

**Valor Prognóstico de Assinaturas de Expressão Diferencial dos
Genes do Sistema de Oxidação Fosforilativa (OXPHOS) em
Câncer**

ALAN TARDIN DA SILVA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

DEZEMBRO DE 2022

**Valor Prognóstico de Assinaturas de Expressão Diferencial dos
Genes do Sistema de Oxidação Fosforilativa (OXPHOS) em
Câncer**

ALAN TARDIN DA SILVA

Tese apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia – CBB, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das exigências
para obtenção do título de Doutor em
Biociências e Biotecnologia.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
DEZEMBRO DE 2022**

Valor Prognóstico de Assinaturas de Expressão Diferencial dos Genes do Sistema de Oxidação Fosforilativa (OXPHOS) em Câncer

ALAN TARDIN DA SILVA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

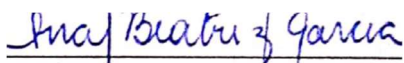
Comissão Examinadora:



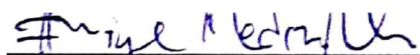
Dr. Filipe Brum Machado, (Doutor em Ciências Biológicas, Genética),
Universidade do Estado de Minas Gerais, UEMG (Membro Externo)



Dr. Victor Martin Quintana Flores (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF
(Membro Interno)



Dr^a. Ana Beatriz Garcia (Doutora em Biologia Molecular e Engenharia Genética) –
UENF (Membro Interno)



Dr. Enrique Medina-Acosta (Doutor em Parasitologia Médica e Molecular) –
UENF.
(Orientador)

DEDICATÓRIA

À Deus, pela sua presença e constante zelo, por toda paz, conforto e apoio que excede todo o entendimento

À toda minha família por estar sempre presente em minha vida, e por toda torcida e compreensão ao longo desses anos

À minha querida tia Ilma, pessoa mais tenra que já conheci, que em sua breve jornada pela vida me ensinou que gentileza não faz distinção, cabe e deve ser dever de todos serem gentis com próximo, pois não sabemos a dor que pode existir ali. Tia que foi mãe, tia que foi tia, tia foi pai...Tia que foi tudo e ainda mais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta, que ao longo destes quatro anos de convivência e ensino, mais do que um orientador se tornou um amigo capaz de fazer com que eu também crescesse como pessoa. Agradeço por todo tempo dispensado ao meu crescimento científico e formação profissional, mas principalmente por ter comprado a ideia inicial deste projeto.

À Cristina dos Santos Ferreira, por toda amizade nos momentos difíceis, por todo incentivo, e pela colaboração na construção deste estudo, pelas discussões e ideias compartilhadas, mas principalmente pela ajuda fora dos horários com os scripts e os outros problemas, a qual foi fundamental para a finalização deste trabalho.

À minha família que tornou todo esse trabalho possível, mãe, pai e irmã, meus mais profundos agradecimentos a toda a ajuda prestada e suporte oferecido. Sem vocês, dificilmente esse projeto de vida teria acontecidos. Amo todos vocês.

Aos amigos: Mirna Lucio, Jessica Mulinari, Thiago Jacomine pelo convívio, companheirismo, e aprendizado mútuo ao longo desses anos. Em especial a amiga Joice Moraes, por toda amizade, companheirismo, pelo dom de me ouvir e me entender, mas principalmente por aguentar minhas pirações.

A todo o corpo docente da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, que direta ou indiretamente participaram efetivamente da minha formação acadêmica.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro— UENF, em particular ao Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, pela oportunidade concedida.

À FAPERJ e CNPq por todo auxílio técnico e financeiro.

RESUMO

O sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS) compreende cinco complexos enzimáticos da cadeia respiratória localizados na membrana interna das mitocôndrias, cuja função é fundamental no metabolismo energético da célula. Distúrbios nesse sistema, como a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas mitocôndrias promovem importantes condições clínicas incluindo o câncer. A incidência de e a mortalidade por vários tipos de câncer são dispare em homens e mulheres. Neste estudo, investigamos se os genes do sistema OXPHOS explicam, em parte, a diferença de agressividade tumoral observada entre sexos, tendo como métricas da desdiferenciação oncogênica quatro métricas de sobrevida dos pacientes (sobrevivência geral (OS), sobrevivência livre de eventos (DSS), sobrevivência livre de doença (DFI) e sobrevivência livre de progressão (PFI)), além dos índices de infiltrados de células imunes e o potencial estaminal. Utilizamos dados secundários de transcriptoma (RNA-Seq) dos consórcios *Genotype-Tissue Expression* (GTEx) e *The Câncer Genome Atlas* (TCGA) para identificar genes diferencialmente expressos (DEG) e conjuntos de genes exibindo perfis de expressão e efeito similares, por meio de metanálise computacional para definir assinaturas gênicas com potencial valor prognóstico em 33 tipos de câncer. Observamos DEG tanto hipo expressos em câncer de cérebro, pele, pulmão, sangue periférico, ovário, útero e testículo, quanto hiper expressos em câncer de ovário, útero, pele, pulmão, testículo e em leucemia. Identificamos nove assinaturas (ID1 a ID9) associadas com sobrevivência geral Pan-Câncer. As assinaturas ID1 e ID2 mostraram uma hiper expressão em tecido não tumoral de rim, já as assinaturas ID4, ID5, ID6 e ID8 demonstraram uma hiper expressão em tumores de cérebro, pulmão e pele. Os perfis de expressão das assinaturas ID1 a ID9 foram associados com bom prognóstico Pan-Câncer nas métricas de desfecho OS, DSS e PFI. Identificamos correlações sexo biológico dependentes para as assinaturas de sobrevivência geral Pan-Câncer nas métricas OS, DSS, PFI. As assinaturas ID3, ID4, ID7, ID8 e ID9 explicam um viés sexual masculino associado a sobrevivência em KIRC, SKCM e UVM. A assinatura ID6 explica um viés sexual feminino, associado a sobrevivência em LUAD. Também identificamos oito assinaturas (ID10 a ID17) com associação de efeito protetor em KIRC, KIRP e OV. As assinaturas

ID12, ID13, ID14, ID15 e ID17 correlacionaram com risco em KICH, LAML, LIHC, SKCM e UVM. Identificamos 26 assinaturas (ID18 a ID44) associadas a infiltrados de células imunes, sendo ID22-ID35 e ID39-ID43 positivamente e ID18-ID21, ID32, ID36-ID38 e ID44 negativamente correlacionadas em diferentes tipos de câncer. Identificamos treze assinaturas (ID45 a ID58) com correlação positiva (ID45-ID49, ID51, ID53-ID56) ou negativa (ID50, ID52, ID57 e ID58) com o potencial estaminal em diferentes tipos de câncer. Concluímos que a desregulação da expressão dos genes OXPHOS em câncer explica a diferença de incidência tumoral observada entre sexos, considerando diversas métricas da desdiferenciação oncogênica. As assinaturas identificadas possuem significativo valor prognóstico Pan-Câncer.

Palavras-chave: valor prognóstico; Genes Diferencialmente Expressos; OXPHOS; câncer; assinatura gênica; Pan-Câncer

ABSTRACT

A vital component of the cell's energy metabolism is the oxidative phosphorylation system (OXPHOS), which comprises five enzyme complexes of the respiratory chain in the inner membrane of mitochondria. Reactive oxygen species (ROS) produced in excess in the mitochondria, for example, disturb this system and promote clinical diseases like cancer. Men and women have varied cancer incidence and mortality rates from distinct cancer kinds. Using four patient survival metrics (overall survival (OS), disease-specific survival (DSS), disease-free interval (DFI), and progression-free interval (PFI) as metrics of oncogenic dedifferentiation, as well as the indices of immune cell infiltrates and stemness, we investigated whether the genes of the OXPHOS system explain, in part, the difference in tumor aggressiveness observed between sexes. We defined gene signatures with potential prognostic value in 33 types of cancer by using secondary transcriptome (RNA-Seq) data from the Genotype-Tissue Expression (GTEx) and The Cancer Genome Atlas (TCGA) consortia to identify differentially expressed genes (DEG) and gene sets exhibiting similar expression and effect profiles. We found that DEG were upregulated in leukemia, ovarian, uterine, skin, lung, testis, and peripheral blood malignancies and downregulated in brain, skin, lung, and peripheral blood cancers. Nine signatures (ID1–ID9) connected to Pan-Cancer survival have been found. While ID4, ID5, ID6, and ID8 signatures showed overexpression in brain, lung, and skin malignancies, ID1 and ID2 signatures showed overexpression in normal kidney tissue. The OS, DSS, and PFI survival outcome measures showed a positive correlation between the expression profile of the ID1 through ID9 markers and a favorable prognosis. We discovered Pan-Cancer associations with OS, DSS, and PFI survival parameters that are sex-dependent biologically. The male sex bias associated with survival in KIRC, SKCM, and UVM is explained by the ID3, ID4, ID7, ID8, and ID9 signatures. The female sex bias associated with survival in LUAD is visible in the ID6 signature. Eight signatures, from ID10 to ID17, were likewise found to have a protective impact on KIRC, KIRP, and OV. In KICH, LAML, LIHC, SKCM, and UVM, the ID12, ID13, ID14, ID15, and ID17 signatures are linked to risk. We identified 26 signatures (ID18 to ID44) associated with immune cell infiltrates, with ID 22-ID35 e ID39-ID43 positively correlated and ID18-ID21, ID32, ID36-ID38 e ID44 negatively correlated in different types of cancer. We identified thirteen

signatures (ID45 to ID58) with positive (ID45-ID49, ID51, ID53-ID56) or negative (ID50, ID52, ID57 and ID58) correlation with stem potential in different malignancies. Considering the oncogenic dedifferentiation metrics, we conclude that deregulation of OXPHOS gene expression in cancer accounts for the variation in tumor incidence across sexes. The Pan-Câncer predictive value of the discovered signatures is significant.

Keywords: prognostic value; Differential Expressed Genes; OXPHOS; cancer

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação do sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS).	18
Figura 2. Apresentações clínicas associadas a doenças mitocondriais.	21
Figura 3. Principais tipos de câncer para a estimativa de novos casos e mortes por sexo nos Estados Unidos em 2022.	26
Figura 4. Genes associados ao sistema de oxidação fosforilativa (OXPHOS).	38
Figura 5. Gráfico de balão dos genes do sistema OXPHOS expressos diferencialmente em tecidos normais versus tecidos com câncer.	39
Figura 6A. Mapa de Calor das correlações entre os perfis de expressão dos genes OXPHOS e sobrevivência geral.	41
Figura 6B. Mapa de Calor das correlações entre os perfis de expressão dos genes OXPHOS e sobrevivência geral.	42
Figura 6C. Mapa de Calor das correlações entre os perfis de expressão dos genes OXPHOS e sobrevivência geral.	43
Figura 7. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hiper expressa em carcinoma de células renais claras.	44
Figura 8. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hipo expressa em carcinoma de células renais claras.	45
Figura 9. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hipo expressa em carcinoma papilar de células renais.	45
Figura 10. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hiper expressa em gliomas de baixo grau.	46
Figura 11. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hipo expressa em gliomas de baixo grau.	46
Figura 12. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hiper expressa em adenocarcinoma de pulmão.	47
Figura 13. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hiper expressa em melanoma cutâneo.	47
Figura 14. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em KIRC.	49
Figura 15. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em KIRC.	50
Figura 16. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença (DFI) em KIRC.	51
Figura 17. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em KIRC.	52
Figura 18. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em KIRC.	53
Figura 19. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em KIRC.	54
Figura 20. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença (DFI) em KIRC.	55
Figura 21. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em KIRC.	56
Figura 22. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em KIRP.	57
Figura 23. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em KIRP.	58

Figura 24. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença (DFI) em KIRP para homens.....	59
Figura 25. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em KIRP para homens.....	60
Figura 26. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em LGG. .	62
Figura 27. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em LGG.	63
Figura 28. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença (DFI) em LGG.	64
Figura 29. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em LGG para homens.....	65
Figura 30. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em LGG. .	66
Figura 31. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em LGG.	67
Figura 32. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença (DFI) em LGG.	68
Figura 33. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em LGG.	69
Figura 34. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em LUAD para mulheres.	70
Figura 35. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em LUAD para mulheres.....	71
Figura 36. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença (DFI) em LUAD.	72
Figura 37. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em LUAD para mulheres.....	73
Figura 38. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em SKCM para mulheres.	74
Figura 39. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em SKCM para homens.....	75
Figura 40. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em SKCM para homens.....	76
Figura 41. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em UVM..	77
Figura 42. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em UVM.	78
Figura 43. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em UVM para homens.	79
Figura 44. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em UVM para homens.	80
Figura 45. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em UVM para homens.	81
Figura 46. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em UVM para homens.	82
Figura 47. Boxplot representativo da associação entre os perfis moleculares das assinaturas ID10 a ID17 e os efeitos de risco ou efeito protetor em diferentes cânceres.	84
Figura 48. Mapa de calor representativo das correlações positivas entre os perfis de expressão das assinaturas ID22 a ID35, ID39 a ID43 e infiltrados de células imunes.	86

- Figura 49. Mapa de calor representativo das correlações negativas entre os perfis de expressão das assinaturas ID18 a ID21, ID32, ID36 a ID38, ID44 e infiltrados de células imunes. 87
- Figura 50. Gráfico de radar representativo para a correlação entre o perfil molecular das assinaturas ID45 a ID49, ID51, ID53 a ID56 e o potencial estaminal com coeficientes de correlação positiva. 88
- Figura 51. Gráfico de radar representativo para a correlação entre o perfil molecular das assinaturas ID50, ID52, ID57, ID58 e o potencial estaminal com coeficientes de correlação negativa..... 89

LISTA DE ABREVIATURA

Chr – *Chromosome*

CSCs – *Câncer Stem Cells*

DEG – *Differentially Expressed Genes*

DSS – *Disease-Specific Survival*

DFI – *Disease-Free Interval*

ETC - *Electron Transport Chain*

FDR - *False Discovery Rate*

GEPIA2 – *Gene Expression Profiling Interactive Analysis*

GTEx - *Genotype-Tissue Expression*

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

mtDNA – *Mitochondrial DNA*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

OXPHOS – *Oxidative Phosphorylation System*

OS – *Overall Survival*

PFI – *Progression-Free Interval*

RNA-Seq - *Transcriptomic sequencing of RNA*

ROS - *Reactive Oxygen Species*

RPKM – *Reads Per Kilobase of Transcript per Million*

RSEM - *RNA-Seq by Expectation-Maximization*

TCGA - *The Câncer Genome Atlas Program*

USCS - *University of California Santa Cruz*

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURA.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 O Sistema de Oxidação Fosforilativa (OXPHOS).....	17
1.2 Doenças Associadas ao Sistema OXPHOS	19
1.3 Metabolismo Tumoral e o Sistema OXPHOS	21
1.4 Associações entre o Microambiente Tumoral, Células Imunes e o Potencial Estaminal	23
1.5 Disparidades na Incidência de Cânceres Associadas ao Sexo.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Seleção dos genes OXPHOS	28
4.2 Análise da Expressão Diferencial dos Genes OXPHOS em Diferentes Tecidos.....	29
4.3 Análise Pan-Câncer da Correlação Entre o Perfil de Expressão dos Genes OXPHOS e Sobrevivência geral	31
4.4 Análise de Comparação do Perfil de Expressão das Assinaturas Gênicas Associadas com Sobrevivência geral entre Amostras Saudáveis e com Tumor.....	32
4.5 Análise de Correlação dos Perfis de Expressão das Assinaturas Gênicas para Diferentes Desfechos de Sobrevivência em Diferentes Cânceres	33
4.6 Análise de Associação Entre os Perfis Moleculares e os Efeitos de Risco ou Efeito em Diferentes Cânceres	34
4.7 Análise de Correlação Entre o Perfil Molecular das Assinaturas com Infiltrados Imune e o Potencial Estaminal.....	35
5. RESULTADOS.....	37
5.1. Expressão Diferencial dos Genes do Sistema OXPHOS	37
5.2. Mapa Pan-Câncer da Correlação Entre o Perfil de Expressão dos Genes OXPHOS e Sobrevivência geral.....	40
5.3 Comparação do Perfil de Expressão das Assinaturas Gênicas Associadas com Sobrevivência geral entre Amostras Saudáveis e com Tumor Perfil.....	43

5.4	Análise de Correlação dos Perfis de Expressão das Assinaturas Gênicas – OXPHOS com Diferentes Desfechos de Sobrevida em Diferentes Cânceres....	48
5.5	Associação Entre os Perfis Moleculares dos Genes OXPHOS e o Risco ou Efeito Protetor em Diferentes Cânceres.....	83
5.6	Correlação Entre o Perfil Molecular das Assinaturas dos Genes OXPHOS com Infiltrados Imunes.....	84
5.7	Correlação Entre o Perfil Molecular das Assinaturas dos Genes OXPHOS e o Potencial Estaminal.....	87
6.	DISCUSSÃO.....	89
7.	CONCLUSÕES.....	97
8.	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	98
9.	LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES.....	98
10.	REFERÊNCIAS.....	104

1. INTRODUÇÃO

O sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS) apresenta uma base genética com o envolvimento de dois genomas, o DNA mitocondrial (mtDNA) e o DNA nuclear, o qual é transmitido biparentalmente (nDNA) (ROUILLARD *et al.*, 2016; LECHUGA-VIECO *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2022). Esse sistema é composto pela cadeia transportadora de elétrons (ETC), formada por cinco grandes complexos. A ETC realiza então as reações redox envolvidas na respiração celular enquanto gera a força motriz de prótons usada pelo complexo ATPase para sintetizar ATP (FERNANDEZ-VIZARRA *et al.*, 2009; KOOPMAN *et al.*, 2013; LECHUGA-VIECO *et al.*, 2021). A biogénese do sistema OXPHOS envolve vários passos, desde a expressão de genes codificados em genomas fisicamente separados, até à montagem coordenada de componentes e cofatores que formam cada complexo individual e, eventualmente, os supercomplexos (FERNANDEZ-VIZARRA *et al.*, 2009).

A ETC utiliza a energia liberada da oxidação de um substrato para bombear íons através de uma membrana e gerar um gradiente eletroquímico (SCHAFER *et al.*, 1999; SCHLEGEL and MULLER, 2013). Em mamíferos, a ETC sustenta a função das organelas e desempenha um papel central no metabolismo energético celular, (KOOPMAN *et al.*, 2013). Em humanos, defeitos na ETC consequentemente resultam em mutações nos genes do mtDNA, induzindo à distúrbios no sistema OXPHOS, os quais estão associados a uma gama de doenças multissistêmicas, como o câncer (HARMAN, 1992; WALLACE *et al.*, 1992; TAYLOR and TURNBULL, 2005; SCHAPIRA, 2006; BRETON *et al.*, 2014). Mutações excessivas no mtDNA podem resultar na disfunção do sistema OXPHOS, subsequentemente levando a doenças associadas à função mitocondrial, visto que a disfunção mitocondrial é diretamente relacionada a muitas doenças, como o câncer (VAN OVEN and KAYSER, 2009; SRINIVASAN *et al.*, 2017). Além disso, acreditava-se que o sistema OXPHOS fosse regulado negativamente em todos os cânceres. Entretanto, estudos recentes mostraram que o sistema OXPHOS também pode ser regulado positivamente em certos tipos de câncer, incluindo leucemias, linfomas, adenocarcinoma pancreático, melanoma e carcinoma endometrial (ASHTON *et al.*, 2018; SICA *et al.*, 2020). Dentro dessa perspectiva, pouco estudos têm analisado os perfis de expressão diferencial dos genes do

sistema OXPHOS em tecidos saudáveis versus câncer (VAN DEN HEUVEL and SMEITINK, 2001; REINECKE *et al.*, 2009; UGALDE *et al.*, 2009). Apenas um pequeno grupo de genes de cada complexo desse sistema vem sendo analisado, complexo I (*MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5*, *MT-ND6*), complexo III (*MT-CYB*), complexo IV (*MT-CO1*, *MT-CO2*, *MT-CO3*) e complexo V (*MT-ATP6* e *MT-ATP8*), onde todos esses genes demonstraram um perfil hipo expresso em diferentes cânceres como câncer de bexiga, mama, esôfago, fígado e rim (REZNIK *et al.*, 2017).

1.1 O Sistema de Oxidação Fosforilativa (OXPHOS)

O sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS) é o maior sistema produtor de energia para a célula (LECHUGA-VIECO *et al.*, 2021). Esse sistema está presente na membrana mitocondrial interna, onde seu número de componentes varia em cada complexo, pois ainda não se tem uma compreensão do total exato de componentes envolvidos nesse sistema. O sistema OXPHOS é composto por cinco complexos: complexo I - NADH desidrogenase; complexo II Succinato desidrogenase; complexo III – Citocromo bc1; complexo IV – Citocromo c oxidase e o complexo V – ATP sintase (Figura 1) (SARASTE, 1999; GRANATA *et al.*, 2015; GHEZZI and ZEVIANI, 2018; LECHUGA-VIECO *et al.*, 2021). O número de componentes gênicos de cada complexo que compõem o sistema OXPHOS abriga ~70 subunidades codificadas pelo nDNA e mtDNA (SARASTE, 1999). Porém, estudos indicam que esse sistema pode apresentar cerca de 90 a 130 subunidades codificadas tanto pelo nDNA quanto mtDNA, o que demonstra que não há uma exata compreensão do número de componentes neste sistema (ROUILLARD *et al.*, 2016; LECHUGA-VIECO *et al.*, 2021).

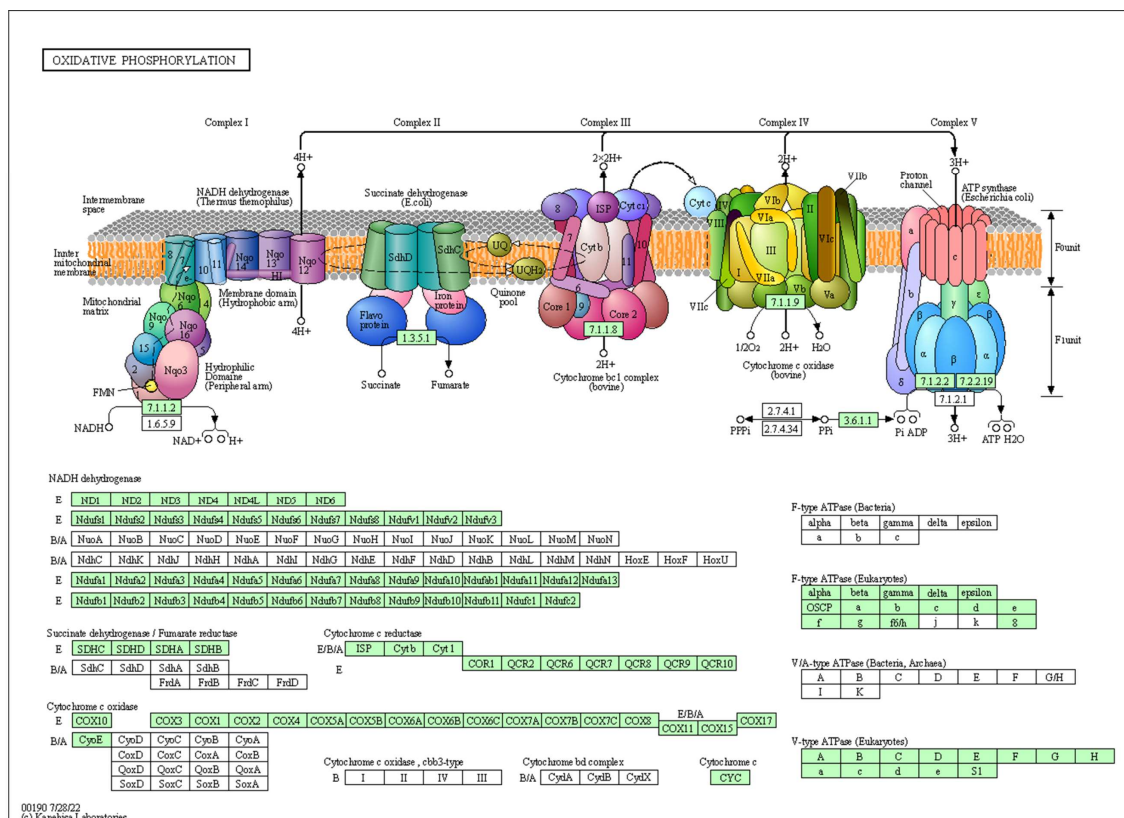


Figura 1. Representação do sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS).

Os elétrons derivados do metabolismo celular chegam ao complexo I ou complexo II através do NADH ou FADH₂, respectivamente. Esses elétrons são então transferidos para a coenzima Q (ubiquinona), um transportador de elétrons do complexo I ou II, para o III. Neste último, as partículas são deslocadas do citocromo b para o citocromo c com consequente transferência para o Complexo IV (citocromo oxidase), onde reduzem o O₂. Fonte: KEEG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: <https://www.genome.jp/pathway/hsa00190>.

Para os diferentes complexos que formam o sistema OXPHOS, apenas o complexo-II não apresenta subunidades codificadas pelo mtDNA. Os demais complexos apresentam a seguinte distribuição: complexo I, possui sete subunidades (*MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5*, *MT-ND6*), complexo III possui uma subunidade (*citocromo b* – *MT-CYB*), complexo IV possui três subunidades (*MT-COI*, *MT-COII*, *MT-COIII*), complexo V possui duas subunidades (*ATPase*, *MT-ATP6* e *MT-ATP8*) (GHEZZI and ZEVIANI, 2018). Quanto as demais subunidades codificadas pelo nDNA, o número de componentes varia dentro do sistema OXPHOS, com o complexo I apresentando trinta e sete subunidades, o complexo II apresentando quatro subunidades estruturais, o complexo III apresentando nove subunidades, o complexo IV apresentando onze

subunidades e o complexo V apresentando dezoito subunidades (BRANDSCH and BICHLER, 1989; SARASTE, 1999; LECHUGA-VIECO *et al.*, 2021).

Em mamíferos, todos os complexos do sistema OXPHOS são multiméricos, possuindo subunidades codificadas tanto no mtDNA quanto no nDNA. As subunidades codificadas pelo mtDNA são hidrofóbicas e sua tradução ocorre próximo à membrana interna da mitocôndria para facilitar sua translocação. As subunidades estruturais, codificadas pelo núcleo, além de outros fatores necessários para a biogênese correta do sistema OXPHOS, são expressos no citoplasma e importados para dentro da organela (MAI *et al.*, 2017; WASILEWSKI *et al.*, 2017). Além disso, disfunções no sistema OXPHOS, em humanos, estão associadas a distúrbios mitocondriais e muitos deles estão associados à montagem alterada de um ou mais componentes desse sistema (HUTTEMANN *et al.*, 2008; FERNANDEZ-VIZARRA *et al.*, 2009). Assim, alguns autores começaram a propor uma ligação da fosforilação oxidativa às doenças humanas, discutindo que vários genes humanos relacionados ao sistema OXPHOS apresentavam mutações relacionadas a diferentes síndromes clínicas, incluindo o câncer. Entretanto, os mecanismos detalhados desses processos não são totalmente compreendidos (HUTTEMANN *et al.*, 2008; TUPPEN *et al.*, 2010; GHEZZI and ZEVIANI, 2012).

1.2 Doenças Associadas ao Sistema OXPHOS

Alterações no sistema OXPHOS implicam em disfunções em processos metabólicos e celulares relacionados aos cinco complexos enzimáticos que compõem esse sistema (SMEITINK *et al.*, 2006; REINECKE *et al.*, 2009). As disfunções nesse sistema estão associadas a dois tipos de distúrbios na cadeia respiratória: doença mitocondrial primária, causada em grande parte por mutações pontuais em genes do mtDNA, resultando em uma alteração na expressão de genes no sistema OXPHOS; distúrbios secundários, causado na maioria das vezes por mutações pontuais em genes do nDNA, resultando em um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), acúmulo de substrato, queda de ADP/ATP e NAD/NADH (CHINNERY, 1993; FERNANDEZ-VIZARRA *et al.*, 2009; REINECKE *et al.*, 2009; GHEZZI and ZEVIANI, 2018). Devemos reconhecer também que qualquer disfunção que cause uma deficiência em um dos complexos enzimáticos, pode resultar em respostas bioquímicas variadas (SMEITINK *et al.*, 2006).

Considerando ainda que o sistema OXPHOS é necessário para o fornecimento de energia para todas as células, qualquer órgão pode ser afetado por uma disfunção nesse sistema, porém tecidos com alta demanda de energia (cérebro, nervos, retina, músculo esquelético e cardíaco) são particularmente mais vulneráveis. Sendo assim, as apresentações clínicas mais comumente associadas a essas disfunções incluem convulsões, hipotonia, oftalmoplegia, episódios semelhantes a acidente vascular cerebral, fraqueza muscular, constipação severa e cardiomiopatia (CHINNERY, 1993; MCFARLAND and TURNBULL, 2009; NG and TURNBULL, 2016).

As disfunções no sistema OXPHOS estão então intimamente associadas a doenças mitocondriais, o que pode interferir na conversão de açúcares em energia pelas mitocôndrias etapa essencial para sustentação da vida, o que pode resultar em lesões celulares e até mesmo a morte da célula. Quando esse processo é repetido em todo o corpo, há o surgimento de disfunções mitocondriais, onde os sistemas orgânicos começam a falhar e podem param de funcionar (TAYLOR and TURNBULL, 2005; TUPPEN *et al.*, 2010; NG and TURNBULL, 2016). Disfunções nesse sistema levam a uma gama de sintomas neurológicos, incluindo regressão do desenvolvimento, déficit de crescimento, convulsões, espasticidade, distonia entre outros (Figura 2) (KOOPMAN *et al.*, 2013). Além disso, uma disfunção no sistema OXPHOS consequentemente causaria uma produção anormal de ROS devido ao dano por estresse oxidativo (LEE *et al.*, 2021). Essas disfunções estão associadas a uma infinidade de doenças que vão desde distúrbios hereditários raros a condições comuns, incluindo alguns tipos de câncer. Dessa forma, existe um grande interesse em estudar os genes reguladores do sistema OXPHOS para melhor compreender essas disfunções (GORE *et al.*, 2022).



Figura 2. Apresentações clínicas associadas a doenças mitocondriais.

São demonstradas as partes do corpo que são afetadas pela doença mitocondrial e seus respectivos sintomas. Adaptado de: United Mitochondrial Disease Foundation - UMDF.

A progressão do câncer também está associada a anormalidades metabólicas (SICA *et al.*, 2020; CASTELLI *et al.*, 2021; EVANS *et al.*, 2021). Dessa forma, uma perturbação metabólica nesse sistema leva a um aumento da taxa de glicólise, disfunção mitocondrial e perturbação do ciclo de Krebs, acúmulo de metabolitos como fumarato e estresse oxidativo pelo aumento de ROS, condições descritas como sendo causadas pelo efeito Warburg (VANDER HEIDEN *et al.*, 2009; SANCHO *et al.*, 2016; CASTELLI *et al.*, 2021). Além disso, outros estudos têm demonstrado um aumento na taxa de glicólise e uma redução no consumo de oxigênio em células cancerosas em comparação com as células normais. Desse modo, estudar o sistema OXPHOS, tornou-se uma estratégia promissora para o desenvolvimento de uma nova terapia do câncer (ASHTON *et al.*, 2018).

1.3 Metabolismo Tumoral e o Sistema OXPHOS

Sabemos que a superprodução de ROS leva a danos no genoma por estresse oxidativo, podendo induzir mutações no mtDNA (CHANDRA and SINGH, 2011; GUNDAMARAJU *et al.*, 2021). Por sua vez, mutações no mtDNA levam a um comprometimento do sistema OXPHOS, pois danos causados nesse sistema

resultam em um aumento na produção de ROS, dando origem a um ciclo que envolve mitocôndrias, ROS, instabilidade genômica e desenvolvimento tumoral (YANG *et al.*, 2016; GRASSO *et al.*, 2020; GUNDAMARAJU *et al.*, 2021). Sendo assim, disfunções no sistema OXPHOS afetam diferentes compartimentos celulares em graus diferentes. Ademais o sistema OXPHOS fornece energia para o citoplasma, porém em condições anaeróbicas essa energia é também utilizada pelo núcleo, compartimento mais susceptível à deficiência de ATP. Dessa forma, a queda nos teores de ATP no núcleo das células, resulta em drástica diminuição da proliferação celular maligna e morte celular por apoptose (DICKENS and SIMER, 1931; HOBERMAN, 1975; GAJEWSKI *et al.*, 2003). Em células cancerosas, os níveis de ATP diminuem, diferente das células normais onde os níveis de ATP se mantêm (HOBERMAN, 1975; BAGGETTO, 1992; CUEZVA *et al.*, 2002).

