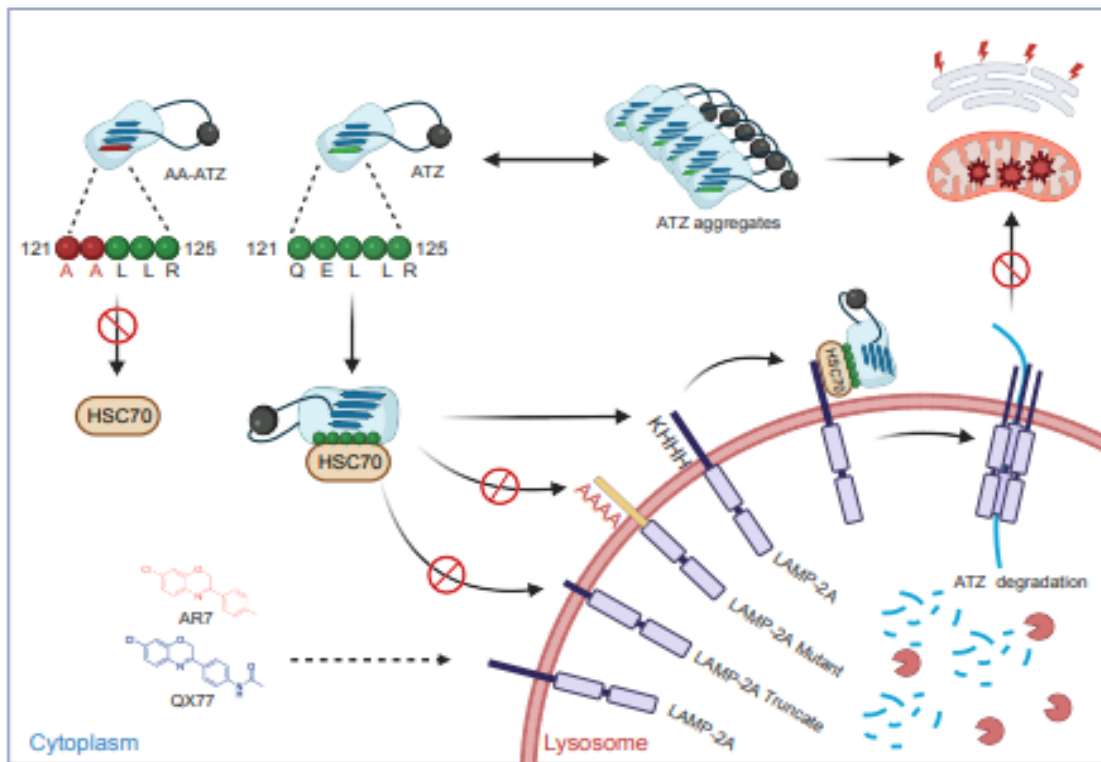
2.4.2 LAMP-2A

A Lysosome-Associated Membrane Protein Type 2A (LAMP-2A) é uma glicoproteína que está localizada na membrana lisossomal, e é responsável pela translocação das proteínas reconhecidas pela HSC70 para o interior do lisossomo, onde ocorre o processo final da autofagia: a degradação (46).

A estrutura da LAMP-2A é composta por grande domínio luminal (localizado do lado externo da membrana do lisossomo) e por uma curta cauda citoplasmática (localizada do lado interno). Tal estruturação é crucial para suas funções específicas, incluindo seu papel na regulação do processo de CMA (47).

Recentemente, evidenciou-se o papel significativo da CMA na degradação da Proteína Z mutada da alfa-1 antitripsina (ATZ): nesse processo, a proteína HSC70 reconhece a ATZ por meio de uma sequência pentapeptídeo (121QELLR125) e a direciona para a proteína LAMP-2A. A ativação seletiva da CMA não apenas degrada os agregados de ATZ, responsáveis pela atividade tóxica celular, mas também destaca a importância da cauda citoplasmática carregada da LAMP-2A na ligação do substrato, facilitando a degradação da ATZ mediada pela CMA (48).

Figura 9: a participação da CMA na degradação da ATZ



Fonte: adaptado de Lin et al., (2023)

2.5 Autofagia e doenças hepáticas

A autofagia está envolvida em uma variedade de processos fisiológicos normais, incluindo a homeostase celular, além de desempenhar um papel em doenças hepáticas como lesões primárias, metástases, hepatites crônicas e doenças associadas ao fígado gorduroso (49).

