

ANÁLISE MULTIÔMICA DOS GENES ASSOCIADOS À AUTOFAGIA  
COMO INDICADORES PROGNÓSTICOS NO CÂNCER

**VICTOR DOS SANTOS LOPES**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ  
JANEIRO – 2026



ANÁLISE MULTIÔMICA DOS GENES ASSOCIADOS À AUTOFAGIA  
COMO INDICADORES PROGNÓSTICOS NO CÂNCER

**VICTOR DOS SANTOS LOPES**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

JANEIRO – 2026

### FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

L864

Lopes, Victor dos Santos.

"Análise multiômica dos genes associados à autofagia como indicadores prognósticos no câncer". / Victor dos Santos Lopes. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

70 f. : il.

Bibliografia: 63 - 70.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.

Orientador: Enrique Medina- Acosta.

1. Assinaturas multiômicas. 2. Autofagia. 3. Microambiente tumoral. 4. Pan-câncer. 5. Prognóstico tumoral. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

VICTOR DOS SANTOS LOPES

ANÁLISE MULTIÔMICA DOS GENES ASSOCIADOS À AUTOFAGIA COMO  
INDICADORES PROGNÓSTICOS NO CÂNCER

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 29 de janeiro de 2026

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Antônio Jesus Dorighetto Cogo - UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristina dos Santos Ferreira - UFF

---

Dra. Yzabella Alves Campos Nogueira - UENF

---

Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta (Orientador) - UENF

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder vida, saúde, força e sabedoria ao longo de toda esta caminhada. Foi por meio de Sua graça que consegui enfrentar os desafios e chegar até esta importante etapa da minha formação.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), expresso minha gratidão pela oportunidade de realizar este trabalho e pela contribuição para minha formação acadêmica e científica. Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia (PGBB), agradeço pelo suporte institucional, pelos conhecimentos compartilhados e pela contribuição essencial para o meu desenvolvimento ao longo do curso.

Aos meus pais, José Eduardo da Silva Lopes e Alcilene Andrade dos Santos Lopes, dedico minha mais profunda gratidão por todo amor, cuidado, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Vocês foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui, e esta conquista também é de vocês.

À minha irmã, Victória dos Santos Lopes, agradeço pelo carinho, pela presença e pelo apoio ao longo dessa trajetória.

À minha noiva, Yasmin Cardoso, agradeço pelo amor, companheirismo, compreensão e incentivo constantes. Sua presença foi essencial nos momentos mais difíceis, tornando esta caminhada mais leve e mais significativa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta, expresso minha sincera gratidão pela orientação, confiança, paciência e pelos ensinamentos transmitidos ao longo deste percurso. Sua contribuição foi fundamental para a realização e conclusão deste trabalho.

Aos colegas do laboratório do Núcleo de Identificação e Diagnóstico Molecular (NUDIM), Emanuell Rodrigues de Souza, Higor Almeida Cordeiro Nogueira e Jacielle Miranda Almeida, expresso meu agradecimento pela convivência, colaboração, apoio e pelas valiosas trocas de conhecimento que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a concretização desta dissertação e para mais esta etapa da minha vida acadêmica

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1. O câncer como desafio global e biológico .....	14
1.2. A autofagia: mecanismos e funções celulares .....	15
1.3. Autofagia e o câncer: interseções e paradoxos .....	16
1.4. Camadas ômicas associadas à autofagia no câncer.....	18
1.4.1. Expressão de mRNA.....	18
1.4.2. Expressão de isoformas de transcritos .....	18
1.4.3. Expressão de miRNAs .....	19
1.4.4 Níveis proteicos .....	19
1.4.5. Metilação de CpG .....	19
1.4.6. Mutações somáticas .....	20
1.4.7. Variações no número de cópias gênicas (CNVs).....	20
1.5. Variáveis fenotípicas .....	20
1.5.1. Potencial estaminal.....	21
1.5.2. Carga mutacional tumoral (TMB).....	21
1.5.3. Instabilidade de microssatélites (MSI) .....	22
1.6. Imunologia tumoral .....	22
1.6.1. Microambiente tumoral (TME).....	23
1.6.2. Perfil imunológico tumoral.....	24
1.7. Análise de sobrevida.....	24
1.8. Integração de bancos de dados e abordagem pan-câncer.....	25
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>26</b>
2.1. Objetivos específicos.....	26
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
3.1. Bancos de dados de genes associados à autofagia .....	27
3.2. Validação dos genes e identificação de <i>aliases</i> .....	28
3.3. Mapeamento de Identificadores: miRNAs maduros e isoformas de transcritos .....	28
3.4. Análise de correlações entre as camadas ômicas e as variáveis fenotípicas tumorais .....	29
3.5. Análise do nível de expressão.....	29
3.6. Análise de sobrevida.....	30
3.7. Regressão de Cox .....	30
3.8. Kaplan–Meier e teste log-rank .....	31

<b>3.9. Classificação do perfil do microambiente tumoral.....</b>	<b>31</b>
<b>3.10. Classificação do fenótipo imunológico do tumor.....</b>	<b>32</b>
<b>3.11. Criação de assinaturas multiômicas.....</b>	<b>33</b>
<b>3.12. Reanálise das assinaturas.....</b>	<b>34</b>
<b>3.13. Nomenclatura das assinaturas.....</b>	<b>34</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1. Consolidação dos dados.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2. Análise individual.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.1. Camadas ômicas e variáveis fenotípicas.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.2. Expressão entre tecidos tumorais e não tumorais.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2.3. Regressão de Cox.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.4 Kaplan–Meier/Log-Rank.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.5. Microambiente tumoral.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.6. Fenótipo imunológico tumoral.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3. Formação e reanálise das assinaturas.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3.1. Camadas ômicas e variáveis fenotípicas.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3.2. Expressão entre tecidos tumorais e não tumorais das assinaturas.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.3. Regressão de Cox.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3.4. Kaplan–Meier/Log-Rank.....</b>	<b>49</b>
<b>4.3.5. Microambiente tumoral.....</b>	<b>51</b>
<b>4.3.6. Fenótipo imunológico tumoral.....</b>	<b>52</b>
<b>4.4. Análise de robustez das assinaturas.....</b>	<b>53</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>62</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE SIGLAS

ACC – Carcinoma adrenocortical (*Adrenocortical carcinoma*)

ATG – Gene relacionado à autofagia (*Autophagy-related gene*)

BLCA – Carcinoma urotelial de bexiga (*Bladder Urothelial Carcinoma*)

BRCA – Carcinoma de mama invasivo (*Breast invasive carcinoma*)

CESC – Carcinoma escamoso do colo do útero e adenocarcinoma endocervical (*Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma*)

CpG – sítios CpG (*Methylation*)

CHOL – Colangiocarcinoma (*Cholangiocarcinoma*)

CNV – Variações no número de cópias (*copy number variation*)

COAD – Adenocarcinoma de cólon (*Colon adenocarcinoma*)

DFI – Intervalo livre de doença (*Disease-Free Interval*)

DLBC – Linfoma difuso de grandes células B (*Diffuse Large B-cell Lymphoma*)

DSS – Sobrevida específica da doença (*Disease-Specific Survival*)

ESCA – Carcinoma de esôfago (*Esophageal carcinoma*)

FDR – Taxa de descobertas falsas (*False Discovery Rate*)

GBM – Glioblastoma (*Glioblastoma multiforme*)

GTE<sub>x</sub> – Projeto Genótipo–Expressão em Tecidos (*Genotype-Tissue Expression Project*)

HADb – Banco de Dados Humano de Autofagia (*Human Autophagy Database*)

HNSC – Carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (*Head and Neck squamous cell carcinoma*)

HR – Razão de riscos (*Hazard Ratio*)

KEGG – Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

KICH – Carcinoma renal cromóforo (*Kidney Chromophobe*)

KIRC – Carcinoma renal de células claras (*Kidney renal clear cell carcinoma*)

KIRP – Carcinoma renal papilífero (*Kidney renal papillary cell carcinoma*)

KM – Método/curva de Kaplan–Meier (*Kaplan–Meier*)

LAML – Leucemia mieloide aguda (*Acute Myeloid Leukemia*)

LGG – Glioma de baixo grau (*Brain Lower Grade Glioma*)

LIHC – Carcinoma hepatocelular (*Liver hepatocellular carcinoma*)

LUAD – Adenocarcinoma de pulmão (*Lung adenocarcinoma*)

LUSC – Carcinoma escamoso de pulmão (*Lung squamous cell carcinoma*)

MESO – Mesotelioma (*Mesothelioma*)

mRNA – RNA mensageiro

MSI – Instabilidade de microssatélites (*Microsatellite Instability*)

MSigDB – Banco de Assinaturas Moleculares (*Molecular Signatures Database*)

MT – Mutado (*Mutant/Mutated*)

NCBI – Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information*)

OMS – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization, WHO*)

OS – Sobrevida global (*Overall Survival*)

OV – Cistadenocarcinoma seroso de ovário (*Ovarian serous cystadenocarcinoma*)

padj – p-valor ajustado (*Adjusted p-value*)

PAAD – Adenocarcinoma de pâncreas (*Pancreatic adenocarcinoma*)

PCPG – Feocromocitoma e paraganglioma (*Pheochromocytoma and Paraganglioma*)

PFI – Intervalo livre de progressão (*Progression-Free Interval*)

PRAD – Adenocarcinoma de próstata (*Prostate adenocarcinoma*)

READ – Adenocarcinoma de reto (*Rectum adenocarcinoma*)

RNA-seq – Sequenciamento de RNA

ROS – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

SARC – Sarcoma (*Sarcoma*)

SKCM – Melanoma cutâneo (*Skin Cutaneous Melanoma*)

STAD – Adenocarcinoma gástrico/estômago (*Stomach adenocarcinoma*)

TCGA – Atlas do Genoma do Câncer (*The Cancer Genome Atlas*)

TGCT – Tumores de células germinativas do testículo (*Testicular Germ Cell Tumors*)

THCA – Carcinoma de tireoide (*Thyroid carcinoma*)

THYM – Timoma (*Thymoma*)

TMB – Carga mutacional tumoral (*Tumor Mutational Burden*)

TME – Microambiente tumoral (*Tumor Microenvironment*)

Tregs – Células T reguladoras (*Regulatory T cells*)

UCEC – Carcinoma endometrial do corpo do útero (*Uterine Corpus Endometrial Carcinoma*)

UCS – Carcinosarcoma uterino (*Uterine Carcinosarcoma*)

UVM – Melanoma uveal (*Uveal Melanoma*)

WT – Tipo selvagem; não mutado (*Wild Type*)

## RESUMO

Este estudo investigou, em escala pan-câncer, o papel de genes associados à autofagia por meio da integração de múltiplas camadas ômicas, utilizando dados do The Cancer Genome Atlas (TCGA) e do projeto Genotype-Tissue Expression (GTEx). A partir da consolidação de 2.739 genes obtidos em diferentes repositórios, foram identificadas e estruturadas 21.184 assinaturas multiômicas, das quais 177 permaneceram totalmente significativas após a aplicação de critérios de refinamento estatístico e biológico. Essas assinaturas revelaram associações consistentes com variáveis fenotípicas tumorais, desfechos clínicos e perfis imunológicos, indicando que a autofagia pode atuar como um programa adaptativo relacionado ao estresse genômico, à adaptação celular e à remodelação do microambiente tumoral. Tumores de maior relevância epidemiológica, como adenocarcinoma de pulmão (LUAD), carcinoma de mama (BRCA) e adenocarcinoma gástrico (STAD), concentraram proporção expressiva de assinaturas significativas, sugerindo participação marcante da autofagia em contextos de maior impacto clínico. Entre os exemplos observados, destacam-se assinaturas envolvendo os genes KPNA2 e RAD51 em LUAD, bem como a presença de genes canônicos, como ATG7, em BRCA, evidenciando a coexistência de mecanismos clássicos e não canônicos relacionados à autofagia no câncer. A redução para 177 assinaturas não implicou perda de informação, mas um processo de priorização baseado na convergência entre camadas ômicas, variáveis fenotípicas e indicadores prognósticos. Ressalta-se, contudo, que as demais assinaturas, embora não tenham atendido simultaneamente a todos os critérios estabelecidos, podem manter relevância biológica e clínica em contextos específicos, merecendo investigação futura. Nesse cenário, as assinaturas descritas configuram recursos exploratórios com potencial translacional para estratificação molecular, geração de hipóteses e produção de evidências voltadas à identificação de possíveis biomarcadores e alvos terapêuticos. Ainda assim, os achados deverão ser posteriormente submetidos a análises independentes e validações funcionais.