Segundo Warburg e colaboradores, as células cancerosas reprogramam seu metabolismo para promover o crescimento, a sobrevivência, a proliferação e a manutenção a longo prazo (WARBURG *et al.*, 1927). Uma característica comum desse metabolismo alterado é o aumento da captação de glicose e sua fermentação em lactato. Warburg sugeriu que a glicólise aeróbica é uma propriedade geral das células cancerosas para produzir ATP suficiente, refletindo assim na função mitocondrial prejudicada (WARBURG *et al.*, 1927; WARBURG, 1928). Sendo assim, as células cancerosas sofrem grandes mudanças no metabolismo energético e biossintético, onde o piruvato é usado para fermentação e não para o ciclo de Krebs (CHEN *et al.*, 2015). Em mamíferos, o produto da glicólise pode ser tanto lactato, via fermentação, ou CO₂ após oxidação total via respiração nas mitocôndrias. Entretanto, em tumores, a taxa de captação de glicose aumenta drasticamente e o lactato é produzido, mesmo na presença de oxigênio e mitocôndrias em pleno funcionamento (LIBERTI and LOCASALE, 2016). Além disso, mutações no sistema OXPHOS resultam em uma condição em que o citoplasma se encontra preenchido por um número elevado de mitocôndrias, morfológica e funcionalmente anormais, caracterizando tumores oncocíticos (GASPARRE *et al.*, 2007; GASPARRE G, 2008; ADZHUBEI *et al.*, 2010; PORCELLI *et al.*, 2010).

Alguns autores sugerem que o sistema OXPHOS está gravemente comprometido em doenças como câncer, onde um defeito nesse sistema é relatado como um dos fenótipos mais comuns na maioria dos cânceres (WARBURG *et al.*,

1927; WARBURG, 1956; MATHUPALA *et al.*, 1997; DAMIANI *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 1999; BIANCHI *et al.*, 2001; PENTA *et al.*, 2001; SINGH *et al.*, 2006; MODICA-NAPOLITANO *et al.*, 2007). Entretanto, em cânceres como paragangliomas e feocromocitomas hereditários, podemos observar que as quatro subunidades da enzima succinato desidrogenase, a saber, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, pertencentes ao complexo III do sistema OXPHOS estão envolvidas em processos oncogênicos, sendo os únicos genes nesse sistema a ter uma capacidade de agir como um supressor de tumor (BAYSAL *et al.*, 2000; NIEMANN and MULLER, 2000; BENN *et al.*, 2003).

1.4 Associações entre o Microambiente Tumoral, Células Imunes e o Potencial Estaminal

O microambiente tumoral (TME) é uma estrutura biológica complexa que envolve as células tumorais e inclui vasos sanguíneos, células imunes, fibroblastos, adipócitos e matriz extracelular. Esse ambiente também é acompanhado por diferentes graus e tipos de infiltrados de células imunes, como os linfócitos infiltrantes de tumor, os quais requerem nutrientes encontrados dentro do TME para apoiar a proliferação e diferenciação celular (ANTONIO *et al.*, 2021; NABI and LE, 2021). As células imunes que se infiltram no tumor apresentam funções divergentes, favorecendo ou inibindo o crescimento do tumor. Células linfoides ativadas podem controlar o crescimento tumoral e malignidades, como já relatado por Pages, onde a infiltração de células T se correlaciona com um melhor prognóstico (PAGES *et al.*, 2010). Entretanto, os tumores muitas vezes atenuam a atividade dos linfócitos infiltrantes (WHITESIDE, 1999; RADOJA and FREY, 2000) e suportam a diferenciação de macrófagos associados ao tumor promovendo o seu crescimento, por exemplo, inibindo células T ou secretando fatores de crescimento (QIAN and POLLARD, 2010).

A interação metabólica entre células imunes e células cancerosas no TME é um processo complexo e dinâmico em que as células imunes atuam como um fator determinante do destino das células cancerígenas e vice-versa (JUNG and LE, 2021). As células do sistema imune inato que atuam no TME (células NK em repouso, células T reguladoras (células Treg), macrófagos M2 e células T de memória) dependem principalmente do sistema OXPHOS para sua sobrevivência,

de modo que perturbações nesse sistema resultam em uma inibição da função das células imunes (PEARCE and PEARCE, 2013; GARDINER, 2019). Além disso, a falta de nutrientes no ambiente tumoral suprime células imunes antitumorais, como macrófagos M1, neutrófilos N1 e células T CD8+, promovendo a diferenciação e ativação de células imunes pró-tumorais, incluindo macrófagos M2, neutrófilos N2 e Tregs (XIA *et al.*, 2021). Desse modo, estudos sobre células imunes e metabolismo energético em câncer têm recebido grande atenção, pois células imunes estão envolvidas na progressão de muitas doenças humanas, como câncer (HU *et al.*, 2022).

As células cancerosas possuem a capacidade de repovoar todo o tumor, sendo por vezes chamadas de células-tronco cancerosas (CSCs), pois são capazes de sustentar a progressão do câncer e interagir com seu ambiente em busca de fatores-chave de sobrevivência (MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al.*, 2011; SHEN YA, 2013; SANCHO *et al.*, 2016). Curiosamente, o ambiente e/ou estímulos específicos podem promover o surgimento de novas CSCs, pois as células em geral mantêm a capacidade de se desdiferenciar e retornar a um estado primitivo de desenvolvimento (TAKAHASHI *et al.*, 2007; DANIEL *et al.*, 2016). Tais capacidades estão compreendidas no termo potencial estaminal, e correspondem a células desprovidas de marcas de diferenciação (CHEN *et al.*, 2013; MILES *et al.*, 2017). Desse modo, os tumores não são uniformes, mas sim funcionalmente heterogêneos, abrigando um subconjunto de células cancerosas com características de perpetuar sua linhagem, dando origem a células diferenciadas (APONTE and CAICEDO, 2017).

As CSCs apresentam dois fenótipos metabólicos conflitantes e mudam de forma flexível a via metabólica para manter suas propriedades ou a homeostase redox. Em um ambiente hipóxico, as CSCs produzem energia por meio de sinalização específica por fatores relacionados à glicólise e aumentam a capacidade das CSCs. No entanto, em um ambiente de oxigênio abundante, as CSCs proliferam enquanto ajustam o nível de ROS produzido pelo sistema OXPHOS (ALVINA *et al.*, 2021; YASUDA *et al.*, 2021). Temos como exemplo um estudo de CSCs em glioblastomas, onde essas células exibem um metabolismo energético baixo e alta glicólise, para geração de ATP, para manter sua capacidade de formação de tumor (ZHOU *et al.*, 2011). Este estudo sugere que o metabolismo glicolítico pode desempenhar um papel importante na manutenção das CSCs, onde

alguns tipos de CSCs são conhecidos por preferir a glicólise ao sistema OXPHOS para adquirir suas propriedades de CSCs. Assim, considerando o conjunto sistema OXPHOS e o potencial estaminal, estes estão intimamente relacionados, pois algumas CSCs podem aproveitar o lactato como combustível para o sistema OXPHOS, sendo uma das razões pelas quais alguns tipos de CSCs preferem o sistema OXPHOS à glicólise (YASUDA *et al.*, 2021).

1.5 Disparidades na Incidência de Cânceres Associadas ao Sexo

A mortalidade e a incidência de câncer vêm diminuindo nas últimas três décadas para a maioria dos países de alta renda, refletindo melhorias na prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer (HASHIM *et al.*, 2016; SIEGEL *et al.*, 2017; ARNOLD *et al.*, 2019; HULVAT, 2020). Entretanto, análises sobre a incidência e mortalidade por câncer em relação ao nível de renda de diferentes países ilustra que, em países de alta renda existem maiores taxas de incidência para alguns tipos de cânceres, como câncer de pulmão, colorretal, mama e próstata (SIEGEL *et al.*, 2016; HULVAT, 2020). Siegel e colaboradores demonstrou, através de um estudo feito na população dos Estados Unidos, que a taxa incidência para cânceres invasivos era aproximadamente de 5.250 novos casos por dia, confirmando a alta incidência de câncer associada a países de alta renda (SIEGEL *et al.*, 2022).

Além disso, também devemos levar em consideração a existência de disparidades na mortalidade e incidência do câncer associadas ao sexo, as quais já foram relatadas para diferentes cânceres, como pulmão, colorretal, bexiga, estômago, rim, pâncreas e glândula tireoide (COSTA *et al.*, 2020). De acordo com Siegel 48% de todos os casos de incidência de câncer em homens seriam em cânceres de próstata, seguido de câncer de pulmão e câncer colorretal, sendo o câncer de próstata sozinho responsável por 27% dos diagnósticos. Para as mulheres, câncer de mama, câncer de pulmão e câncer colorretal representam 51% de todos os novos diagnósticos, sendo o câncer de mama sozinho responsável por quase um terço dos casos (MILLER *et al.*, 2021; SIEGEL *et al.*, 2022).

Em relação ao câncer sexo específico, ou seja, em órgãos sexuais específicos, não é descrita uma alta taxa de mortalidade para mulheres em órgãos

como ovário e corpo uterino (11%). Da mesma forma, em cânceres específicos para homens, como câncer de próstata e testículo, a mortalidade é de cerca de 8% (SIEGEL *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018). Outras evidências também demonstram que, a probabilidade de ser diagnosticado ao longo da vida com câncer invasivo é ligeiramente maior para homens (40,2%) do que para mulheres (38,5%), refletindo os altos riscos e a menor expectativa de vida (Figura 3) (DESANTIS *et al.*, 2019; SIEGEL *et al.*, 2022). Entretanto, as razões para o maior risco de câncer estar associado a homens não são totalmente compreendidas, mas provavelmente refletem uma maior exposição a fatores ambientais e biológicos causadores de câncer, como tabagismo e alcoolismo (ISLAMI *et al.*, 2018; MILLER *et al.*, 2021). Além disso, também devemos considerar as diferenças sexuais atribuídas a hormônios endógenos e na função de resposta imune, como possíveis fatores de associação ao maior risco de câncer, pois os hormônios endógenos tem um papel importante na tumorigênese e suscetibilidade ao câncer através de vários mecanismos que podem afetar a autorrenovação das células-tronco cancerígenas, o microambiente tumoral, o sistema imunológico e o metabolismo (CLOCCHIATTI *et al.*, 2016; KLEIN and FLANAGAN, 2016)

Estimativa de Novos Casos								
	Próstata	268,490	27%	Homens Mulheres	Mama	287,850	31%	
	Pulmão	117,910	12%		Pulmão	118,830	13%	
	Colón	80,890	8%		Colón	70,340	8%	
	Bexiga	61,700	6%		Corpo Uterino	65,950	7%	
	Melanoma	57,180	6%			Melanoma	42,600	5%
	Rins	50,290	5%		Linfoma	42,600	5%	
	Linfoma	44,120	4%		Tiroide	31,940	3%	
Cavidade Oral & Faringe	38,700	4%	Pâncreas		29,240	3%		
	Leucemia	35,810	4%		Rins	28,710	3%	
	Pâncreas	32,970	3%		Leucemia	24,840	3%	
	Todos os sítios	983,160	100%		Todos os sítios	934,870	100%	
Estimativa de Mortes								
	Pulmão	68,820	21%	Homens Mulheres	Pulmão	61,360	21%	
	Próstata	34,500	11%		Mama	42,250	15%	
	Colón	28,400	9%		Colón	24,180	8%	
	Pâncreas	25,970	8%		Pâncreas	23,860	8%	
	Fígado	20,420	6%		Corpo Uterino	Ovário	12,810	4%
	Leucemia	50,290	4%			12,550	4%	
	Esófago	13,250	4%		Fígado	10,100	4%	
	Bexiga	12,120	4%		Leucemia	9,980	3%	
	Linfoma	11,700	4%		Linfoma	8,550	3%	
	Cérebro	10,710	3%		Cérebro	7,570	3%	
	Todos os sítios	322,090	100%		Todos os sítios	287,270	100%	

Figura 3. Principais tipos de câncer para a estimativa de novos casos e mortes por sexo nos Estados Unidos em 2022.

As estimativas são arredondadas para o valor mais próximo e excluem os cânceres de pele basocelular e espinocelular, e carcinoma in situ, exceto bexiga urinária. Adaptado de: Siegel *et al.*, 2022.

Os fatores genéticos e moleculares envolvidos na suscetibilidade ao câncer podem também variar entre os sexos, de modo que as disparidades genéticas e moleculares entre homens e mulheres venham a contribuir para as diferenças na incidência e malignidade de uma variedade de cânceres (KIM *et al.*, 2018; KIM, 2022). Dentre os fatores genéticos, devemos considerar as possíveis diferenças na expressão dos genes entre homens e mulheres, variantes genéticas, mutações somáticas e número de cópias alteradas, pois mutações em um único gene podem ser moderadas por redes de interação de elementos reguladores e outros elementos dentro da célula (BARABASI and OLTVAI, 2004). Um estudo feito em 21 tipos de câncer demonstrou que apenas seis genes localizados no cromossomo X (*ATRX*, *CNKSR2*, *DDX3X*, *KDM5C*, *KDM6A* e *MAGEC3*), que escapam da inativação do cromossomo X e são supressores de tumor (EXITS), exibiram maior taxa de mutação para homens (DUNFORD *et al.*, 2017; JACKSON *et al.*, 2022). Essa descoberta demonstra que mulheres podem estar protegidas para muitos cânceres devido à expressão bialélica dos genes EXITS e a necessidade de um segundo evento para inativá-los. Assim, fatores genéticos associados à etiologia do câncer podem ter efeitos diferentes em homens e mulheres. Por exemplo, alterações na expressão gênica ou mutação podem ter potencial valor prognóstico para apenas um dos sexos (LOPES-RAMOS *et al.*, 2020).

A hipótese desse estudo é de que existem diferenças sexuais na expressão dos genes do sistema de oxidação fosforilativa associadas com a desdiferenciação oncogênica quando comparada com tecido não tumoral, devido a condição do tecido tumoral ter um metabolismo energético alterado. Dessa forma, espera-se observar marcas de expressão diferencial com associações ao resultado de sobrevivência dos pacientes, infiltrados de células imunes e ao potencial estaminal.

2. JUSTIFICATIVA

Embora existam evidências ligando os genes do sistema OXPHOS a processos carcinogênicos, apenas um subconjunto limitado de genes de cada complexo que constitui esse sistema tem sido estudado. Não há investigação sistemática de como os demais genes que compõem esse sistema são expressos em vários tipos de câncer e se há correlação entre os perfis de expressão e a sobrevivência como variável de desfecho. Além disso, não se sabe se os genes diferencialmente expressos se correlacionam com fatores do microambiente

tumoral, onde a ação de várias células imunes pode ser modificada por alterações no metabolismo energético e o aumento do consumo de oxigênio. Da mesma forma, pouco se sabe sobre as relações entre os genes OXPHOS e a capacidade de desdiferenciação celular no microambiente tumoral.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar uma metanálise computacional para estimar o valor prognóstico de assinaturas de expressão diferencial dos genes do sistema de oxidação fosforilativa (OXPHOS) em diferentes cânceres.

3.2 Objetivos Específicos

Identificar possíveis associações entre o perfil de expressão dos genes OXPHOS e os resultados de sobrevivência em diferentes cânceres.

Comparar os perfis de expressão gênica das assinaturas obtidas com associação ao resultado de sobrevivência, entre amostras de tecido primário saudável versus com câncer.

Identificar associações entre o perfil de expressão dos genes OXPHOS para efeito de risco ou protetor em diferentes cânceres.

Identificar uma associação entre o perfil de expressão dos genes OXPHOS e as assinaturas de infiltrados imunes em diferentes cânceres.

Identificar uma associação entre o perfil de expressão dos genes OXPHOS e o potencial estaminal em relação aos diferentes tipos de câncer.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos genes OXPHOS

A seleção dos genes OXPHOS foi realizada através de consulta manual utilizando o browser KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <https://www.kegg.jp/kegg/>). Para encontrar os genes associados ao sistema

OXPHOS foram utilizadas diferentes sessões dos bancos de dados KEGG. Acessamos a opção *KEGG overview* em *KEGG Database*, onde os dados são amplamente categorizados em informações de sistemas, informações genômicas, para que fosse possível acessar a parte de dados referentes ao KEGG Pathway (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Nessa sessão do Browser a busca foi direcionada para a categoria *KEGG Metabolism*, para localizar a rota metabólica associada ao sistema de oxidação fosforilativa (Oxidative Phosphorylation - 00190 M/ <https://www.genome.jp/pathway/map00190>). Nessa nova sessão, foi acessada e analisada a opção *Organism Menu*, para determinar o organismo modelo onde serão analisados os dados a respeito do sistema OXPHOS ([hsa](#) Homo sapiens - human). Logo após, foi selecionada a opção *Pathway Entry*, para que fosse possível identificar todos os genes associados ao sistema OXPHOS em cada complexo através da opção *KEGG GENES*.

Os dados a respeito dos genes OXPHOS foram transferidos para o ambiente computacional RStudio na forma de um data frame contendo as seguintes informações: *Gene Name*, *KEGG Entry*, *KEGG Genes*, *KEGG Pathway*, *KO Entry*, *Enzyme Entry*, *Module Code*, *Module Name*, *Module Nº* e *Comments*. Os símbolos dos genes foram submetidos a uma validação em ambiente computacional RStudio, pois alguns genes possuíam diferentes aliases para seus símbolos, os quais poderiam não ser reconhecidos em outros bancos de dados. A validação consistiu em parear esses diferentes símbolos em diferentes bancos de dados, como GEPIA2 (<http://gepia2.câncer-pku.cn/#index>), o UCSCXena (<https://xenabrowser.net/>) e GTEx Portal (<https://www.gtexportal.org/home/>), para obtermos símbolos que fossem e reconhecidos em todos os bancos de dados (Tabela S1).

4.2 Análise da Expressão Diferencial dos Genes OXPHOS em Diferentes Tecidos

Foram utilizadas 14.195 amostras de experimentos de RNA-Seq, entre elas amostras provenientes do The Genotype-Tissue Expression (GTEx) para 52 tecidos saudáveis (Tabela S2) e do The Câncer Genome Atlas (TCGA) para 33 tipos de câncer (Tabela S3; URL: <https://xenabrowser.net/?bookmark=a2c329d7eaf36f16e7f048285761d56f>), para

investigar genes do sistema OXPHOS diferencialmente expressos (DEG). O browser UCSCXena (<https://xena.ucsc.edu/>) foi utilizado para construir a base desta análise, onde essa construção ocorreu manualmente através de consulta. Inicialmente selecionamos o estudo que contém os dados de amostras de RNA-Seq para cada doador *TCGA TARGET GTEx*. Posteriormente, foi selecionada nossa variável de análise, uma variável fenotípica, utilizando os seguintes critérios *Study, Gender, Primary_site, Sample Type* e *Main Category*. Logo após, os dados observados foram filtrados de modo a obtermos apenas amostras de tecido normal e tumor primário, excluindo assim amostras que continham linhagens celulares, dados de metástase, dados de tumor primário sólido, tecido normal sólido, tumor recorrente sólido, tumor recorrente e dados de pós-tratamento.

Posteriormente, foi realizada uma comparação das amostras de tecidos disponíveis nos dois estudos, GTEx e TCGA, pois a distribuição das amostras de tecido não era igual entre eles. Assim, foram considerados apenas os tecidos que apresentavam amostras tanto saudáveis quanto de tumor. Os tecidos que apresentavam apenas amostras saudáveis ou apenas amostras de tumor foram excluídos. Após as etapas descritas a análise seguiu para o critério *Main Category*, o qual separa o conjunto de dados entre amostras de tecido normal (GTEx) e tecidos com câncer (TCGA). Aqui, foi utilizada a opção *Differential Expression* para compararmos os dois grupos de dados da variável *Main Category* utilizando o pipeline de análise Appyter bulk RNA-seq do laboratório Ma'ayan, em linguagem python. Essa abordagem consistiu em investigar DEG entre amostras saudáveis e com tumor, utilizando estimativas de transcrição do nível do gene como uma contagem normalizada de RSEM transformada em $\log_2(x+1)$ (*TOIL RSEM TPM*), para obtermos as informações referentes a expressão gênica. A análise de DEG foi realizada tecido por tecido separadamente na plataforma UCSCXena.

Os dados obtidos da análise de cada tecido foram transferidos para o ambiente de linguagem computacional RStudio onde os dados de expressão diferencial de cada tecido foram agrupados, contendo informação de todos os tecidos pareados. Posteriormente, um novo filtro foi adicionado para obtenção dos dados que fossem referentes aos genes do sistema OXPHOS, realizando uma busca pelos símbolos de cada gene que compõe esse sistema. Logo após, outros parâmetros foram utilizados como um filtro para analisarmos os conjuntos DEG (Log2 Fold Change acima de 1,5 e abaixo de -1,5) de cada tecido saudável em

comparação com o mesmo tecido em tumor, investigando assim a existência de um tecido com DEG. Também foi aplicado nos dados a taxa de descoberta falsa (FDR ≤ 0.05), um método de conceituar a taxa de erros do tipo I em testes de hipótese nula ao realizar comparações múltiplas.

4.3 Análise Pan-Câncer da Correlação Entre o Perfil de Expressão dos Genes OXPHOS e Sobrevivência geral

A plataforma de dados GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) foi utilizada nessa análise, a qual contém dados públicos para análise interativa de perfis de expressão gênica em amostras de RNA-Seq de cânceres primários do TCGA (<https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>), um programa de referência em genômica do câncer, cobrindo 33 tipos de câncer (Tabela S3), com um total de 9.736 amostras. O objetivo foi realizar uma metanálise computacional para determinar um mapa de sobrevivência geral Pan-Câncer dos genes OXPHOS em 33 tipos de câncer. Essa análise foi realizada através de consulta manual, a qual consistiu em estimar e comparar a contribuição de sobrevivência de vários genes em vários tipos de câncer.

Na plataforma GEPIA2 foram acessadas as opções *Expression Analysis* e *Survival Analysis*, para que fosse possível ter acesso a uma interface online contendo os diferentes tipos de análise de sobrevivência disponíveis nessa plataforma. Nessa interface, foi selecionada a opção *Survival Map* para estimar e comparar a contribuição de sobrevivência de vários genes em vários tipos de câncer usando o teste de Mantel-Cox utilizado para comparar as distribuições de sobrevivência de duas amostras. Posteriormente, foram introduzidos os genes, gene a gene, de todos os componentes do sistema OXPHOS na forma de símbolos para sua identificação. Os genes que apresentavam a mesma direção de associação, tendo pelo menos três genes em cada tipo de câncer, foram agrupados em uma assinatura, sendo essa o somatório da expressão dos genes que a compõe. Os parâmetros dessa análise foram definidos de modo que o nível de significância admitido fosse igual ou inferior a 0,05; foi utilizado o valor de P ajustado: False Discovery Rate (FDR); ponto de corte do grupo de pacientes foi a mediana (cutoff 50%).

4.4 Análise de Comparação do Perfil de Expressão das Assinaturas Gênicas Associadas com Sobrevivência geral entre Amostras Saudáveis e com Tumor

Nessa análise foi comparado o perfil de distribuição molecular das assinaturas gênicas dos genes OXPHOS entre amostras saudáveis e com tumor. As assinaturas gênicas obtidas após as análises na plataforma GEPIA2 foram utilizadas para investigar se o perfil de expressão dessas assinaturas estaria variando entre tecido saudável e com tumor, porém investigando nos mesmos tecidos onde as assinaturas foram observadas na análise de mapa de sobrevivência. A análise foi realizada utilizando o ambiente RStudio através de um script computacional utilizando o aplicativo autônomo UCSCXenaShiny (<http://xena.ucsc.edu/>).

Para essa análise a interface UCSCXenaShiny foi utilizada, selecionando a seção *QuickPanCanAnalysis* para chegarmos a opção *TCGA+GTEx: Molecular Profile Distribution (Tumor versus Normal)*, onde acessamos a uma nova interface contendo os dados do projeto TCGA e GTEx. Aqui foi determinado o uso de dados de expressão de mRNA Pan-Câncer, para inferir o perfil de expressão dos genes OXPHOS entre as amostras saudáveis e de tumor. Também foram introduzidos os identificadores moleculares como uma fórmula para a assinatura genômica, sendo essa o somatório da expressão dos genes que a compõe (por exemplo, `MT-ND1` + `MT-ND2` + `MT-ND3` + `MT-ND4`). Por fim, o tipo de câncer a ser analisado foi filtrado, para obtenção de informações apenas dos cânceres onde as assinaturas mostraram estar associadas com a sobrevivência geral Pan-Câncer. Foi utilizado o teste Wilcoxon, um teste de hipóteses não paramétrico para comparar duas amostras relacionadas, amostras saudáveis versus com tumor. Comparamos então a média de expressão das assinaturas utilizando o $\log_2(\text{TPM} + 0.001)$, para investigar se as médias de expressão seriam diferentes entre as amostras.

4.5 Análise de Correlação dos Perfis de Expressão das Assinaturas Gênicas para Diferentes Desfechos de Sobrevivência em Diferentes Cânceres

Aqui o valor de fator prognóstico dos genes do sistema OXPHOS em diferentes métricas de desfecho de sobrevida foram estimados: Sobrevivência geral (OS) referindo-se à porcentagem de pacientes vivos após o diagnóstico de câncer durante o período do estudo; Intervalo de sobrevivência livre de eventos (DSS), descrevendo a porcentagem de pacientes que não morreram de um tipo de câncer em um período definido, como pacientes que morreram de outras causas que não o tipo específico de câncer não contados nesta medição; Intervalo de sobrevivência livre da doença (DFI) sendo o período de tempo após o tratamento primário para o câncer que o paciente sobrevive sem quaisquer sinais ou sintomas desse câncer; Intervalo de sobrevivência livre de progressão (PFI), sendo o período de tempo, durante e após o tratamento de um tipo de câncer, que um paciente vive com a doença, mas não piora. Essa análise ocorreu em ambiente RStudio utilizando um script computacional, através do aplicativo autônomo UCSCXenaShiny.

Para essa análise foi utilizado o método de Kaplan-Meier para calcular a significância da correlação da sobrevivência em relação aos dados de expressão dos genes OXPHOS, ou seja, explorar a relação entre a sobrevida de um paciente e outras variáveis explicativas. Assim, para cada intervalo de tempo, a probabilidade de sobrevivência é calculada como o número de indivíduos sobreviventes dividido pelo número de pacientes em risco. Esse método é capaz de estimar a curva de sobrevivência, assume a razão de risco comparando dois grupos de forma constante ao longo do tempo, possibilitando estimar em qual dos grupos analisados a taxa de sobrevivência seria maior.

Utilizamos um racional de três passos para essa análise de sobrevivência: Primeiro, foi selecionada a seção *QuickPanCanAnalysis* na interface UCSCXenaShiny, para acessar a opção *TCGA: Survival Analysis* sendo direcionado a uma nova interface, onde é possível encontrar o conjunto de dados TCGA Pan-Câncer; segundo, foi selecionado o tipo de câncer a ser analisado e os dados de expressão, dados de mRNA Pan-Câncer. Logo após, os identificadores moleculares foram introduzidos, na forma de assinatura genômica; terceiro, foram estabelecidos filtros para separar os dados de acordo com as diferentes métricas de desfecho de sobrevivência (OS, DSS, PFI e DFI). Os dados de expressão foram

separados em dois grupos baseando-se na mediana de expressão dos genes, aqueles com alta expressão (com um cutoff de expressão superior a 50%) e aqueles com baixa expressão (com um cutoff de expressão inferior a 50%). Os parâmetros dessa análise foram definidos de modo que a unidade de tempo de sobrevivência foi baseada em meses; o nível de significância admitida sendo igual ou inferior a 0,05; foi utilizado o valor de P ajustado: False Discovery Rate (FDR); ponto de corte do grupo de pacientes foi a mediana (cutoff 50%). Assim, cada métrica de desfecho de sobrevida (OS, DSS, PFI e DFI) foi avaliada dentro dos critérios e parâmetros demonstrados aqui para todas as assinaturas obtidas.

Além disso, também foi investigada a significância dos níveis de expressão das assinaturas gênicas nas diferentes métricas de sobrevida categorizando as amostras pelo sexo biológico. O objetivo da análise consistiu em determinar se a sobrevivência e o perfil de expressão das assinaturas gênicas eram dependentes do sexo biológico do doador. Para investigar essa associação foram utilizados os mesmos parâmetros descritos acima.

4.6 Análise de Associação Entre os Perfis Moleculares e os Efeitos de Risco ou Efeito em Diferentes Cânceres

Para esta análise, foram utilizados dados de expressão de mRNA para 33 tipos diferentes de câncer disponíveis pelo TCGA (Tabela S3). O modelo de Cox foi utilizado na análise para investigar a associação entre o tempo de sobrevida do paciente e uma ou mais variáveis preditoras independentes, neste caso, o risco ou efeito protetor. Esta análise foi realizada em ambiente RStudio utilizando um script computacional através do aplicativo autônomo UCSCXenaShiny. Inicialmente foi selecionada a seção *QuickPanCanAnalysis* na interface UCSCXenaShiny, para acessar a opção *TCGA: Molecular Profile Cox Analysis* para uma nova interface. Nessa interface, foi selecionado o tipo de dado de expressão, dados de mRNA Pan-Câncer, usados para estimar os perfis de expressão dos genes OXPHOS. Para os dados de expressão foi estipulado um corte limite de 0,5 para a mediana. Posteriormente, os genes OXPHOS foram selecionados como identificadores moleculares e a medida de tempo utilizada para essa análise foi baseada na sobrevivência geral (OS). Também foram definidos alguns parâmetros para essa análise onde o gene em determinado tipo de câncer poderia ter uma associação de risco ($\log(\text{Hazard Ratio}) > 0$), uma associação protetora ($\log(\text{Hazard Ratio}) < 0$) ou

sem significância estatística (NS, valor $P > 0,05$). Dessa forma, o objetivo aqui foi identificar se o fator de risco ou protetor está associado aos níveis de expressão dos genes OXPHOS.

4.7 Análise de Correlação Entre o Perfil Molecular das Assinaturas com Infiltrados Imune e o Potencial Estaminal

Posteriormente, foi investigada a correlação do perfil molecular dos genes do sistema OXPHOS com assinaturas de infiltrados imune, mas também a correlação desses com o potencial estaminal em diferentes tipos de tumores (Tabela S3). Ambas as análises foram realizadas em ambiente RStudio utilizando um script computacional através do aplicativo autônomo UCSCXenaShiny.

Para a análise de correlação com infiltrados de células imune foi selecionada a seção *QuickPanCanAnalysis* na interface UCSCXenaShiny, para acessar a opção *TCGA: Association Between Molecular Profile and Tumor Immune Infiltrates*, tendo acesso a uma nova interface contendo os dados do projeto TCGA para os diferentes tipos de infiltrados de células imunes. Nessa interface foi selecionado o tipo de dado de expressão utilizado, dados de mRNA Pan-Câncer, e os genes OXPHOS utilizados foram introduzidos gene a gene como símbolos na forma de identificadores moleculares. Posteriormente, foi selecionada a fonte de dados TIMER para obter os tipos de infiltrados de células imunes utilizados na análise (*BCell*, *T cell CD4+* e *CD8+*, *Neutrophil*, *Macrophage*, *Myeloide dendritic cells*). A fonte de dados TIMER é um recurso abrangente para investigar as interações entre genes de interesse e interações imunes tumorais em diferentes tipos de câncer. Para estimar a correlação entre as assinaturas gênicas e os infiltrados de células imune em diferentes tipos de cânceres com o perfil molecular dos genes OXPHOS o teste de Spearman foi utilizado. O teste foi utilizado para estimar a correlação das assinaturas, como sendo positiva ($\geq 0,50$) ou negativa ($\leq -0,50$). Por último, os dados foram submetidos a um filtro que considera seu valor de p, admitindo apenas dados com valor de p inferior a 0,05. Os genes que apresentavam a mesma direção de associação foram agrupados em uma assinatura, sendo essa o somatório da expressão dos genes que a compõe. Também foi realizada uma validação das assinaturas, que consistiu em averiguar

se o mesmo perfil de expressão, observado gene a gene, era mantido quando analisamos o conjunto de genes que compunha a assinatura.

Para a análise de correlação dos genes OXPHOS com o potencial estaminal foi selecionada a seção *QuickPanCanAnalysis*, para acessar a opção *TCGA: Association Between Molecular Profile and TMB/ Stemness/ MSI (radar show)*, tendo acesso a uma nova interface contendo os dados do projeto TCGA para diferentes recursos de análise (TMB, MSI e Stemness). Nessa interface os mesmos passos da análise anterior foram seguidos para obtenção dos dados de expressão e introdução dos símbolos dos genes como identificadores moleculares e obtenção de assinaturas gênicas, porém aqui foi selecionada a opção recursos para acessar a categoria *Stemness*, sendo esse referente ao potencial estaminal. O teste de Spearman também foi aplicado nessa análise para estimar a correlação das assinaturas. Por último, os dados foram submetidos a um filtro que considera seu valor de p, admitindo apenas dados com valor de p inferior a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Expressão Diferencial dos Genes do Sistema OXPHOS

A validação dos símbolos de cada gene associado ao sistema OXPHOS feita por referência cruzada em diferentes bancos de dados, revelando que esse sistema possui uma distribuição não homogênea de genes entre cada complexo que o compõe. Sendo composto por cinco grandes complexos a distribuição dos genes em cada complexo se mostrou-se dessa forma: complexo I - NADH desidrogenase composto por sete genes; complexo II Succinato desidrogenase composto por quatro genes; complexo III – Citocromo bc1 composto por onze genes; complexo IV – Citocromo c oxidase composto por vinte e quatro genes e o complexo V – ATP sintase composto por três genes. Além disso, esse sistema também possui um complexo estrutural composto por oitenta e cinco genes, o qual atua auxiliando os demais complexos desse sistema, totalizando assim cento e trinta e quatro genes (Tabela S1; Figura 4).