Este processo também está envolvido na progressão da fibrose, onde as células estreladas hepáticas se transformam em miofibroblastos, levando eventualmente à cirrose. Quando a autofagia está ativada, ela pode contribuir para intensificar as vias de apoptose (23,50,51) - inclusive em doenças hepáticas colestáticas (doenças em que há obstrução do fluxo biliar) induzidas por hepatotoxinas (52).

3. JUSTIFICATIVA

A deficiência de alfa-1 antitripsina é uma condição genética rara associada a uma série de manifestações clínicas. Com o aumento da realização dos transplantes hepáticos em uma esfera nacional e local, é necessário entender a doença no contexto de explante e avaliar a associação entre o diagnóstico clínico e o achado histopatológico de cirrose de padrão biliar.

Assim, novos estudos sobre os mecanismos de formação dos complexos insolúveis e a ativação da autofagia são necessários a fim de melhorar o nosso conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos que poderiam explicar a hepatopatia secundária à DAAT.

4. QUESTÃO DE PESQUISA

Como a interpretação dos anticorpos imunohistoquímicos envolvidos na autofagia e na formação de autofagossomos podem auxiliar na explicação da patogênese da cirrose biliar secundária à DAAT?

5. HIPÓTESES

5.1 Hipótese nula

- O diagnóstico de cirrose de padrão biliar, secundária à deficiência de alfa-1 antitripsina, não está associado aos fenótipos ou mutações.
- A lesão biliar, secundária à deficiência de alfa-1 antitripsina, não se correlaciona com o acúmulo de proteínas mal dobradas da AAT.

5.2 Hipótese alternativa

- A falta de ação da AAT leva à lesão biliar.
- A disfunção dos autofagossomos está relacionada à lesão hepatocitária.
- A deficiência de alfa 1-antitripsina (DAAT) ocasiona diferenciação histopatológica intra-hepática e extra-hepática por estar associada aos fenótipos ou mutações.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

- Investigar e descrever marcadores de autofagia em pacientes cirróticos secundários à deficiência de alfa-1 antitripsina.

6.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o papel dos autofagossomos na degradação das proteínas mal dobradas e a sua repercussão na árvore biliar.
- Avaliar a expressão dos biomarcadores envolvidos no processo de formação dos autofagossomos (MAP1LC3, p62/SQSTM1, CARM-1 Beclin-1, EZH2) em explantes hepáticos por cirrose associada a deficiência de AAT, por Atresia de Vias Biliares (AVB) e por Colangite Biliar Primária (CBP), e comparar o perfil imuno-histoquímico entre os grupos.
- Avaliar a expressão dos biomarcadores envolvidos na Autofagia Mediada por Chaperonas (HSC70 e LAMP-2A) em explantes hepáticos por cirrose associada a deficiência de AAT, por AVB e por CBP, e comparar o perfil imuno-histoquímico entre os grupos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MORNEX, Jean-François; TRACLET, Julie; GUILLAUD, Olivier; *et al.* Alpha1-antitrypsin deficiency: An updated review. **La Presse Médicale**, v. 52, n. 3, p. 104170, 2023.
2. Poole, B., Oshins, R., Huo, Z., Aranyos, A., West, J., Duarte, S., Clark, V. C., Beduschi, T., Zarrinpar, A., Brantly, M., & Khodayari, N. (2024). Sirtuin3 promotes the degradation of hepatic Z alpha-1 antitrypsin through lipophagy. *Hepatology Communications*, 8(2). <https://doi.org/10.1097/hc9.0000000000000370>.
3. COSTA, Mariana Pena; FERREIRA, Alexandre Rodrigues; RODRIGUES, Adriana Teixeira; *et al.* CLINICAL, LABORATORIAL AND EVOLUTIONARY ASPECTS OF PEDIATRIC PATIENTS WITH LIVER DISEASE DUE TO ALPHA 1-ANTITRYPSIN DEFICIENCY. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 60, n. 4, p. 438–449, 2023.
4. DEBNATH, Jayanta; GAMMOH, Noor; RYAN, Kevin M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 24, n. 8, p. 560–575, 2023.
5. Jeon, M., Park, J., Yang, E., Baek, H., & Kim, H. (2021). Regulation of autophagy by protein methylation and acetylation in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 237(1), 13–28. <https://doi.org/10.1002/jcp.30502>.