**Palavras-chave:** Assinaturas multiômicas; Autofagia; Microambiente tumoral; Pan-câncer; Prognóstico tumoral.

## ABSTRACT

This study investigated, at a pan-cancer scale, the role of autophagy-associated genes through the integration of multiple omics layers, using data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx). From the consolidation of 2,739 genes obtained from different repositories, 21,184 multi-omic signatures were identified and structured, of which 177 remained fully significant after the application of statistical and biological refinement criteria. These signatures revealed consistent associations with tumor phenotypic variables, clinical outcomes, and immunological profiles, indicating that autophagy may act as an adaptive program related to genomic stress, cellular adaptation, and tumor microenvironment remodeling. Tumors of higher epidemiological relevance, such as lung adenocarcinoma (LUAD), breast carcinoma (BRCA), and gastric adenocarcinoma (STAD), concentrated a substantial proportion of significant signatures, suggesting a prominent role of autophagy in clinically impactful contexts. Among the observed examples, signatures involving the genes KPNA2 and RAD51 in LUAD stand out, as well as the presence of canonical genes, such as ATG7, in BRCA, highlighting the coexistence of classical and non-canonical mechanisms related to autophagy in cancer. The reduction to 177 signatures did not imply loss of information, but rather a prioritization process based on convergence among omics layers, phenotypic variables, and prognostic indicators. However, it is important to emphasize that the remaining signatures, although they did not simultaneously meet all established criteria, may retain biological and clinical relevance in specific contexts and therefore deserve further investigation. In this scenario, the described signatures constitute exploratory resources with translational potential for molecular stratification, hypothesis generation, and evidence production aimed at identifying potential biomarkers and therapeutic targets. Nevertheless, these findings should be subsequently subjected to independent analyses and functional validation.

**Keywords:** Autophagy; Multi-omic signatures; Pan-cancer; Tumor microenvironment; Tumor prognosis.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O câncer como desafio global e biológico

O câncer constitui uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, representando um desafio persistente à saúde pública e ao desenvolvimento socioeconômico (Sung *et al.*, 2021). Estimativas globais indicam que, em 2020, mais de 19 milhões de novos casos foram diagnosticados, resultando em aproximadamente 10 milhões de óbitos (Sung *et al.*, 2021). Projeções recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) sugerem que, até 2050, o número de novos casos poderá aumentar em cerca de 77%, evidenciando a crescente complexidade do controle da doença e a necessidade de estratégias terapêuticas mais eficazes (Bray *et al.*, 2024). Do ponto de vista biológico, o câncer é caracterizado por elevada heterogeneidade clínica e molecular, resultante da interação dinâmica entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (Hanahan, 2022). Essas interações afetam vias celulares fundamentais para a manutenção da homeostase, incluindo proliferação, apoptose, reparo do DNA, resposta ao estresse e degradação intracelular. A disfunção desses mecanismos favorece a instabilidade genômica e a transformação neoplásica, permitindo a sobrevivência e expansão de células geneticamente instáveis (Hanahan, 2022; Hanahan; Weinberg, 2011).

Nesse contexto, a autofagia emerge como um processo celular central para o equilíbrio metabólico e a preservação da integridade celular. Trata-se de um mecanismo altamente regulado, responsável pela degradação e reciclagem de componentes citoplasmáticos, cuja atividade adequada é essencial para a adaptação celular a diferentes tipos de estresse (Glick; Barth; Macleod, 2010; Ryter; Cloonan; Choi, 2013). Evidências crescentes demonstram que a disfunção da autofagia está intimamente associada à iniciação tumoral, à progressão da doença e à resistência a terapias antineoplásicas, posicionando esse processo como um elo fundamental entre metabolismo celular, estresse e câncer (Jalali *et al.*, 2025; Russell; Guan, 2022). Contudo, apesar dos avanços no entendimento da autofagia na oncogênese, ainda persiste heterogeneidade na definição e na seleção dos genes associados a esse processo, bem como nos critérios utilizados para avaliar suas alterações em diferentes tipos tumorais. Essa ausência de padronização limita a comparação entre estudos e dificulta a identificação de assinaturas moleculares robustas e clinicamente relevantes. Diante desse cenário, abordagens integrativas baseadas em dados multiômicos e

análises pan-câncer tornam-se fundamentais para compreender como a autofagia contribui para a heterogeneidade tumoral e para os desfechos clínicos dos pacientes.

## 1.2. A autofagia: mecanismos e funções celulares

A autofagia é um processo celular responsável pela degradação e reciclagem de componentes citoplasmáticos, como proteínas malformadas, organelas danificadas e patógenos intracelulares. Por meio desse mecanismo, as células mantêm a homeostase metabólica e estrutural e se adaptam a condições adversas, incluindo privação de nutrientes, hipóxia e estresse oxidativo (Schaaf *et al.*, 2019). Em níveis basais, esse processo contribui para reduzir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), limitar danos ao DNA e preservar a integridade funcional dos tecidos, atuando como mecanismo essencial de proteção celular (Jalali *et al.*, 2025; White, 2015). Esses mecanismos foram elucidados a partir de estudos conduzidos por Yoshinori Ohsumi, culminando na identificação dos genes relacionados à autofagia (ATGs), que estabeleceram as bases moleculares do processo e resultaram na concessão do Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2016 (Tsukada; Ohsumi, 1993).

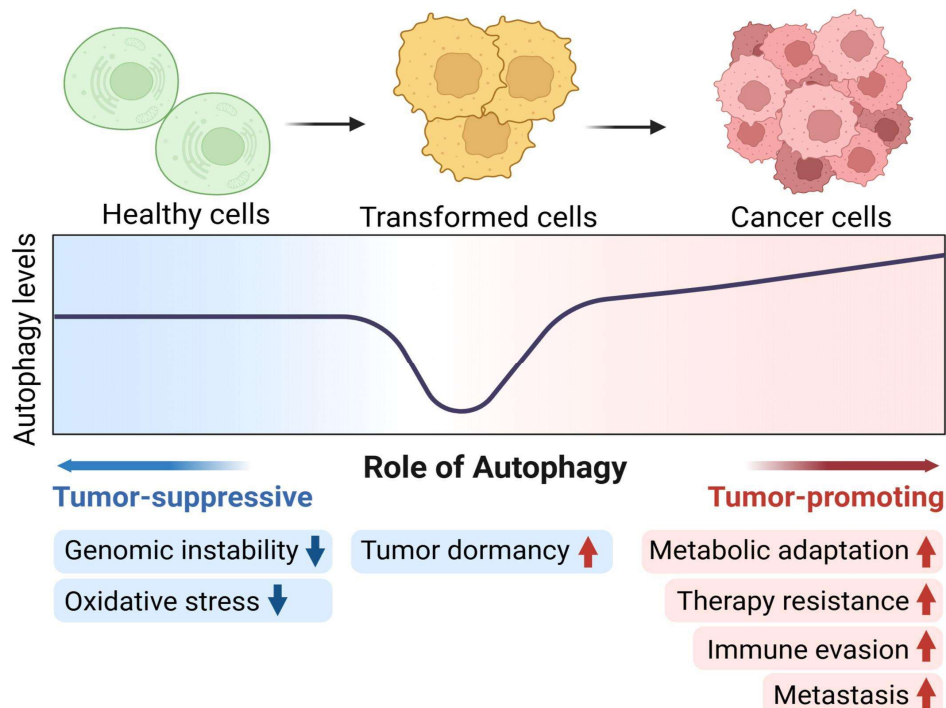
Em células de mamíferos, a autofagia pode ocorrer por três vias principais: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. A macroautofagia, frequentemente referida simplesmente como “autofagia”, envolve a formação de vesículas de dupla membrana denominadas autofagossomos. Essas estruturas englobam porções do citoplasma e se fundem aos lisossomos para degradação do conteúdo sequestrado (Glick; Barth; Macleod, 2010; Tiwari *et al.*, 2024). A microautofagia ocorre por invaginação direta da membrana lisossomal, permitindo a incorporação de pequenas frações citoplasmáticas. Já a autofagia mediada por chaperonas é um processo altamente seletivo, no qual proteínas específicas são reconhecidas por chaperonas citoplasmáticas e translocadas para o lúmen lisossomal por meio do receptor LAMP-2A (Glick; Barth; Macleod, 2010; Tiwari *et al.*, 2024).

A regulação da autofagia ocorre por uma rede complexa de proteínas codificadas pelos genes ATGs, cuja atividade é modulada por sensores metabólicos centrais, como o complexo mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) e a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Laplante; Sabatini, 2012). Esses reguladores integram sinais relacionados à disponibilidade energética, crescimento celular e estresse, determinando a ativação ou repressão do fluxo autofágico. Dessa forma, a autofagia atua como um

mecanismo adaptativo fundamental, conectando o estado metabólico celular à sobrevivência e à manutenção da integridade celular frente a condições adversas (Glick; Barth; Macleod, 2010; Li; Zhao, 2025).

### 1.3. Autofagia e o câncer: interseções e paradoxos

No contexto da oncogênese, a autofagia assume caráter dinâmico e ambíguo, podendo atuar tanto como mecanismo supressor quanto como promotora da progressão tumoral, a depender do tipo de tumor, do microambiente e do estágio da doença (Figura 1) (Verma *et al.*, 2021; Yu; Kim; Baek, 2025). Evidências experimentais e clínicas demonstram que, enquanto em fases iniciais a autofagia contribui para a manutenção da estabilidade genômica, em tumores estabelecidos ela pode ser reprogramada para sustentar adaptação metabólica, evasão imune e resistência terapêutica (Verma *et al.*, 2021; White; DiPaola, 2009; Yu; Kim; Baek, 2025). Essa dualidade torna-se particularmente relevante do ponto de vista prognóstico, justificando a investigação sistemática de marcadores relacionados ao processo no presente estudo.



**Figura 1. Papel dual da autofagia ao longo do desenvolvimento tumoral.** Na parte superior, a figura apresenta a progressão de células saudáveis → células transformadas → células cancerosas. No painel central, uma curva representa a variação dos níveis de autofagia ao longo dessa transição. Na parte inferior, os gradientes e setas indicam a mudança funcional da autofagia de um perfil supressor tumoral (à esquerda) para um perfil promotor tumoral (à direita). Nos estágios iniciais, a autofagia se associa à redução da instabilidade genômica e do estresse oxidativo. Em tumores estabelecidos, passa a favorecer

dormência tumoral, adaptação metabólica, resistência à terapia, evasão imune e metástase, consolidando a autofagia como um fator relevante para a sobrevivência e progressão do tumor.

Durante as fases iniciais da transformação celular, a ativação basal da autofagia associa-se a efeitos protetores, contribuindo para a redução do acúmulo de ROS, do estresse do retículo endoplasmático e de danos ao DNA (Glick; Barth; Macleod, 2010). Esses efeitos favorecem a manutenção da estabilidade genômica e a limitação de processos inflamatórios crônicos que podem impulsionar a transformação neoplásica (Bhol *et al.*, 2025; Onorati *et al.*, 2018). Nesse cenário, proteínas centrais da maquinaria autofágica, como Beclin-1, ATG5 e LC3B, têm sido consistentemente associadas a funções supressoras da tumorigênese em diferentes modelos experimentais (Hu *et al.*, 2020; Nepal *et al.*, 2015).

Em contraste, uma vez estabelecido o tumor, a autofagia pode ser funcionalmente reprogramada pelas células neoplásicas como estratégia adaptativa de sobrevivência (Bhol *et al.*, 2025; Mowers; Sharifi; Macleod, 2017). Sob condições adversas, como hipóxia, privação de nutrientes ou exposição a agentes quimioterápicos, a ativação do fluxo autofágico permite a reciclagem de componentes celulares e a manutenção do balanço energético, favorecendo a persistência celular em ambientes hostis (Qu, 2003; Yamamoto, Keisuke *et al.*, 2020). Essa adaptação metabólica confere vantagem seletiva às células tumorais, estando frequentemente associada a fenótipos mais agressivos, resistência terapêutica e progressão tumoral (Jalali *et al.*, 2025; Mulcahy Levy; Thorburn, 2020).