Para avaliarmos diferenças nos níveis de expressão dos genes OXPHOS, investigando DEGs, entre amostras saudáveis e de tumor, escolhemos os sistemas de tecidos que apresentavam amostras iguais em ambos os estudos GTEx e TCGA. Foram obtidos um total de 18 sistemas de tecidos com amostras em ambos os estudos TCGA e GTEx (Tabela S4). Os genes OXPHOS foram DEG em todos os sistemas de tecidos com tumor, variando de quarenta e cinco genes (máximo) em tecido de ovário e um gene (mínimo) em tecido saudável de cérebro (LogFC variando de 1.5 a -1.5; $p_value \leq 0.05$). Os sistemas de tecidos com maior número de DEG, hiper ou hipo expressos, foram de cérebro, leucemia, pulmão pele, ovário, testículo e útero (Figura 5). Em câncer de ovário, o maior número de DEG com perfil hiper expresso foi observado ($n=45$; $\text{LogFC} \leq -1.5$; $p_value \leq 0.05$). Em câncer de útero vemos o segundo maior número de DEG com perfil hiper expresso ($n=35$; $\text{LogFC} \leq -1.5$; $p_value \leq 0.05$). Notamos outros DEG com perfil hiper expresso em diferentes tumores como leucemia (sangue periférico), pele, pulmão, testículo e útero (LogFC variando de -1.5 a -6.56; $p_value \leq 5.81E-07$) (Tabela S4).

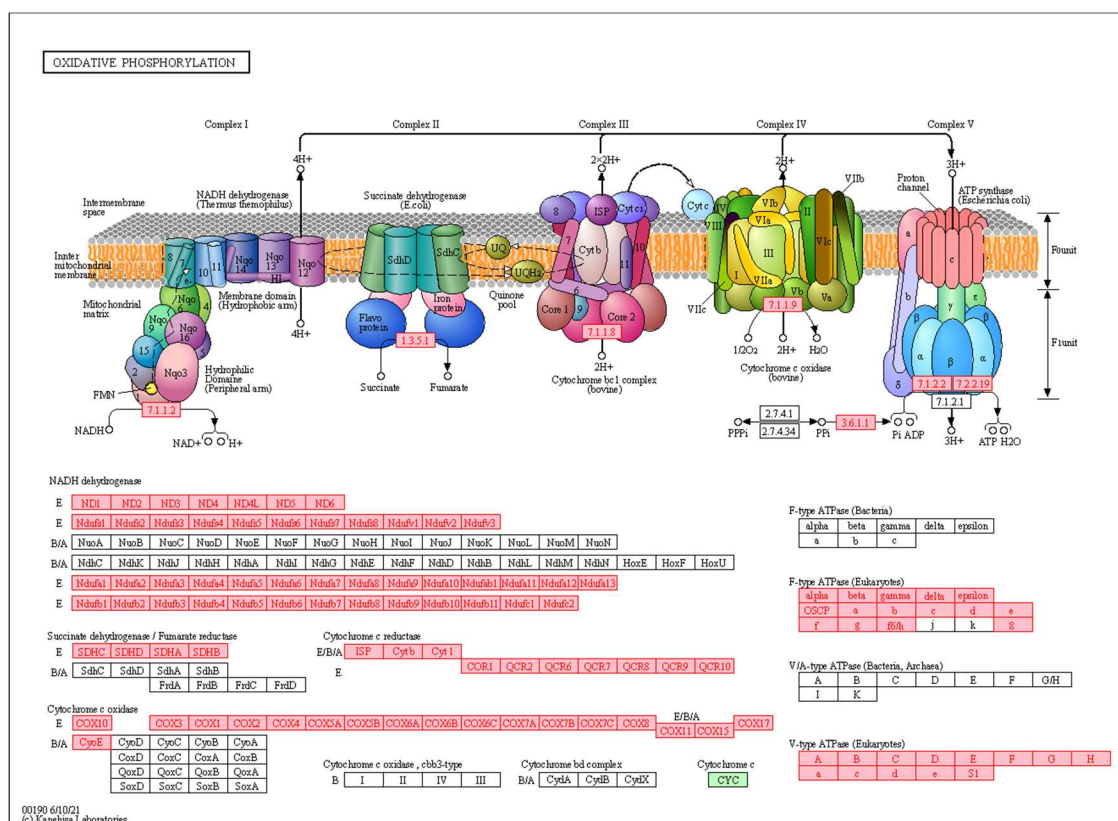


Figura 4. Genes associados ao sistema de oxidação fosforilativa (OXPHOS).

Esquema dos complexos proteicos que constituem o sistema OXPHOS localizados na matriz mitocondrial. Na parte superior da figura estão localizados os cinco complexos que compõem o sistema OXPHOS (complexos I-V). Nas caixas destacadas em vermelho observamos os genes associados ao sistema OXPHOS, os quais estão agrupados em diferentes complexos. Fonte: KEEG.

O maior número de DEG com perfil hipo expresso foi observado em câncer de cérebro com treze genes (*ATP6V0A4*, *COX6B2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *COX7A1*, *ATP4A*, *MT-ATP6*, *MT-ATP8*, *MT-ND1*, *MT-ND2*, *ATP6V1C2*, *COX6A2*; LogFC variando de 1.64 a 2.46; $p_value \leq 1.38E-73$), seguido de leucemia (sangue periférico), com onze genes (*ATP6V0A1*, *ATP6V0E1*, *ATP6V0E2*, *ATP6V1B1*, *ATP6V1E1*, *COX4I2*, *COX6A2*, *COX7A1*, *NDUFA4L2*, *NDUFB7*, *TCIRG1*; LogFC variando de 1.59 a 6.08; $p_value \leq 0.05$) (Tabela S4). Também observamos outros DEG com perfil hipo expresso em diferentes tumores como leucemia (sangue periférico), ovário, pele, pulmão, testículo e útero (LogFC variando de 6.08 a 1.57; $p_value \leq 3.66E-15$). As maiores diferenças nos níveis de expressão para DEG foram observadas em tumores de cérebro, esôfago, tireoide ($p_value \leq 9.89E-243$). (Figura 5, Tabela S4).

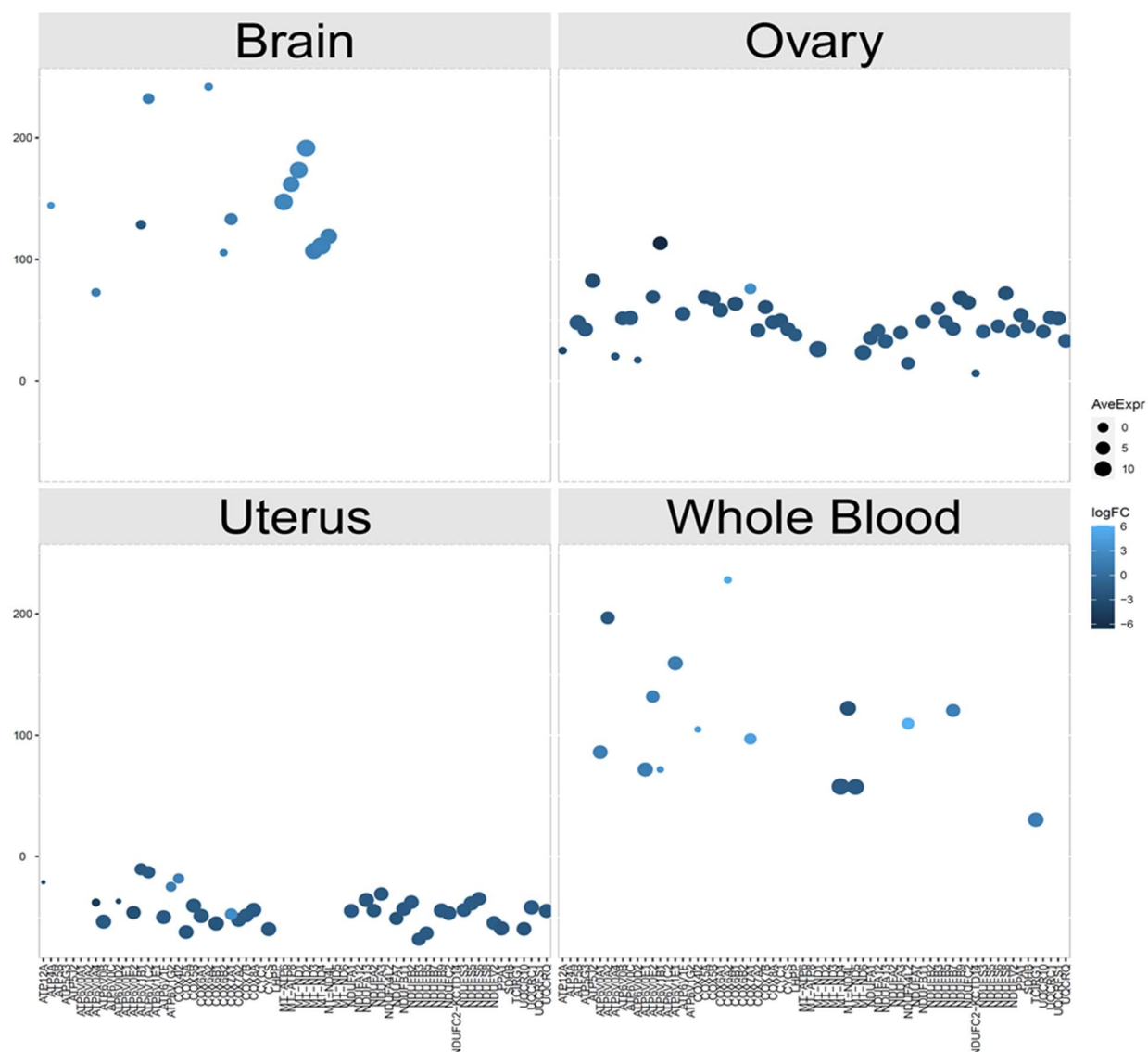


Figura 5. Gráfico de balão dos genes do sistema OXPHOS expressos diferencialmente em tecidos normais versus tecidos com câncer.

O tamanho do balão refere-se à expressão média (norm_counts); a intensidade da cor azul refere-se ao Log2FC, denotando superexpressão para valores positivos (azul mais claro) e subexpressão para valores negativos (azul escuro). Eixo X: os genes OXPHOS; Eixo Y, FDR (-log10). Os tecidos são indicados em cada caixa.

5.2. Mapa Pan-Câncer da Correlação Entre o Perfil de Expressão dos Genes OXPHOS e Sobrevivência geral

Nós estimamos a correlação entre os perfis de expressão dos genes OXPHOS e a sobrevivência geral em 33 tipos de cânceres, mapeando a taxa de risco (Hazard-risk) com base no modelo de risco proporcional de Cox para grupos de pacientes com hiper expressão e hipo expressão. Nove assinaturas (ID1 a ID-9, Tabela S5) gênicas foram observadas com diferentes correlações, super ou hipo expressão entre os grupos de pacientes (Figura 6-A, B e C). O número de componentes de cada assinatura gênica variou de 3 a 52, em diferentes cânceres (Tabela S6). Em carcinoma renal de células claras – KIRC foi observada a assinatura hipo expressa com 30-componentes (ID1; $p_value \leq 0.05$; HR ≤ 1.3) e uma assinatura hiper expressa com 8-componentes (ID2; $p_value \leq 1.3e-07$; HR ≤ 2.7). Em carcinoma de células papilares renais - KIRP identificamos uma assinatura com 8-componentes hipo expressa (ID3; $p_value \leq 0.01$; HR ≤ 0.24). Para glioma de baixo grau – LGG observamos uma assinatura com 15-componentes hiper expressa (ID4; $p_value \leq 2.1e-06$; HR ≤ 2.5) e outra assinatura hipo expressa com 21-componentes (ID5; $p_value \leq 0.01$; HR ≤ 0.9). Para adenocarcinoma de pulmão - LUAD identificamos uma assinatura com 3-componentes hiper expressa (ID6; $p_value \leq 0.01$; HR ≤ 1.6). Em melanoma cutâneo - SKCM foi obtida uma assinatura hiper expressa com 9-componentes (ID7; $p_value \leq 0.0075$; HR ≤ 1.4). Para melanoma uveal – UVM foi obtida uma assinatura hiper expressa com 52-componentes (ID8; $p_value \leq 0.015$; HR ≤ 24) e outra assinatura hipo expressa com 3-componentes (ID9; $p_value \leq 5.8e-05$; HR ≤ 0.15) (Figura 6-A, B e C).

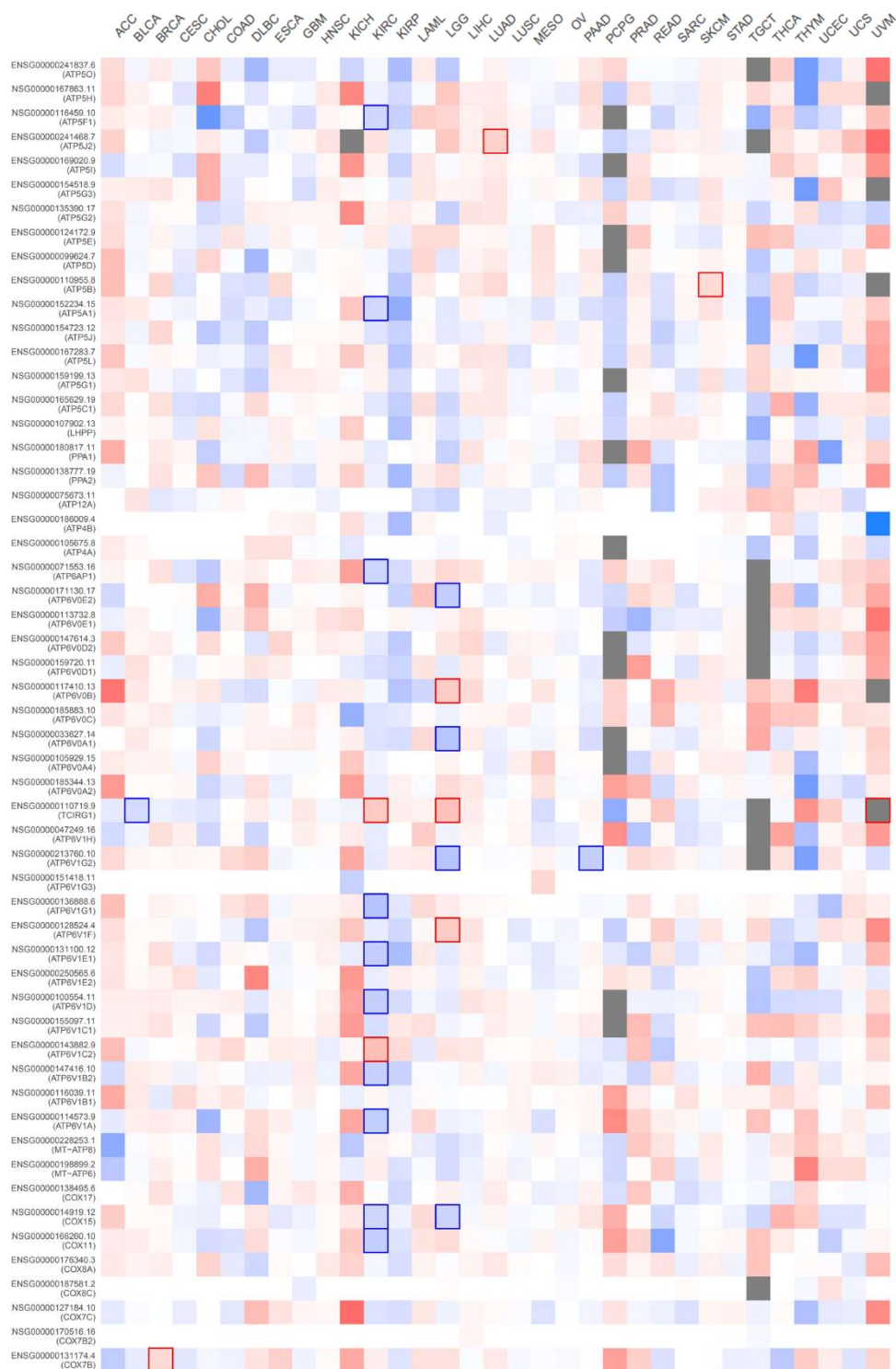


Figura 6A. Mapa de Calor das correlações entre os perfis de expressão dos genes OXPHOS e sobrevivência geral.

Os quadrados denotam a sobrevivência geral associada à hiperexpressão (vermelho) ou hipoexpressão (azul). Os quadros destacados denotam associações significativas com os resultados de sobrevivência geral com base nas razões de risco (escala logarítmica $\log_{10}$). Eixo Y: genes do sistema OXPHOS (transcrições Ensembl e nomes UCSCXena), eixo X: tipos de pan-câncer.

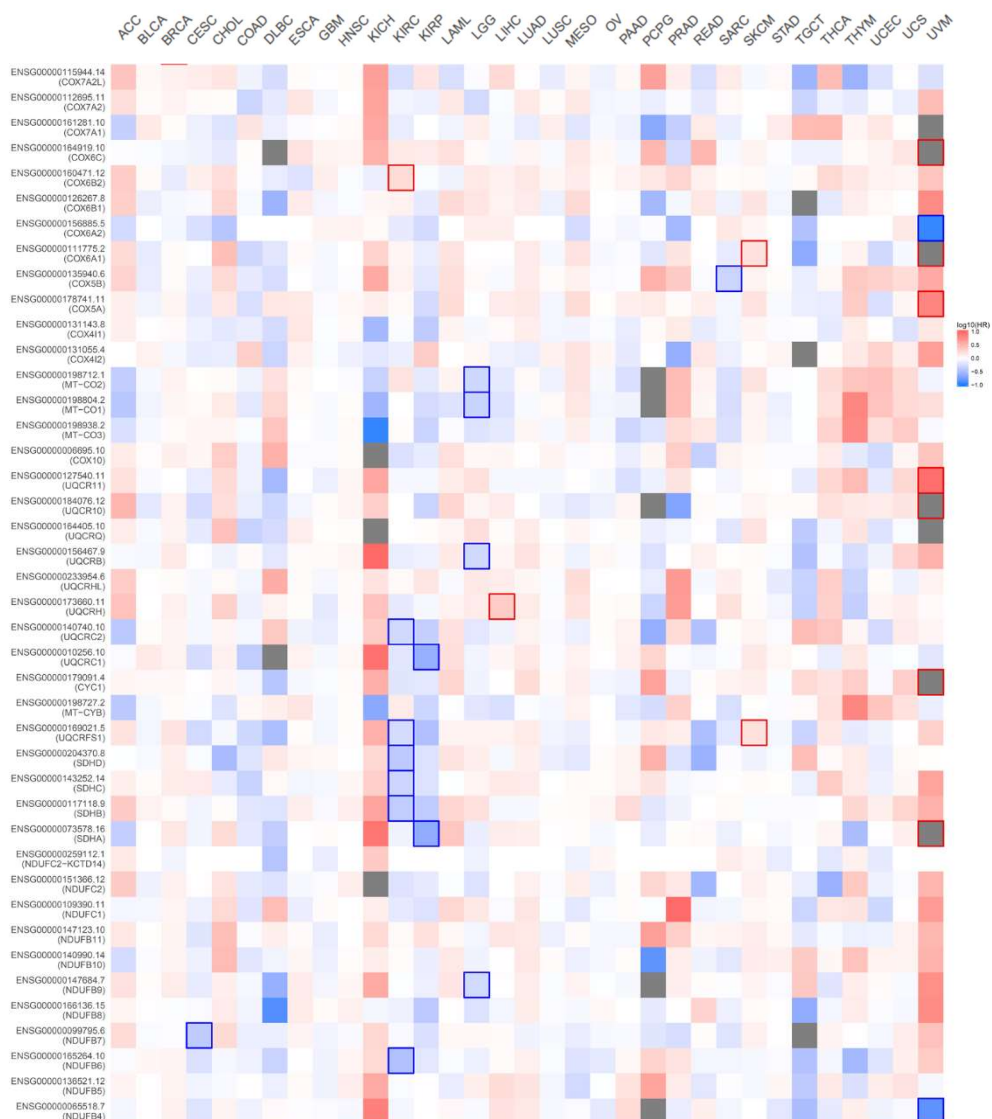


Figura 7B. Mapa de Calor das correlações entre os perfis de expressão dos genes OXPHOS e sobrevivência geral.

Os quadrados denotam a sobrevivência geral associada à hiperexpressão (vermelho) ou hipoexpressão (azul). Os quadros destacados denotam associações significativas com os resultados de sobrevivência geral com base nas razões de risco (escala logarítmica $\log_{10}$). Eixo Y: genes do sistema OXPHOS (transcrições Ensembl e nomes UCSCXena), eixo X: tipos de câncer.

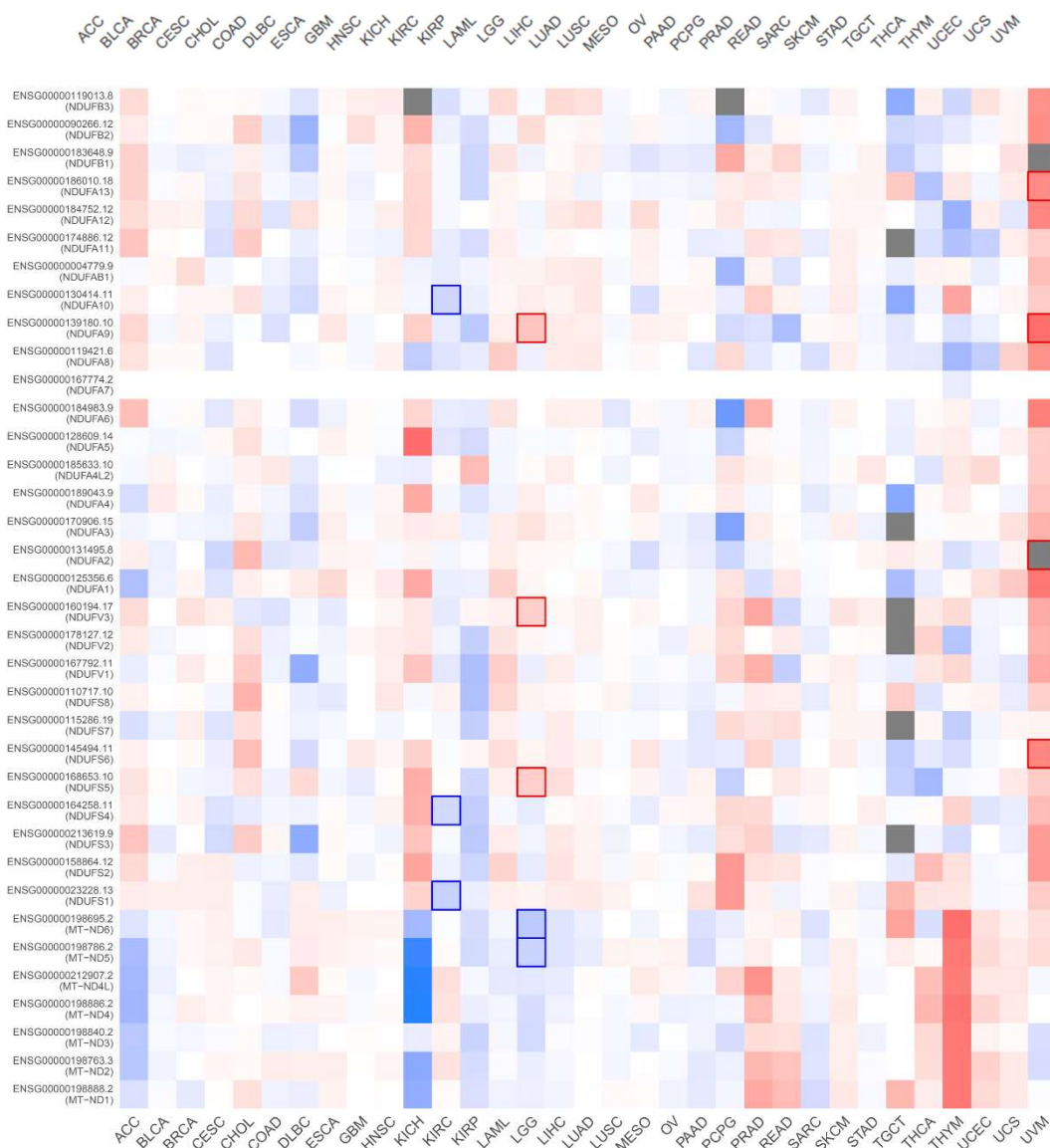


Figura 8C. Mapa de Calor das correlações entre os perfis de expressão dos genes OXPHOS e sobrevivência geral.

Os quadrados denotam a sobrevivência geral associada à hiper expressão (vermelho) ou hipo expressão (azul). Os quadros destacados denotam associações significativas com os resultados de sobrevivência geral com base nas razões de risco (escala logarítmica $\log_{10}$). Eixo Y: genes do sistema OXPHOS (transcrições Ensembl e nomes UCSCXena), eixo X: tipos de pan-câncer.

5.3 Comparação do Perfil de Expressão das Assinaturas Gênicas Associadas com Sobrevivência geral entre Amostras Saudáveis e com Tumor Perfil

Utilizando as assinaturas obtidas na análise de sobrevivência geral Pan-Câncer dos genes do sistema OXPHOS, exploramos a distribuição do perfil molecular dessas assinaturas entre amostras saudáveis versus com tumor.

Observamos que em todos os tecidos analisados (KIRC, KIRP, LGG, LUAD e SKCM) as assinaturas genéticas hiper ou hipo expressas mostraram diferenças significativas quanto a sua expressão em tecido normal versus com tumor (p_value variando de $1.4e-18$ a $7.9e-96$). Em KIRC a assinatura ID1 exibiu um maior perfil de expressão para o tecido normal em relação ao tumor, o mesmo efeito foi observado na assinatura ID2 (Figura 7 e 8; Tabela S7 e S8). Em KIRP, a assinatura ID3 não apresentou diferença significativa entre as amostras saudáveis e com tumor (Figura 9; Tabela S9). Para LGG, a assinatura ID4 mostrou um maior perfil de expressão em tecido normal, já para a assinatura ID5 o maior perfil de expressão estava associado as amostras de tumor (Figura 10 e 11) (Tabela S10 e S11). Em LUAD, a assinatura ID6 exibiu maior perfil de expressão em amostras saudáveis (Figura 12; Tabela S12). Para SKCM, o mesmo efeito foi observado na assinatura ID7 (Figura 13) (Tabela S13). Para as assinaturas de ID8 e ID9 observadas em UVM, essas não apresentaram amostras equivalente entre tecido normal e com tumor, não sendo possível realizar a análise para essa assinatura.

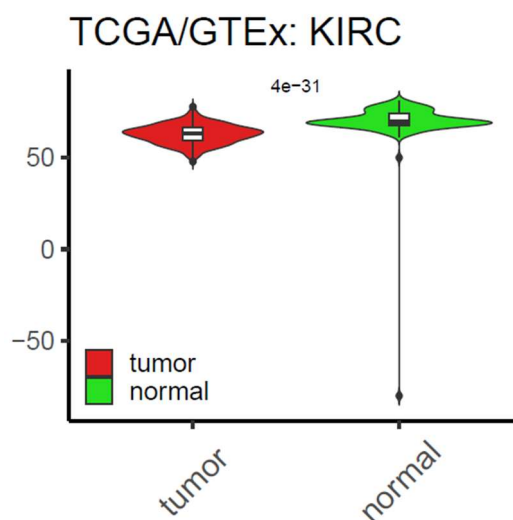


Figura 9. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hiper expressa em carcinoma de células renais claras.

Perfil de expressão da assinatura ID1 dos genes OXPHOS em KIRC. No eixo X temos as amostras de tecido correspondentes: saudável (verde) e com tumor (vermelho); no eixo Y temos o valor de expressão das assinaturas (TPM) em Log2, onde aplicamos o teste de Wilcoxon para mensurar significância entre os níveis de expressão.

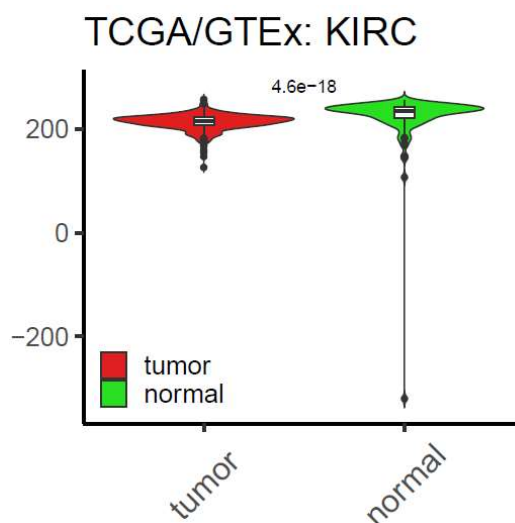


Figura 10. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hipo expressa em carcinoma de células renais claras.

Perfil de expressão da assinatura ID2 dos genes OXPHOS em KIRC. No eixo X temos as amostras de tecido correspondentes: saudável (verde) e com tumor (vermelho); no eixo Y temos o valor de expressão das assinaturas (TPM) em Log2, onde aplicamos o teste de Wilcoxon para mensurar significância entre os níveis de expressão.

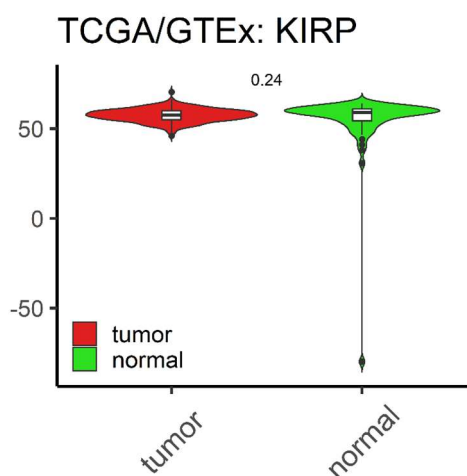


Figura 11. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hipo expressa em carcinoma papilar de células renais.

Perfil de expressão da assinatura ID3 dos genes OXPHOS em KIRP. No eixo X temos as amostras de tecido correspondentes: saudável (verde) e com tumor (vermelho); no eixo Y temos o valor de expressão das assinaturas (TPM) em Log2, onde aplicamos o teste de Wilcoxon para mensurar significância entre os níveis de expressão.

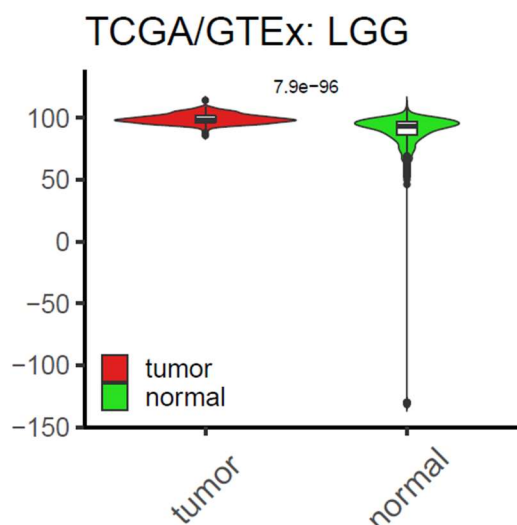


Figura 12. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hiper expressa em gliomas de baixo grau.

Perfil de expressão da assinatura ID4 dos genes OXPHOS em LGG. No eixo X temos as amostras de tecido correspondentes: saudável (verde) e com tumor (vermelho); no eixo Y temos o valor de expressão das assinaturas (TPM) em Log2, onde aplicamos o teste de Wilcoxon para mensurar significância entre os níveis de expressão.

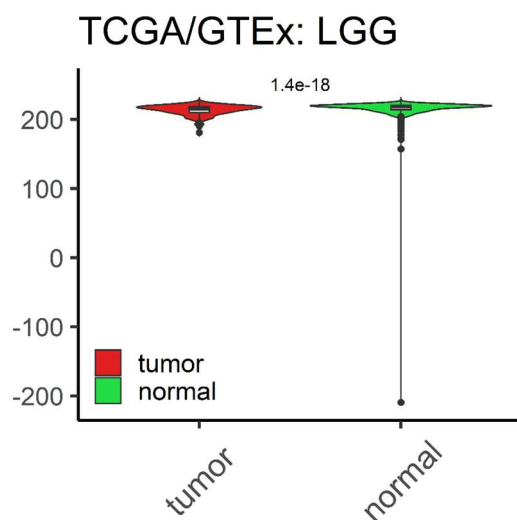


Figura 13. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hipo expressa em gliomas de baixo grau.

Perfil de expressão da assinatura ID5 dos genes OXPHOS em LGG. No eixo X temos as amostras de tecido correspondentes: saudável (verde) e com tumor (vermelho); no eixo Y temos o valor de expressão das assinaturas (TPM), onde aplicamos o teste de Wilcoxon para mensurar significância entre os níveis de expressão.