6. KRAUSE, Gregory J.; KIRCHNER, Philipp; STILLER, Barbara; *et al.* Molecular determinants of the crosstalk between endosomal microautophagy and chaperone-mediated autophagy. **Cell Reports**, v. 42, n. 12, p. 113529, 2023.

7. CAMELIER, Aquiles A; WINTER, Daniel Hugo; JARDIM, José Roberto; *et al.* Deficiência de alfa-1 antitripsina: diagnóstico e tratamento. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 7, p. 514–527, 2008.

8. R JARDIM, José; CASAS-MALDONADO, Francisco; LEON ARRABAL FERNANDES, Frederico; *et al.* Update on and future perspectives for the diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency in Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, p. e20200380, 2021.

9. SANTOS, Gabriela; TURNER, Alice M. Alpha-1 antitrypsin deficiency: an update on clinical aspects of diagnosis and management. **Faculty Reviews**, v. 9, 2020.

10. BRANTLY, Mark; CAMPOS, Michael; DAVIS, Angela M.; *et al.* Detection of alpha-1 antitrypsin deficiency: the past, present and future. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, n. 1, 2020.

11. SANDHAUS, Robert A.; TURINO, Gerard; BRANTLY, Mark L.; *et al.* The Diagnosis and Management of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency in the Adult. **Chronic**

Obstructive Pulmonary Diseases: Journal of the COPD Foundation, v. 3, n. 3, p. 668–682, 2016.

12. NARAYANAN, Praveena; MISTRY, Pramod K. Update on Alpha-1 Antitrypsin Deficiency in Liver Disease. **Clinical Liver Disease**, v. 15, n. 6, p. 228–235, 2020.

13. VUURBERG, Nienke E; VAN DEN BOOM, Anne Loes; VAN DEN HEUVEL, Marius C; *et al.* Intrahepatic cholangiocarcinoma in a non-cirrhotic liver in a patient with homozygous ZZ alpha-1 antitrypsin deficiency. **BMJ Case Reports**, v. 14, n. 3, p. e240077, 2021.

14. MITCHELL, Ellen L.; KHAN, Zahida. Liver Disease in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Current Approaches and Future Directions. **Current Pathobiology Reports**, v. 5, n. 3, p. 243–252, 2017.

15. PATEL, Dhiren; MCALLISTER, Shannon L.; TECKMAN, Jeffrey H. Alpha-1 antitrypsin deficiency liver disease. **Translational Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, p. 23–23, 2021.

16. TEJWANI, Vickram; STOLLER, James K. The spectrum of clinical sequelae associated with alpha-1 antitrypsin deficiency. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 12_suppl, p. 204062232199569, 2021.

17. FELISBINO, Manuela Brisot; FERNANDES, Frederico Leon Arrabal; NUCCI,

Maria Cecília Nieves Maiorano de; *et al.* The patient profile of individuals with Alpha-1 antitrypsine gene mutations at a referral center in Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 5, p. 383–389, 2018.

18. KIM, Kyu Min; KIM, Sang Geon. Autophagy and microRNA dysregulation in liver diseases. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n. 9, p. 1097–1116, 2014.

19. CHOI, Augustine M.K.; RYTER, Stefan W.; LEVINE, Beth. Autophagy in Human Health and Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 7, p. 651–662, 2013.

20. WU, Yuhui; YAO, Junlin; XIE, Jiansheng; *et al.* The role of autophagy in colitis-associated colorectal cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 3, n. 1, 2018.

21. CHOWDHURY, Sougata Ghosh; RAY, Rachayeeta; KARMAKAR, Parimal. Relating aging and autophagy: a new perspective towards the welfare of human health. **EXCLI Journal**, v. 22, p. 732–748, 2023.

22. RAEE, Pourya; TAN, Shing Cheng; NAJAFI, Sajad; *et al.* Autophagy, a critical element in the aging male reproductive disorders and prostate cancer: a therapeutic point of view. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 21, n. 1, 2023.