Além de seu papel metabólico, a autofagia influencia diretamente a interação entre células tumorais e o sistema imunológico (Duan *et al.*, 2021; Li; Zhao, 2025). A modulação autofágica implica tanto na facilitação da apresentação de antígenos e ativação da resposta imune antitumoral quanto na sustentação de mecanismos de evasão imune, por meio da sobrevivência de células imunossupressoras e da atenuação da atividade citotóxica efetora (Wang *et al.*, 2025). Assim, a autofagia emerge como um componente central na interface entre metabolismo tumoral, imunomodulação e evolução clínica da doença, reforçando a necessidade de abordagens integrativas para compreender seu impacto funcional no câncer.

#### 1.4. Camadas ômicas associadas à autofagia no câncer

A elucidação dos mecanismos moleculares que regulam a autofagia no câncer requer abordagens capazes de integrar múltiplos níveis de informação biológica (Luo *et al.*, 2022; Yu; Kim; Baek, 2025). Nesse contexto, a análise multiômica emerge como uma estratégia essencial. Essa abordagem permite investigar, de forma coordenada, alterações genômicas, epigenéticas, transcricionais e proteicas que, em conjunto, modulam o estado funcional da via autofágica (Luo *et al.*, 2022). Essa integração possibilita compreender como diferentes camadas moleculares contribuem para a heterogeneidade tumoral, a adaptação ao estresse e a resposta terapêutica em distintos tipos de câncer (Luo *et al.*, 2022).

No cenário oncológico, a autofagia apresenta comportamento altamente dependente do contexto molecular, podendo atuar tanto como mecanismo supressor da tumorigênese quanto como via adaptativa de sobrevivência tumoral (Verma *et al.*, 2021). Assim, a avaliação isolada de uma única camada ômica mostra-se insuficiente para capturar a complexidade desse processo. A integração de múltiplas camadas permite identificar padrões convergentes de regulação autofágica e estabelecer relações mais robustas entre alterações moleculares, fenótipos tumorais e desfechos clínicos (Catalano *et al.*, 2025; Heo *et al.*, 2021).

##### 1.4.1. Expressão de mRNA

A análise da expressão de mRNA representa o nível inicial da regulação gênica e reflete diretamente como as células tumorais modulam a ativação ou repressão de genes relacionados à autofagia em resposta a estímulos ambientais e metabólicos (Metur *et al.*, 2023). Alterações transcricionais em genes autofágicos indicam reprogramação funcional da célula tumoral, especialmente em condições de hipóxia, estresse oxidativo e privação nutricional. Dessa forma, o perfil de expressão de mRNA fornece uma visão abrangente da ativação basal da via autofágica e de sua associação com fenótipos adaptativos durante a progressão tumoral (Li; Zhao, 2025; Vega-Rubín-de-celis, 2020).

##### 1.4.2. Expressão de isoformas de transcritos

O *splicing* alternativo acrescenta um nível adicional de complexidade à regulação da autofagia, uma vez que diferentes isoformas de um mesmo gene podem originar proteínas com funções distintas ou até antagônicas (Meng *et al.*, 2019). Em tumores, alterações nos padrões de *splicing* contribuem para a geração de variantes que favorecem a sobrevivência celular, a adaptação metabólica e a evasão de mecanismos

de morte celular (González-Rodríguez; Klionsky; Joseph, 2022). Evidências indicam que eventos específicos de *splicing* em genes relacionados à autofagia modulam diretamente o fluxo autofágico em cânceres de mama, pulmão e pâncreas, conferindo vantagem adaptativa às células (González-Rodríguez; Klionsky; Joseph, 2022; Meng *et al.*, 2019).

#### 1.4.3. Expressão de miRNAs

Os microRNAs (miRNAs) constituem reguladores pós-transcricionais fundamentais da autofagia, atuando no controle fino da tradução de mRNAs codificadores de proteínas autofágicas (Brum; Vieira, 2025). No câncer, perfis aberrantes de expressão de miRNAs podem modular seletivamente a intensidade da resposta autofágica, influenciando adaptação ao estresse, resistência terapêutica e escape imune (Shan *et al.*, 2020). Por exemplo, o *miR-30a* regula negativamente o gene *BECN1*, reduzindo a formação de autofagossomos, enquanto o *miR-21* atua sobre a via PTEN/AKT, favorecendo mecanismos associados à sobrevivência (Zhu *et al.*, 2009). Assim, assinaturas de miRNAs associadas à autofagia refletem mecanismos refinados de controle pós-transcricional com impacto direto no comportamento tumoral (Chen *et al.*, 2020).

#### 1.4.4 Níveis proteicos

A camada proteômica representa o nível funcional no qual a autofagia é efetivamente executada. Alterações na abundância, estabilidade ou modificações pós-traducionais das proteínas determinam a capacidade da célula de iniciar, sustentar ou inibir o fluxo autofágico (Xie *et al.*, 2015). Em tumores, alterações rápidas na camada proteômica permitem respostas eficientes a estresses ambientais e terapêuticos, tornando essa camada essencial para compreender o estado funcional real da autofagia, além de revelar potenciais alvos terapêuticos diretamente acionáveis (Periyasamy-Thandavan *et al.*, 2009).

#### 1.4.5. Metilação de CpG

A metilação do DNA constitui um dos principais mecanismos epigenéticos de regulação da autofagia. Alterações nos padrões de metilação em regiões promotoras de genes autofágicos podem resultar em silenciamento ou ativação transcricional, impactando diretamente o fluxo autofágico (Bhol *et al.*, 2025). Em cânceres como os de cólon e pulmão, a hipermetilação de genes reguladores da autofagia tem sido associada à redução de sua atividade, favorecendo instabilidade genômica e progressão tumoral. Por outro lado, a hipometilação em tumores avançados pode contribuir para ativação

exacerbada da autofagia, promovendo adaptação metabólica e evasão imune (Peixoto *et al.*, 2019; Qiao *et al.*, 2022).

#### **1.4.6. Mutações somáticas**

As mutações somáticas alteram diretamente a regulação da autofagia ao comprometer regiões codificadoras ou regulatórias do genoma (Lei *et al.*, 2025). Em tumores, mutações em genes associados à via autofágica podem tanto enfraquecer mecanismos supressores quanto favorecer rotas adaptativas de sobrevivência celular (Laddha *et al.*, 2014). Assim, o panorama mutacional fornece informações críticas sobre como alterações permanentes no DNA reprogramam a dependência tumoral da autofagia, revelando simultaneamente fatores de agressividade e possíveis vulnerabilidades terapêuticas (Bhol *et al.*, 2025; Laddha *et al.*, 2014).

#### **1.4.7. Variações no número de cópias gênicas (CNVs)**

As variações no número de cópias gênicas (CNVs) representam alterações estruturais do genoma que afetam diretamente a dose gênica e a expressão de genes relacionados à autofagia (Polo *et al.*, 2022). Amplificações ou deleções em genes autofágicos têm sido associadas à resistência terapêutica, remodelação metabólica e progressão tumoral em diferentes tipos de câncer, incluindo mama, ovário e próstata (Laddha *et al.*, 2014). Dessa forma, a análise de CNVs fornece uma perspectiva genômica complementar, essencial para compreender como a instabilidade genômica contribui para a dependência tumoral da autofagia (Polo *et al.*, 2022; Tan *et al.*, 2022).

### **1.5. Variáveis fenotípicas**

Para compreender de forma integrada o impacto da autofagia na biologia tumoral, torna-se necessário considerar não apenas alterações genéticas, epigenéticas e transcricionais, mas também variáveis fenotípicas que refletem o comportamento funcional das células neoplásicas. Essas variáveis descrevem características observáveis associadas à adaptação celular, à instabilidade genômica e à interação com o sistema imune, funcionando como pontos de convergência entre os mecanismos moleculares e os desfechos clínicos (Addeo *et al.*, 2021; Aponte, 2017; Cohen *et al.*, 2019). Além de sintetizarem processos biológicos complexos, essas métricas permitem comparar tumores quanto à capacidade adaptativa e ao potencial de progressão, oferecendo um eixo funcional para interpretação de assinaturas moleculares associadas à autofagia.

No presente estudo, três variáveis fenotípicas centrais foram selecionadas por sua relevância na literatura e por captarem dimensões complementares do fenótipo tumoral: potencial estaminal (*stemness*), carga mutacional tumoral (*tumor mutational burden – TMB*) e instabilidade de microssatélites (*microsatellite instability – MSI*). Em conjunto, essas métricas permitem avaliar se assinaturas multiômicas associadas à autofagia tendem a se relacionar com estados celulares mais indiferenciados e resistentes, maior geração de diversidade mutacional e perfis de instabilidade genômica com implicações para imunogenicidade e resposta terapêutica, fornecendo base funcional para a interpretação das assinaturas multiômicas identificadas (Addeo et al., 2021; Aponte, 2017; Cohen et al., 2019).

### **1.5.1. Potencial estaminal**

O potencial estaminal (*stemness*) refere-se ao grau de similaridade das células tumorais com células-tronco, refletindo autorrenovação, heterogeneidade fenotípica e adaptação a ambientes adversos (Nazio et al., 2019). Em tumores sólidos, níveis elevados de *stemness* estão associados a maior agressividade, recorrência e resistência terapêutica, frequentemente atribuídos a subpopulações com características de células-tronco cancerígenas (CSCs) (Aponte, 2017).

A autofagia contribui para a manutenção desse fenótipo ao sustentar a homeostase metabólica e remover componentes celulares danificados, favorecendo sobrevivência sob estresse (Niharika; Garg, 2024). Em contexto tumoral, sua ativação tem sido relacionada à preservação do estado indiferenciado e à tolerância à quimioterapia e radioterapia, enquanto a desregulação pode comprometer o equilíbrio energético celular e alterar a dinâmica entre diferenciação e viabilidade celular. (Jia et al., 2025; Nazio et al., 2019). Assim, a interface entre autofagia e *stemness* constitui eixo funcional relevante para progressão tumoral e resistência terapêutica (Jia et al., 2025; Li et al., 2023; Niharika; Garg, 2024).

### **1.5.2. Carga mutacional tumoral (TMB)**

O TMB corresponde ao número total de mutações somáticas acumuladas no genoma tumoral e é amplamente reconhecida como um biomarcador indireto de imunogenicidade (Addeo et al., 2021). Tumores com alta TMB tendem a apresentar maior diversidade de neoantígenos, o que favorece o reconhecimento imunológico e está

associado a melhores respostas a terapias baseadas em bloqueio de checkpoints imunológicos (Addeo *et al.*, 2021).

Entretanto, a autofagia pode modular esse cenário ao atuar como mecanismo adaptativo associado ao escape imune, influenciando a imunogenicidade tumoral e processos relacionados ao processamento e à apresentação antigênica, com potencial impacto sobre a eficácia da resposta imune citotóxica (Poillet-Perez *et al.*, 2020). Assim, a interação entre TMB e autofagia reforça o interesse na modulação dessa via como estratégia combinatória em contextos de alta carga mutacional (Poillet-Perez *et al.*, 2020).

### **1.5.3. Instabilidade de microssatélites (MSI)**

A instabilidade de microssatélites (MSI) reflete deficiências no sistema de reparo de erros de pareamento do DNA (*mismatch repair* – MMR), resultando em acúmulo de mutações e aumento da carga neoantigênica tumoral (Ballhausen *et al.*, 2020; Cohen *et al.*, 2019). Tumores com alto grau de MSI, como os de cólon, endométrio e estômago, apresentam, em geral, maior imunogenicidade e melhor resposta a imunoterapias baseadas em inibidores de *checkpoint* imunológico (Cohen *et al.*, 2019; Sahin *et al.*, 2019; Yamamoto, Hiroyuki *et al.*, 2020).