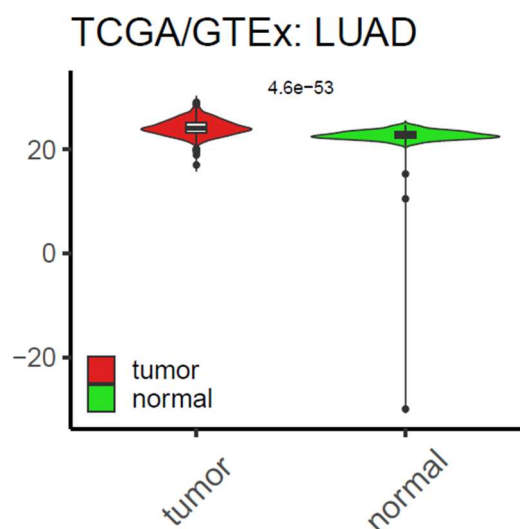


Figura 14. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hiper expressa em adenocarcinoma de pulmão.

Perfil de expressão da assinatura ID6 dos genes OXPHOS em LUAD. No eixo X temos as amostras de tecido correspondentes: saudável (verde) e com tumor (vermelho); no eixo Y temos o valor de expressão das assinaturas (TPM) em Log2, onde aplicamos o teste de Wilcoxon para mensurar significância entre os níveis de expressão.

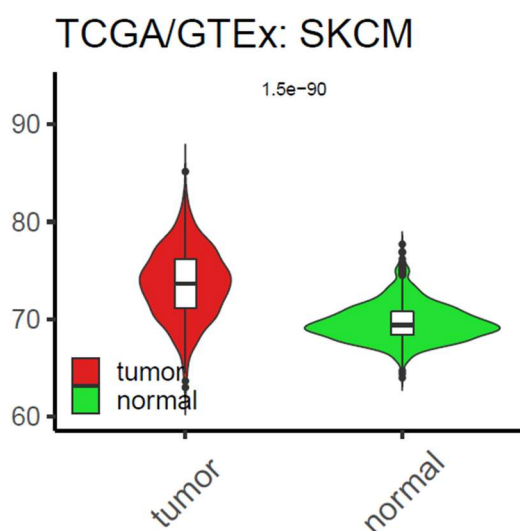


Figura 15. Boxplot da distribuição dos perfis de expressão entre amostras normais e de tumor para a assinatura hiper expressa em melanoma cutâneo.

Perfil de expressão da assinatura ID7 dos genes OXPHOS em SKCM. No eixo X temos as amostras de tecido correspondentes: saudável (verde) e com tumor (vermelho); no eixo Y temos o valor de expressão das assinaturas (TPM) em Log2, onde aplicamos o teste de Wilcoxon para mensurar significância entre os níveis de expressão.

5.4 Análise de Correlação dos Perfis de Expressão das Assinaturas Gênicas – OXPHOS com Diferentes Desfechos de Sobrevivência em Diferentes Cânceres.

Aqui estimamos o valor do fator prognóstico das assinaturas obtidas a partir da análise do mapa de sobrevivência para os genes do sistema OXPHOS, correlacionando o perfil de expressão molecular com as taxas de resultados de sobrevivência em KIRC, KIRP, LGG, LUAD, SKCM, UVM. Utilizamos quatro métodos de análise de sobrevivência como variável de desfecho: sobrevivência geral (OS), sobrevivência livre de eventos (DSS), sobrevivência livre da doença (DFI) e sobrevivência livre de progressão (PFI).

Nesta análise, observamos em carcinoma de células renais claras - KIRC, para duas métricas de desfecho (OS, DSS), observamos que o grupo de pacientes com hiper expressão da assinatura ID1, foi associado com pior prognóstico de sobrevivência, tanto em homens quanto em mulheres (Log-rank $p < 0.05$) (Figura 14 e 15; Tabelas S14 – S19). Para as métricas de desfecho DFI e PFI, notamos que o grupo de pacientes com hipo expressão da assinatura ID1 associou-se a um pior prognóstico de sobrevivência, tanto em homens quanto em mulheres (Log-rank $p < 0.05$) (Figuras 16-17) (Tabela S20-S25). Para a assinatura ID2, observamos que em três das quatro métricas de desfecho (OS, DSS e PFI) o grupo de pacientes com hiper expressão foi associado a um melhor prognóstico de sobrevivência, tanto em homens quanto em mulheres (Log-rank $p < 0.0001$ em 505 amostras) (Figuras 18, 19 e 21; Tabelas S26-S34). Em DFI notamos que o grupo de pacientes com hipo expressão associou-se a um melhor prognóstico (Log-rank $p < 0.019$), não havendo relação significativa da sobrevivência quanto sexo (Figura 20) (Tabela S35-S37).

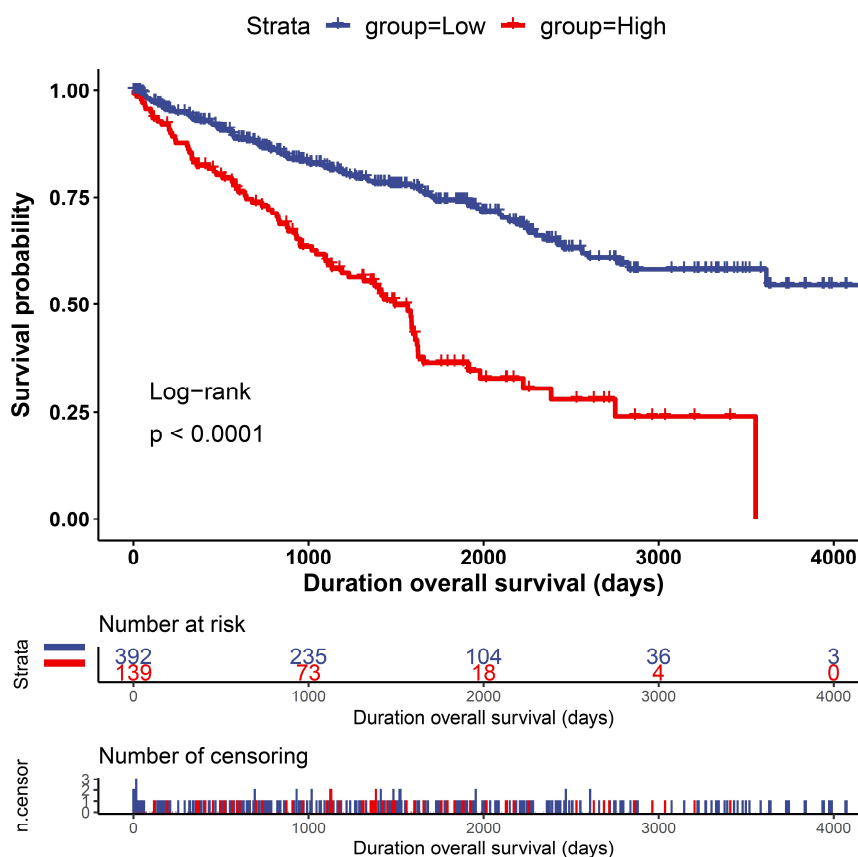


Figura 16. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em KIRC.

As curvas denotam a contribuição da assinatura ID1 para o resultado em pacientes do baixo (azul – hipo expressos) e alto (vermelho – hiper expressos) grupos de expressão. O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

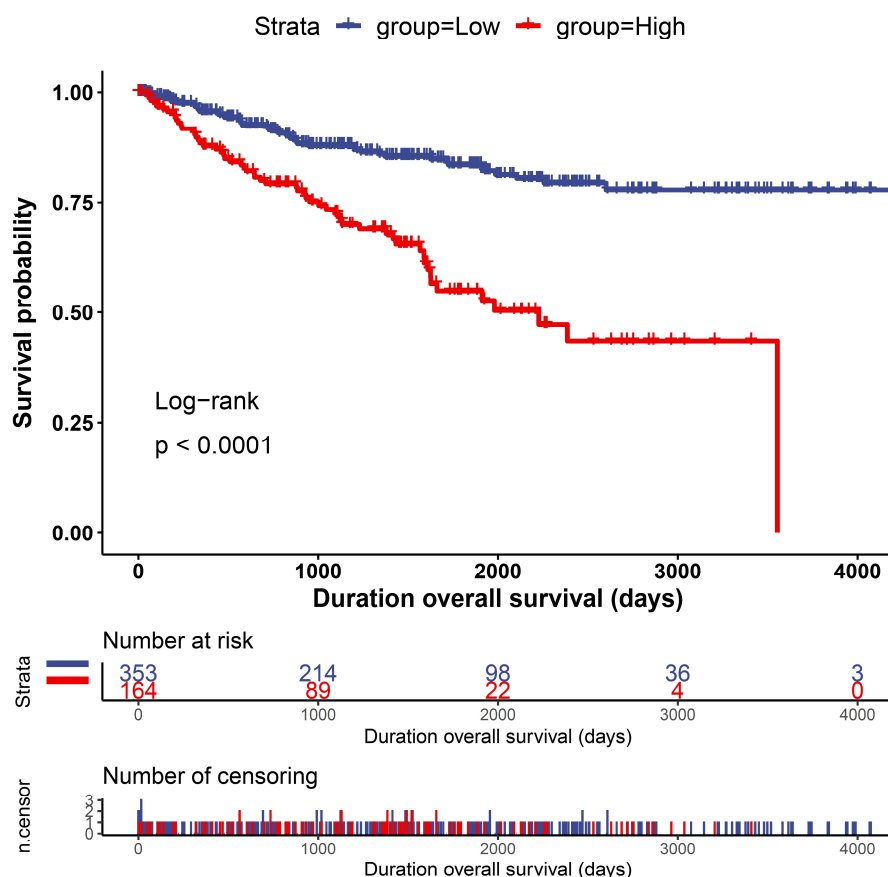


Figura 17. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em KIRC.

As curvas denotam a contribuição da assinatura de expressos) ID1 para o resultado em pacientes do baixo (azul – hipo expressos) e alto (vermelho – hiper expressos) grupos de expressão. O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

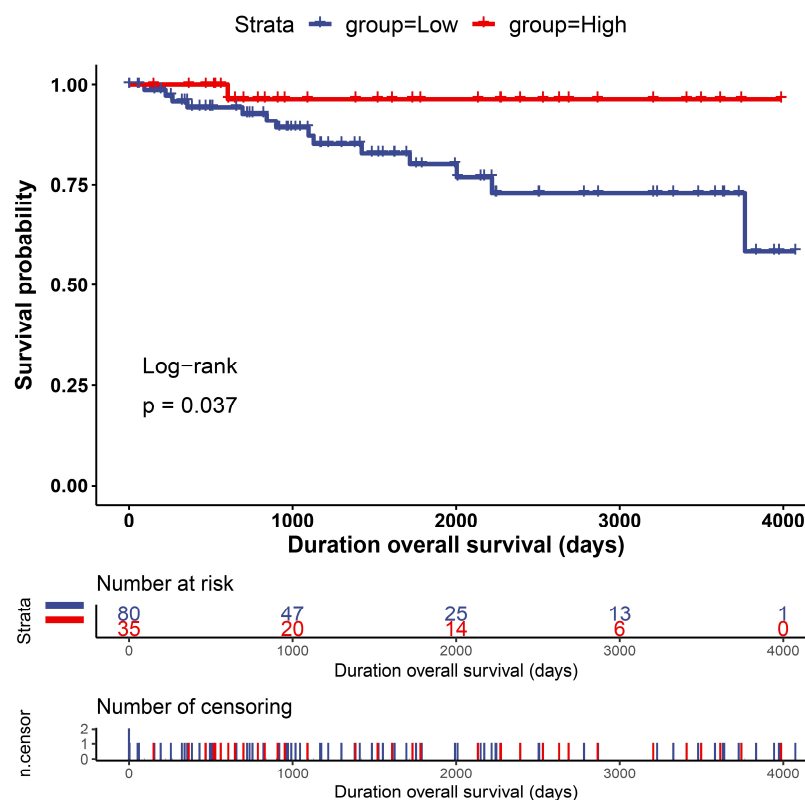


Figura 18. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença (DFI) em KIRC.

As curvas denotam a contribuição da assinatura ID1 para o resultado em pacientes do baixo (azul – hipo expressos) e alto (vermelho – hiper expressos) grupos de expressão. O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hiper expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

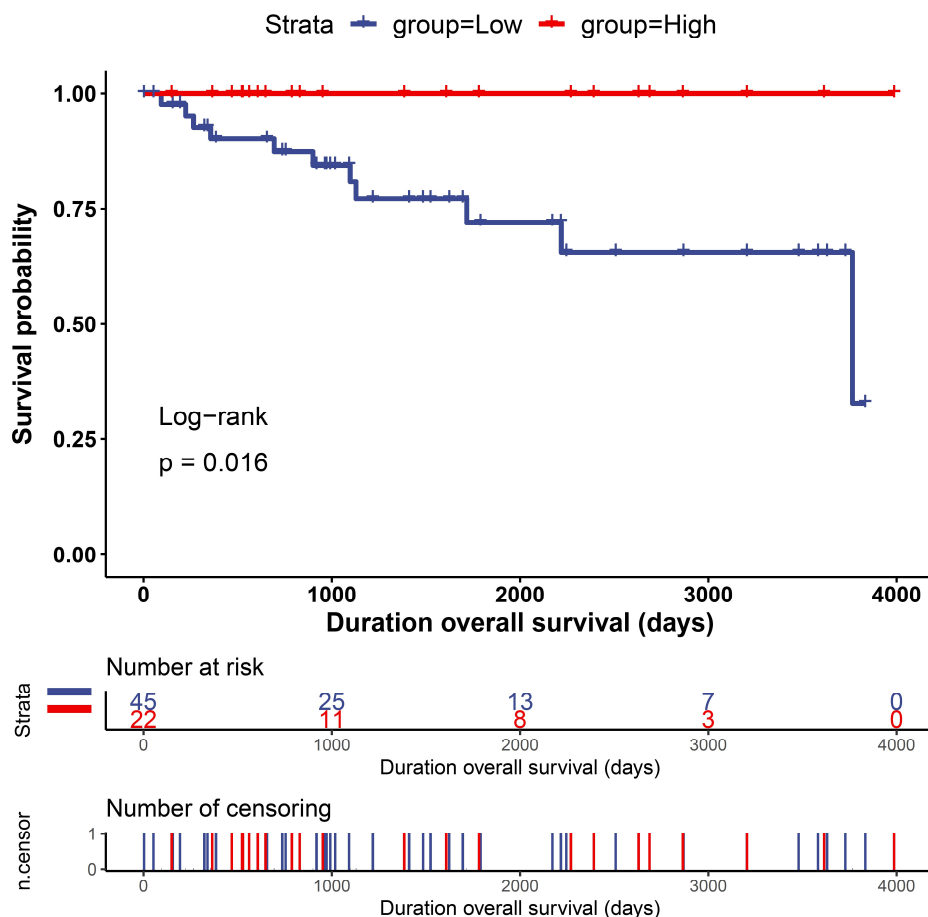


Figura 19. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em KIRC.

As curvas denotam a contribuição da assinatura ID1 para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hiper expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

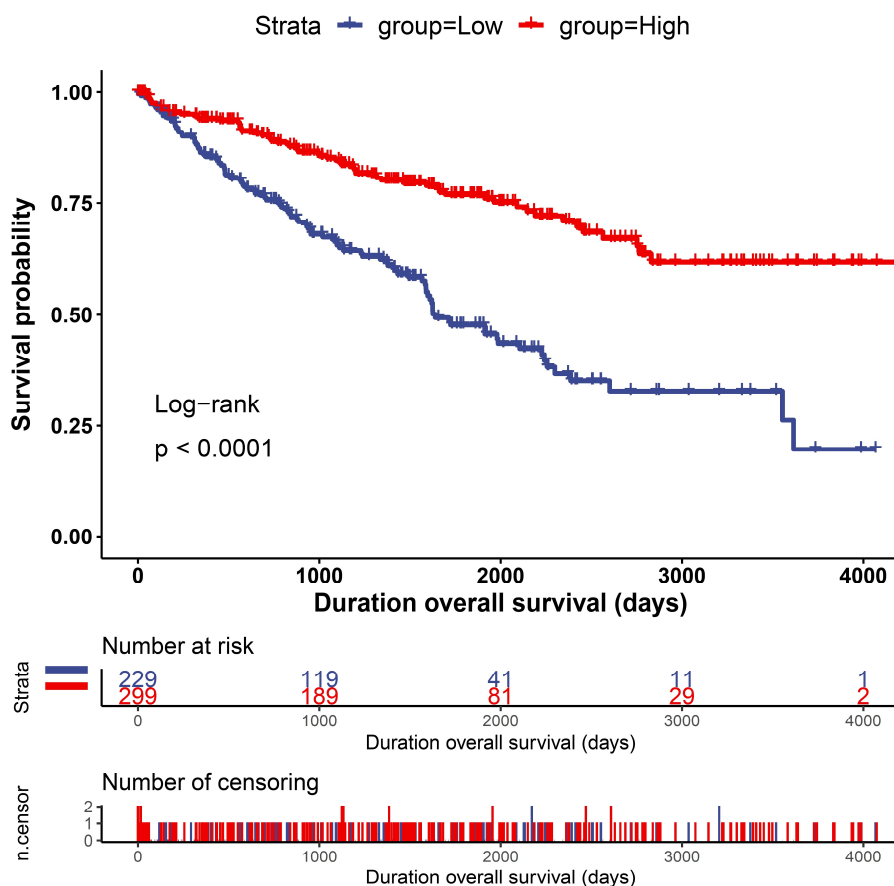


Figura 20. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em KIRC.

As curvas denotam a contribuição da assinatura ID2 para o resultado em pacientes do baixo (azul – hipo expressos) e alto (vermelho – hiper expressos) grupos de expressão. O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hiper expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

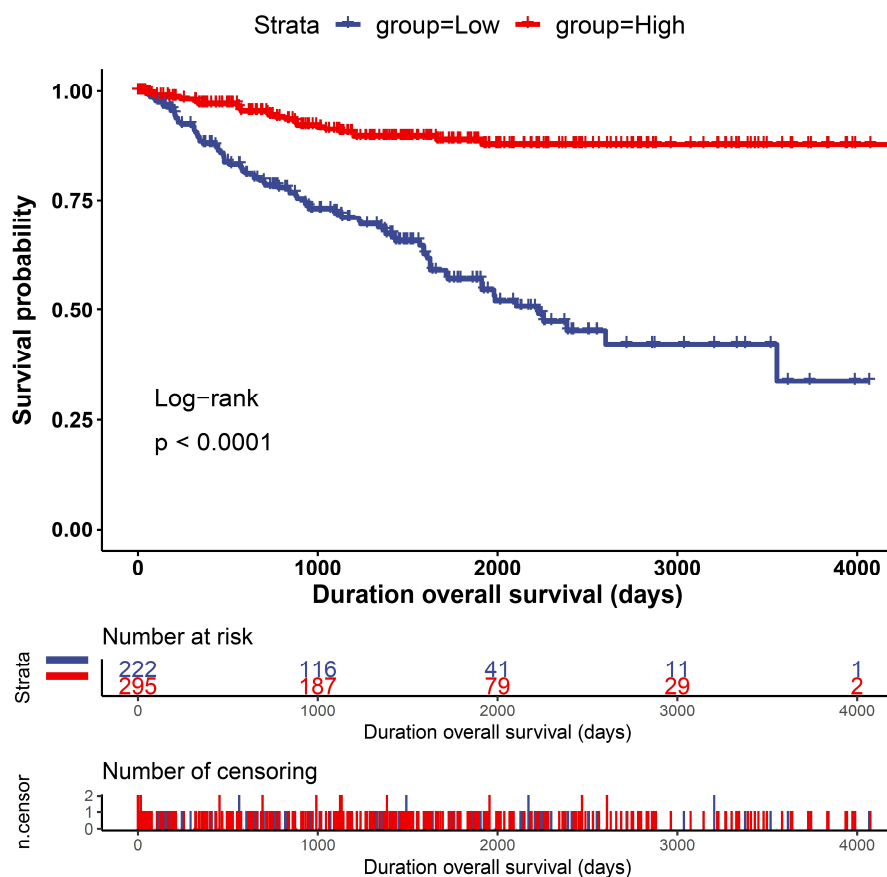


Figura 21. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em KIRC.

As curvas denotam a contribuição da assinatura ID2 para o resultado em pacientes do baixo (azul – hipo expressos) e alto (vermelho – hiper expressos) grupos de expressão. O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hiper expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

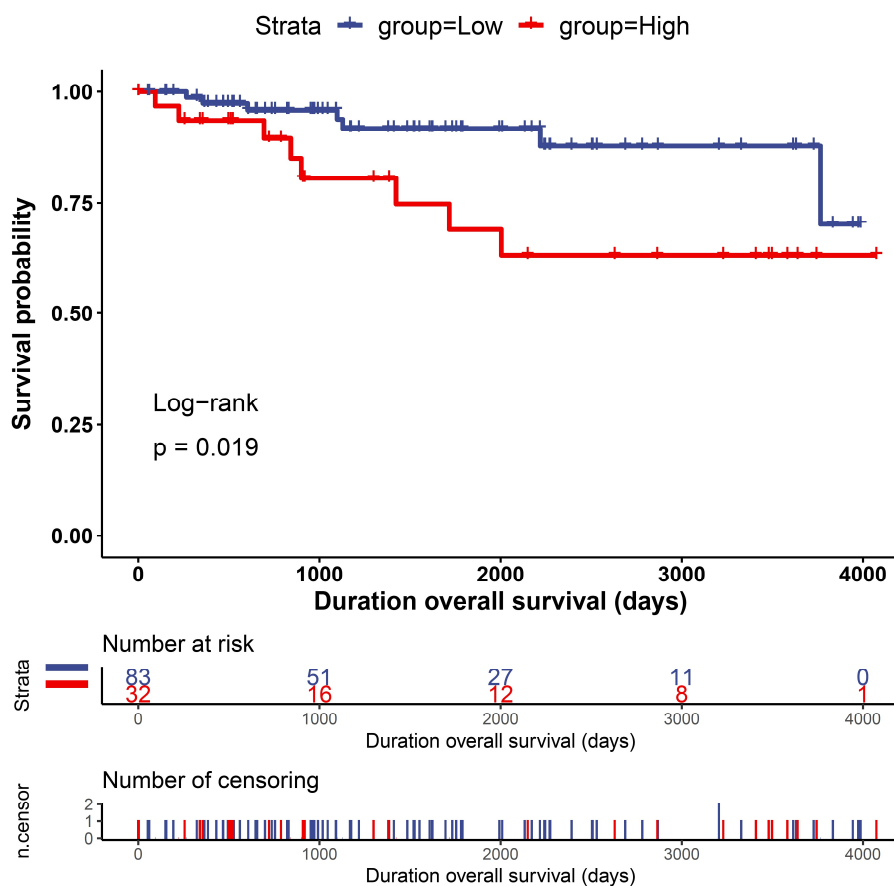


Figura 22. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença (DFI) em KIRC.

As curvas denotam a contribuição da assinatura ID2 para o resultado em pacientes do baixo (azul – hipo expressos) e alto (vermelho – hiper expressos) grupos de expressão. O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

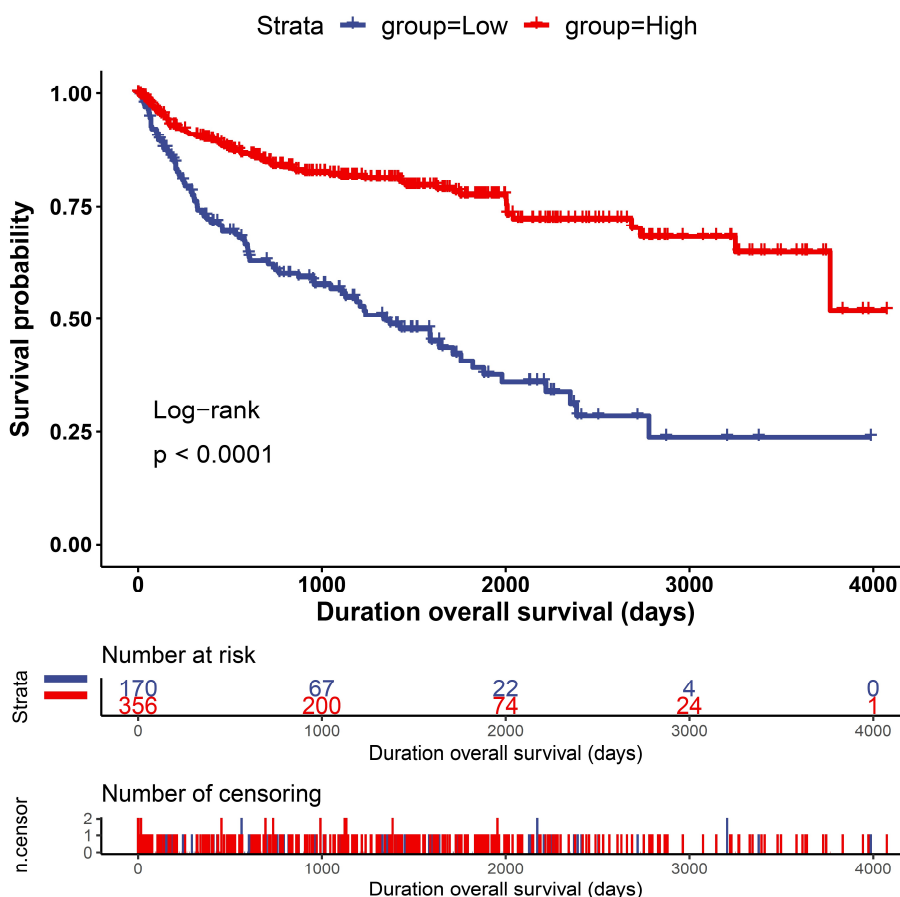


Figura 23. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em KIRC.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID2, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hiper expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

Em carcinoma papilar de células renais - KIRP, observamos que o grupo de pacientes com maior expressão da assinatura ID3 foram associados uma maior sobrevivência para OS e DSS (Log-rank p < 0.05) (Figura 22 e 23; Tabelas S39-S44). Nas métricas de desfecho PFI e DFI, o grupo de pacientes com menor expressão dessa assinatura foram associados a maior sobrevivência em homens (Log-rank p < 0.05) (Figura 24 e 25; Tabela S44-S49).

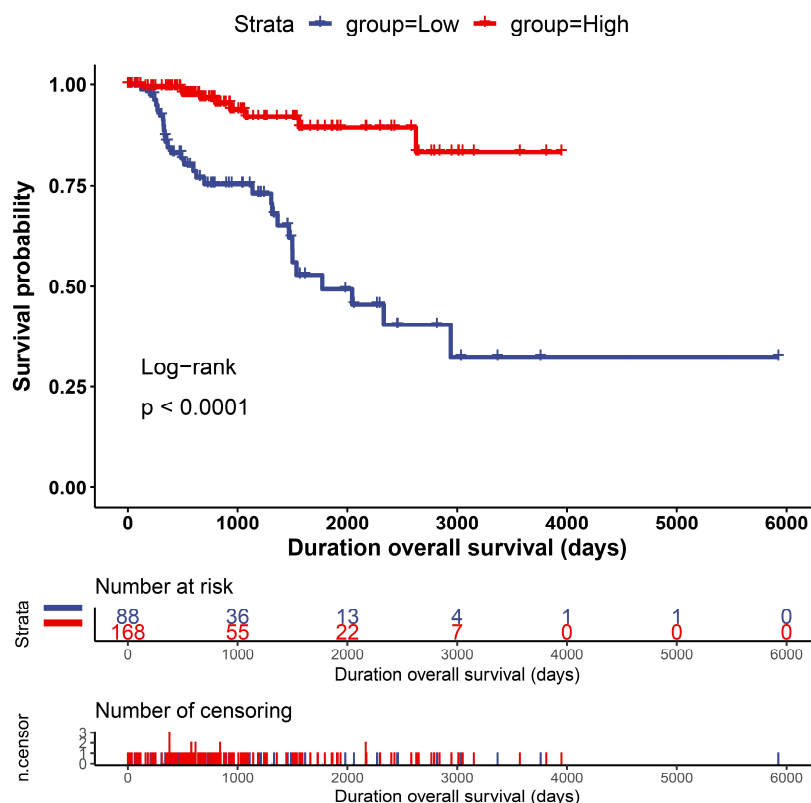


Figura 24. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em KIRP.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID3, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hiper expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

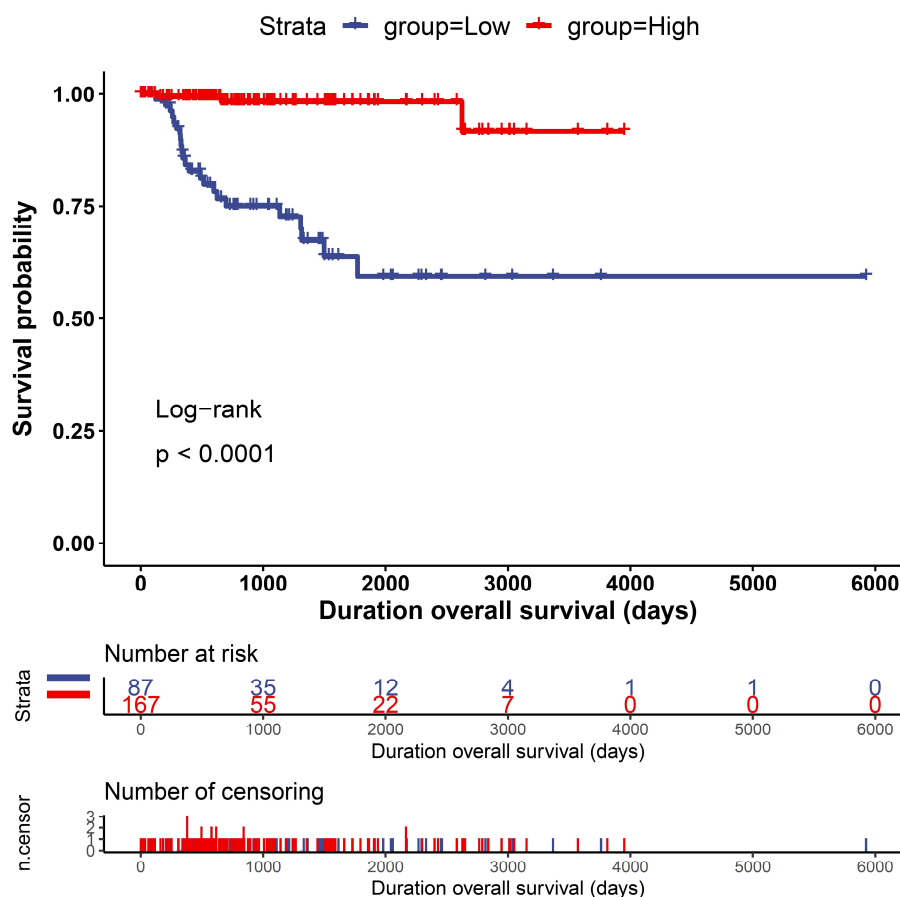


Figura 25. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em KIRP.

As curvas denotam a contribuição da assinatura ID3, para o resultado em pacientes do baixo (azul – hipo expressos) e alto (vermelho – hiper expressos) grupos de expressão. O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hiper expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

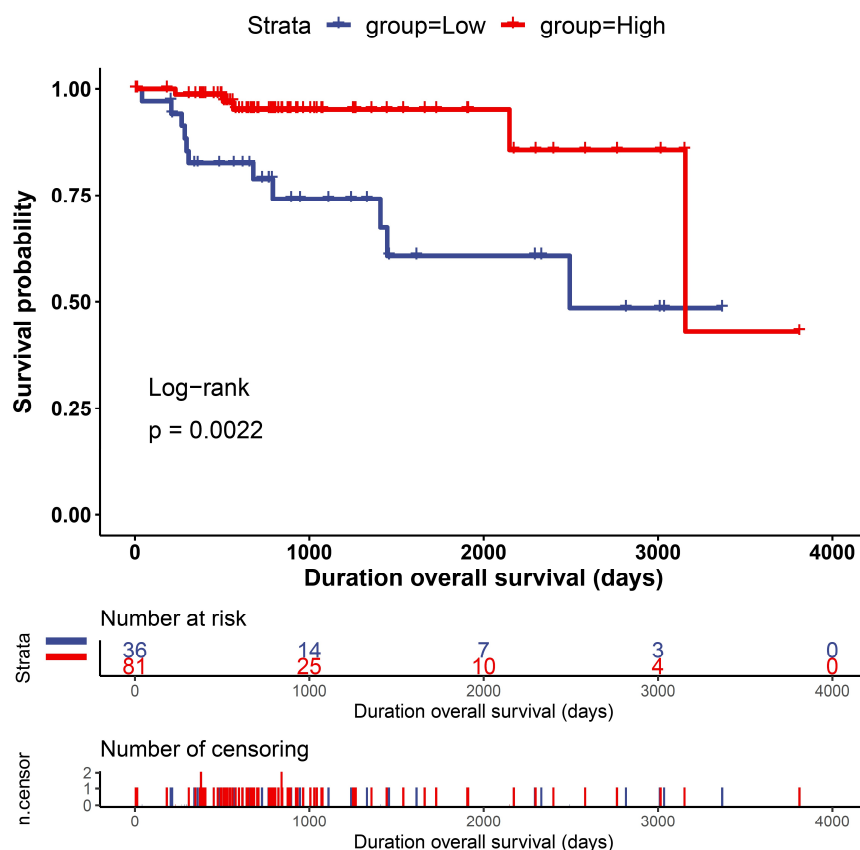


Figura 26. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença (DFI) em KIRP para homens.