23. KOUROUMALIS, Elias; TSOMIDIS, Ioannis; VOUMVOURAKI, Argyro. Interplay of autophagy, apoptosis, and senescence in primarybiliary cholangitis. **Exploration of Digestive Diseases**, v. 2, n. 5, p. 223–245, 2023.

24. GRAMA, Alina; MITITELU, Alexandra; SÎRBE, Claudia; *et al.* Immune-mediated cholangiopathies in children: the need to better understand the pathophysiology for finding the future possible treatment targets. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 2023.
25. XU, Weilin; OCAK, Umut; GAO, Liansheng; *et al.* Selective autophagy as a therapeutic target for neurological diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 4, p. 1369–1392, 2020.
26. GÓMEZ-VIRGILIO, Laura; SILVA-LUCERO, Maria-del-Carmen; FLORES-MORELOS, Diego-Salvador; *et al.* Autophagy: A Key Regulator of Homeostasis and Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Modulators. **Cells**, v. 11, n. 15, p. 2262, 2022.
27. RODRIGUEZ, Myosotys; OWENS, Florida; PERRY, Marissa; *et al.* Implication of the Autophagy-Related Protein Beclin1 in the Regulation of EcoHIV Replication and Inflammatory Responses. **Viruses**, v. 15, n. 9, p. 1923, 2023.
28. SALWA, Amreen; FERRARESI, Alessandra; SECOMANDI, Eleonora; *et al.* High BECN1 Expression Negatively Correlates with BCL2 Expression and Predicts Better Prognosis in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Role of Autophagy. **Cells**, v. 12, n. 15, p. 1924, 2023.
29. PRERNA, Kumari; DUBEY, Vikash Kumar. Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 204, p. 258–273, 2022.
30. TRAN, Sharon; FAIRLIE, W. Douglas; LEE, Erinna F. BECLIN1: Protein

Structure, Function and Regulation. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1522, 2021.

31. SAKURAI, Hajime Tajima; IWASHITA, Hidefumi; ARAKAWA, Satoko; *et al.* Development of small fluorescent probes for the analysis of autophagy kinetics. **iScience**, v. 26, n. 7, p. 107218, 2023.

32. YE, Jing; ZHANG, Jin; ZHU, Yanghui; *et al.* Targeting autophagy and beyond: Deconvoluting the complexity of Beclin-1 from biological function to cancer therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 13, n. 12, p. 4688–4714, 2023.

33. TAN, Chong Teik; SOH, Natalie Jun Hui; CHANG, Hao-Chun; *et al.* p62/SQSTM1 in liver diseases: the usual suspect with multifarious identities. **The FEBS Journal**, v. 290, n. 4, p. 892–912, 2021.

34. ROGOV, Vladimir; DÖTSCH, Volker; JOHANSEN, Terje; *et al.* Interactions between Autophagy Receptors and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy. **Molecular Cell**, v. 53, n. 2, p. 167–178, 2014.

35. LIU, Yuankai; YANG, Qiong. The roles of EZH2 in cancer and its inhibitors. **Medical Oncology**, v. 40, n. 6, 2023.

36. SHU, Feng; XIAO, Han; LI, Qiu-Nuo; *et al.* Epigenetic and post-translational modifications in autophagy: biological functions and therapeutic targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, 2023.

37. WEI, Fu-Zheng; CAO, Ziyang; WANG, Xi; *et al.* Epigenetic regulation of autophagy by the methyltransferase EZH2 through an MTOR-dependent pathway.

Autophagy, v. 11, n. 12, p. 2309–2322, 2015.

38. JIN, Wenke; ZHANG, Jin; CHEN, Xiya; *et al.* Unraveling the complexity of histone-arginine methyltransferase CARM1 in cancer: From underlying mechanisms to targeted therapeutics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1878, n. 4, p. 188916, 2023.

39. STOUTH, Derek W.; VANLIESHOUT, Tiffany L.; MIKHAIL, Andrew I.; *et al.* CARM1 drives mitophagy and autophagy flux during fasting-induced skeletal muscle atrophy. **Autophagy**, p. 1–23, 2023.

40. SABER, John; RUDNICKI, Michael A. Carm1 and the Epigenetic Control of Stem Cell Function. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 11, n. 11, p. 1143–1150, 2022.