Evidências indicam que, em um contexto de elevada instabilidade genômica dMMR/MSI-H, a autofagia pode atuar como via adaptativa de sobrevivência celular ao remover componentes celulares danificados gerados por alta taxa mutacional, favorecendo viabilidade sob estresse, inclusive quimioterápico (Mathew *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022). Assim, tumores dMMR podem exibir dependência funcional da autofagia, tornando-a alvo promissor para terapêuticas combinadas (Tsai *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

## **1.6. Imunologia tumoral**

O sistema imunológico desempenha papel central na vigilância contra o câncer, sendo capaz de reconhecer e eliminar células transformadas antes que estas evoluam para tumores clinicamente detectáveis (Sandoval-Valencia, 2019; Wang *et al.*, 2025). No entanto, ao longo da progressão tumoral, as células neoplásicas podem adquirir múltiplos mecanismos de evasão imune, permitindo sua sobrevivência, expansão clonal e disseminação (Sandoval-Valencia, 2019). Esse processo resulta do equilíbrio dinâmico

entre respostas imunes antitumorais e estratégias de escape imunológico desenvolvidas pelas células tumorais (Tufail; Jiang; Li, 2025). Essas interações ocorrem em um ecossistema altamente complexo conhecido como microambiente tumoral (*tumor microenvironment* – TME), composto por células imunes, células estromais, componentes endoteliais e matriz extracelular (Li, Zhengrui *et al.*, 2024; Petitprez *et al.*, 2018). Além disso, a composição e o estado funcional do TME exercem influência direta sobre o crescimento tumoral, a progressão da doença e a resposta a terapias, especialmente aquelas baseadas na ativação do sistema imunológico (Li, Zhengrui *et al.*, 2024; Petitprez *et al.*, 2018).

No contexto da autofagia, essa interface é particularmente relevante porque a autofagia pode modular a imunidade tumoral de forma contexto-dependente. Em determinadas condições, pode favorecer processos ligados à imunogenicidade e à ativação imune; em outras, pode sustentar a sobrevivência tumoral e de populações imunossupressoras, reduzindo a eficácia de respostas citotóxicas e favorecendo tolerância imune (Bustos *et al.*, 2020; Duan *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2023; Jiang; Li, 2025). Dessa forma, considerar o TME e o estado funcional da resposta imune fornece um enquadramento biológico essencial para interpretar como assinaturas multiômicas associadas à autofagia se relacionam ao prognóstico e ao potencial terapêutico.

### **1.6.1. Microambiente tumoral (TME)**

O TME desempenha papel determinante na biologia do câncer, modulando o crescimento, a progressão e a resposta terapêutica. Trata-se de um sistema complexo composto por células imunes, estromais, endoteliais e componentes da matriz extracelular, que interagem dinamicamente com as células neoplásicas (Tufail; Jiang; Li, 2025). De forma geral, sua composição pode refletir um microambiente predominantemente antitumoral, com resposta imune ativa e citotoxicidade, ou pró-tumoral, com predomínio de mecanismos imunossupressores e ambiente permissivo ao crescimento tumoral; em alguns casos, essas dinâmicas coexistem, configurando perfis mistos/duais (Kim *et al.*, 2025; Petitprez *et al.*, 2020; Rodrigues de Souza *et al.*, 2025). Dessa forma, o TME emerge como componente essencial na compreensão dos mecanismos pelos quais processos biológicos, como a autofagia, modulam o equilíbrio entre vigilância imunológica e progressão neoplásica (Bustos *et al.*, 2020; Galluzzi *et al.*, 2015).

### 1.6.2. Perfil imunológico tumoral

O perfil imunológico tumoral complementa a análise do TME ao descrever o estado funcional da resposta imune presente no tumor (Thorsson *et al.*, 2018). Com base no padrão de infiltração de células efetoras e imunossupressoras, os tumores podem ser classificados em quentes (*hot*), frios (*cold*) ou variáveis (*variable*) (Sang *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2024).

- Tumores quentes apresentam intensa infiltração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, células NK ativadas e outras populações pró-inflamatórias, sendo geralmente mais responsivos à imunoterapia (Sang *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2024).
- Tumores frios exibem baixa atividade imune, predominância de macrófagos M2 e linfócitos T reguladores (Tregs), refletindo um estado imunossupressor e resistência a terapias baseadas em ativação imune (Sang *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2024).
- Tumores variáveis apresentam características intermediárias, combinando elementos inflamatórios e supressores, o que indica um microambiente tumoral imunologicamente heterogêneo (Sang *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2024).

Essa classificação permite avaliar como assinaturas multiômicas — incluindo aquelas relacionadas à autofagia — se associam a estados imunes distintos, impactando a sensibilidade terapêutica e o prognóstico clínico dos pacientes (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025). Dessa forma, a análise integrada entre autofagia, TME e perfil imune contribui para identificar mecanismos de imunomodulação tumoral e potenciais alvos terapêuticos.

### 1.7. Análise de sobrevida

A análise de sobrevida constitui uma etapa fundamental para investigar a relevância clínica de assinaturas moleculares no câncer, permitindo identificar como as alterações em diferentes camadas ômicas se associam a maior ou menor risco de morte dos pacientes (Andrade, 2023; George; Seals; Aban, 2014). Entre os métodos utilizados, podemos ressaltar o estimador de Kaplan-Meier, o qual possibilita visualizar diferenças na probabilidade de sobrevida ao longo do tempo entre grupos estratificados pela expressão de cada assinatura (Lee, 2023). Essa abordagem não apenas evidencia contrastes prognósticos entre perfis moleculares distintos, mas também auxilia na identificação de assinaturas com potencial impacto biológico relevante (Nazio *et al.*, 2019; Stel *et al.*, 2011). Adicionalmente, o modelo de Regressão de Cox quantifica o

efeito relativo dessas assinaturas sobre o risco de óbito por meio do cálculo do *hazard ratio*, permitindo avaliar se a expressão molecular se associa a maior agressividade tumoral ou a desfechos mais favoráveis (Stel *et al.*, 2011). A integração entre Kaplan-Meier e Cox oferece um arcabouço robusto para interpretar o papel prognóstico de mecanismos biológicos, como a autofagia, no contexto clínico. Dessa forma, a incorporação dessas análises ao estudo multiômico contribui para revelar assinaturas potencialmente úteis na estratificação de pacientes e no direcionamento de estratégias terapêuticas mais precisas (Andrade *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2023).

### **1.8. Integração de bancos de dados e abordagem pan-câncer**

A crescente disponibilidade de grandes bases de dados oncológicos tem possibilitado a realização de análises integrativas em larga escala, permitindo a investigação sistemática de alterações moleculares e clínicas em diferentes tipos tumorais (Aaltonen *et al.*, 2020). Iniciativas como TCGA e GTEx disponibilizam dados multiômicos padronizados, associados a informações clínicas detalhadas, constituindo recursos fundamentais para estudos translacionais em oncologia (Lonsdale *et al.*, 2013; Weinstein *et al.*, 2013). A integração dessas bases de dados permite superar limitações inerentes a análises restritas a um único tipo tumoral, possibilitando a identificação de padrões moleculares compartilhados ou específicos entre diferentes neoplasias (Aaltonen *et al.*, 2020). No contexto da autofagia, essa abordagem é particularmente relevante, uma vez que a dependência funcional dessa via pode variar substancialmente entre tecidos, estágios tumorais e contextos moleculares distintos (Aaltonen *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2025). Assim, a análise pan-câncer fornece um arcabouço comparativo robusto para investigar a heterogeneidade biológica da autofagia e sua associação com fenótipos clínicos e imunológicos (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025).

Além disso, a integração entre dados tumorais provenientes do TCGA e tecidos normais provenientes do GTEx possibilita a avaliação sistemática de diferenças de expressão gênica entre condições fisiológicas e patológicas, contribuindo para a identificação de assinaturas moleculares específicas do câncer (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025; Yuan *et al.*, 2025). Essa comparação é essencial para distinguir alterações associadas à transformação neoplásica de variações relacionadas ao tecido de origem ou à homeostase celular (Aaltonen *et al.*, 2020; Rodrigues de Souza *et al.*, 2025).

Entretanto, a complexidade e o volume desses conjuntos de dados impõem desafios analíticos significativos, exigindo estratégias computacionais capazes de integrar múltiplas camadas ômicas, variáveis fenotípicas e informações clínicas de forma padronizada (Catalano *et al.*, 2025; Rodrigues de Souza *et al.*, 2025). Nesse cenário, abordagens baseadas em pipelines integrativos e sistemas de nomenclatura consistentes tornam-se fundamentais para garantir reprodutibilidade, comparabilidade e interpretação biológica dos resultados obtidos (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025).

Dessa forma, a adoção de uma abordagem pan-câncer integrada, fundamentada na combinação de múltiplas bases de dados e camadas de informação, permite a identificação de assinaturas multiômicas associadas à autofagia com relevância prognóstica e imunológica. Essa estratégia fornece uma base conceitual sólida para compreender o papel da autofagia na heterogeneidade tumoral e para explorar seu potencial como eixo biomolecular na estratificação de pacientes e no desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais precisas.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo principal deste estudo foi avaliar assinaturas moleculares relacionadas à autofagia no câncer por meio da integração de dados multiômicos e variáveis fenotípicas, incluindo potencial estaminal (*stemness*), carga mutacional tumoral (*tumor mutational burden* – TMB) e instabilidade de microssatélites (*microsatellite instability* – MSI). Além disso, buscou-se investigar sua correlação com o microambiente tumoral, o perfil imunológico e o prognóstico de pacientes.

### **2.1. Objetivos específicos**

1. Obter e caracterizar assinaturas multiômicas relacionadas à autofagia a partir de diferentes camadas biológicas, como expressão de mRNA, isoformas de transcritos, miRNAs, proteínas, mutações somáticas, variações no número de cópias gênicas (CNVs) e metilação do DNA.
2. Avaliar a correlação entre as assinaturas multiômicas relacionadas à autofagia e variáveis fenotípicas tumorais, incluindo potencial estaminal (*stemness*), carga mutacional tumoral (TMB) e instabilidade de microssatélites (MSI).
3. Investigar a correlação entre as assinaturas multiômicas e o microambiente tumoral (TME) por meio da inferência computacional de infiltrados imunológicos, utilizando ferramentas como CIBERSORT e xCell.

4. Classificar o perfil imunológico tumoral (*hot*, *cold* ou *variable*) com base nos padrões de infiltração celular e determinar sua correlação com assinaturas moleculares relacionadas à autofagia.
5. Avaliar o valor prognóstico das assinaturas multiômicas por meio de análises de sobrevivência, incluindo curvas de Kaplan–Meier e modelos de regressão de Cox, identificando assinaturas correlacionadas a diferenças no risco de eventos clínicos.
6. Integrar dados multiômicos, fenotípicos, imunológicos e prognósticos em uma abordagem pan-câncer, para compreender a relação da autofagia com heterogeneidade tumoral, à modulação do microambiente tumoral e à progressão do câncer.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Bancos de dados de genes associados à autofagia

Para identificação de genes associados à autofagia foi realizada a consolidação de quatro bancos de dados com as fontes e descrições:

- **Molecular Signatures Database v2023.1. Hs (MSigDB):** recurso que reúne conjuntos de genes anotados para análises de enriquecimento gênico. Foram utilizados os módulos *Curated Gene Sets* (C2) e *Oncology Gene Sets* (C5) para a obtenção de genes associados à autofagia (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>).
- **National Center for Biotechnology Information (NCBI):** por meio do filtro “Genes”, utilizaram-se os termos “*autophagy-related genes*” e “*Homo sapiens*” para identificar genes associados à autofagia (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- **Human Autophagy Database (HADb):** base especializada que disponibiliza uma lista curada de genes e proteínas envolvidas no processo de autofagia em humanos (<http://autophagy.lu/clustering/index.html>).
- **GeneCards:** banco de dados abrangente de genes humanos, consultado com os filtros “*Autophagy*” e “*Cancer*” na seção *Pathways*, considerando as categorias *Protein Coding*, *RNA Gene*, *Genetic Locus* e *Gene Cluster* (<https://www.genecards.org/>).

Para enriquecer a anotação dos genes identificados, utilizou-se o pacote `rentrez` para extrair, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), os seguintes

metadados: *uid*, *name*, *description*, *otheraliases*, *chromosome*, *chrstart*, *chrstop*, *maplocation* e *summary*. De forma complementar, os genes foram mapeados no banco *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), possibilitando a identificação das vias metabólicas e de sinalização às quais estavam associados. Essa etapa teve caráter descritivo e de anotação funcional, contribuindo para contextualizar biologicamente os genes integrados e subsidiar as interpretações realizadas nas etapas analíticas subsequentes.