As curvas denotam a contribuição da assinatura ID3, para o resultado em pacientes do baixo (azul – hipo expressos) e alto (vermelho – hiper expressos) grupos de expressão. O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

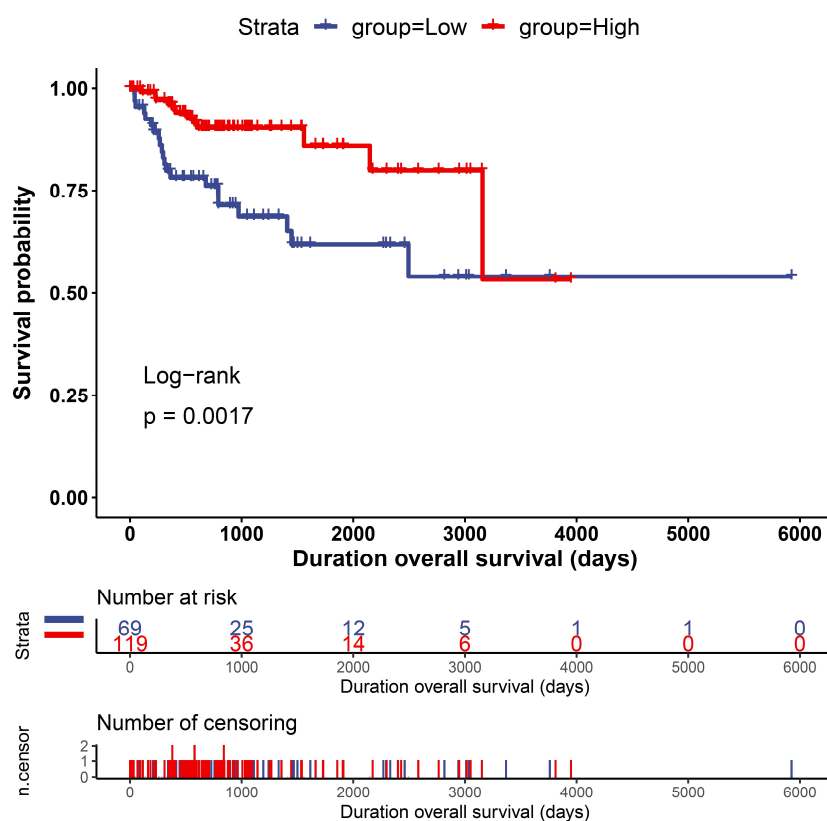


Figura 27. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em KIRP para homens.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica ID3, para em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

Em glioma de baixo grau - LGG, para a métrica de desfecho OS, o grupo de pacientes com menor expressão da assinatura ID4 foi associado a uma maior sobrevivência, tanto em homens quanto em mulheres (Log -rank $p = 0.0001$) (Figura 26; Tabela S50-S52). Um efeito similar foi observado em DSS para essa assinatura (Log-rank $p = 0.0001$) (Figura 27; Tabela S53-S55). Para DFI, o grupo de pacientes com menor expressão dessa assinatura não apresentou um desfecho com resultado significativo na sobrevida dos grupos de pacientes (Log-rank $p = 0.08$) (Figura 28; Tabela S56-S58). Em PFI, o grupo de pacientes com menor expressão dessa assinatura associou-se a uma maior sobrevivência para homens (Log-rank $p = 0.0001$) (Figura 29; Tabelas S59-S61). Para a assinatura ID5, notamos que o grupo de pacientes com maior expressão dessa assinatura foi associado a um melhor prognóstico para sobrevivência em três métricas de desfecho (OS, DSS e PFI; Log-rank $p = 0.0001$) para mulheres, porém para homens o grupo de pacientes com menor expressão dessa assinatura exibiu melhor prognóstico de sobrevivência (Figura 30, 31 e 33; Tabela S62-S70). Em DFI, a assinatura não apresentou uma correlação significativa na sobrevida dos grupos de pacientes (Log-rank $p = 0.09$) (Figura 32; Tabelas S71 – S73).

Em adenocarcinoma de pulmão LUAD, o grupo de pacientes com menor expressão da assinatura ID6 foi associado a melhor prognóstico de sobrevivência em três métrica de desfecho (OS, DSS e PFI) associado a mulheres (Log-rank $p = 0.001$) (Figuras 34, 35 e 37; Tabela S74-S81). Para a categoria DFI, essa assinatura não apresentou uma correlação significativa na sobrevida dos grupos de pacientes (Log-rank $p = 0.23$) (Figura 36; Tabela S82-S84).

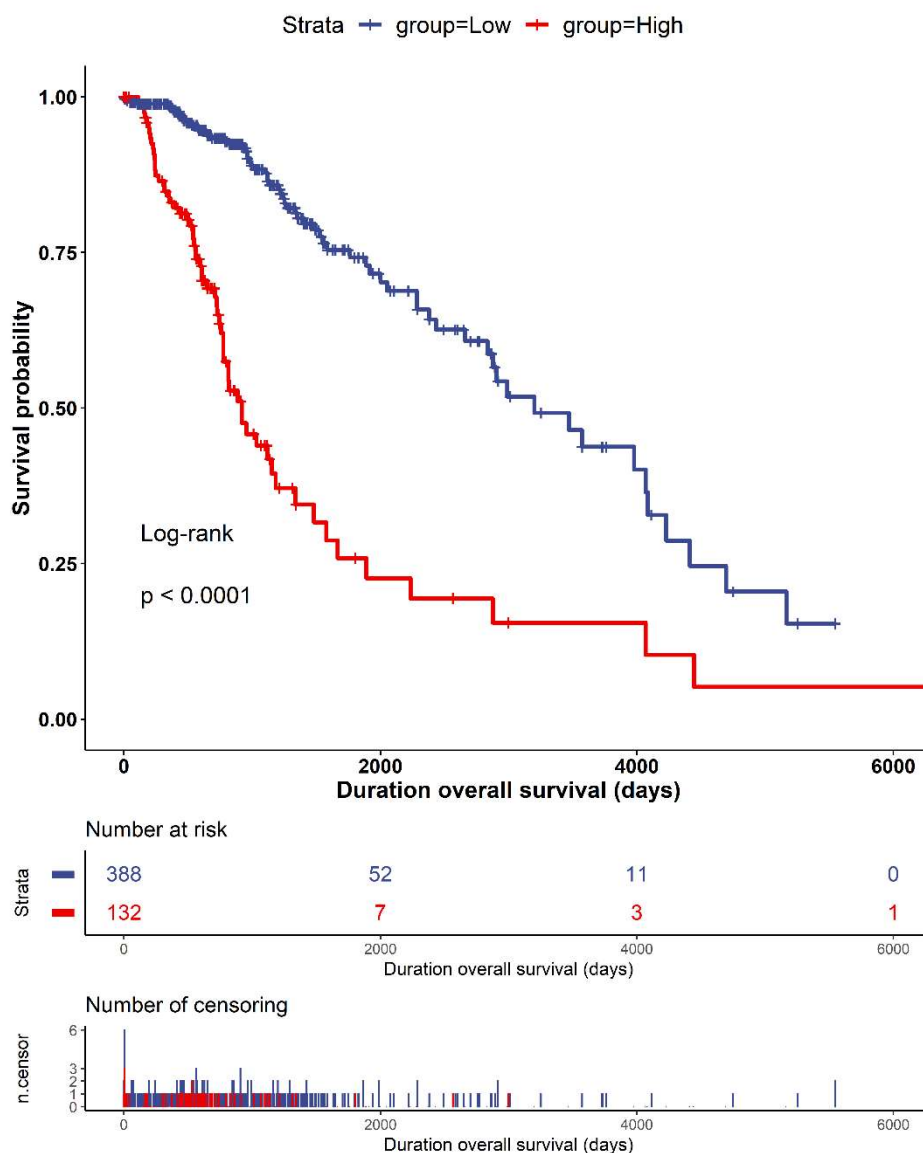


Figura 28. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em LGG.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID4, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

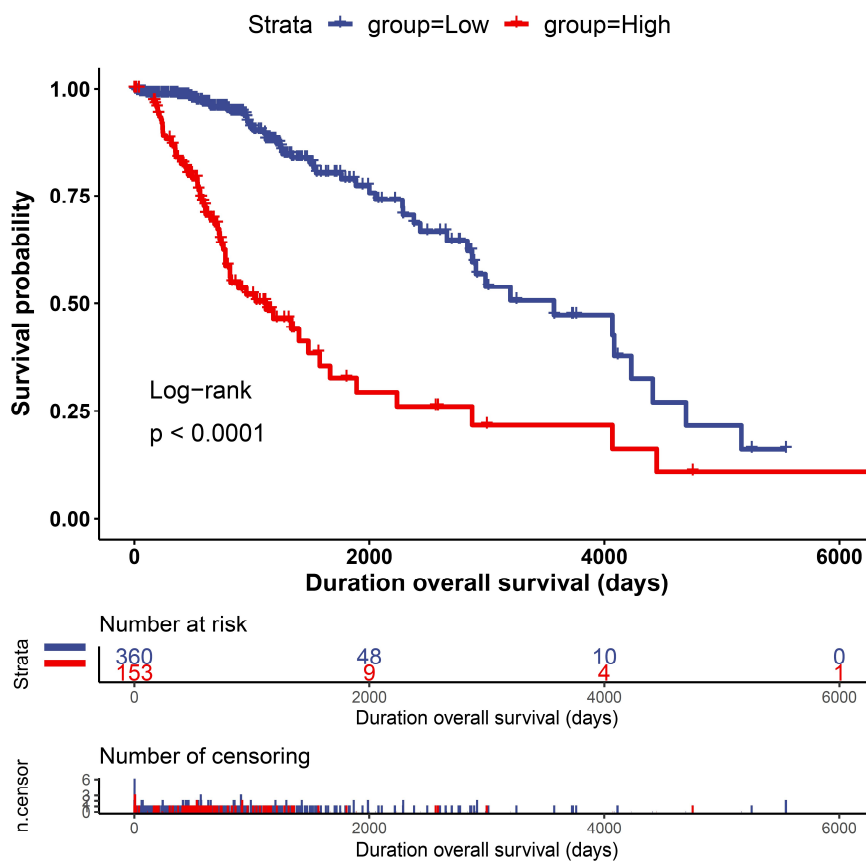


Figura 29. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em LGG.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID4, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

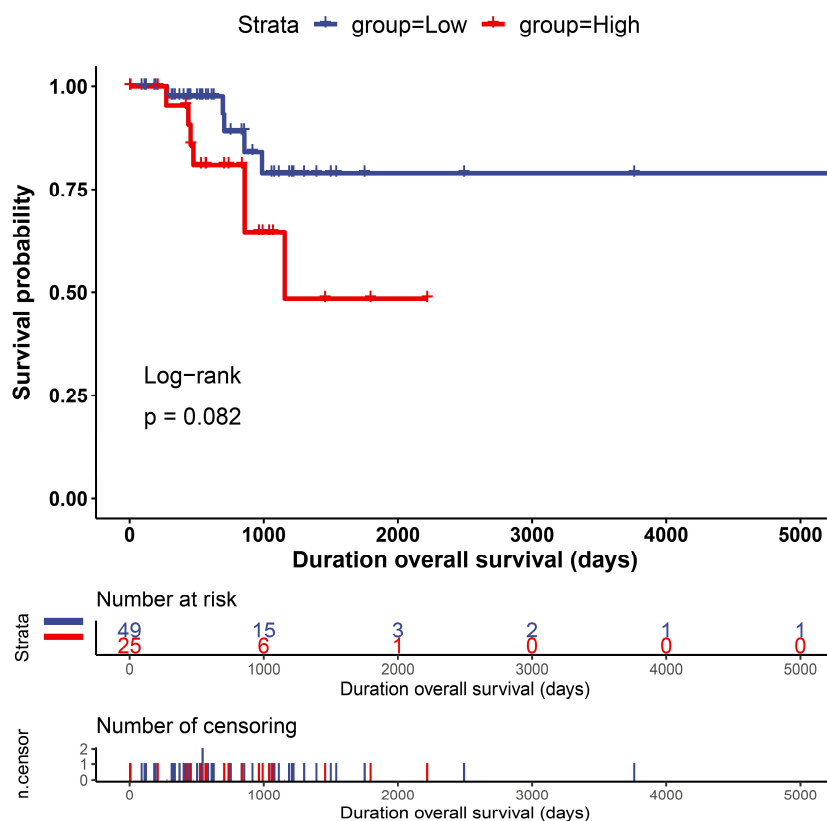


Figura 30. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença (DFI) em LGG.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID4, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

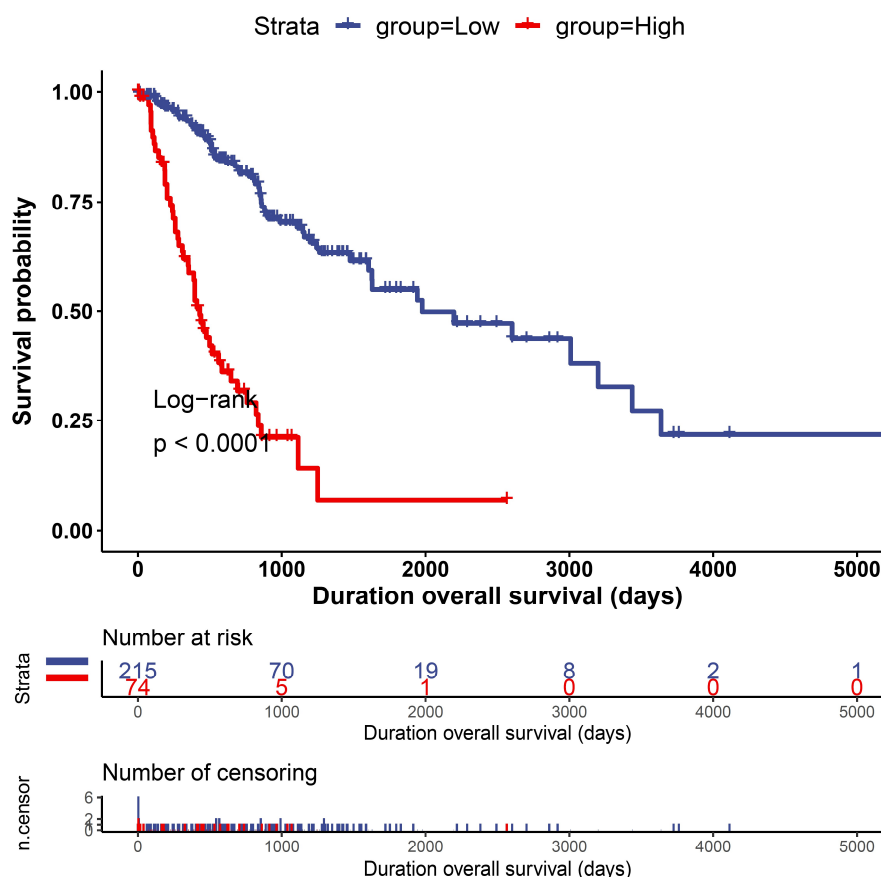


Figura 31. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em LGG para homens.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID4, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

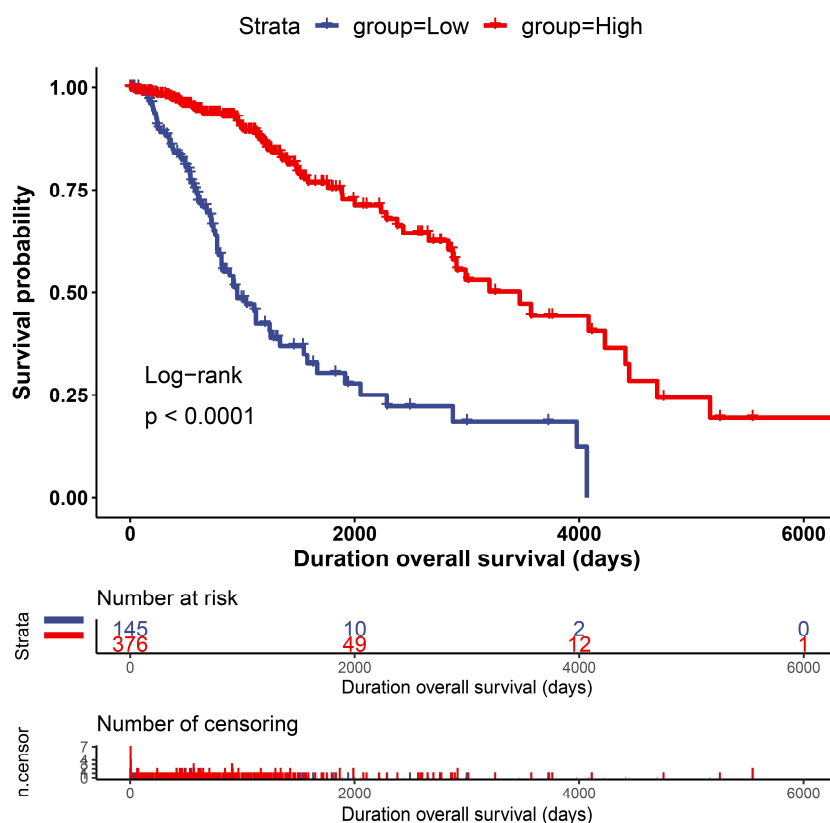


Figura 32. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em LGG.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID5, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hiper expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

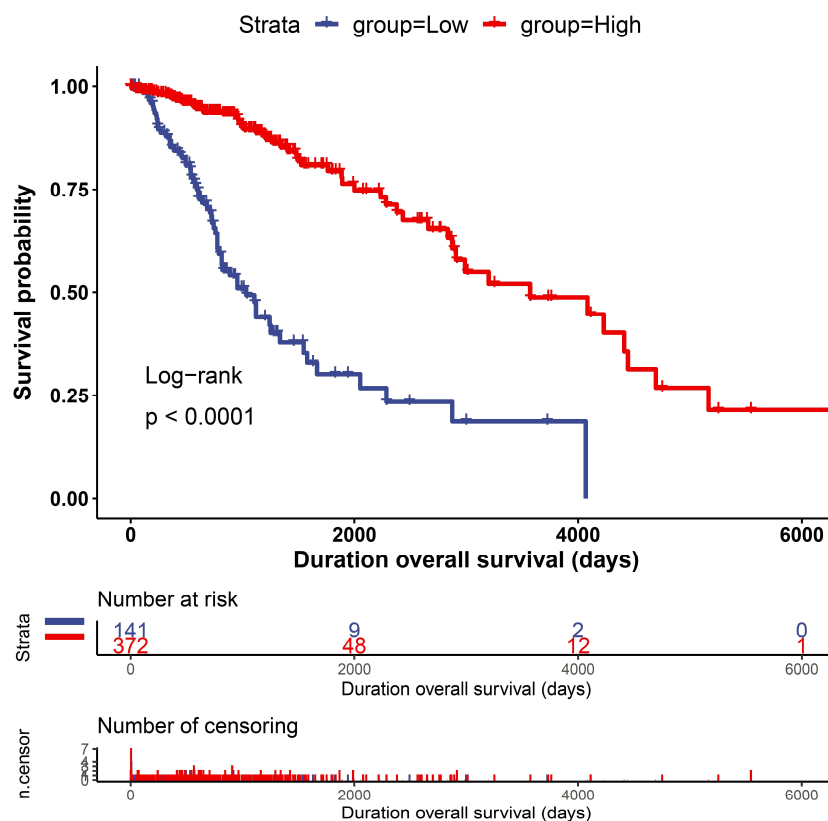


Figura 33. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em LGG.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID5, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hiper expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

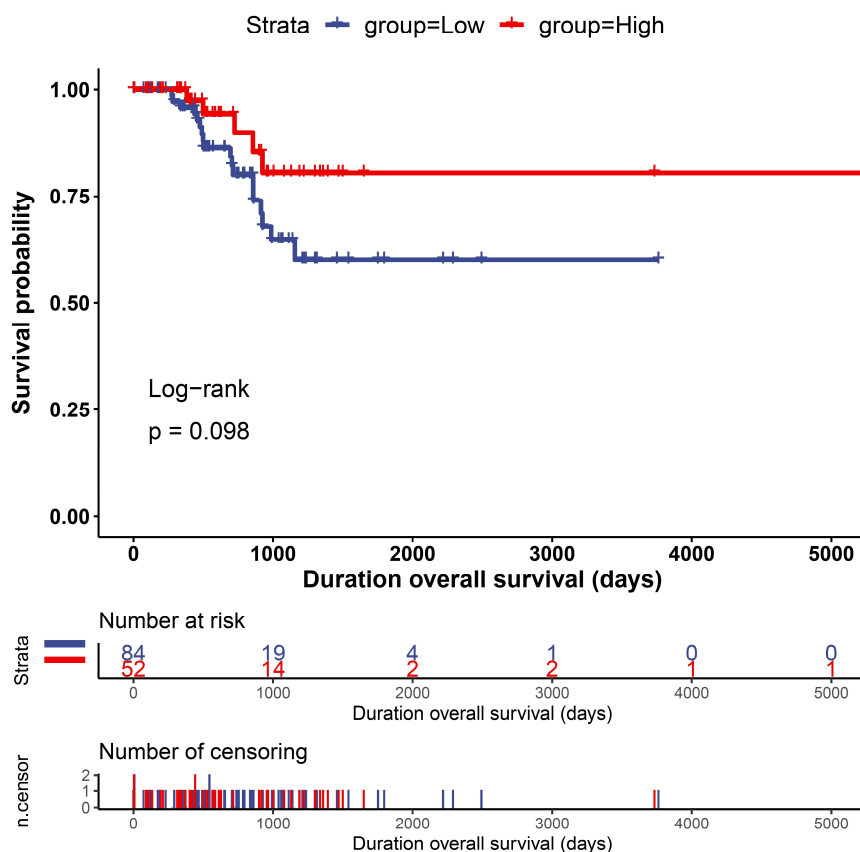


Figura 34. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença (DFI) em LGG.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID5, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A expressão da assinatura não teve significância no valor de fator prognóstico.

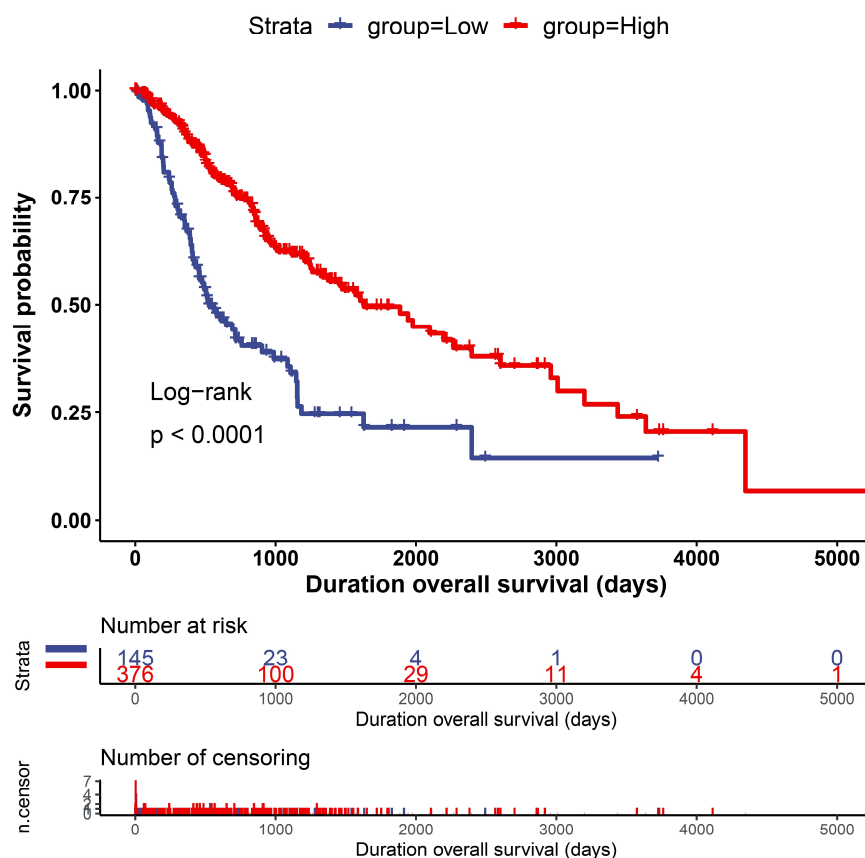


Figura 35. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em LGG.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID5, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hiper expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

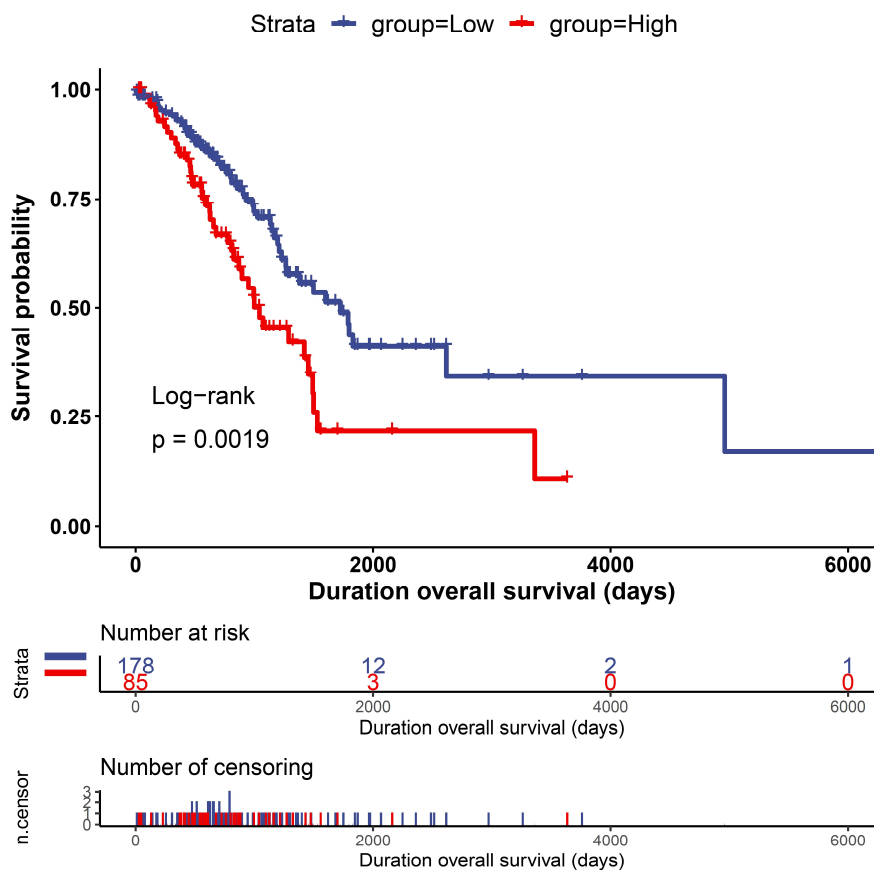


Figura 36. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em LUAD para mulheres.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID6, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

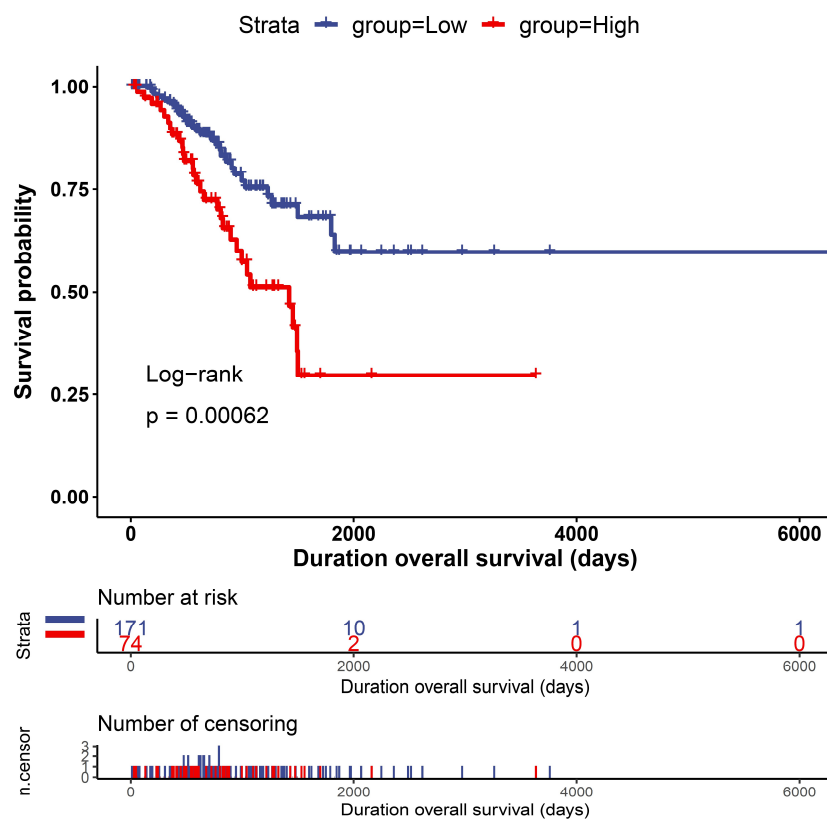


Figura 37. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em LUAD para mulheres.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID6, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

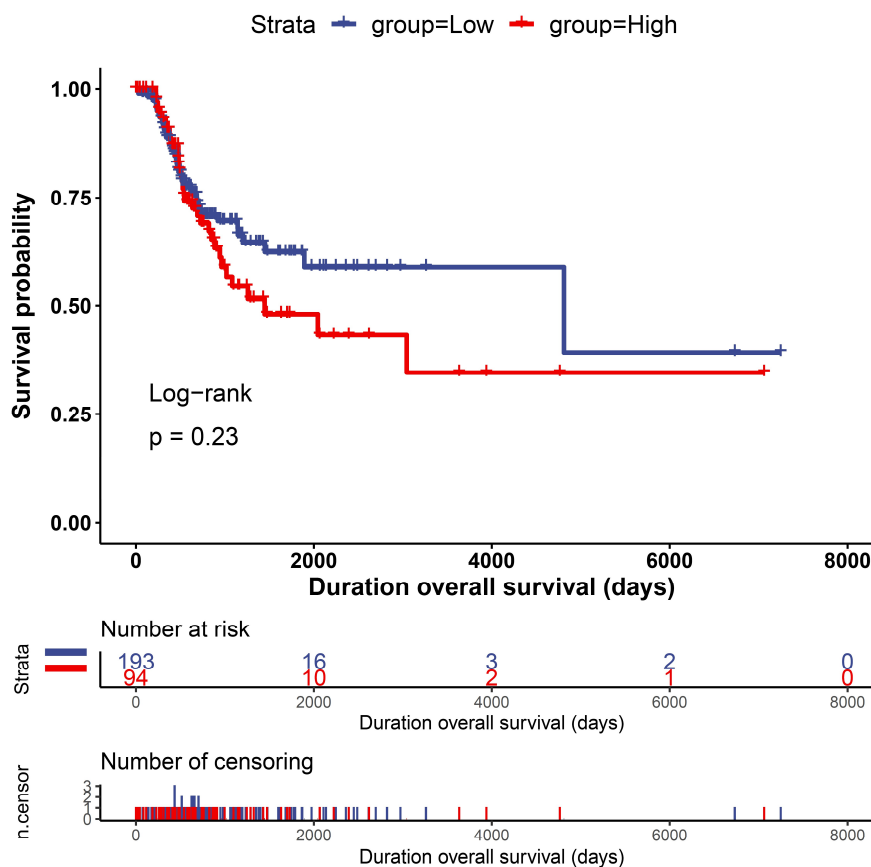


Figura 38. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença (DFI) em LUAD.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID6, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A expressão da assinatura não teve significância no valor de fator prognóstico.

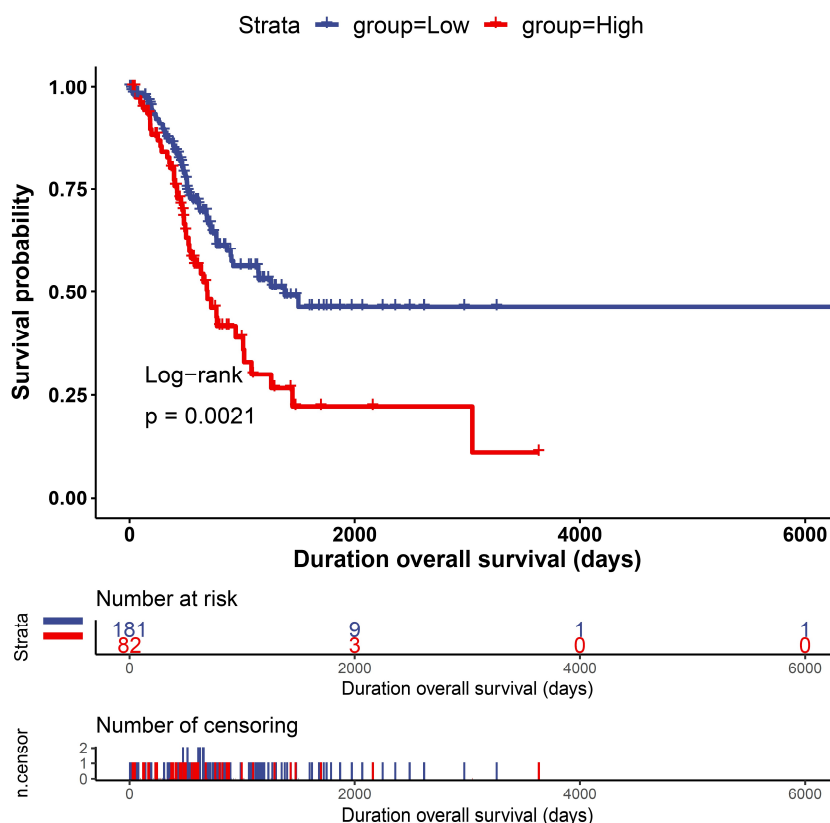


Figura 39. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em LUAD para mulheres.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID6, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

Em melanoma cutâneo - SKCM, notamos que o grupo de pacientes com menor expressão da assinatura ID7 foram associados a uma maior OS em mulheres (Figura 38; Tabela S86-S88). Em DSS e PFI, o grupo de pacientes com menor expressão dessa assinatura foram associados a uma maior sobrevivência em homens (Log-rank $p < 0.05$) (Figura 39-40; Tabela S89-S94). Para a categoria DFI não houve dados suficientes ($n \leq 10$ amostras) sobre a sobrevivência dos grupos de pacientes, não sendo possível estimar os valores prognósticos de sobrevivência.