41. CYR, Douglas M.; RAMOS, Carlos H. Specification of Hsp70 Function by Hsp40 Co-chaperones. In: *Subcellular Biochemistry*. Cham: Springer International Publishing, 2022, p. 127–139. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-031-14740-1_4>. Acesso em: 27 Jan. 2024.

42. YAO, Ruchen; SHEN, Jun. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms, biological functions, and diseases. **MedComm**, v. 4, n. 5, 2023.

43. GROCHOWSKA, Katarzyna M.; SPERVESLAGE, Marit; RAMAN, Rajeev; *et al.* Chaperone-mediated autophagy in neuronal dendrites utilizes activity-dependent lysosomal exocytosis for protein disposal. **Cell Reports**, v. 42, n. 8, p. 112998, 2023.

44. LIU, Tuo; DANIELS, Christopher K.; CAO, Shousong. Comprehensive review

on the Hsc70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 136, n. 3, p. 354–374, 2012.

45. DORES-SILVA, Paulo R.; CAUVI, David M.; COTO, Amanda L.S.; *et al.* Human heat shock cognate protein (Hsc70/HSPA8) interacts with negatively charged phospholipids by a different mechanism than other HSP70s and brings HSP90 into membranes. **Cell Stress and Chaperones**, v. 26, n. 4, p. 671–684, 2021.

46. XU, Xiaoyan; SUN, Yaqin; CEN, Xufeng; *et al.* Metformin activates chaperone-mediated autophagy and improves disease pathologies in an Alzheimer disease mouse model. **Protein & Cell**, v. 12, n. 10, p. 769–787, 2021.

47. LOSMANOVÁ, Tereza; JANSER, Félice A.; HUMBERT, Magali; *et al.* Chaperone-Mediated Autophagy Markers LAMP2A and Hsc70 Are Independent Adverse Prognostic Markers in Primary Resected Squamous Cell Carcinomas of the Lung. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–12, 2020.

48. IKAMI, Yuta; TERASAWA, Kazue; WATABE, Tetsuro; *et al.* The two-domain architecture of LAMP2A within the lysosomal lumen regulates its interaction with HSPA8/Hsc70. **Autophagy Reports**, v. 1, n. 1, p. 205–209, 2022.

49. Zhou, J., Wang, J., Ren, H., & Shi, X. (2021). Autophagy plays a double-edged sword role in liver diseases. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 78(1), 9–17. <https://doi.org/10.1007/s13105-021-00844-7>.

50. Seo, J., Kwon, D., Kim, S. H., Byun, M. R., Lee, Y.-H., & Jung, Y.-S. (2024). Role

of autophagy in betaine-promoted hepatoprotection against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Current Research in Food Science*, 8, 100663. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2023.100663>.

51. Alim Al-Bari, A., Ito, Y., Thomes, P. G., Menon, M. B., García-Macia, M., Fadel, R., Stadlin, A., Peake, N., Faris, M. E., Eid, N., & Klionsky, D. J. (2023). Emerging mechanistic insights of selective autophagy in hepatic diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1149809>.

52. Byrnes, K., Bailey, N. T., Baral, K., Mercer, A., Joshi, S., Wahby, N., Rorison, T., Liu, G., Yin, X.-M., & Khambu, B. (2023). Impaired hepatic autophagy exacerbates hepatotoxin induced liver injury. *Cell Death Discovery*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01368-3>.

53. LIN, Jiayu; LU, Haorui; WEI, Xinyue; *et al.* **Chaperone-mediated autophagy is an overlooked pathway for mutant α 1-antitrypsin Z degradation.** [s.l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/2023.11.24.568525>>. Acesso em: 27 Jan. 2024.

54. CHU, Andrew S.; CHOPRA, Kapil B.; PERLMUTTER, David H. Is severe progressive liver disease caused by alpha-1-antitrypsin deficiency more common in children or adults? **Liver Transplantation**, v. 22, n. 7, p. 886–894, 2016.

55. FROMME, Malin; SCHNEIDER, Carolin V.; TRAUTWEIN, Christian; *et al.* Alpha-1 antitrypsin deficiency: A re-surfacing adult liver disorder. **Journal of**

Hepatology, v. 76, n. 4, p. 946–958, 2022.