### **3.2. Validação dos genes e identificação de *aliases***

A avaliação dos genes relacionados à autofagia foi conduzida por meio de scripts personalizados no ambiente RStudio, utilizando a plataforma UCSCXenaShiny (Wang *et al.*, 2022), integrada ao UCSC Xena Browser (Goldman *et al.*, 2020) (<https://xena.ucsc.edu/>). As análises foram conduzidas com dados provenientes dos bancos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (Weinstein *et al.*, 2013) (<https://www.cancer.gov/tcga>) e o *Genotype-Tissue Expression* (GTEx) (Lonsdale *et al.*, 2013) (<https://www.gtexportal.org/home/>).

Inicialmente, os símbolos gênicos obtidos na etapa anterior foram avaliados quanto ao seu reconhecimento nas matrizes de dados do TCGA e GTEx (Li, Shensuo *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2022). Essa abordagem resultou em duas listas com informações gênicas: genes identificados e genes não identificados. Para os genes não identificados, foram realizadas buscas por *aliases* por meio da API do NCBI. Os *aliases* obtidos foram testados individualmente, e aqueles que apresentaram correspondência válida foram incorporados à lista de genes identificados. Posteriormente, foi realizada a remoção de duplicatas, resultando em uma lista final consolidada de genes para as análises subsequentes.

### **3.3. Mapeamento de Identificadores: miRNAs maduros e isoformas de transcritos**

A integração multiômica exigiu a harmonização de identificadores, pois as matrizes utilizadas apresentam diferentes níveis de anotação (gene, transcrito e miRNA maduro). Neste trabalho, a lista final foi definida inicialmente no nível gênico e utilizada como referência para derivar os identificadores requeridos por cada camada. Dessa forma, foi possível compatibilizar a seleção de elementos com o formato de anotação de cada matriz analisada.

Para a camada de miRNA, os símbolos gênicos com prefixo “MIR” foram inicialmente separados, por representarem loci codificadores de microRNAs. Esses símbolos foram convertidos em identificadores de precursores (pré-miRNA) utilizando o pacote BioMart e posteriormente convertidos em microRNAs maduros (5p e 3p) por meio do pacote `miRBaseConverter` em ambiente R. Essa etapa foi necessária, pois os dados de expressão de miRNA disponibilizados pelo TCGA/UCSC Xena são reportados predominantemente no nível de miRNA maduro.

As informações referentes às isoformas de transcritos foram obtidas a partir da plataforma *Ensembl* (<https://www.ensembl.org>), por meio do pacote BioMart, permitindo o mapeamento dos símbolos gênicos para *Transcript IDs* e a padronização da nomenclatura necessária para integrar a lista de elementos às matrizes anotadas no nível de transcrito.

### **3.4. Análise de correlações entre as camadas ômicas e as variáveis fenotípicas tumorais**

As correlações entre camadas ômicas e variáveis fenotípicas tumorais foram avaliadas por meio de análises estatísticas conduzidas em ambiente R, utilizando dados extraídos do TCGA via UCSCXenaShiny, em uma abordagem iterativa em 33 tipos de câncer. As camadas ômicas analisadas incluíram expressão de mRNA, isoformas de transcritos, miRNA, metilação de sítios CpG, variações no número de cópias gênicas (CNVs), mutações somáticas e expressão proteica (RPPA). As variáveis fenotípicas consideradas nessa etapa incluíram TMB, MSI e *stemness*.

As correlações foram realizadas em escala *genome-wide*, e os resultados foram interpretados considerando a direção das associações (correlação positiva ou negativa). Para controle do erro associado ao grande número de testes simultâneos, foi aplicada correção para múltiplas comparações pelo método de *false discovery rate* (FDR), segundo o procedimento de *Benjamini–Hochberg*, adotando-se como critério de significância  $p$  ajustado ( $padj$ )  $< 0,05$ , conforme descrito no artigo de referência (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025).

### **3.5. Análise do nível de expressão**

A análise do nível de expressão foi realizada por meio do teste não paramétrico de WilCoxon, utilizando dados bulk RNA-seq provenientes do TCGA e tecidos do GTEx.

Para cada gene e tipo tumoral, a comparação entre os grupos tumoral e não tumoral foi conduzida no ambiente R por meio do pacote UCSCXenaShiny, utilizando a função `vis_toil_TvsN_cancer`, com base na comparação das medianas de expressão entre os grupos (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025). Os genes com valores de  $p$  ajustado ( $p_{adj}$ )  $\geq 0,05$  foram classificados como não alterados. Genes com  $p_{adj} < 0,05$  foram classificados como superexpressos quando apresentaram maior mediana de expressão no tecido tumoral, ou como subexpressos quando apresentaram menor mediana no tumor em relação ao tecido normal. Nos casos em que não houve retorno de dados válidos, os genes foram categorizados como não significativos.

### 3.6. Análise de sobrevida

A avaliação prognóstica foi realizada por meio de análises de sobrevida, combinando a estimação de risco por regressão de Cox proporcional de riscos e a visualização e comparação de curvas por Kaplan-Meier, com foco em quatro desfechos clínicos:

- **Sobrevida Global (OS) (*Overall Survival*):** tempo desde o diagnóstico até o óbito por qualquer causa, refletindo a mortalidade total.
- **Sobrevida Específica da Doença (DSS) (*Disease-Specific Survival*):** tempo até o óbito atribuído especificamente ao câncer em estudo, representando uma medida mais direcionada do impacto da doença-alvo.
- **Intervalo Livre de Doença (DFI) (*Disease-Free Interval*):** período após o tratamento durante o qual o paciente permanece livre de recorrência ou sinais da doença.
- **Intervalo Livre de Progressão (PFI) (*Progression-Free Interval*):** duração do tempo em que a doença não apresenta progressão ou agravamento clínico.

### 3.7. Regressão de Cox

As análises foram conduzidas de forma univariada para cada variável ômica. Posteriormente, os resultados prognósticos dessas análises foram integrados no processo de construção e anotação das assinaturas multiômicas, obtendo-se o *hazard ratio* (HR) como medida de risco relativo ao longo do tempo. As análises foram executadas em ambiente R com suporte do UCSCXenaShiny, por rotinas derivadas de funções como `vis_uniCox_tree`, que retornam os parâmetros do modelo e o  $p$ -valor para cada candidato, camada ômica e tipo tumoral (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025).

Adotou-se  $p < 0,05$  (não ajustado) como critério de significância, em consonância com a abordagem exploratória de descoberta. A direção do efeito foi interpretada a partir do  $\log(\text{HR})$ , sendo classificada como risco quando  $\log(\text{HR}) > 0$ , proteção quando  $\log(\text{HR}) < 0$ , e não significativa (NS) quando  $p \geq 0,05$ .

Para síntese por assinatura, os resultados de OS, DSS, DFI e PFI foram integrados em um rótulo consolidado: (i) risco nas quatro métricas; (ii) proteção nas quatro; (iii) risco em pelo menos uma métrica sem proteção em nenhuma; (iv) proteção em pelo menos uma sem risco em nenhuma; (v) padrão misto (risco e proteção em métricas distintas); e (vi) NS quando nenhuma métrica foi significativa. Casos sem informação em uma ou mais métricas foram registrados como sem dados.

### 3.8. Kaplan–Meier e teste log-rank

As associações prognósticas foram avaliadas por curvas de Kaplan–Meier e teste log-rank, construídas separadamente para os desfechos OS, DSS, DFI e PFI. A significância foi interpretada com  $p < 0,05$  (não ajustado), classificando-se como NS quando  $p \geq 0,05$ . A estratificação dos pacientes seguiu a natureza da variável: *High vs Low* para camadas contínuas (expressão, metilação e RPPA), MT vs WT para mutações somáticas e categorias de CNV (Normal, Deletado ou Duplicado), conforme parâmetros de execução específicos (por exemplo, `cutoff_mode` e `cnv_type`).

A implementação foi realizada em ambiente R com o uso do pacote UCSCXenaShiny, utilizando funções para obtenção dos dados clínicos e geração das curvas (por exemplo, `tcga_surv_get` e `tcga_surv_plot`) com execução em lote por candidato, camada ômica e tipo tumoral (por exemplo, `perform_survival_analysis`). O grupo de pior prognóstico foi definido como aquele com menor probabilidade de sobrevida ao longo do tempo (curva inferior), registrado nas saídas do tipo `worst_prognosis_group`.

### 3.9. Classificação do perfil do microambiente tumoral

A classificação do perfil do microambiente tumoral (TME) foi baseada em estimativas de infiltrados celulares inferidas por deconvolução de dados de expressão gênica em *bulk*, empregando os métodos CIBERSORT e xCell disponibilizados via UCSCXenaShiny, considerando 29 subconjuntos celulares representativos do microambiente tumoral (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025). Nessa etapa, foram utilizados scores ou abundâncias estimadas de infiltrado celular, interpretadas como *proxies* de

presença celular no TME, e não a expressão gênica comparativa entre tecido tumoral e não tumoral.

Foram calculadas as correlações de *Spearman* entre as variáveis ômicas/assinaturas e os scores de infiltrado celular. O contraste tumor versus não-tumor foi utilizado exclusivamente para classificar cada variável ou assinatura como superexpressa, subexpressa ou inalterada, servindo como contexto para a interpretação do sinal das correlações. Assim, para assinaturas superexpressas, uma correlação positiva indica maior presença de infiltrado celular, ao passo que uma correlação negativa indica menor presença. Em contrapartida, essa interpretação é inversa para assinaturas subexpressas e, nos casos de assinaturas inalteradas, a correlação positiva sugere presença de infiltrado, enquanto a negativa indica sua ausência.

Por fim, os coeficientes de correlação estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ; não ajustado; NS quando  $p \geq 0,05$ ) foram combinados por grupos funcionais de células infiltradas, permitindo classificar o perfil predominante associado à assinatura como antitumoral, pró-tumoral ou dual, conforme o balanço funcional das associações observadas.

### **3.10. Classificação do fenótipo imunológico do tumor**

A classificação do fenótipo imunológico tumoral (*Tumor Immune Contexture – TIC*) foi realizada com o objetivo de categorizar os tumores como hot, cold ou variable, com base no padrão de correlação entre as variáveis ômicas ou assinaturas e os escores de infiltrados imunes estimados a partir de dados de RNA-seq em bulk, utilizados como *proxies* de presença e atividade imune no tumor, e não por critérios histológicos diretos.

Essa classificação considerou correlações compatíveis com maior infiltração ou atividade de efetores citotóxicos — principalmente linfócitos T CD8+ e células NK, além de perfis associados a macrófagos M1 — para a definição do fenótipo “hot”. Por outro lado, maior correlação com componentes imunossupressores, como macrófagos M2 e células T regulatórias (Tregs), foi utilizada para caracterizar o fenótipo “cold”, enquanto a “Variable” representa padrões intermediários ou heterogêneos de infiltrados imunes. Em situações ambíguas, a definição do fenótipo priorizou a contribuição de CD8+ e NK, conforme descrito no estudo de (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025). A significância das associações foi interpretada com base em  $p < 0,05$ , sendo classificadas como não

significativas (NS) quando  $p \geq 0,05$ , em consonância com o critério adotado para análises fenotípicas não tratadas como *genome-wide*.

### 3.11. Criação de assinaturas multiômicas

Após as análises individuais por camada ômica, os resultados foram integrados por um algoritmo implementado em ambiente R (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025) para agrupar candidatos em assinaturas, com base em padrões convergentes de associação. Cada assinatura foi construída de forma mono-ômica e multi-fenotípica, preservando a identidade da camada molecular de origem, enquanto integrava múltiplas informações fenotípicas e clínicas.