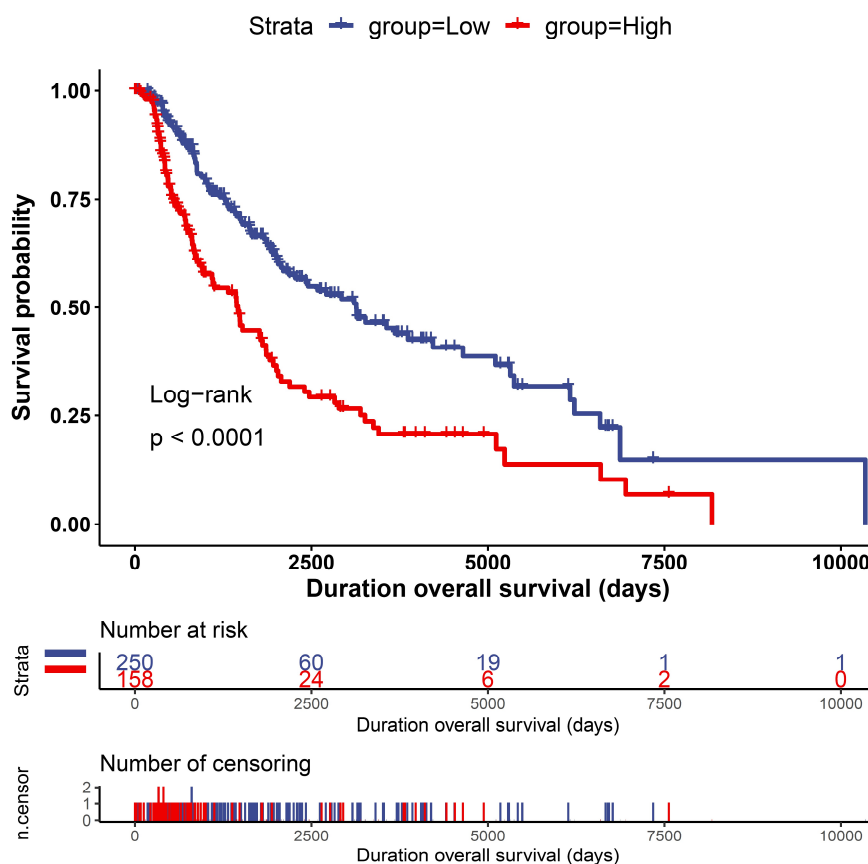


Figura 40. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em SKCM para mulheres.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID7, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

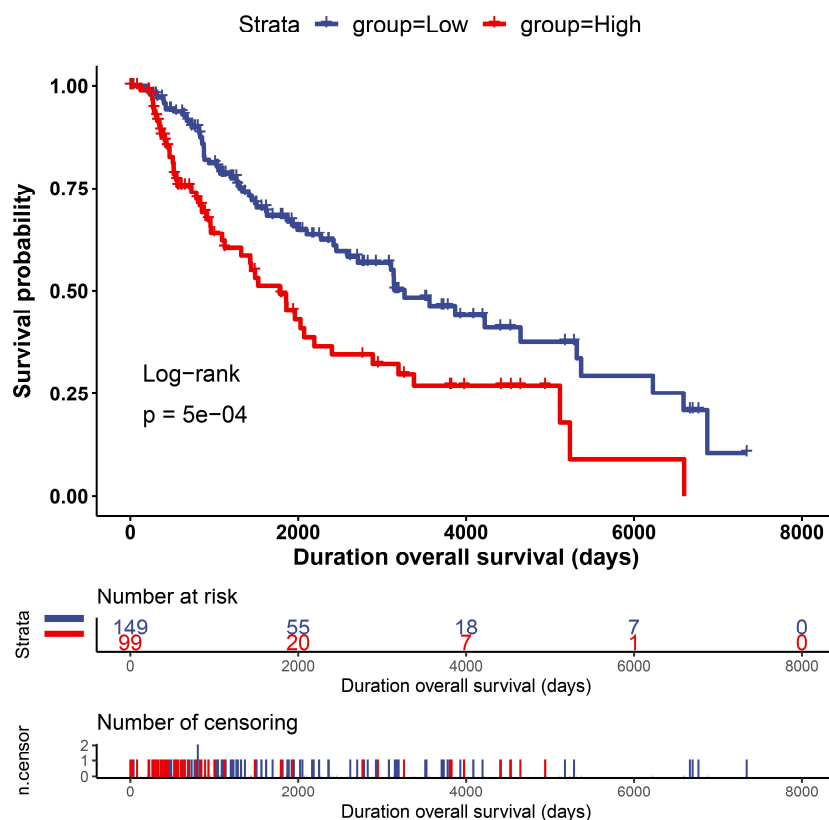


Figura 41. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em SKCM para homens.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID7, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

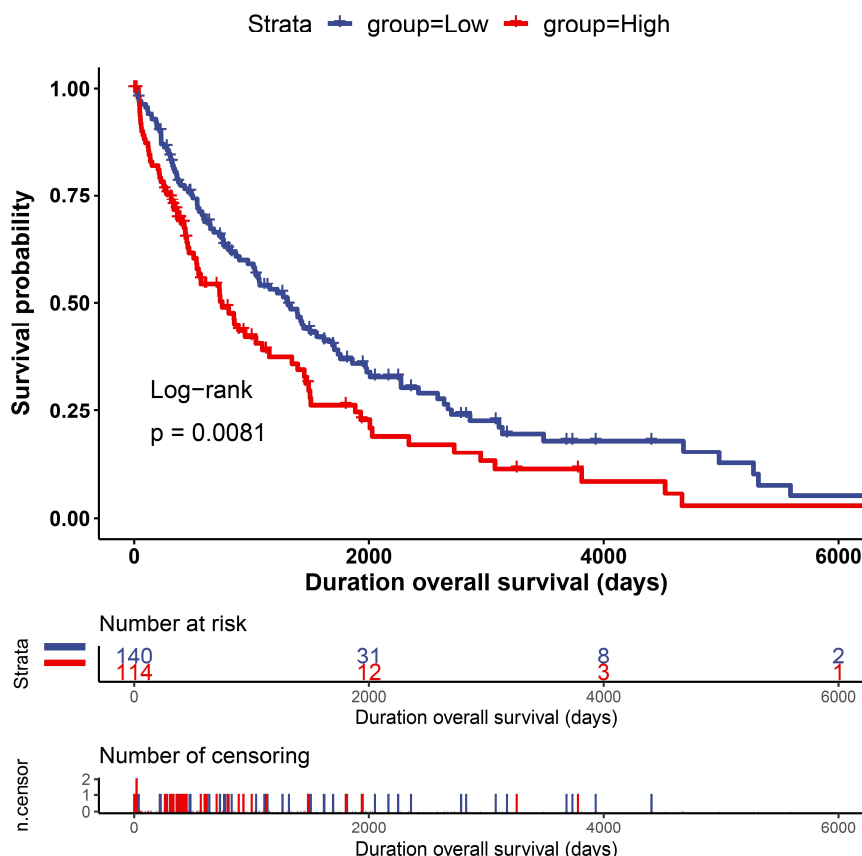


Figura 42. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em SKCM para homens.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID7, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expresso) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

No tecido de melanoma uveal – UVM, o grupo de pacientes com menor expressão da assinatura ID8 foi associado a uma maior sobrevivência em duas métricas de desfecho (OS, DSS) para homens e mulheres (Log-rank $p = 0.0001$) (Figura 41-42; Tabela S95-S100). Para a categoria DFI não houve dados suficientes ($n \leq 10$ amostras) sobre a sobrevivência dos grupos de pacientes, não sendo possível estimar os valores prognósticos de sobrevivência. Em PFI, o grupo de pacientes com menor expressão dessa assinatura associou-se com maior sobrevivência em homens (Log-rank $p = 0.0001$) (Figuras 43; Tabelas S101 – S103). Para a assinatura ID9, o grupo de pacientes com maior expressão foi associado a melhor prognóstico de sobrevivência aos homens em duas métricas de desfecho (OS e DSS; Log-rank $p \leq 0.0001$) (Figura 44 e 45; Tabela S104-S109).

A categoria DFI não apresentou dados suficientes ($n \leq 10$ amostras) sobre a sobrevivência dos grupos de pacientes, não sendo possível estimar os valores prognósticos deles. Quanto a métrica de desfecho PFI, o grupo de pacientes com maior expressão dessa assinatura foi associado a maior sobrevivência em homens (Log-rank $p = 0.0001$) (Figura 46; Tabelas S110 - S112).

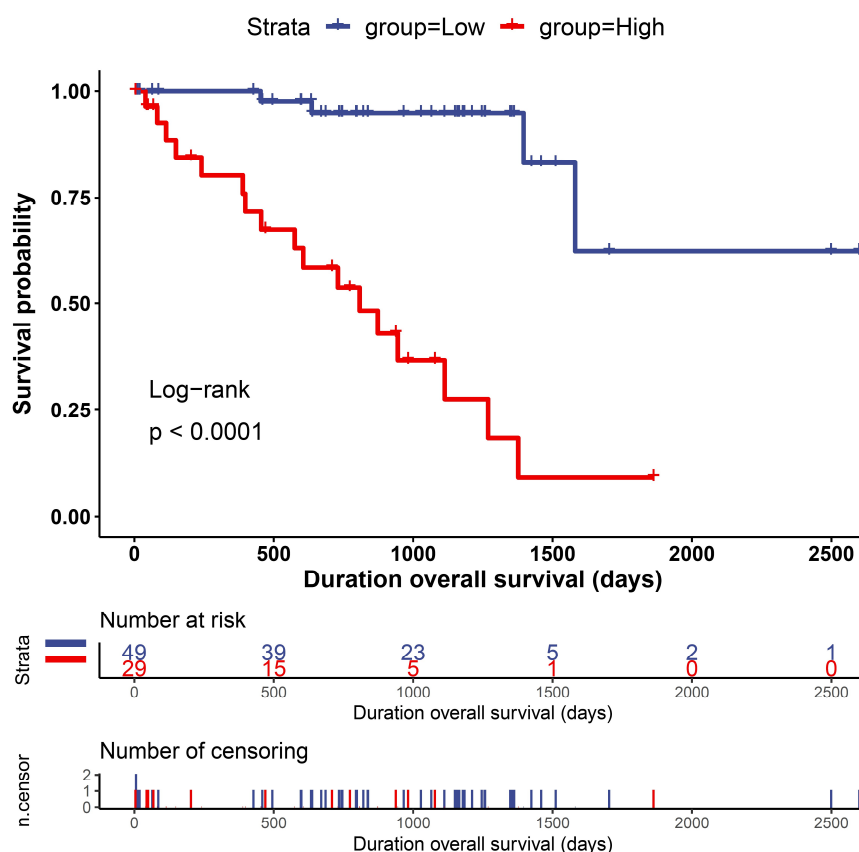


Figura 43. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em UVM.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID8, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

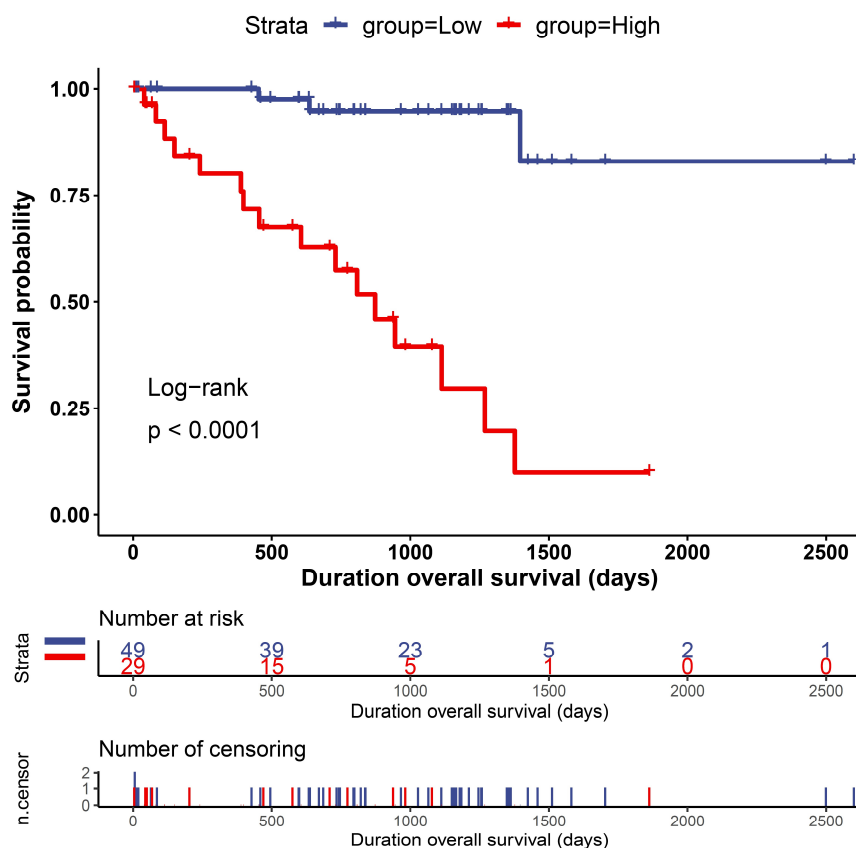


Figura 44. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em UVM.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID8, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

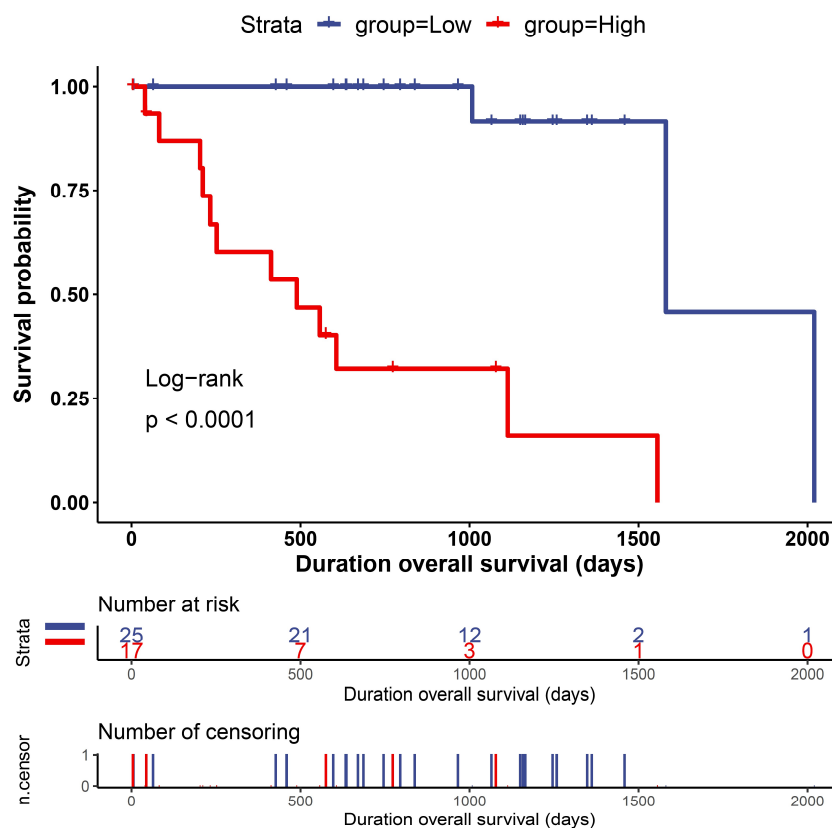


Figura 45. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em UVM para homens.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID8, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hipo expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

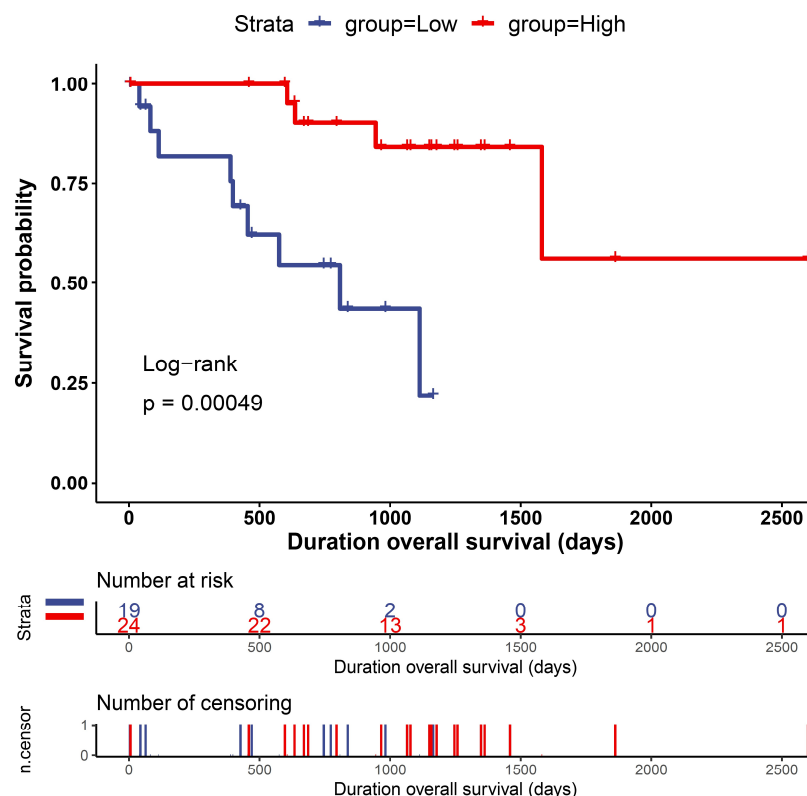


Figura 46. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência geral (OS) em UVM para homens.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID9, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A superexpressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

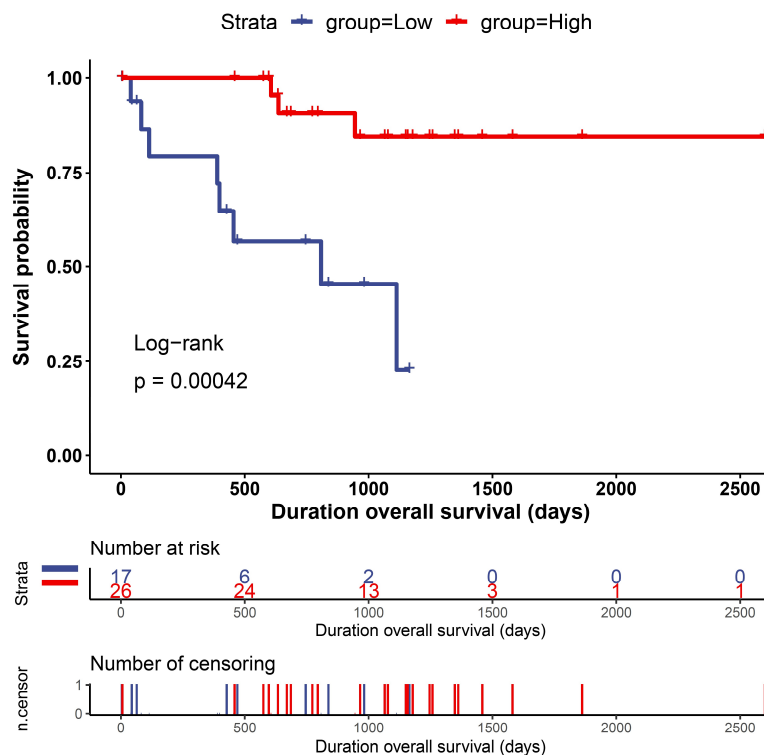


Figura 47. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de eventos (DSS) em UVM para homens.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID9, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipoeexpressos) e grupos de expressão alta (vermelho – regulado positivamente). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A superexpressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

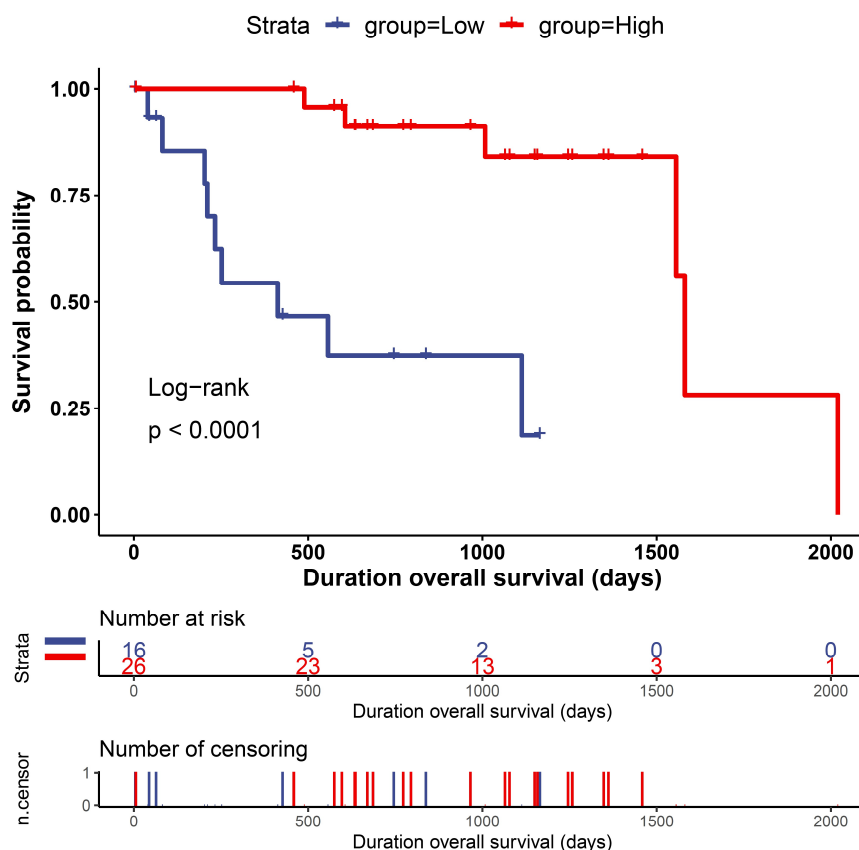


Figura 48. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de progressão (PFI) em UVM para homens.

As curvas denotam a contribuição da assinatura gênica de ID9, para o resultado em pacientes do nível baixo (azul – hipo expressos) e grupos de expressão alta (vermelho – hiper expressos). O número de censura refere-se aos pacientes que não sofreram o desfecho de interesse durante o período de estudo especificado. A hiper expressão da assinatura tem um valor de fator prognóstico mais significativo.

5.5 Associação Entre os Perfis Moleculares dos Genes OXPHOS e o Risco ou Efeito Protetor em Diferentes Cânceres

Analizamos os níveis de expressão de mRNA dos genes OXPHOS em relação a sobrevida geral (OS) em 33 tipos de câncer. Para esta análise utilizamos o aplicativo autônomo UCSCXenaShiny. Nessa análise identificamos oito assinaturas (ID10 a ID17, Table S114), variando de 28 a 69 componentes, com correlação positiva ou negativa em oito tipos de câncer (KIRC, KIRP, KICH, LAML, LIHC, SKCM, OV e UVM) (Figura 47). Na análise gene a gene foram observados cento e vinte e sete genes com associação com efeito protetor (Hazard ratio variando -0.03 a -3.42. $p_value \leq 0.04$) ou de risco (Hazard ratio variando -0.03 a -3.42. $p_value \leq 0.04$) em trinta e um tipos de cânceres (Figura 47; Tabela S113). Observamos três assinaturas gênicas nessa análise, variando de 39 a 50 componentes (Tabela S113), com perfil de expressão associado ao efeito protetor em três cânceres, KIRP, KIRC e OV (Hazard ratio variando -0.006 a -0.06; $p_value \leq 0$). Do mesmo modo, observamos cinco assinaturas, variando de 28 a 69 componentes, com perfil de expressão associado ao efeito de risco em cinco cânceres KICH, LAML, LIHC, SKCM e UVM (Hazard ratio variando 0.11 a 0.01; $p_value \leq 0$).

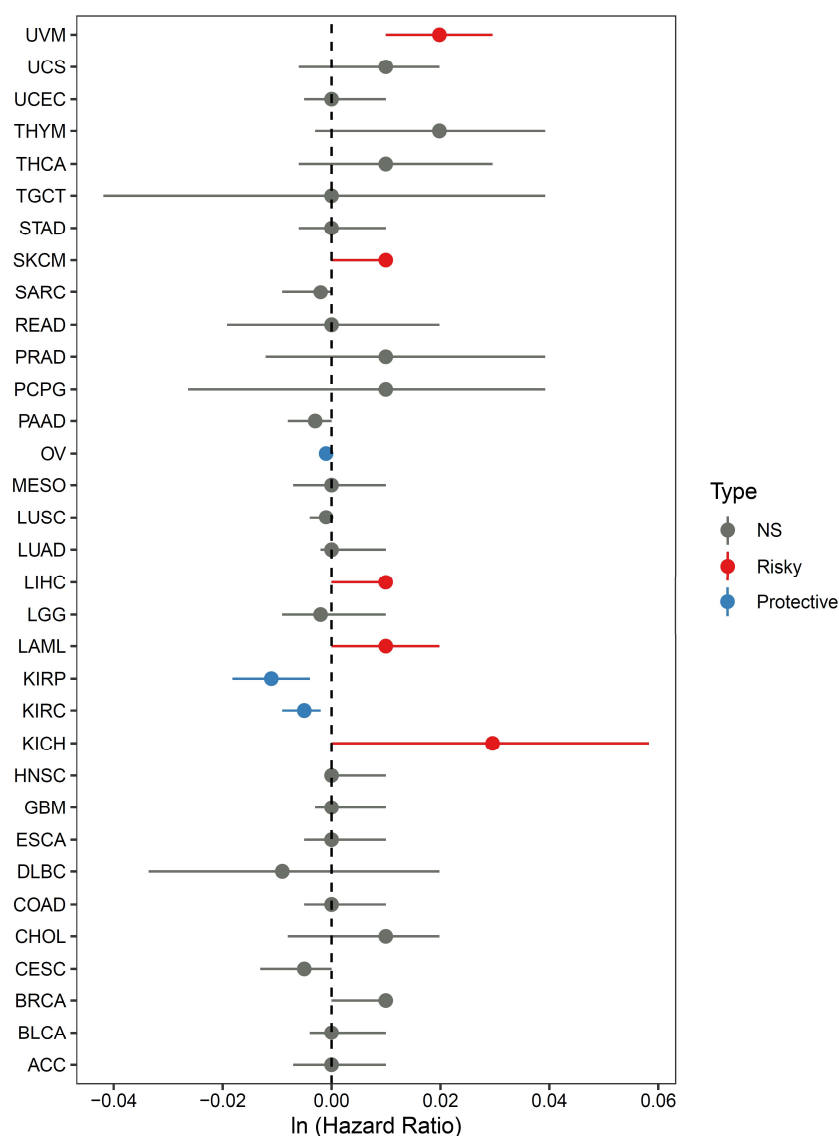


Figura 49. Boxplot representativo da associação entre os perfis moleculares das assinaturas ID10 a ID17 e os efeitos de risco ou efeito protetor em diferentes cânceres.

Análise do modelo de Cox, com base na taxa de risco, para os genes OXPHOS em KIRC, KIRP e OV (p-valor < 3.10E-10) com efeito protetor (azul), e um efeito de risco (vermelho) em KICH, LAML, SKCM e UVM (p-valor < 6.46E-06).

5.6 Correlação Entre o Perfil Molecular das Assinaturas dos Genes OXPHOS com Infiltrados Imunes

Estimamos os graus de associação entre os níveis de expressão de mRNA dos genes OXPHOS e os perfis de expressão molecular indicativos de infiltrados de células imunes em 33 tipos de câncer. Identificamos 27 assinaturas gênicas, variando de 3 a 70 componentes (ID18 a ID44, Tabela S114) com correlação

positiva ou negativa para 32 tipos de cânceres (ACC, BLCA, BRCA, CESC, CHOL, COAD, DLBC, ESCA, GBM, HNSC, KICH, KIRC, KIRP, LGG, LIHC, LUAD, LUSC, MESO, OV, PAAD, PCPG, PRAD, READ, SARC, SKCM, STAD, TGCT, THCA, THYM, UCEC, UCSC, UVM; Rho variando 0.81 a -0.064, $p_value \leq 0,05$). Dessas, 18 assinaturas (ID 22-35, 39-43) apresentaram uma correlação positiva para diferentes células imunes (Neutrófilos, células mieloides dendríticas, macrófagos, células T CD4+ e CD8+, células B), com as assinaturas variando de 3 a 36 componentes (Rho variando de 0.064 a 0.81; $p_value \leq 0,05$) para os 32 tipos de cânceres. A assinatura com maior número de componentes ocorreu em PRAD (n=36) com correlação positiva para células B, neutrófilos, células mielóide dendrítica e células T CD8+ (Figura 48; Tabela S114).

Do mesmo modo, identificamos 09 assinaturas (ID 18-21, 32, 36-38, 44) com correlação negativa para diferentes células imunes (Neutrófilos, células mieloides dendríticas, macrófagos, células T CD4+ e CD8+, células B), com as assinaturas variando de 3 a 70 componentes (Rho variando -0.06 a -0.74; $p_value \leq 0,05$). A assinatura com maior número de componentes (n=70) ocorreu em 32 tipos de câncer (ACC, BLCA, BRCA, CESC, CHOL, COAD, DLBC, ESCA, GBM, HNSC, KICH, KIRC, KIRP, LGG, LIHC, LUAD, LUSC, MESO, OV, PAAD, PCPG, PRAD, READ, SARC, SKCM, STAD, TGCT, THCA, THYM, UCEC, UCS, UVM) (Figura 49; Tabela S114). Em DLBC, essa assinatura mostrou-se positivamente associada a neutrófilos, células mielóide dendríticas e células T CD8+ (Rho variando de -0.34 a -0.54; $p_value \leq 0,05$). Em THCA, essa assinatura mostrou-se associada positivamente a neutrófilos, células mielóide dendríticas e células B (Rho variando de -0.25 a -0.74; $p_value \leq 0$) (Figura 46; Tabela S115).

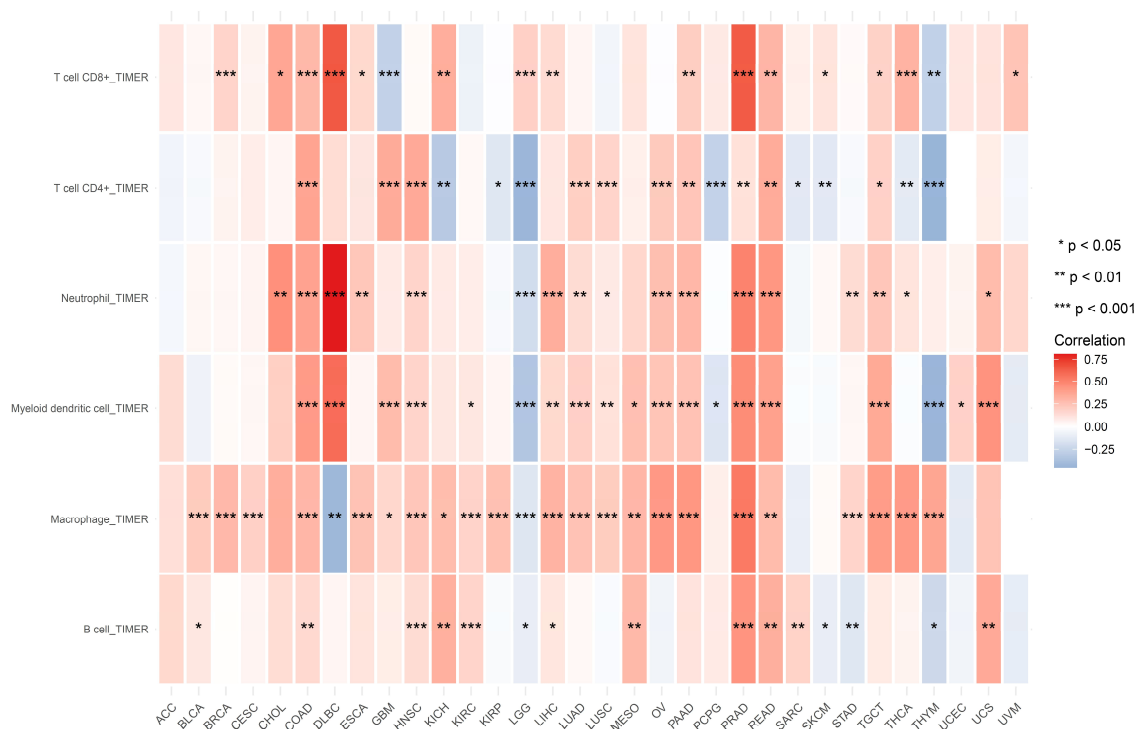


Figura 50. Mapa de calor representativo das correlações positivas entre os perfis de expressão das assinaturas ID22 a ID35, ID39 a ID43 e infiltrados de células imunes.