56. GHAVAMI, Saeid; ZAMANI, Mozhddeh; AHMADI, Mazaher; *et al.* Epigenetic regulation of autophagy in gastrointestinal cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1868, n. 11, p. 166512, 2022.

57. SHIN, Hi-Jai R.; KIM, Hyunkyung; OH, Sungryong; *et al.* AMPK–SKP2–CARM1 signalling cascade in transcriptional regulation of autophagy. **Nature**, v. 534, n. 7608, p. 553–557, 2016.

58. LI, Chen; YU, Lu; XUE, Han; *et al.* Nuclear AMPK regulated CARM1 stabilization impacts autophagy in aged heart. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 486, n. 2, p. 398–405, 2017.

59. LORINCZ, Reka; CURIEL, David T. Advances in Alpha-1 Antitrypsin Gene Therapy. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 63, n. 5, p. 560–570, 2020.

60. STRNAD, Pavel; MCELVANEY, Noel G.; LOMAS, David A. Alpha1-Antitrypsin Deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 15, p. 1443–1455, 2020.

61. PIRES FERREIRA, Debora; GRUNTMAN, Alisha M; FLOTTE, Terence R. Gene therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency: an update. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 23, n. 3, p. 283–291, 2023.

8. CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia aplicada neste estudo, com a literatura consultada e com os resultados obtidos, foi possível concluir que:

1. Além da mutação PiZZ, alterações na proteína CARM-1 podem estar envolvidas na progressão da doença hepática relacionada à AATD para cirrose;
2. A via das chaperonas pode não estar envolvida na patogênese da hepatopatia secundária à deficiência de alfa 1-antitripsina;
3. A subexpressão do CARM-1 pode não estar associada à cirrose de padrão biliar nos casos de DAAT.

9. PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FUTURAS

É importante ressaltar a amostra restrita no presente estudo, o que pode impactar generalizações mais amplas dos resultados. Assim, com base nos resultados apresentados, recomenda-se investigar mais profundamente aspectos de apoptose e necrose em estudos futuros, a fim de expandir nosso entendimento sobre o fenômeno estudado.

10. APÊNDICES

APÊNDICE A - Interpretação imuno-histoquímica do anticorpo Beclin-1

Grupo Adulto DAAT	
Caso 1	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 2	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 3	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 4	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 5	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Grupo Adulto CBP	
Caso 6	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais. Grânulos em septos perisseptais moderadamente marcados*.
Caso 7	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 8	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 9	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 10	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Grupo Pediátrico DAAT	
Caso 11	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 12	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 13	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 14	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 15	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 16	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Grupo Pediátrico AVB	
Caso 17	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais. Grânulos em septos perisseptais moderadamente marcados*.
Caso 18	Positivo em hepatócitos. Negativo em reação ductular. Grânulos em septos perisseptais moderadamente marcados*.
Caso 19	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 20	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 21	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 22	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais

APÊNDICE B - Interpretação imuno-histoquímica do anticorpo MAP1LC3

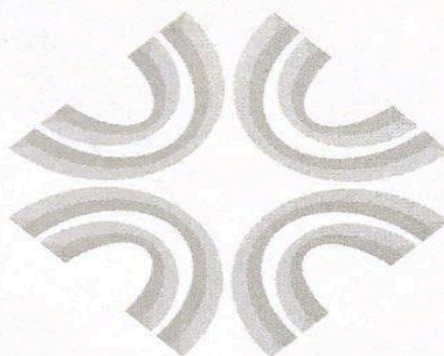
Grupo Adulto DAAT	
Caso 1	Negativo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 2	Negativo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 3	Negativo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 4	Negativo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 5	Negativo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Grupo Adulto CBP	
Caso 6	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 7	Negativo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 8	Negativo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 9	Negativo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 10	Negativo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Grupo Pediátrico DAAT	
Caso 11	Negativo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 12	Negativo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 13	Negativo em hepatócitos. Negativo em reação ductular
Caso 14	Negativo em hepatócitos. Positivo em reação ductular
Caso 15	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 16	Negativo em hepatócitos. Positivo em reação ductular
Grupo Pediátrico AVB	
Caso 17	Negativo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 18	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 19	Negativo em hepatócitos. Negativo em reação ductular
Caso 20	Negativo em hepatócitos. Positivo em reação ductular
Caso 21	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 22	Negativo em hepatócitos. Positivo em reação ductular