O agrupamento considerou, de forma simultânea e obrigatória: (i) a camada ômica de origem; (ii) o(s) tipo(s) de câncer em que as associações foram identificadas; (iii) a direção do contraste tumor versus tecido não tumoral; (iv) a correlação com variáveis fenotípicas tumorais (por exemplo, TMB, MSI ou *stemness*); (v) o comportamento prognóstico consistente nas métricas de sobrevida OS, DSS, DFI e PFI, avaliadas por regressão de Cox e por Kaplan–Meier/log-rank; e (vi) a anotação do perfil do microambiente tumoral (TME) e do fenótipo imunológico predominante. Como critério ilustrativo de agrupamento, dois genes só poderiam compor uma mesma assinatura se apresentassem padrões convergentes no mesmo contexto tumoral e ômico. Por exemplo, em adenocarcinoma de pulmão (LUAD), ambos devem pertencer à mesma camada ômica (como mRNA), ser superexpressos no tecido tumoral em relação ao não tumoral e exibir correlação positiva com a variável fenotípica TMB.

Adicionalmente, os candidatos devem apresentar direção prognóstica concordante nas análises de sobrevida, indicando consistentemente efeito protetor nos desfechos OS, DSS, DFI e PFI no modelo de Cox, com suporte correspondente nas curvas de Kaplan–Meier/log-rank, de modo que níveis elevados da variável ômica estejam correlacionados a maior probabilidade de sobrevida em todas as métricas avaliadas. Por fim, a assinatura pode ser anotada quanto ao perfil do microambiente tumoral, como antitumoral, e ao fenótipo imunológico, como “quente”, reforçando a consistência entre o padrão molecular, o prognóstico clínico e o contexto imunológico associado.

### 3.12. Reanálise das assinaturas

Para avaliar a robustez e a consistência interna dos resultados obtidos, as assinaturas foram novamente submetidas às etapas analíticas previamente descritas, desta vez de forma estratificada pelos tipos tumorais aos quais estavam associadas. Essa reanálise teve como objetivo verificar se os padrões observados se mantinham de maneira estável dentro de cada contexto tumoral específico. A reavaliação incluiu a confirmação dos padrões de correlação previamente identificados, bem como a verificação da estabilidade das correlações fenotípicas e prognósticas. Adicionalmente, o impacto prognóstico das assinaturas foi novamente estimado por meio de modelos de regressão de Cox proporcional de riscos e de análises de sobrevida baseadas em curvas de Kaplan–Meier e teste log-rank.

Dessa forma, buscou-se assegurar que os efeitos atribuídos às assinaturas não fossem dependentes de agregações pan-câncer, mas permanecessem consistentes e reproduzíveis quando avaliados em seus respectivos contextos tumorais, em consonância com a abordagem metodológica descrita no estudo de referência (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025).

### 3.13. Nomenclatura das assinaturas

Para facilitar a interpretação e a rastreabilidade dos resultados obtidos, foi desenvolvido um sistema de nomenclatura alfanumérico que organiza e codifica, de forma integrada, as características moleculares, fenotípicas e clínicas associadas às assinaturas identificadas (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025).

Esse sistema é composto por 10 elementos concatenados, organizados na seguinte estrutura: CTAB-GSI.GFC.PFC.SCS.TNC.HRC.SMC.TMC.TIC, em que cada componente corresponde a:

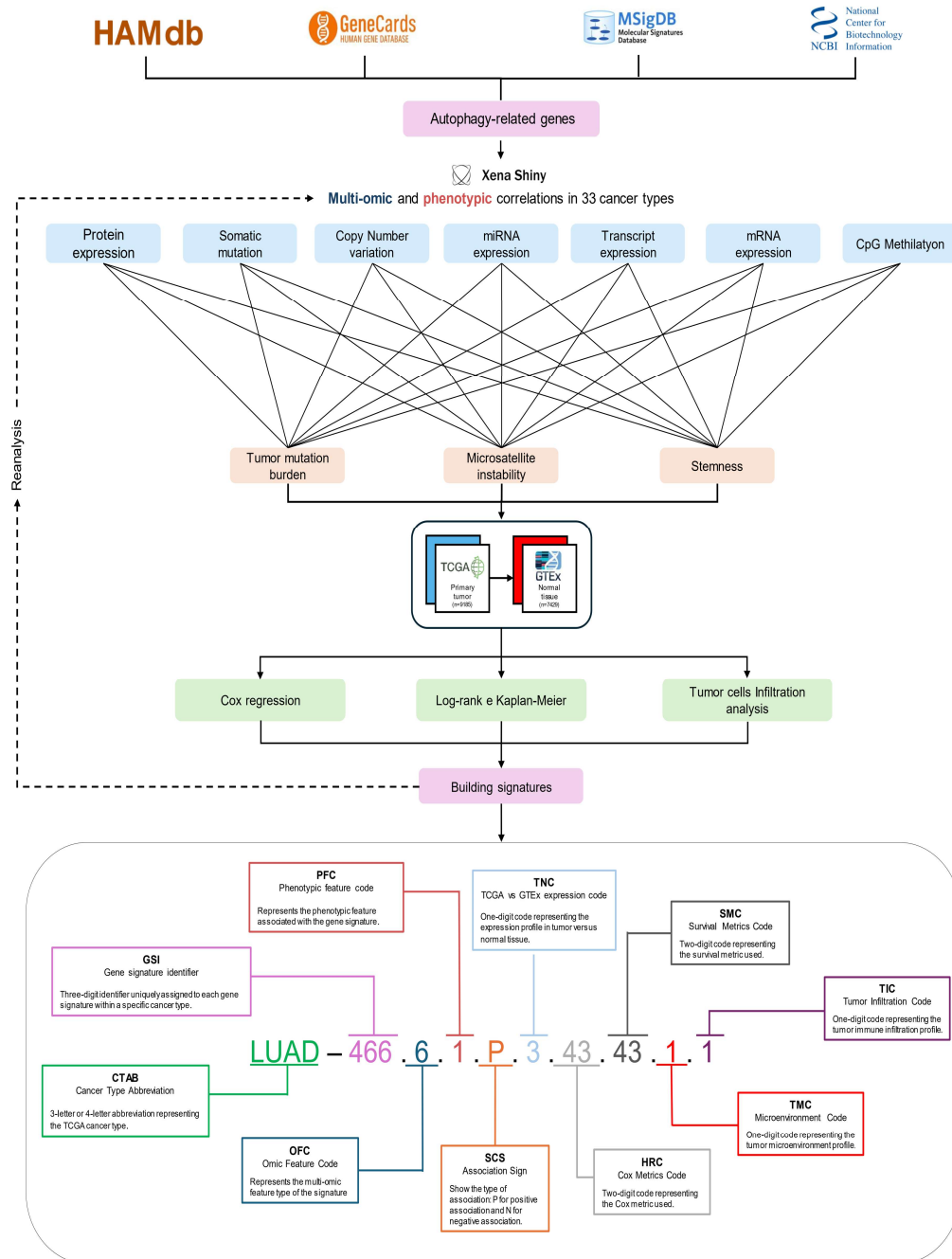
- **CTAB**: abreviação de três ou quatro letras que identifica o tipo tumoral segundo a classificação do banco de dados TCGA;
- **GSI** (*Gene Signature Identifier*): identificador numérico exclusivo da assinatura dentro de cada tipo tumoral;
- **GFC** (*Genomic Feature Contexture*): especifica a camada ômica da assinatura, sendo atribuídos códigos numéricos distintos: 1 para expressão proteica, 2 para mutações, 3 para CNV, 4 para expressão de miRNA, 5 para expressão de isoformas de transcritos, 6 para expressão de mRNA e 7 para metilação CpG;

- **PFC** (*Phenotypic Feature Contexture*): representa a característica fenotípica associada, com codificação numérica de 1 para TMB, 2 para MSI e 3 para *stemness*;
- **SCS** (*Spearman Correlation Sign*): indica o sinal da correlação de Spearman, sendo “P” para correlação positiva e “N” para correlação negativa;
- **TNC** (*Tumor vs Normal Contexture*): refere-se à expressão em tecido tumoral em comparação ao tecido não tumoral, sendo classificada como 0 para ausência de dados, 1 para expressão inalterada, 2 para hipoexpressa e 3 para hiperexpressa;
- **HRC** (*Hazard Ratio Contexture*): utiliza a notação alfanumérica 1N2N3N4N, em que cada dígito corresponde a um desfecho de sobrevida (DSS, DFI, PFI e OS) e as letras indicam a direção da associação: A para ausência de efeito, B para risco e C para proteção;
- **SMC** (*Survival Metric Contexture*): segue a mesma notação 1N2N3N4N, porém sua categorização varia conforme a camada ômica. Para proteínas, transcritos, mRNA e metilação, B indica *High* e C indica *LOW*; para mutações, B corresponde a *mutant* (MT) e C a *wild-type* (WT); para CNV, B indica *deleted*, C indica *duplicated* e D representa o estado combinado *deleted/duplicated*. Na ausência de significância estatística, todos os campos recebem a letra A.

Existem 105 combinações possíveis para HRC e SMC, e cada uma foi reclassificada com um identificador numérico entre 0 e 104 ([Tabela suplementar 1](#));

- **TMC** (*Tumor Microenvironment Contexture*): classifica o perfil do microambiente tumoral como 1 para antitumoral, 2 para dual, 3 para pró-tumoral e 4 para ausência de significância;
- **TIC** (*Tumor Immune Contexture*): descreve o fenótipo imunológico tumoral, sendo atribuído 1 para tumores “quentes”, 2 para “variáveis”, 3 para “frios” e 4 para ausência de significância.

Esse sistema de nomenclatura estruturado assegura a rastreabilidade e a padronização das assinaturas multiômicas, permitindo a rápida identificação de suas características moleculares, fenotípicas e clínicas em diferentes contextos tumorais.



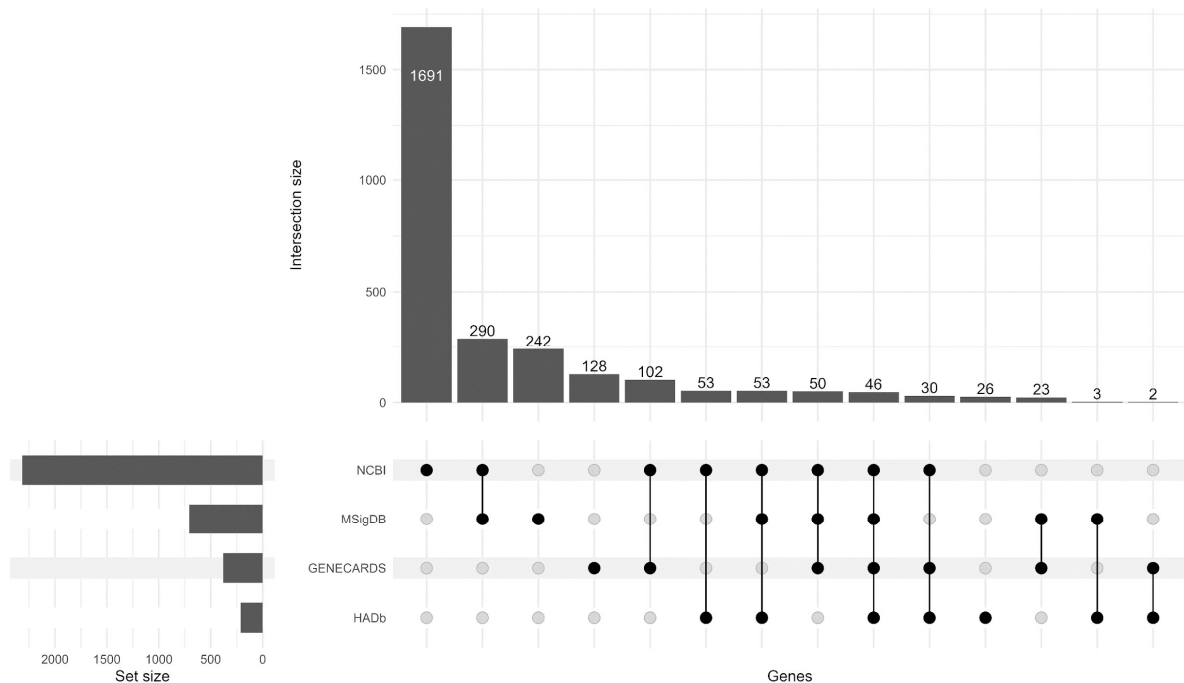
**Figura 2. Fluxograma da metodologia desenvolvida no estudo.** Representação esquemática da metodologia aplicada, na qual foram utilizados dados do The Cancer Genome Atlas (TCGA) e do Genotype-Tissue Expression (GTEx) para a comparação entre tecidos tumorais e normais. A relevância clínica foi avaliada por meio de análises estatísticas, incluindo regressão de Cox e testes de log-rank de Kaplan–Meier. Os genes relacionados à autofagia foram obtidos a partir de quatro bases de dados e analisados por meio da plataforma UCSC XenaShiny. Sete camadas ômicas foram integradas a três fenótipos tumorais, além da realização de análises de infiltração imune. Ao final, foram construídas assinaturas moleculares, estabelecendo-se um sistema padronizado para a identificação e a pontuação de assinaturas associadas ao prognóstico.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Consolidação dos dados

A validação dos genes nas plataformas do UCSC Xena resultou em uma alta taxa de reconhecimento entre os bancos de dados utilizados neste estudo. No HADb, dos 221 genes inicialmente identificados, 211 foram validados, dos quais 26 eram exclusivos desse banco. O MSigDB apresentou 707 genes, com 685 validados e 242 exclusivos. No GeneCards, todos os 381 genes foram validados, sendo 128 exclusivos. Já na busca realizada no NCBI, foram identificados 2.358 genes, dos quais 2.248 foram validados e 1.641 considerados exclusivos (Figura 3).