A escala do mapa de calor vermelho-azul mostra os níveis de significância (***, **, *) dos coeficientes de correlação de Spearman. Em diferentes cânceres as assinaturas estavam positivamente correlacionadas com célula dendrítica mieloide, neutrófilo, célula T cd8+, macrófago, célula B, célula T cd4+ (Rho variando 0.50 a 0.81, $p < 0$).

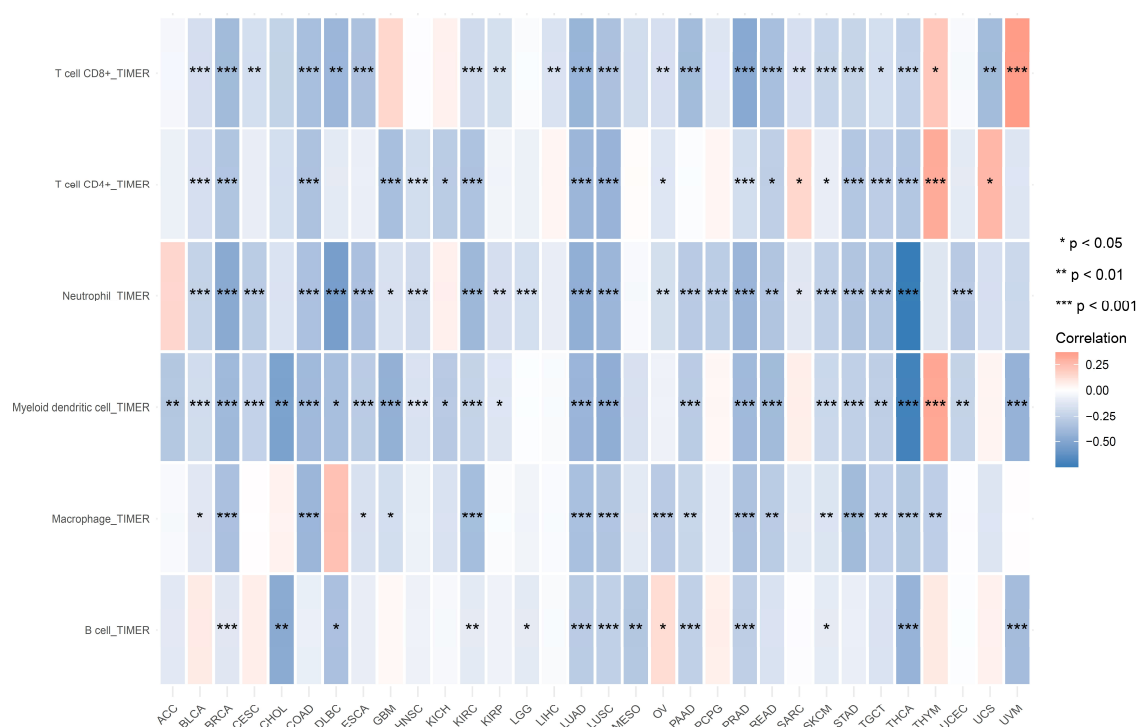


Figura 51. Mapa de calor representativo das correlações negativas entre os perfis de expressão das assinaturas ID18 a ID21, ID32, ID36 a ID38, ID44 e infiltrados de células imunes. A escala do mapa de calor vermelho-azul mostra os níveis de significância (***, **, *) dos coeficientes de correlação de Spearman. Em diferentes cânceres as assinaturas estavam positivamente correlacionadas com célula dendrítica mieloide, neutrófilo, célula T cd8+, macrófago, célula B, célula T cd4+ (Rho variando -0.7 a -0.50, $p < 0$).

5.7 Correlação Entre o Perfil Molecular das Assinaturas dos Genes OXPHOS e o Potencial Estaminal

Aqui investigamos a correlação entre o perfil molecular de genes OXPHOS, utilizando dados de expressão mRNA, e o potencial estaminal em 33 tipos de câncer (Tabela S3), visando identificar correlações positivas ou negativas para as assinaturas gênicas. Foram identificadas 14 assinaturas gênicas (ID45 a ID58, Tabela S115) com correlação positiva ou negativa ao potencial estaminal para vinte tipos de câncer (BLCA, BRCA, CESC, COAD, DLBC, ESCA, HNSC, KICH, KIRC, LUAD, LUSC, MESO, PAAD, PRAD, READ, SARC, STAD, TGCT, THYM, UCEC), onde as assinaturas variaram de 3 a 35 componentes (Rho variando de 0.83 a -0.78; $p_value \leq 8.70E-05$) (Figuras 50 e 51;). Identificamos 10 diferentes assinaturas (ID 45-49, 51, 53-56) com correlação positiva ao potencial estaminal em dezessete

tipos de câncer (BLCA, BRCA, CESC, DLBC, ESCA, HNSC, KICH, KIRC, LUAD, LUSC, MESO, PRAD, SARC, STAD, TGCT, THYM, UCEC), com as assinaturas variando de 3 a 35 componentes (Rho variando de 0.50 a 0.83; $p_value \leq 8.70E-05$). Da mesma forma, identificamos 4 diferentes assinaturas (ID 50, 52, 57, 58) com correlação negativa ao potencial estaminal para dezesseis tipos de câncer (BLCA, BRCA, CESC, COAD, DLBC, HNSC, KICH, LUAD, LUSC, PAAD, PRAD, READ, STAD, TGCT, THYM, UCEC), com as assinaturas variando de 3 a 8 componentes (Rho variando de -0.50 a -0.78; $p_value \leq 5.35E-05$).

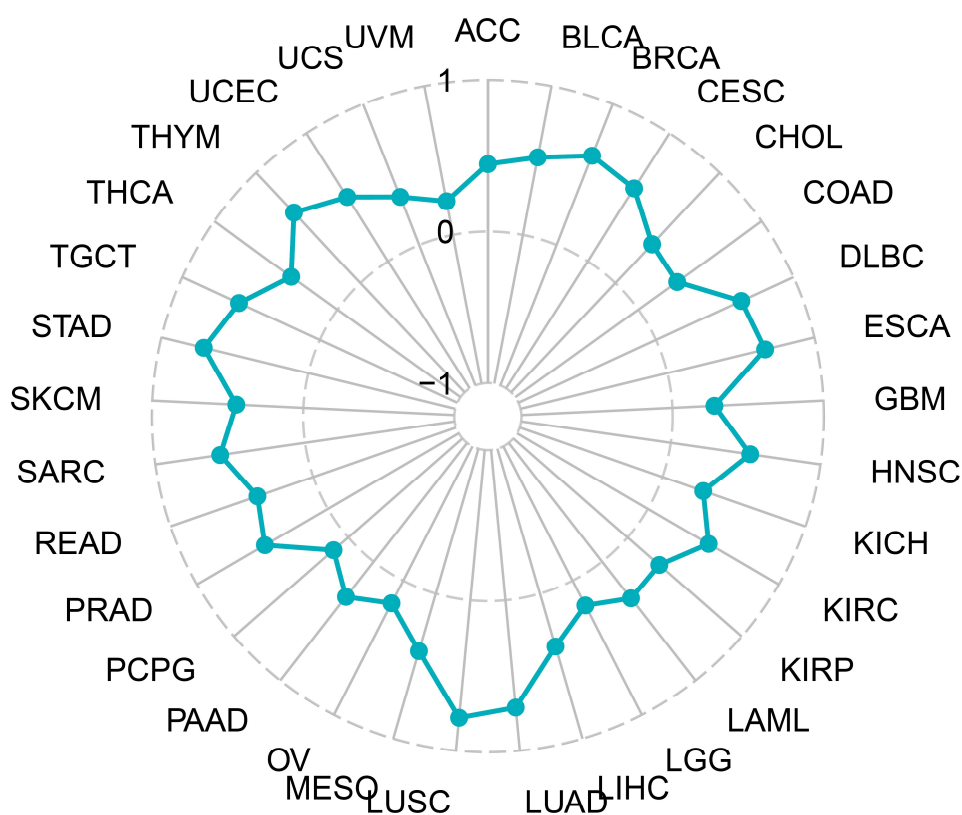


Figura 52. Gráfico de radar representativo para a correlação entre o perfil molecular das assinaturas ID45 a ID49, ID51, ID53 a ID56 e o potencial estaminal com coeficientes de correlação positiva.

Correlação entre as assinaturas gênicas de 8 a 35 componentes em 33 tipos de câncer. É mostrada a distribuição da amplitude dos coeficientes de correlação de Spearman, onde a associação pode ser positiva (+1), negativa (-1) ou neutra (0).

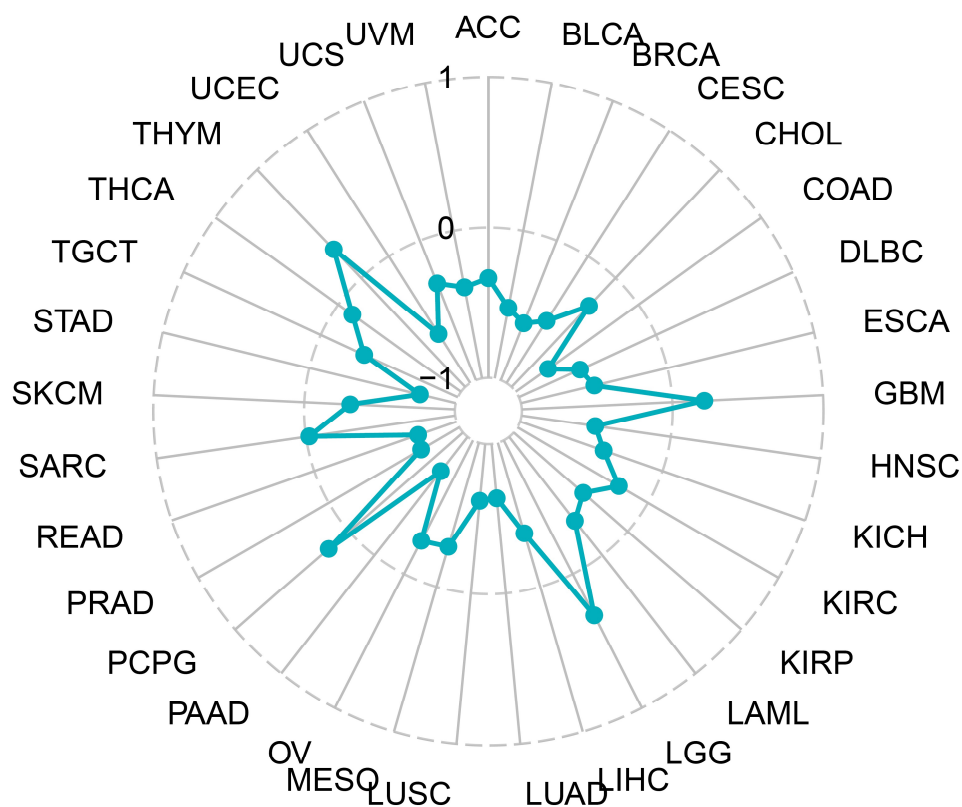


Figura 53. Gráfico de radar representativo para a correlação entre o perfil molecular das assinaturas ID50, ID52, ID57, ID58 e o potencial estaminal com coeficientes de correlação negativa.

Correlação negativa entre as assinaturas gênicas de 3 a 8 componentes em 33 tipos de câncer. É mostrada a distribuição da amplitude dos coeficientes de correlação de Spearman, onde a associação pode ser positiva (+1), negativa (-1) ou neutra (0).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, determinamos o valor prognóstico de assinaturas de expressão diferencial dos genes OXPHOS em câncer. O perfil aditivo de expressão diferencial das assinaturas (ID1 a ID9) foi estimado em diferentes métricas de desfecho de sobrevivência (OS, DSS, DFI e PFI), possuindo potencial fator prognóstico associado a sobrevivência para os grupos de pacientes analisados em KIRC, KIRC, LGG, LUAD, SKCM e UVM. As assinaturas gênicas ID2, ID3, ID5, ID9 mostraram-se correlacionadas a um pior prognóstico para o grupo de pacientes com hipo expressão em três das quatro métricas de desfecho de sobrevivência (OS, DSS e PFI) em KIRC, KIRP, LGG e UVM. Quanto às assinaturas gênicas ID1, ID4, ID6, ID7 e ID8, essas correlacionaram com pior prognóstico para o grupo de

pacientes com hiper expressão em três das quatro métricas de desfecho de sobrevivência (OS, DSS e PFI) em KIRC, LGG, LUAD, SKCM e UVM. Os perfis de expressão das assinaturas gênicas ID1 a ID9 associadas com sobrevivência geral também foram comparados entre amostras saudáveis versus com tumor. As assinaturas ID1 e ID2 mostraram um hiper expressão associada a amostras saudáveis em tecido de rim, já as assinaturas ID4, ID5, ID6 e ID8 demonstraram uma hiper expressão associada as amostras de tumor para tecidos de cérebro, pulmão e pele.

Também identificamos associações dependentes do sexo biológico entre a expressão gênica das assinaturas do sistema OXPHOS e sobrevivência dos pacientes. As assinaturas ID1 a ID9 exibiram diferenças na expressão associadas ao sexo biológico, em diferentes métricas de desfecho de sobrevivência. Em KIRC, o grupo de pacientes do sexo masculino que exibiu os hipo expressão da assinatura ID3 foi associado a um melhor prognóstico de sobrevida em duas métricas de desfecho de sobrevivência DFI e PFI, demonstrando um viés masculino. Em LGG, o grupo de pacientes do sexo masculino que exibiu hiper expressão da assinatura ID4 foram associados a um pior prognóstico para a métrica de desfecho PFI, demonstrando um viés feminino. Para LUAD, a sobrevivência em três métricas de desfecho de sobrevivência (OS, DSS e PFI) foi menor para o grupo de pacientes do sexo feminino com hiper expressão da assinatura ID6, demonstrando um viés sexual feminino. Em SKCM, o grupo de pacientes do sexo masculino que exibiu hipo expressão da assinatura ID7 foi associado a uma melhor sobrevida em duas métricas de desfecho (DSS e PFI), demonstrando um viés sexual masculino. Para UVM, o grupo de pacientes do sexo masculino que exibiu maior expressão da assinatura ID8 foi associado a uma menor sobrevivência para a métrica de desfecho PFI, enquanto o grupo de pacientes do sexo masculino que exibiu hipo expressão da assinatura ID9 foi associado a uma menor sobrevivência em duas outras métricas de desfecho (OS e DSS), demonstrando um viés sexual masculino em esse tipo de câncer.

Também observamos a desregulação diferencial da transcrição dos genes do sistema OXPHOS em 33 tipos de câncer quando comparada com tecidos não tumorais. Uma hipoexpressão ocorreu em treze genes em câncer de cérebro, onze genes em leucemia, quatro genes em câncer de pulmão, sete genes em câncer de pele, cinco genes em câncer de testículo. Uma hiper expressão ocorreu em

quarenta e cinco genes em câncer de ovário, trinta e cinco genes em câncer de útero, dezenove genes em câncer de testículo, doze genes em câncer de pele, quatro genes em leucemia, quatro genes em câncer de pulmão e um gene em câncer de cérebro. Os genes do sistema OXPHOS também constituíram assinaturas (ID10 a ID17) com perfil de expressão associadas ao efeito protetor ou de risco. As assinaturas ID10, ID11, ID16 foram associadas a um efeito protetor em KIRC, KIRP e OV. As demais assinaturas, ID12, ID13, ID14, ID15 e ID17, foram associadas a um efeito de risco em KICH, LAML, LIHC, SKCM e UVM.

As assinaturas ID18 a ID58 foram correlacionadas com desdiferença oncogênica. Identificamos correlações positivas/negativas com diversos índices de infiltrados de células imunes e o potencial estaminal em diversos cânceres. A assinatura com maior número de componentes (ID22) ocorreu em PRAD e exibiu correlação positiva com infiltrados de células B. A assinatura com maior número de componentes com correlação negativa (ID36) para neutrófilos e células dendríticas mieloides foi observada em vinte e três tipos de câncer. Também identificamos correlações positivas entre as assinaturas ID45-ID49, ID51, ID53-ID56 e o potencial estaminal em dezessete tipos de câncer (BLCA, BRCA, CESC, DLBC, ESCA, HNSC, KICH, KIRC, LUAD, LUSC, MESO, PRAD, SARC, STAD, TGCT, THYM, UCEC), e correlações negativas entre as assinaturas ID50, ID52, ID57 e ID58 em dezesseis tipos de câncer (BLCA, BRCA, CESC, COAD, DLBC, HNSC, KICH, LUAD, LUSC, PAAD, PRAD, READ, STAD, TGCT, THYM, UCEC). Sendo assim, a correlação entre as assinaturas gênicas diferencialmente expressas, os resultados de sobrevivência, infiltrados de células imunes e potencial estaminal sugerem que as assinaturas relatadas são proxies de desdiferenciação oncogênica.

A desregulação da expressão dos genes OXPHOX em câncer foi observada por Reznik e colaboradores em uma análise gene-a-gene, e não de assinaturas como no presente estudo, dos diferentes complexos da mitocôndria (I-V), incluindo 13 dos genes do sistema OXPHOS (*MT-ND2*, *MT-ND1*, *MT-ATP8*, *MT-ATP6*, *MT-CO2*, *MT-CYB*, *MT-CO3*, *MT-ND4L*, *MT-ND4*, *MT-ND3*, *MT-CO1*, *MT-ND5*, *MT-ND6*) aqui analisados. O estudo de Reznik demonstrou que a expressão é significativamente suprimida em câncer de mama, cólon, rim e fígado (REZNIK *et al.*, 2017). Nós identificamos treze DEG do sistema OXPHOS hipoexpressos em câncer de cérebro, onze genes em leucemia, quatro genes em câncer de pulmão, sete genes em câncer de pele, cinco genes em câncer de

testículo. Todavia, identificamos assinaturas correlacionadas com o valor prognóstico de sobrevida, infiltrados imunes e os índices de potencial estaminal em diversos tipos de câncer. Tais resultados só foram possíveis pela inclusão do critério de seleção para magnitudes de valores de logFC de expressão diferencial ($\geq 1,5$ ou $\leq -1,5$) com valores de FDR em todo o genoma $\leq 5e-5$.

A combinação de múltiplos genes formando uma assinatura tem sido usada para aumentar o poder preditivo de desfecho em câncer de próstata, pulmão e rins (JONES *et al.*, 2005; BIBIKOVA *et al.*, 2007; SANCHEZ-PALENCIA *et al.*, 2011). Aqui demonstramos que as assinaturas ID1 e ID2, para KIRC, exibiram diferenças de expressão em amostras saudáveis versus com tumor. Entretanto, exclusivamente em KIRP para a assinatura ID3 não foram observadas diferenças na expressão entre amostra saudável e com tumor. De acordo com os dados de Sanchez-Palencia, foram identificadas assinaturas gênicas não relacionadas aos genes OXPHOS diferencialmente desreguladas em câncer de pulmão em relação às amostras saudáveis, onde foram hiper expressas ($p_value < 0.05$) (SANCHEZ-PALENCIA *et al.*, 2011). Contrário ao observado por Sanchez-Palencia, aqui notamos que em LUAD a assinatura ID4 exibiu maior perfil de expressão em amostras com tumor. Para as assinaturas ID4, ID6 e ID7 em LGG e SKCM foram encontradas associações de maior expressão em amostras saudáveis ou de tumor na literatura.

As análises sobre os perfis de expressão de assinaturas gênicas vêm sendo amplamente utilizadas em estudos de câncer, pois nesse cenário os perfis de expressão das assinaturas têm um potencial preditivo para resultados clínicos (NEVINS and POTTI, 2007; SOTIRIOU and PUSZTAI, 2009). Aqui identificamos as assinaturas ID1 e ID2 para KIRC e apenas uma assinatura ID3 para KIRP. A assinatura ID2 foi associada a melhores resultados de sobrevivência para OS, DSS e PFI no grupo de pacientes com alta expressão, porém a assinatura ID1 foi associada a melhores resultados para o grupo com baixa expressão para as diferentes métricas de desfecho de sobrevivência (OS, DSS, PFI). De acordo com a literatura, conjuntos gênicos que compõem uma assinatura, não estando associados aos genes OXPHOS, já foram significativamente associados à OS em KIRC para o grupo com baixa expressão (ZHAN *et al.*, 2015). Outra evidência pode ser encontrada nos achados por Jiang e colaboradores, que utilizaram assinaturas gênicas não associadas aos genes OXPHOS, mas sim relacionadas a

sobrevivência, onde essas tiveram melhor associação com sobrevida para o grupo com baixa expressão em KIRC (Log-rank $p \leq 0.01$) (JIANG *et al.*, 2020). Li e colaboradores identificaram uma assinatura gênica não relacionada ao OXPHOS correlacionou com OS em KIRC e em KIRP, com melhor resultado na sobrevivência geral (OS) para o grupo com baixa expressão em ambos os cânceres (Log-rank $p \leq 0.01$) (LI, F. *et al.*, 2020). Sun e colaboradores identificaram em KIRP uma assinatura de três genes reguladores da metilação do RNA, não relacionados aos genes OXPHOS, em carcinoma papilar de células renais em que o grupo de pacientes com baixa expressão foi associado a um pior prognóstico de sobrevivência (SUN *et al.*, 2020).

Xiao e colaboradores demonstram que assinaturas gênicas relacionadas a células do sistema imune como CD44 foram associadas a um melhor prognóstico para o grupo de pacientes com maior expressão em diferentes desfechos de sobrevivência (OS e DSS) para LGG (XIAO, Y. *et al.*, 2020). Aqui, observamos que a assinatura ID5 foi associada a um melhor valor prognóstico em OS, DSS e PFI para o grupo com alta expressão. Xiao e colaboradores demonstraram que em assinaturas de genes não associados aos genes OXPHOS em LGG, o grupo de pacientes com alta expressão teve pior prognóstico associado a sobrevivência (XIAO, K. *et al.*, 2020).

Outros estudos também já demonstraram um melhor prognóstico nos resultados de sobrevida associado ao grupo com baixa expressão utilizando assinaturas gênicas não relacionadas aos genes OXPHOS (CHEN *et al.*, 2021; GUO *et al.*, 2021). Em LUAD, observamos que a assinatura ID6 correlacionou-se com melhor prognóstico de sobrevida no grupo com baixa expressão em três métricas de desfecho de sobrevivência (OS, DSS e PFI). Li e colaboradores demonstraram que uso de uma assinatura gênica mesmo não associada aos genes OXPHOS pode servir como um fator de prognóstico em LUAD, de modo que o grupo de pacientes com baixa expressão tende a estar associado com maior OS (LI, Z. *et al.*, 2020). Yang e colaboradores também demonstraram que assinaturas gênicas associadas a resposta imune correlacionaram com melhor taxa na sobrevivência geral (OS; Log-rank $p \leq 0,001$) de pacientes para o grupo com baixa expressão em LUAD (YANG *et al.*, 2021). Entretanto, para as demais métricas de sobrevivência não foram encontradas associações para LGG e LUAD na literatura.

Seguindo para as assinaturas em SKCM (ID7) e UVM (ID8 e ID9), observamos um efeito semelhante as outras assinaturas, onde para as assinaturas ID7 e ID8 os grupos com baixa expressão exibiram melhor sobrevida e para a assinatura ID9 os grupos com alta expressão exibiram melhor sobrevida em diferentes métricas (OS, DSS e PFI). Ju e colaboradores utilizaram assinaturas gênicas, relacionadas a piroptose, como fator de predição de OS em SKCM, observando uma melhor taxa de sobrevivência associada ao grupo com baixa expressão (Log-rank $p \leq 0,001$) (JU *et al.*, 2021). Outros autores também observaram o mesmo efeito utilizando diferentes assinaturas gênicas não associadas aos genes OXPHOS, onde o grupo de pacientes com baixa expressão se associou com maior OS (ZHANG, Y. *et al.*, 2021).

Quanto às assinaturas em UVM, a assinatura ID9 correlacionou-se com um melhor prognóstico de sobrevida para o grupo de pacientes com baixa expressão. Tang e Cai identificaram assinaturas gênicas não relacionadas aos genes OXPHOS, mas relacionadas a OS e DSS em UVM, onde o grupo de pacientes com baixa expressão apresentou maior sobrevivência (TANG and CAI, 2021).

A identificação de assinaturas gênicas como fatores de risco é relevante no diagnóstico precoce dos pacientes e na oncologia de precisão em carcinoma hepatocelular, câncer de cólon e gliomas (LI, Z. *et al.*, 2020; LIU and LI, 2021; ZHAI *et al.*, 2021). Diante disso, buscamos identificar uma correlação entre os efeitos protetores ou de risco associados ao resultado de sobrevida para os genes do sistema OXPHOS em 33 tipos diferentes de câncer usando a coorte TCGA. Em relação ao efeito protetor associado ao desfecho de sobrevida neste estudo, encontramos três assinaturas ID10, ID11, ID16, com associação para efeito protetor em três cânceres, KIRP, KIRC e OV. Do mesmo modo, observamos cinco assinaturas ID12, ID13, ID14, ID15 e ID17 com associação para efeito de risco em cinco cânceres KICH, LAML, LIHC, SKCM e UVM.

De acordo com Zhang e colaboradores, uma associação de efeito protetor para assinaturas gênicas relacionadas com sistema imune foi observada em cânceres de KIRC, KIRP e OV (ZHANG *et al.*, 2020). Não foram encontradas outras associações na literatura para efeito protetor de assinaturas gênicas nesses cânceres. Entretanto, é possível observar que em outros cânceres como LGG, o uso de assinaturas gênicas, não relacionadas ao sistema OXPHOS, demonstrou tanto um efeito protetor quanto de risco (ZHANG *et al.*, 2019). Do mesmo modo,

Wang e colaboradores demonstraram evidências de associação das assinaturas gênicas, não relacionadas aos genes OXPHOS, com o efeito de risco em câncer de cérebro (WANG *et al.*, 2022). Aqui, observamos então um fator de efeito protetor ou de risco em diferentes cânceres para as assinaturas gênicas do sistema OXPHOS, de modo que essas associações ainda não possuem referências na literatura atualmente.

A associação entre os perfis de expressas em assinaturas genicas e infiltrados células imunes em câncer tem sido objeto de amplo estudo, pois as correlações fornecem indícios com implicações clínicas para o tratamento e prognóstico do câncer, quanto à agressividade e a desdiferenciação oncogênica (IGLESIA *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2020). Desse modo, utilizamos os genes sistema OXPHOS no contexto de assinatura gênica, buscando uma correlação com infiltrados de células imunes em 33 tipos de câncer da coorte TCGA. Alguns autores relatam evidências de que em PRAD foram observadas associações positivas das assinaturas gênicas relacionadas a N⁷-metilação da guanina e ao sistema imunológico, com infiltrados de neutrófilos, células Th1 e células T cd8⁺ (ZHANG, C. *et al.*, 2021; FEI and CHEN, 2022). Do mesmo modo, aqui observamos associações positivas da assinatura ID22 em PRAD para os mesmos tipos de infiltrados de célula imune.

No nosso estudo em DLBC, a assinatura ID36 mostrou uma correlação positiva para três tipos celulares diferentes, incluindo neutrófilos. Manfroi e colaboradores utilizaram assinaturas gênicas não relacionadas ao sistema OXPHOS para demonstrar uma correlação entre a maior proporção de neutrófilos e um pior prognóstico em DLBC (MANFROI *et al.*, 2018; MU *et al.*, 2018). Em outros estudos, também é possível observar assinaturas de linfócitos T associadas ao prognóstico de pacientes em DBLC, demonstrando a importância das assinaturas gênicas no prognostico e predição de sobrevivência em linfomas de células B agressivos (ANSELL *et al.*, 2001; KEANE *et al.*, 2013; KEANE *et al.*, 2015).

O uso de assinaturas gênicas para estudar células-tronco tumorais também tem sido muito útil para fornecer novos insights sobre potencial estaminal, possibilitando medir o grau de desdiferenciação oncogênica. Evidências de uma correlação entre assinaturas de potencial estaminal e resultado desfavorável para cânceres da coorte TCGA já foram reportadas na literatura (MALTA *et al.*, 2018). Da mesma forma, já foram demonstradas evidências de assinaturas gênicas não

relacionadas aos genes OXPHOS com associação negativa com o potencial estaminal em melanoma e carcinoma hepatocelular (CAI *et al.*, 2021; ZHANG, Y. *et al.*, 2021). Além disso, existem evidências de associação do potencial estaminal com cânceres como KIRC, mas não para KICH, correlacionando-se negativamente com infiltrados imunológicos (XIAO *et al.*, 2021). Aqui nesse estudo, demonstramos uma correlação negativa das assinaturas ID50, ID52, ID57 e ID58 com KICH, efeito não observado ainda na literatura. Além disso, outros estudos demonstraram o uso de assinaturas gênicas relacionadas ao potencial estaminal, mas não associadas aos genes OXPHOS, em cânceres como carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma ductal do pâncreas e câncer de endométrio, sendo utilizadas como um novo marcador de prognóstico para sobrevivência (HUANG *et al.*, 2021; ZHANG, Y. *et al.*, 2021; LUO *et al.*, 2022; YE *et al.*, 2022). Neste estudo, relatamos correlações positivas para as assinaturas ID45-ID49, ID51, ID53-ID56 e o potencial estaminal em diferentes cânceres.

7. CONCLUSÕES

Observamos que o câncer de cérebro regula negativamente treze genes do sistema OXPHOS, enquanto o câncer de ovário regula positivamente quarenta e cinco genes desse sistema. As assinaturas ID1 a ID9 diferencialmente expressas em câncer para diferentes métricas de desfecho de sobrevivência demonstraram um bom valor preditivo nas métricas de OS, DSS e PFI. Observamos correlações sexo biológico dependentes entre as assinaturas e sobrevivência para as diferentes métricas de desfecho (OS, DSS, PFI). As assinaturas ID3, ID4, ID7, ID8 e ID9 demonstraram um viés sexual masculino associado a sobrevivência em KIRC, SKCM e UVM. Entretanto, a assinatura ID6 demonstrou um viés sexual feminino, associado a sobrevivência em LUAD. Encontramos assinaturas ID10 a ID17 demonstrando uma associação protetora em câncer KIRC, KIRP e OV, enquanto as assinaturas ID12, ID13, ID14, ID15 e ID17 demonstraram uma associação de risco em KICH, LAML, LIHC, SKCM e UVM. Diferentes infiltrados de células imunes (células B, neutrófilos e células dendríticas mieloides) foram associados positivamente ou negativamente com as assinaturas ID22 e ID36. Identificamos também assinaturas associadas ao potencial estaminal com correlação positiva (ID45-ID49, ID51, ID53-ID56) para diferentes cânceres, mas também assinaturas (ID50, ID52, ID57 e ID58) com correlação negativa. A correlação entre as assinaturas gênicas diferencialmente expressas, as métricas de sobrevivência, infiltrados de células imunes e o potencial estaminal sugerem que as assinaturas relatadas aqui são proxies de desdiferenciação oncogênica.