APÊNDICE C - Interpretação imuno-histoquímica do anticorpo p62/SQSTM1

Grupo Adulto DAAT	
Caso 1	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 2	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 3	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais. Obs.: Grânulos em septos perisseptais fortemente marcados*.
Caso 4	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais. Obs.: Grânulos em septos perisseptais fortemente marcados*.
Caso 5	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Grupo Adulto CBP	
Caso 6	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 7	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 8	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 9	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 10	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Grupo Pediátrico DAAT	
Caso 11	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais. Grânulos em septos perisseptais moderadamente marcados*.
Caso 12	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais. Grânulos em septos perisseptais moderadamente marcados*.
Caso 13	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais. Grânulos em septos perisseptais fortemente marcados*.
Caso 14	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais. Grânulos em septos perisseptais fortemente marcados*.
Caso 15	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais. Grânulos em septos perisseptais moderadamente marcados*.
Caso 16	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais. Grânulos em septos perisseptais fortemente marcados*.
Grupo Pediátrico AVB	
Caso 17	Positivo em hepatócitos. Positivo em reação ductular
Caso 18	Positivo em hepatócitos. Positivo em reação ductular
Caso 19	Positivo em hepatócitos. Positivo em reação ductular

APÊNDICE C - Interpretação imuno-histoquímica do anticorpo p62/SQSTM1

Caso 20	Positivo em hepatócitos. Positivo em reação ductular
Caso 21	Positivo em hepatócitos. Positivo em reação ductular
Caso 22	Positivo em hepatócitos. Positivo em reação ductular



HOSPITAL DE

CLÍNICAS
PORTO ALEGRE RS

APÊNDICE D - Interpretação imuno-histoquímica do anticorpo EZH2

Grupo Adulto DAAT	
Caso 1	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais
Caso 2	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais
Caso 3	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais
Caso 4	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais
Caso 5	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais
Grupo Adulto CBP	
Caso 6	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 7	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 8	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 9	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 10	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Grupo Pediátrico DAAT	
Caso 11	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais
Caso 12	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais
Caso 13	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais
Caso 14	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais
Caso 15	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais
Caso 16	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais
Grupo Pediátrico AVB	
Caso 17	Negativo em hepatócitos. Negativo em reação ductular
Caso 18	Negativo em hepatócitos. Negativo em reação ductular
Caso 19	Negativo em hepatócitos. Negativo em reação ductular
Caso 20	Negativo em hepatócitos. Negativo em reação ductular
Caso 21	Negativo em hepatócitos. Negativo em reação ductular
Caso 22	Negativo em hepatócitos. Negativo em reação ductular

APÊNDICE E - Interpretação imuno-histoquímica do anticorpo CARM-1

Grupo Adulto DAAT	
Caso 1	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 2	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 3	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 4	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 5	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Grupo Adulto CBP	
Caso 6	Positivo focal nos hepatócitos. Positivo focal nas células ductais
Caso 7	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 8	Positivo "focal" nos hepatócitos. Positivo "focal" nas células ductais
Caso 9	Positivo "focal" nos hepatócitos. Positivo "focal" nas células ductais
Caso 10	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Grupo Pediátrico DAAT	
Caso 11	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 12	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 13	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 14	Positivo em hepatócitos. Positivo em células ductais
Caso 15	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 16	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Grupo Pediátrico AVB	
Caso 17	Positivo "focal" nos hepatócitos. Positivo "focal" nas células ductais
Caso 18	Positivo nos hepatócitos. Positivo nas células ductais
Caso 19	Positivo nos hepatócitos. Positivo nas células ductais
Caso 20	Positivo nos hepatócitos. Positivo em reação ductular
Caso 21	Positivo "focal" nos hepatócitos. Positivo "focal" em reação ductular
Caso 22	Positivo "focal" nos hepatócitos. Positivo "focal" em reação ductular