Após a integração e remoção de duplicatas entre as bases, obteve-se uma lista final composta por 2.739 genes validados associados à autofagia, enriquecida com anotações funcionais provenientes do NCBI e do KEGG, que serviram como referência para as análises subsequentes.



**Figura 3. Distribuição e interseção dos genes associados à autofagia entre diferentes bases de dados.** O gráfico apresenta a análise de interseção entre quatro bases de dados utilizadas para a identificação de genes associados à autofagia: HADb, GeneCards, MSigDB e NCBI. As barras horizontais à esquerda (*Set Size*) indicam o número total de genes identificados em cada base individualmente. As barras verticais superiores (*Intersection Size*) representam a quantidade de genes compartilhados entre combinações específicas das bases, conforme indicado pelos pontos pretos conectados nas linhas inferiores. O gráfico evidencia tanto a sobreposição quanto a exclusividade dos genes relacionados à autofagia entre as diferentes bases de dados.

A partir da lista consolidada de genes relacionados à autofagia, foram realizadas etapas exploratórias para identificar e estruturar as diferentes camadas ômicas associadas. Na camada proteômica (RPPA), 186 genes apresentaram medida correspondente e, por isso, foram incluídos nas análises em nível de proteína. Para a camada de miRNA, foram identificados 381 miRNAs maduros ([Tabela suplementar 2](#)), e, para a camada de transcritos, foram obtidas 32.551 isoformas ([Tabela suplementar 3](#)). Esses elementos foram posteriormente avaliados em 33 tipos tumorais do TCGA, que reúne dados de experimentos de RNA-seq de aproximadamente 11.093 pacientes.

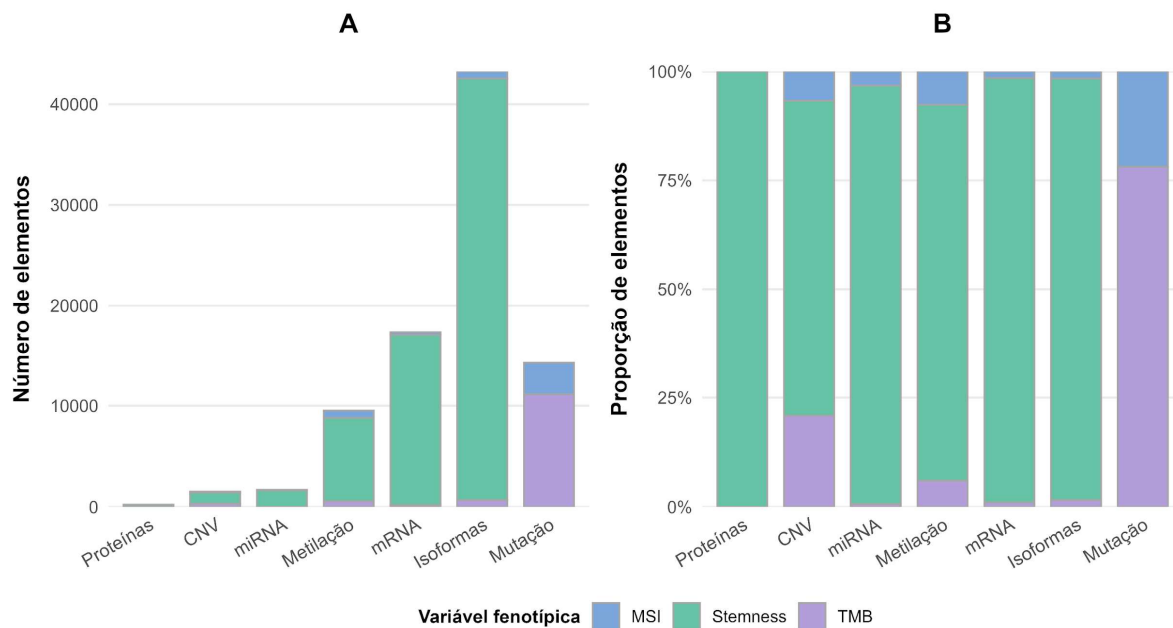
## 4.2. Análise individual

Nesta etapa, foram identificados 87.375 elementos moleculares, distribuídos nas sete camadas ômicas analisadas: proteínas (n = 261), CNV (n = 1.505), miRNAs (n = 1.683), metilação (n = 9.535), mRNA (n = 17.270), isoformas de transcritos (n = 42.847) e mutações (n = 14.274), abrangendo 32 tipos tumorais do TCGA. Dos 33 tipos tumorais inicialmente considerados, o Linfoma Difuso de Grandes Células B (DLBC) não apresentou resultados válidos nesta etapa e, por isso, não foi incluído na contabilização final. Em termos proporcionais, essas camadas representaram, respectivamente, 0,30%, 1,72%, 1,93%, 10,91%, 19,77%, 49,04% e 16,34% do total de elementos. Esse total reflete ocorrências (elemento molecular × tipo tumoral), de modo que um mesmo elemento pode ser contabilizado em mais de um tipo tumoral quando apresenta associação em diferentes tumores ([Tabela suplementar 4](#)).

### 4.2.1. Camadas ômicas e variáveis fenotípicas

Na análise de correlação entre as sete camadas ômicas (proteínas, CNV, miRNA, metilação, mRNA, isoformas de transcritos e mutações) e as variáveis fenotípicas tumorais, a categoria *stemness* concentrou o maior número de correlações significativas (n = 69.524), totalizando 261 (0,38%) ocorrências de correlação significativa com proteínas, 1.090 (1,57%) com CNV, 1.617 (2,33%) com miRNAs, 8.238 (11,85%) com metilação, 16.836 (24,22%) com expressão de mRNA e 41.482 (59,67%) com isoformas de transcritos; para *stemness*, a camada de mutações não apresentou correlações significativas. Para TMB (n = 12.883), foram observadas correlações significativas de 314 (2,44%) com CNV, 11 (0,09%) com miRNAs, 570 (4,42%) com metilação, 176 (1,37%) com mRNA, 672 (5,22%) com isoformas de transcritos e 11.140 (86,47%) com mutações; para TMB, a camada proteômica não apresentou correlações significativas.

Já para MSI (n = 4.968), foram identificadas correlações significativas de 101 (2,03%) com CNV, 55 (1,11%) com miRNAs, 727 (14,63%) com metilação, 258 (5,19%) com mRNA, 693 (13,95%) com isoformas de transcritos e 3.134 (63,08%) com mutações; para MSI, a camada proteômica também não apresentou correlações significativas (Figura 4).

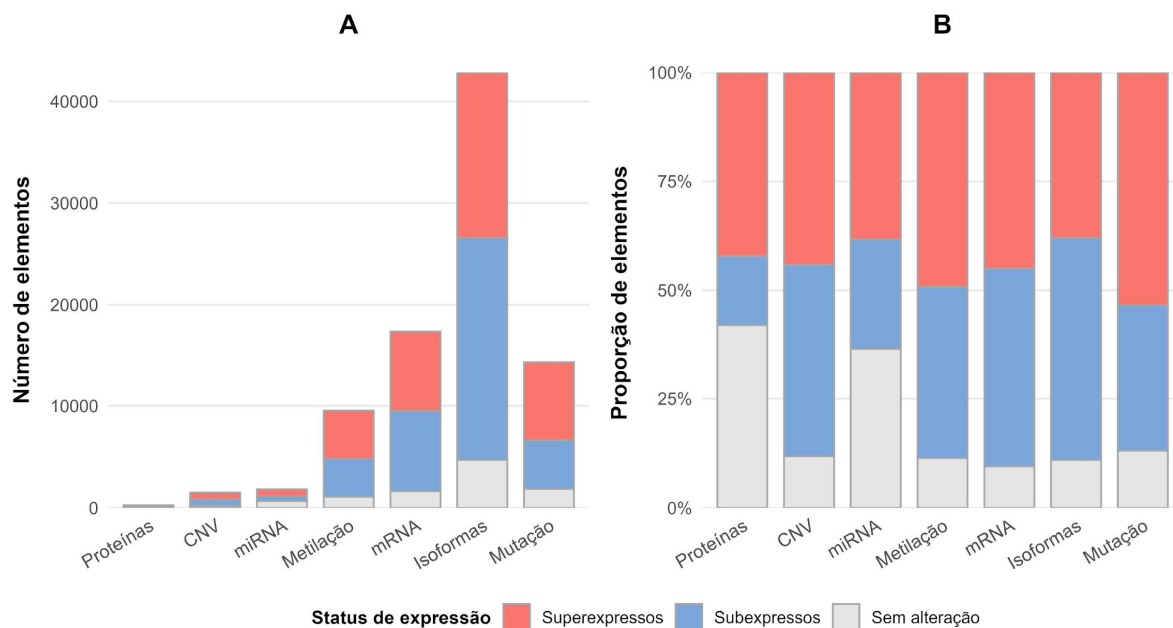


**Figura 4. Gráfico de barras representativo das correlações significativas entre camadas ômicas e variáveis fenotípicas.** (A) Número absoluto de correlações significativas identificadas entre as diferentes camadas ômicas (proteínas, CNV, miRNA, metilação, mRNA, isoformas de transcritos e mutações) e as variáveis fenotípicas MSI, *stemness* e TMB. (B) Proporção relativa das correlações em cada camada ômica, evidenciando a contribuição percentual de cada variável fenotípica no conjunto de correlações significativas.

#### 4.2.2. Expressão entre tecidos tumorais e não tumorais

Com as correlações entre as camadas ômicas e as variáveis fenotípicas estabelecidas, foi avaliado se os candidatos também exibiam diferenças entre tecidos tumorais e não tumorais. Na camada de proteínas, foram identificadas 110 (42,15%) proteínas superexpressas, 42 (16,09%) subexpressas e 109 (41,76%) sem alteração significativa. Em CNV, foram registrados 664 (44,12%) genes superexpressos, 663 (44,05%) subexpressos e 178 (11,83%) sem alteração significativa. Na camada de miRNAs, foram identificados 702 (38,26%) miRNAs superexpressos, 466 (25,40%) subexpressos e 667 (36,35%) sem alteração significativa. Em metilação, foram observados 4.691 (49,20%) genes superexpressos, 3.759 (39,42%) subexpressos e 1.085 (11,38%) sem alteração significativa. Na camada de mRNA, foram identificados

7.770 (44,99%) genes superexpressos, 7.862 (45,52%) subexpressos e 1.638 (9,48%) sem alteração significativa. Na camada de isoformas de transcritos, foram identificados 16.276 (37,99%) transcritos superexpressos, 21.882 (51,07%) subexpressos e 4.689 (10,94%) sem alteração significativa. Por fim, na camada de mutações, foram observados 7.622 (53,40%) genes superexpressos, 4.789 (33,55%) subexpressos e 1.863 (13,05%) sem alteração significativa (Figura 5).