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

Link de acesso para o Google drive
https://drive.google.com/drive/folders/1RcJqQFdWwo5HbxAXHeGLw2_Go6NWbfGh?usp=sharing

9. LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela S1. Genes do Sistema OXPHOS e sua Localização no Genoma Humano

Tabela S2. Tipos de Cânceres no TCGA

Tabela S3. Tecidos Primários Disponíveis pelo GTEX

Tabela S4. Genes do Sistema OXPHOS Diferencialmente Expressos em Amostras Saudável versus Tumor

Tabelas S5. Mapa de Calor das correlações entre os perfis de expressão dos genes OXPHOS e sobrevivência geral

Tabela S8. Perfil de Expressão das Assinatura do Genes OXPHOS hiper-regulados em KIRC

Tabela S9. Perfil de Expressão das Assinatura do Genes OXPHOS hipo regulados em KIRC

Tabela S10. Perfil de Expressão das Assinatura do Genes OXPHOS hiper-regulados em KIRP

Tabela S11. Perfil de expressão da assinatura dos genes OXPHOS hiper-regulados em LGG

Tabela S12. Perfil de expressão da assinatura dos genes OXPHOS hipo regulados em LGG

Tabela S13. Perfil de expressão da assinatura dos genes OXPHOS hiper-regulados em LUAD

Tabela S14. Perfil de expressão da assinatura dos genes OXPHOS hiper-regulados em SKCM

Tabela S15. Sobrevivência geral para Assinatura ID1 em KIRC

Tabela S16. Sobrevivência geral para Assinatura ID1 em KIRC para Mulheres

Tabela S17. Sobrevivência geral para Assinatura ID1 em KIRC para Homens

Tabela S18. Sobrevivência livre de eventos para Assinatura ID1 em KIRC

Tabela S19. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID1 em KIRC para Homens

Tabela S20. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID1 em KIRC para Mulheres

Tabela S21. Sobrevida livre de doença para Assinatura ID1 em KIRC

Tabela S22. Sobrevida livre de doença para Assinatura ID1 em KIRC para Mulheres

Tabela S23. Sobrevida livre de doença para Assinatura ID1 em KIRC para Homens

Tabela S24. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID1 em KIRC

Tabela S25. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID1 em KIRC para Homens

Tabela S26. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID1 em KIRC para Mulheres

Tabela S27. Sobrevida geral para Assinatura ID2 em KIRC

Tabela S28. Sobrevida geral para Assinatura ID2 em KIRC para Homens

Tabela S29. Sobrevida geral para Assinatura ID2 em KIRC para Mulheres

Tabela S30. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID2 em KIRC

Tabela S31. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID2 em KIRC para Homens

Tabela S32. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID2 em KIRC para Mulheres

Tabela S33. Sobrevida livre de doença para Assinatura ID2 em KIRC

Tabela S34. Sobrevida livre de doença para Assinatura ID2 em KIRC para Mulheres

Tabela S35. Sobrevida livre de doença para Assinatura ID2 em KIRC para Homens

Tabela S36. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID2 em KIRC

Tabela S37. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID2 em KIRC para Mulheres

Tabela S38. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID2 em KIRC para Homens

Tabela S39. Sobrevida geral para Assinatura ID3 em KIRP

Tabela S40. Sobrevida geral para Assinatura ID3 em KIRP para Homens

Tabela S41. Sobrevida geral para Assinatura ID3 em KIRP para Mulheres.

Tabela S42. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID3 em KIRP

Tabela S43. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID3 em KIRP para Homens

Tabela S44. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID3 em KIRP para Mulheres

Tabela S45. Sobrevida livre de doença para Assinatura ID3 em KIRP

Tabela S46. Sobrevida livre de doença para Assinatura ID3 em KIRP para Homens

Tabela S47. Sobrevida livre de doença para Assinatura ID3 em KIRP para Mulheres

Tabela S48. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID3 em KIRP

Tabela S49. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID3 em KIRP para Homens

Tabela S50. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID3 em KIRP para Mulheres

Tabela S51. Sobrevida geral para Assinatura ID4 em LGG

Tabela S52. Sobrevida geral para Assinatura ID4 em LGG para Homens

Tabela S53. Sobrevida geral para Assinatura ID4 em LGG para Mulheres

Tabela S54. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID4 em LGG

Tabela S55. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID4 em LGG para Homens

Tabela S56. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID4 em LGG para Mulheres

Tabela S57. Sobrevida livre de doença para Assinatura ID4 em LGG

Tabela S58. Sobrevida livre de doença para Assinatura ID4 em LGG para Homens

Tabela S59. Sobrevida livre de doença para Assinatura ID4 em LGG para Mulheres

Tabela S60. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID4 em LGG

Tabela S61. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID4 em LGG para Homens

Tabela S62. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID4 em LGG para Mulheres

Tabela S63. Sobrevivência geral para Assinatura ID5 em LGG

Tabela S64. Sobrevivência geral para Assinatura ID5 em LGG para Homens

Tabela S65. Sobrevivência geral para Assinatura ID5 em LGG para Mulheres.

Tabela S66. Sobrevivência livre de eventos para Assinatura ID5 em LGG

Tabela S67. Sobrevivência livre de eventos para Assinatura ID5 em LGG para Homens

Tabela S68. Sobrevivência livre de eventos para Assinatura ID5 em LGG para Mulheres

Tabela S69. Sobrevivência livre de doença para Assinatura ID5 em LGG

Tabela S70. Sobrevivência livre de doença para Assinatura ID5 em LGG para Homens

Tabela S71. Sobrevivência livre de doença para Assinatura ID5 em LGG para Mulheres

Tabela S72. Sobrevivência livre de progressão para Assinatura ID5 em LGG

Tabela S73. Sobrevivência livre de progressão para Assinatura ID5 em LGG para Homens

Tabela S74. Sobrevivência livre de progressão para Assinatura ID5 em LGG para Mulheres

Tabela S75. Sobrevivência geral para Assinatura ID6 em LUAD

Tabela S76. Sobrevivência geral para Assinatura ID6 em LUAD para Homens.

Tabela S77. Sobrevivência geral para Assinatura ID6 em LUAD para Mulheres

Tabela S78. Sobrevivência livre de eventos para Assinatura ID6 em LUAD

Tabela S79. Sobrevivência livre de eventos para Assinatura ID6 em LUAD para Homens

Tabela S80. Sobrevivência livre de eventos para Assinatura ID6 em LUAD para Mulheres

Tabela S81. Sobrevivência livre de doença para Assinatura ID6 em LUAD

Tabela S82. Sobrevivência livre de doença para Assinatura ID6 em LUAD para Homens

Tabela S83. Sobrevivência livre de doença para Assinatura ID6 em LUAD para Mulheres

Tabela S84. Sobrevivência livre de progressão para Assinatura ID6 em LUAD

Tabela S85. Sobrevivência livre de progressão para Assinatura ID6 em LUAD para Homens

Tabela S86. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID6 em LUAD para Mulheres

Tabela S87. Sobrevida Geral para Assinatura dos genes OXPHOS hiper-regulados em SKCM.

Tabela S88. Sobrevida Geral para Assinatura dos genes OXPHOS hiper-regulados em SKCM para Homens

Tabela S89. Sobrevida Geral para Assinatura dos genes OXPHOS hiper-regulados em SKCM para Mulheres

Tabela S90. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID7 em SKCM

Tabela S91. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID7 em SKCM para Homens

Tabela S92. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID7 em SKCM para Mulheres

Tabela S93. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID7 em SKCM

Tabela S94. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID7 em SKCM para Homens

Tabela S95. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID7 em SKCM para Mulheres

Tabela S96. Sobrevida geral para Assinatura ID8 em UVM

Tabela S97. Sobrevida geral para Assinatura ID8 em UVM para Homens

Tabela S98. Sobrevida geral para Assinatura ID8 em UVM para Mulheres.

Tabela S99. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID8 em UVM

Tabela S100. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID8 em UVM para Homens

Tabela S101. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID8 em UVM para Mulheres.

Tabela S102. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID8 em UVM

Tabela S103. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID8 em UVM para Homens.

Tabela S104. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID8 em UVM para Mulheres

Tabela S105. Sobrevida geral para Assinatura ID9 em UVM

Tabela S106. Sobrevida geral para Assinatura ID9 em UVM para Homens

Tabela S107. Sobrevida geral para Assinatura ID9 em UVM para Mulheres

Tabela S108. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID9 em UVM

Tabela S109. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID9 em UVM para Homens

Tabela S110. Sobrevida livre de eventos para Assinatura ID9 em UVM para Mulheres

Tabela S111. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID9 em UVM

Tabela S112. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID9 em UVM para Homens

Tabela S113. Sobrevida livre de progressão para Assinatura ID9 em UVM para Mulheres

Tabela S114. Sobrevida para Efeito Protetor ou de Risco em Diferentes Cânceres

Tabela S115. Correlações entre os Perfis de expressão Molecular das Assinaturas dos Genes OXPHOS e Infiltrados de Células Imunes

Tabela S116. Correlações entre os Perfis de Expressão Molecular das Assinaturas dos Genes OXPHOS e o Potencial Estaminal

Tabela S117. Assinaturas dos Genes OXPHOS Correlacionadas a Sobrevida Global Pan-Câncer

10. REFERÊNCIAS

ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nat Methods**, v. 7, n. 4, p. 248-9, Apr 2010. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20354512> >.

ALVINA, F. B.; GOUW, A. M.; LE, A. Cancer Stem Cell Metabolism. **Adv Exp Med Biol**, v. 1311, p. 161-172, 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34014542> >.

ANSELL, S. M. et al. Cd4+ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. **J Clin Oncol**, v. 19, n. 3, p. 720-6, Feb 1 2001. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157023> >.

ANTONIO, M. J.; ZHANG, C.; LE, A. Different Tumor Microenvironments Lead to Different Metabolic Phenotypes. **Adv Exp Med Biol**, v. 1311, p. 137-147, 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34014540> >.

APONTE, P. M.; CAICEDO, A. Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment. **Stem Cells Int**, v. 2017, p. 5619472, 2017. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28473858> >.

ARNOLD, M. et al. Progress in cancer survival, mortality, and incidence in seven high-income countries 1995-2014 (ICBP SURVMARK-2): a population-based study. **Lancet Oncol**, v. 20, n. 11, p. 1493-1505, Nov 2019. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31521509> >.

ASHTON, T. M. et al. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 11, p. 2482-2490, 2018. ISSN 1078-0432. Available at: < <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3070> >

BAGGETTO, L. G. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. **Biochimie**, v. 74, n. 11, p. 959-74, Nov 1992. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1477140> >.

BARABASI, A. L.; OLTVAI, Z. N. Network biology: understanding the cell's functional organization. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 2, p. 101-13, Feb 2004. available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14735121> >.

BAYSAL, B. E. et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. **Science**, v. 287, n. 5454, p. 848-51, Feb 4 2000. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657297> >.

BENN, D. E. et al. Novel succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) mutations in familial pheochromocytomas and paragangliomas, but an absence of somatic SDHB mutations in sporadic pheochromocytomas. **Oncogene**, v. 22, n. 9, p. 1358-64, Mar 6 2003. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618761> >.

BIANCHI, N. O.; BIANCHI, M. S.; RICHARD, S. M. Mitochondrial genome instability in human cancers. **Mutat Res**, v. 488, n. 1, p. 9-23, Mar 2001. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223402> >.

BIBIKOVA, M. et al. Expression signatures that correlated with Gleason score and relapse in prostate cancer. **Genomics**, v. 89, n. 6, p. 666-72, Jun 2007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459658> >.

BRANDSCH, R.; BICHLER, V. Covalent cofactor binding to flavoenzymes requires specific effectors. **Eur J Biochem**, v. 182, n. 1, p. 125-8, Jun 1 1989. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2659351> >.

BRETON, S. et al. A resourceful genome: updating the functional repertoire and evolutionary role of animal mitochondrial DNAs. **Trends Genet**, v. 30, n. 12, p. 555-64, Dec 2014. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25263762> >.

CAI, N. et al. Mitochondrial DNA variants modulate N-formylmethionine, proteostasis and risk of late-onset human diseases. **Nat Med**, v. 27, n. 9, p. 1564-1575, Sep 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34426706> >.

CASTELLI, S. et al. Lipid Catabolism and ROS in Cancer: A Bidirectional Liaison. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 21, Oct 31 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34771647> >.

CHANDRA, D.; SINGH, K. K. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1807, n. 6, p. 620-5, Jun 2011. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21074512> >.

CHEN, J. et al. An autophagic gene-based signature to predict the survival of patients with low-grade gliomas. **Cancer Med**, v. 10, n. 5, p. 1848-1859, Mar 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33591634> >.

CHEN, J. et al. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. **Nat Genet**, v. 45, n. 1, p. 34-42, Jan 2013. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202127> >.

CHEN, X.; QIAN, Y.; WU, S. The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept. **Free Radic Biol Med**, v. 79, p. 253-63, Feb 2015. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25277420> >.

CHINNERY, P. F. Primary Mitochondrial Disorders Overview. In: ADAM, M. P.; EVERMAN, D. B., et al (Ed.). **GeneReviews((R))**. Seattle (WA), 1993.

CLOCCHIATTI, A. et al. Sexual dimorphism in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 5, p. 330-9, May 2016. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27079803> >.

COSTA, A. R. et al. The Sex Bias of Cancer. **Trends Endocrinol Metab**, v. 31, n. 10, p. 785-799, Oct 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32900596> >.

CUEZVA, J. M. et al. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. **Cancer Res**, v. 62, n. 22, p. 6674-81, Nov 15 2002. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438266> >.

DAMIANI, S.; DINA, R.; EUSEBI, V. Eosinophilic and granular cell tumors of the breast. **Semin Diagn Pathol**, v. 16, n. 2, p. 117-25, May 1999. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10452577> >.

DANIEL, M. G. et al. Making a Hematopoietic Stem Cell. **Trends Cell Biol**, v. 26, n. 3, p. 202-214, Mar 2016. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26526106> >.

DESANTIS, C. E. et al. Cancer statistics for adults aged 85 years and older, 2019. **CA Cancer J Clin**, v. 69, n. 6, p. 452-467, Nov 2019. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31390062> >.

DICKENS, F.; SIMER, F. The metabolism of normal and tumour tissue: The respiratory quotient in bicarbonate-media. **Biochem J**, v. 25, n. 4, p. 985-93, 1931. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16744705> >.

DUNFORD, A. et al. Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. **Nat Genet**, v. 49, n. 1, p. 10-16, Jan 2017. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27869828> >.

EVANS, K. W. et al. Oxidative Phosphorylation Is a Metabolic Vulnerability in Chemotherapy-Resistant Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Res**, v. 81, n. 21, p. 5572-5581, Nov 1 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34518211> >.

FEI, H.; CHEN, X. Development of a novel five-gene immune-related risk model for the prognosis evaluation of prostate adenocarcinoma patients. **Am J Cancer Res**, v. 12, n. 5, p. 2337-2349, 2022. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35693084> >.

FERNANDEZ-VIZARRA, E.; TIRANTI, V.; ZEVIANI, M. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793, n. 1, p. 200-11, Jan 2009. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18620006> >.

GAJEWSKI, C. D. et al. New insights into the bioenergetics of mitochondrial disorders using intracellular ATP reporters. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 9, p. 3628-35, Sep 2003. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12972552> >.

GARDINER, C. M. NK cell metabolism. **J Leukoc Biol**, v. 105, n. 6, p. 1235-1242, Jun 2019. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30676653> >.

GASPARRE G, H. E., DE LAPLANCHE E, ET AL. Clonal expansion of mutated mitochondrial DNA is associated with tumor formation and complex I deficiency in the benign renal oncocytoma. **Hum Mol Genet**, 2008.

GASPARRE, G. et al. Disruptive mitochondrial DNA mutations in complex I subunits are markers of oncocytic phenotype in thyroid tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 21, p. 9001-6, May 22 2007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17517629> >.

GHEZZI, D.; ZEVIANI, M. Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes: physiology and pathophysiology. **Adv Exp Med Biol**, v. 748, p. 65-106, 2012. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22729855> >.

_____. Human diseases associated with defects in assembly of OXPHOS complexes. **Essays Biochem**, v. 62, n. 3, p. 271-286, Jul 20 2018. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30030362> >.

GORE, E. et al. The Multifaceted ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) in Energy Metabolism Reprogramming and Mitochondrial Dysfunction: A New Player in Age-Associated Disorders? **Antioxid Redox Signal**, v. 37, n. 4-6, p. 370-393, Aug 2022. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34605675> >.

GRANATA, S. et al. Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease. **Nutr Metab (Lond)**, v. 12, p. 49, 2015. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26612997> >.

GRASSO, D. et al. Mitochondria in cancer. **Cell Stress**, v. 4, n. 6, p. 114-146, May 11 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32548570> >.

GUNDAMARAJU, R.; LU, W.; MANIKAM, R. Revisiting Mitochondria Scored Cancer Progression and Metastasis. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 3, Jan 23 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33498743> >.

GUO, J. C. et al. Prognostic Value of an Autophagy-Related Five-Gene Signature for Lower-Grade Glioma Patients. **Front Oncol**, v. 11, p. 644443, Mar 9 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33768004> >.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutat Res**, v. 275, n. 3-6, p. 257-66, Sep 1992. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1383768> >.

HASHIM, D. et al. The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. **Ann Oncol**, v. 27, n. 5, p. 926-33, May 2016. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26802157> >.

HOBBERMAN, H. D. Is there a role for mitochondrial genes in carcinogenesis? **Cancer Res**, v. 35, n. 11 Pt. 2, p. 3332-5, Nov 1975. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1104145> >.

HU, C. et al. Immune cell metabolism and metabolic reprogramming. **Mol Biol Rep**, v. 49, n. 10, p. 9783-9795, Oct 2022. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35696048> >.

HUANG, X. Y. et al. A New Stemness-Related Prognostic Model for Predicting the Prognosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Biomed Res Int**, v. 2021, p. 6669570, 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34671679> >.

HULVAT, M. C. Cancer Incidence and Trends. **Surg Clin North Am**, v. 100, n. 3, p. 469-481, Jun 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32402294> >.

HUTTEMANN, M. et al. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. **J Bioenerg Biomembr**, v. 40, n. 5, p. 445-56, Oct 2008. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843528> >.

IGLESIA, M. D. et al. Genomic Analysis of Immune Cell Infiltrates Across 11 Tumor Types. **J Natl Cancer Inst**, v. 108, n. 11, Nov 2016. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27335052> >.

ISLAMI, F. et al. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 1, p. 31-54, Jan 2018. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29160902> >.

JACKSON, S. S. et al. Sex disparities in the incidence of 21 cancer types: Quantification of the contribution of risk factors. **Cancer**, v. 128, n. 19, p. 3531-

3540, Oct 1 2022. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35934938> >.

JIANG, H.; CHEN, H.; CHEN, N. Construction and validation of a seven-gene signature for predicting overall survival in patients with kidney renal clear cell carcinoma via an integrated bioinformatics analysis. **Anim Cells Syst (Seoul)**, v. 24, n. 3, p. 160-170, May 12 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33209196> >.

JONES, J. et al. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 16, p. 5730-9, Aug 15 2005. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115910> >.

JU, A. et al. Pyroptosis-Related Gene Signatures Can Robustly Diagnose Skin Cutaneous Melanoma and Predict the Prognosis. **Front Oncol**, v. 11, p. 709077, 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34327145> >.

JUNG, J. G.; LE, A. Metabolism of Immune Cells in the Tumor Microenvironment. **Adv Exp Med Biol**, v. 1311, p. 173-185, 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34014543> >.

KEANE, C. et al. CD4(+) tumor infiltrating lymphocytes are prognostic and independent of R-IPI in patients with DLBCL receiving R-CHOP chemo-immunotherapy. **Am J Hematol**, v. 88, n. 4, p. 273-6, Apr 2013. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23460351> >.

KEANE, C. et al. Ratios of T-cell immune effectors and checkpoint molecules as prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. **Lancet Haematol**, v. 2, n. 10, p. e445-55, Oct 2015. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26686046> >.

KIM, H. I.; LIM, H.; MOON, A. Sex Differences in Cancer: Epidemiology, Genetics and Therapy. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 26, n. 4, p. 335-342, Jul 1 2018. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29949843> >.

KIM, S. Y. Oxidative stress and gender disparity in cancer. **Free Radic Res**, v. 56, n. 1, p. 90-105, Jan 2022. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35118928> >.

KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 10, p. 626-38, Oct 2016. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27546235> >.

KOOPMAN, W. J. et al. OXPHOS mutations and neurodegeneration. **EMBO J**, v. 32, n. 1, p. 9-29, Jan 9 2013. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23149385> >.

LECHUGA-VIECO, A. V.; JUSTO-MENDEZ, R.; ENRIQUEZ, J. A. Not all mitochondrial DNAs are made equal and the nucleus knows it. **IUBMB Life**, v. 73, n. 3, p. 511-529, Mar 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33369015> >.

LEE, H. Y. et al. Mitochondrial Metabolic Signatures in Hepatocellular Carcinoma. **Cells**, v. 10, n. 8, Jul 27 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34440674> >.

LI, F. et al. A 17-Gene Signature Predicted Prognosis in Renal Cell Carcinoma. **Dis Markers**, v. 2020, p. 8352809, 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32184905> >.

LI, Z.; QI, F.; LI, F. Establishment of a Gene Signature to Predict Prognosis for Patients with Lung Adenocarcinoma. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 22, Nov 11 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33187219> >.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends Biochem Sci**, v. 41, n. 3, p. 211-218, Mar 2016. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778478> >.

LIU, Z.; LI, C. Identification of the Novel Methylated Genes' Signature to Predict Prognosis in INRG High-Risk Neuroblastomas. **J Oncol**, v. 2021, p. 1615201, 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34557229> >.

LOPES-RAMOS, C. M.; QUACKENBUSH, J.; DEMEO, D. L. Genome-Wide Sex and Gender Differences in Cancer. **Front Oncol**, v. 10, p. 597788, 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33330090> >.

LUO, Y. et al. Novel Stemness-Related Gene Signature Predicting Prognosis and Indicating a Different Immune Microenvironment in HNSCC. **Front Genet**, v. 13, p. 822115, 2022. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35360859> >.

MAI, N.; CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z. M.; LIGHTOWLERS, R. N. The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. **Cell Tissue Res**, v. 367, n. 1, p. 5-20, Jan 2017. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27411691> >.

MALTA, T. M. et al. Machine Learning Identifies Stemness Features Associated with Oncogenic Dedifferentiation. **Cell**, v. 173, n. 2, p. 338-354 e15, Apr 5 2018. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29625051> >.

MANFROI, B. et al. Tumor-associated neutrophils correlate with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients. **Blood Cancer J**, v. 8, n. 7, p. 66, Jul 5 2018. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29977076> >.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E. et al. Ketones and lactate increase cancer cell "stemness," driving recurrence, metastasis and poor clinical outcome in breast cancer: achieving personalized medicine via Metabolo-Genomics. **Cell Cycle**, v. 10, n. 8, p. 1271-86, Apr 15 2011. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21512313> >.

MATHUPALA, S. P.; HEESE, C.; PEDERSEN, P. L. Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active

response elements for the tumor suppressor p53. **J Biol Chem**, v. 272, n. 36, p. 22776-80, Sep 5 1997. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278438> >.

MCFARLAND, R.; TURNBULL, D. M. Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease. **J Intern Med**, v. 265, n. 2, p. 210-28, Feb 2009. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19192037> >.

MILES, D. C. et al. TRIM28 is an Epigenetic Barrier to Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming. **Stem Cells**, v. 35, n. 1, p. 147-157, Jan 2017. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27350605> >.

MILLER, K. D. et al. Updated Methodology for Projecting U.S.- and State-Level Cancer Counts for the Current Calendar Year: Part II: Evaluation of Incidence and Mortality Projection Methods. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 30, n. 11, p. 1993-2000, Nov 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34404684> >.

MODICA-NAPOLITANO, J. S.; KULAWIEC, M.; SINGH, K. K. Mitochondria and human cancer. **Curr Mol Med**, v. 7, n. 1, p. 121-31, Feb 2007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311537> >.

MU, S. et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in diffuse large B cell lymphoma patients: an updated dose-response meta-analysis. **Cancer Cell Int**, v. 18, p. 119, 2018. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30166942> >.

NABI, K.; LE, A. The Intratumoral Heterogeneity of Cancer Metabolism. **Adv Exp Med Biol**, v. 1311, p. 149-160, 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34014541> >.

NEVINS, J. R.; POTTI, A. Mining gene expression profiles: expression signatures as cancer phenotypes. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 8, p. 601-9, Aug 2007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17607306> >.

NG, Y. S.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial disease: genetics and management. **J Neurol**, v. 263, n. 1, p. 179-91, Jan 2016. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26315846> >.

NIEMANN, S.; MULLER, U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. **Nat Genet**, v. 26, n. 3, p. 268-70, Nov 2000. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11062460> >.

PAGES, F. et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene**, v. 29, n. 8, p. 1093-102, Feb 25 2010. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19946335> >.

PEARCE, E. L.; PEARCE, E. J. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 633-43, Apr 18 2013. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23601682> >.

PENTA, J. S. et al. Mitochondrial DNA in human malignancy. **Mutat Res**, v. 488, n. 2, p. 119-33, May 2001. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11344040> >.

PORCELLI, A. M. et al. The genetic and metabolic signature of oncocytic transformation implicates HIF1alpha destabilization. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. 6, p. 1019-32, Mar 15 2010. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20028790> >.

QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39-51, Apr 2 2010. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371344> >.

RADOJA, S.; FREY, A. B. Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing. **Mol Med**, v. 6, n. 6, p. 465-79, Jun 2000. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972084> >.

REINECKE, F.; SMEITINK, J. A.; VAN DER WESTHUIZEN, F. H.
 OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 12, p. 1113-21, Dec 2009. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19389473> >.

REZNIK, E. et al. Mitochondrial respiratory gene expression is suppressed in many cancers. **Elife**, v. 6, Jan 18 2017. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28099114> >.

ROUILLARD, A. D. et al. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. **Database (Oxford)**, v. 2016, 2016. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27374120> >

SANCHEZ-PALENCIA, A. et al. Gene expression profiling reveals novel biomarkers in nonsmall cell lung cancer. **Int J Cancer**, v. 129, n. 2, p. 355-64, Jul 15 2011. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20878980> >.

SANCHO, P.; BARNEDA, D.; HEESCHEN, C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. **Br J Cancer**, v. 114, n. 12, p. 1305-12, Jun 14 2016. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27219018> >.

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1488-93, Mar 5 1999. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066163> >.

SCHAFER, G.; ENGELHARD, M.; MULLER, V. Bioenergetics of the Archaea. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 63, n. 3, p. 570-620, Sep 1999. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477309> >.

SCHAPIRA, A. H. Mitochondrial disease. **Lancet**, v. 368, n. 9529, p. 70-82, Jul 1 2006. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16815381> >.

SCHLEGEL, K.; MULLER, V. Evolution of Na(+) and H(+) bioenergetics in methanogenic archaea. **Biochem Soc Trans**, v. 41, n. 1, p. 421-6, Feb 1 2013. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23356322> >.

SHEN YA, L. C., CHI WH, WANG CY, HSIEH YT, WEI YH, CHEN YJ. Resveratrol impedes the stemness, epithelial-mesenchymal transition, and metabolic reprogramming of cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma through p53 activation. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2013.

SICA, V. et al. Oxidative phosphorylation as a potential therapeutic target for cancer therapy. **Int J Cancer**, v. 146, n. 1, p. 10-17, Jan 1 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31396957> >.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2022. **CA Cancer J Clin**, v. 72, n. 1, p. 7-33, Jan 2022. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35020204> >.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7-30, Jan-Feb 2016. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742998> >.

_____. Cancer Statistics, 2017. **CA Cancer J Clin**, v. 67, n. 1, p. 7-30, Jan 2017. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28055103> >.

SINGH, K. K. et al. Mitochondrial aconitase and citrate metabolism in malignant and nonmalignant human prostate tissues. **Mol Cancer**, v. 5, p. 14, Apr 4 2006. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595004> >.

SINGH, K. K. et al. Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents. **Oncogene**, v. 18, n. 48, p. 6641-6, Nov 18 1999. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10597269> >.

SMEITINK, J. A. et al. Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. **Cell Metab**, v. 3, n. 1, p. 9-13, Jan 2006. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16399500> >.

SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L. Gene-expression signatures in breast cancer. **N Engl J Med**, v. 360, n. 8, p. 790-800, Feb 19 2009. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228622> >.

SRINIVASAN, S. et al. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. **Biochim Biophys Acta Bioenerg**, v. 1858, n. 8, p. 602-614, Aug 2017. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28104365> >.

SUN, Z. et al. Prognostic risk signature based on the expression of three m6A RNA methylation regulatory genes in kidney renal papillary cell carcinoma. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 21, p. 22078-22094, Nov 7 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33177247> >.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-72, Nov 30 2007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035408> >.

TANG, Z.; CAI, K. A Novel 8-Gene Prognostic Signature for Survival Prediction of Uveal Melanoma. **Anal Cell Pathol (Amst)**, v. 2021, p. 6693219, 2021. ISSN 2210-7185 (Electronic)
2210-7177 (Print)
2210-7177 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34434692> >.

TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 5, p. 389-402, May 2005. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15861210> >.

TUPPEN, H. A. et al. Mitochondrial DNA mutations and human disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1797, n. 2, p. 113-28, Feb 2010. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19761752> >.

UGALDE, C. et al. Mitochondrial disorders due to nuclear OXPHOS gene defects. **Adv Exp Med Biol**, v. 652, p. 85-116, 2009. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20225021> >.

VAN DEN HEUVEL, L.; SMEITINK, J. The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetic diseases. **Bioessays**, v. 23, n. 6, p. 518-25, Jun 2001. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11385631> >.

VAN OVEN, M.; KAYSER, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. **Hum Mutat**, v. 30, n. 2, p. E386-94, Feb 2009. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18853457> >.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029-33, May 22 2009. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460998> >.

WALLACE, D. C. et al. Diseases resulting from mitochondrial DNA point mutations. **J Inherit Metab Dis**, v. 15, n. 4, p. 472-9, 1992. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1528007> >.

WANG, J.; MA, X.; MA, J. Identification of Four Enhancer-Associated Genes as Risk Signature for Diffuse Glioma Patients. **J Mol Neurosci**, v. 72, n. 2, p. 410-419, Feb 2022. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34462884> >.

WARBURG, O. The Chemical Constitution of Respiration Ferment. **Science**, v. 68, n. 1767, p. 437-43, Nov 9 1928. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17782077> >.

_____. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-14, Feb 24 1956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683> >.

WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. The Metabolism of Tumors in the Body. **J Gen Physiol**, v. 8, n. 6, p. 519-30, Mar 7 1927. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19872213> >.

WASILEWSKI, M.; CHOJNACKA, K.; CHACINSKA, A. Protein trafficking at the crossroads to mitochondria. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res**, v. 1864, n. 1, p. 125-137, Jan 2017. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27810356> >.

WHITESIDE, T. L. Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. **Cancer Immunol Immunother**, v. 48, n. 7, p. 346-52, Oct 1999. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501846> >.

XIA, Y. et al. Metabolic reprogramming of immune cells: Shaping the tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma. **Cancer Med**, v. 10, n. 18, p. 6374-6383, Sep 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34390203> >.

XIAO, K. et al. Identification and validation of a three-gene signature as a candidate prognostic biomarker for lower grade glioma. **PeerJ**, v. 8, p. e8312, Jan 3 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31921517> >.

XIAO, Y. et al. A Novel Four-Gene Signature Associated With Immune Checkpoint for Predicting Prognosis in Lower-Grade Glioma. **Front Oncol**, v. 10, p. 605737, 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33381460> >.

XU, R. et al. Lack of transcriptional coordination between mitochondrial and nuclear oxidative phosphorylation genes in the presence of two divergent

mitochondrial genomes. **Zool Res**, v. 43, n. 1, p. 111-128, Jan 18 2022. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34904419> >.

YAN, S. et al. Comprehensive analysis of prognostic gene signatures based on immune infiltration of ovarian cancer. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, p. 1205, Dec 7 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33287740> >.

YANG, T. et al. Identification of an immune prognostic 11-gene signature for lung adenocarcinoma. **PeerJ**, v. 9, p. e10749, 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33552736> >.

YANG, Y. et al. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. **J Cell Physiol**, v. 231, n. 12, p. 2570-81, Dec 2016. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26895995> >.

YASUDA, T.; ISHIMOTO, T.; BABA, H. Conflicting metabolic alterations in cancer stem cells and regulation by the stromal niche. **Regen Ther**, v. 17, p. 8-12, Jun 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33598509> >.

YE, M. L. et al. Integrative Analysis Revealed Stemness Features and a Novel Stemness-Related Classification in Colorectal Cancer Patients. **Front Cell Dev Biol**, v. 10, p. 817509, 2022. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35721480> >.

ZHAI, W. Y. et al. A Novel Inflammatory-Related Gene Signature Based Model for Risk Stratification and Prognosis Prediction in Lung Adenocarcinoma. **Front Genet**, v. 12, p. 798131, 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35069695> >.

ZHAN, Y. et al. A Five-Gene Signature Predicts Prognosis in Patients with Kidney Renal Clear Cell Carcinoma. **Comput Math Methods Med**, v. 2015, p. 842784, 2015. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26539246> >.

ZHANG, C. et al. Depiction of tumor stemlike features and underlying relationships with hazard immune infiltrations based on large prostate cancer cohorts. **Brief Bioinform**, v. 22, n. 3, May 20 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32856039> >.

ZHANG, G. H. et al. Seven genes for the prognostic prediction in patients with glioma. **Clin Transl Oncol**, v. 21, n. 10, p. 1327-1335, Oct 2019. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30762207> >.

ZHANG, Y. et al. Identification and Validation of Immune- and Stemness-Related Prognostic Signature of Melanoma. **Front Cell Dev Biol**, v. 9, p. 755284, 2021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34805163> >.

ZHANG, Z. et al. The SARS-CoV-2 host cell receptor ACE2 correlates positively with immunotherapy response and is a potential protective factor for cancer progression. **Comput Struct Biotechnol J**, v. 18, p. 2438-2444, 2020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32905022> >.

ZHOU, Y. et al. Metabolic alterations in highly tumorigenic glioblastoma cells: preference for hypoxia and high dependency on glycolysis. **J Biol Chem**, v. 286, n. 37, p. 32843-53, Sep 16 2011. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21795717> >.