APÊNDICE F - Interpretação imuno-histoquímica do anticorpo HSC70

Grupo Adulto DAAT	
Caso 1	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 2	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 3	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 4	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 5	Positivo em hepatócitos. Positivo focal em células ductais (01 ducto).
Grupo Adulto CBP	
Caso 6	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 7	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 8	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 9	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 10	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Grupo Pediátrico DAAT	
Caso 11	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 12	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 13	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 14	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 15	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 16	
Grupo Pediátrico AVB	
Caso 17	Positivo em hepatócitos. Positivo em reação ductular
Caso 18	Positivo em hepatócitos. Positivo em reação ductular
Caso 19	Positivo em hepatócitos. Negativo em reação ductular
Caso 20	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 21	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais
Caso 22	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais

APÊNDICE G - Interpretação imuno-histoquímica do anticorpo LAMP-2A

Grupo Adulto DAAT	
Caso 1	Positivo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais.
Caso 2	Positivo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais.
Caso 3	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais.
Caso 4	Positivo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais.
Caso 5	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais.
Grupo Adulto CBP	
Caso 6	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais. Exibe certa marcação em células de Kupffer.
Caso 7	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais.
Caso 8	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais.
Caso 9	Negativo em hepatócitos. Negativo em células ductais.
Caso 10	Positivo em hepatócitos. Negativo em células ductais.
Grupo Pediátrico DAAT	
Caso 11	Positivo forte em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais.
Caso 12	Positivo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais.
Caso 13	Positivo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais.
Caso 14	Positivo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais.
Caso 15	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais.
Caso 16	Negativo em hepatócitos perisseptais. Negativo em células ductais.
Grupo Pediátrico AVB	
Caso 17	Positivo em hepatócitos. Negativo em reação ductular.
Caso 18	Positivo em hepatócitos perisseptais. Negativo em reação ductular.
Caso 19	Negativo em hepatócitos. Negativo em reação ductular.
Caso 20	Positivo em hepatócitos hepatócitos perisseptais. Negativo em reação ductular.
Caso 21	Negativo em hepatócitos. Negativo em reação ductular.
Caso 22	Negativo em hepatócitos. Negativo em reação ductular.

11. ANEXOS

Anexo 1: Orçamento

Anexo 2: Termo de compromisso para utilização de dados

Anexo 1:



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE DIRETORIA DE PESQUISA

Relatório de Orçamento

Projeto: 2021 / 0553

Título do projeto: Estudo sobre a participação da autofagia na patogênese da hepatopatia secundária à deficiência de alfa 1-antitripsina

Pesquisador responsável: CARLOS THADEU SCHMIDT CERSKI

Itens personalizados

Item	Financiador	Valor unitário (R\$)	Quantidade	Total (R\$)
CONSULTA - CPC	FIPE	7,55	12	90,60
LÂMINA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (ANTICORPO: ROTINA) - (POR UNIDADE)	FIPE	25,00	170	4.250,00
Valor total (Itens personalizados) (R\$):				4.340,60

Serviços de terceiros

Item	Financiador	Valor unitário (R\$)	Quantidade	Total (R\$)
Tradutor	PESQUISADOR	150,00	1	150,00
Valor total (Serviços de terceiros) (R\$):				150,00

Valor total do orçamento: **R\$** 4.490,60

Totais por financiador

Financiador	Total (R\$)
PESQUISADOR	150,00
FIPE	4.340,60

Anexo 2:



HOSPITAL DE
CLÍNICAS
PORTO ALEGRE - RS



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HCPA

DECLARAÇÃO DE CONHECIMENTO E CUMPRIMENTO DA LEI GERAL DE
PROTEÇÃO DE DADOS PARA PESQUISAS AVALIADAS PELO CEP HCPA

Título do projeto: Estudo sobre a participação da autofagia na patogênese da hepatopatia secundária à deficiência de alfa 1-antitripsina.

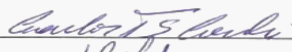


Os pesquisadores declaram conhecer e cumprir os requisitos da Lei Geral de Proteção de Dados (Lei Nº 13.709, de 14 de agosto de 2018) quanto ao tratamento de dados pessoais e dados pessoais sensíveis que serão utilizados para a execução do presente projeto de pesquisa.

Declaram estar cientes que o acesso e o tratamento dos dados deverão ocorrer de acordo com o descrito na versão do projeto aprovada pelo CEP HCPA.

Nome

Assinatura

Carlos Thadeu Cerski
Jéssica Onofre de Brito Lima
Eduardo Cremonese Filippi Chiela

Data 08/11/2021