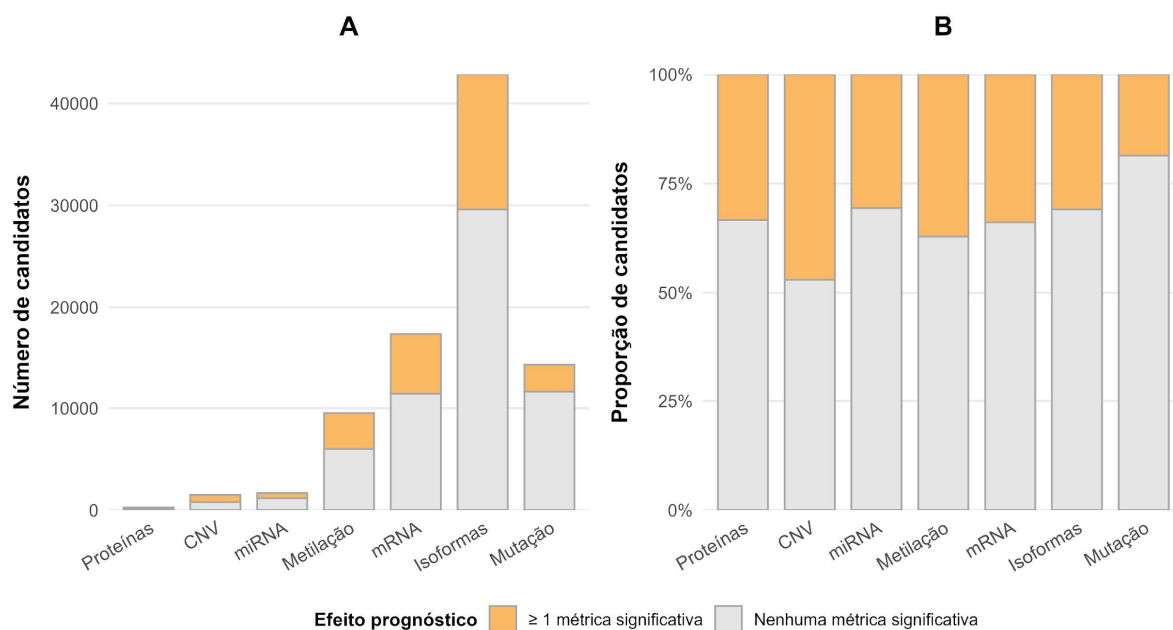
**Figura 5. Gráfico de barras representativo da distribuição da expressão nas camadas ômicas.** (A) Número absoluto de elementos diferencialmente expressos nas diferentes camadas ômicas (proteínas, CNV, miRNA, metilação, mRNA, isoformas de transcritos e mutações), classificados como superexpressos, subexpressos ou sem alteração. (B) Proporção relativa desses elementos em cada camada ômica, evidenciando a contribuição percentual de cada status de expressão.

#### 4.2.3. Regressão de Cox

Na análise de regressão de Cox, foi avaliada a significância estatística e a direção do efeito prognóstico (risco ou proteção) dos elementos moleculares de cada camada ômica (genes, transcritos/isoformas, miRNAs e proteínas) em pelo menos uma das quatro métricas de sobrevida (OS, DSS, DFI e PFI). Com base nesse critério, na camada de proteínas ( $n = 261$ ) foram identificados 87 (33,33%) candidatos prognósticos, enquanto 174 (66,67%) não atenderam ao critério de significância. Em CNV ( $n = 1.505$ ), foram identificados 708 (47,04%) candidatos prognósticos e 797 (52,96%) não significativos. Na camada de miRNA ( $n = 1.683$ ), foram identificados 515 (30,60%) candidatos prognósticos e 1.168 (69,40%) não significativos. Em metilação ( $n = 9.535$ ), 3.541 (37,13%) candidatos exibiram associações prognósticas, frente a 5.994 (62,87%)

não significativos. Na camada de mRNA ( $n = 17.270$ ), foram identificados 5.854 (33,89%) candidatos prognósticos, enquanto 11.416 (66,11%) não apresentaram correlações significativas. Para isoformas de transcritos ( $n = 42.847$ ), 13.252 (30,93%) candidatos foram correlacionados ao prognóstico, enquanto 29.595 (69,07%) não atenderam ao critério de significância. Por fim, na camada de mutações ( $n = 14.274$ ), foram identificados 2.650 (18,56%) candidatos prognósticos e 11.624 (81,44%) não significativos (Figura 6).

Considerando todas as camadas de forma integrada, 51.548 (59,00%) elementos moleculares não apresentaram correlações significativas com nenhuma das quatro métricas de sobrevida, evidenciando o caráter seletivo da abordagem adotada.

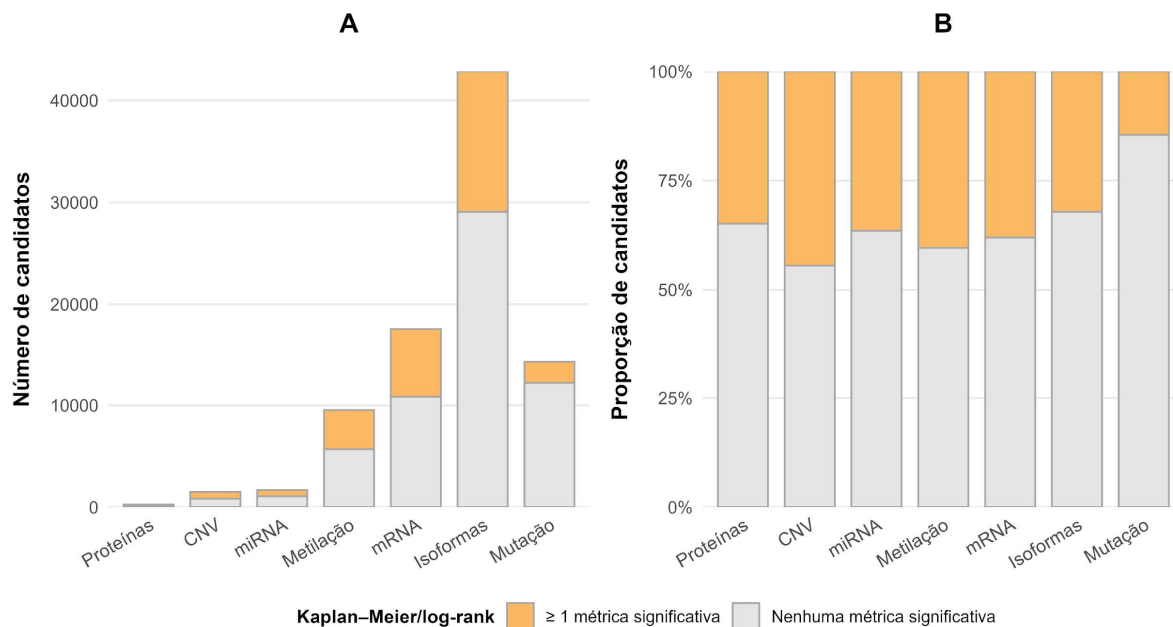


**Figura 6. Gráfico de barras representativo da distribuição do efeito prognóstico nas camadas ômicas.** (A) Número absoluto de candidatos que apresentaram efeito prognóstico significativo, bem como daqueles sem correlação prognóstica, em cada camada ômica (proteínas, CNV, miRNA, metilação, mRNA, isoformas de transcritos e mutações), considerando pelo menos uma das métricas de sobrevida avaliadas (OS, DSS, DFI ou PFI). (B) Proporção relativa de candidatos prognósticos e não prognósticos em cada camada ômica.

#### 4.2.4 Kaplan–Meier/Log-Rank

Nas análises de Kaplan–Meier/log-rank, foi avaliada, para cada candidato, a significância do grupo associado ao pior prognóstico (por exemplo, *High vs Low*; MT vs WT; e categorias de CNV), considerando pelo menos uma das quatro métricas de sobrevida (OS, DSS, PFI e DFI). Na camada de proteínas, 91 (34,87%) candidatos foram correlacionados de forma significativa ao pior prognóstico, enquanto 170 (65,13%) não

apresentaram correlação significativa. Em CNV, 669 (44,45%) foram significativos e 836 (55,55%) não significativos. Na camada de miRNA, 614 (36,48%) foram significativos e 1.069 (63,52%) não significativos. Em metilação, 3.852 (40,40%) exibiram correlação significativa, frente a 5.683 (59,60%) não significativos. Na camada de mRNA, 6.646 (38,04%) candidatos foram correlacionados de forma significativa ao pior prognóstico, enquanto 10.824 (61,96%) não apresentaram correlação significativa. Para isoformas de transcritos, 13.781 (32,17%) foram correlacionadas significativamente, enquanto 29.066 (67,83%) não atenderam ao critério de significância. Por fim, na camada de mutações, 2.075 (14,54%) foram significativos e 12.199 (85,46%) não significativos (Figura 7).

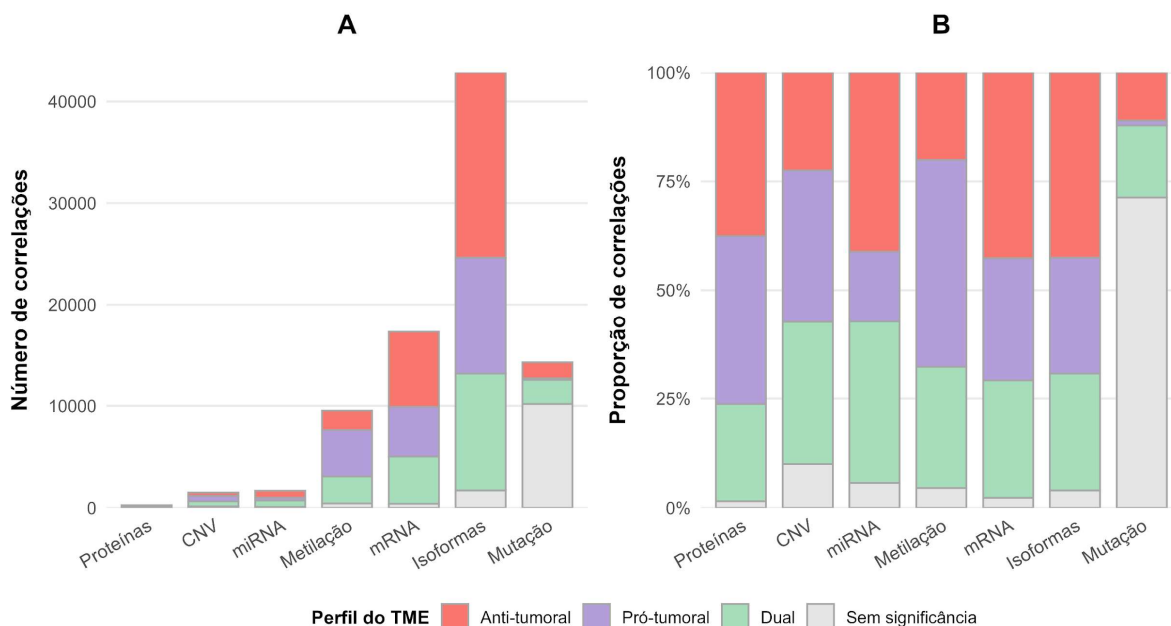


**Figura 7. Gráfico de barras representativo da correlação prognóstica (Kaplan-Meier/log-rank) nas camadas ômicas.** (A) Número absoluto de candidatos que apresentaram efeito prognóstico significativo, bem como daqueles sem correlação prognóstica, em cada camada ômica (proteínas, CNV, miRNA, metilação, mRNA, isoformas de transcritos e mutações), considerando pelo menos uma das métricas de sobrevida avaliadas (OS, DSS, DFI ou PFI). (B) Proporção relativa de candidatos prognósticos e não prognósticos em cada camada ômica.

#### 4.2.5. Microambiente tumoral

Na classificação do perfil do microambiente tumoral (TME), observou-se que a camada proteômica apresentou distribuição equilibrada entre os padrões antitumoral 98 (37,55%) e pró-tumoral 101 (38,70%), com efeito dual em 58 (22,22%) e apenas 4 (1,53%) proteínas sem significância. Em CNV, predominou o padrão pró-tumoral 526 (34,95%), seguido de efeito dual 490 (32,56%) e antitumoral 338 (22,46%), com 151 (10,03%) genes sem significância. Na camada de miRNAs, houve maior proporção de

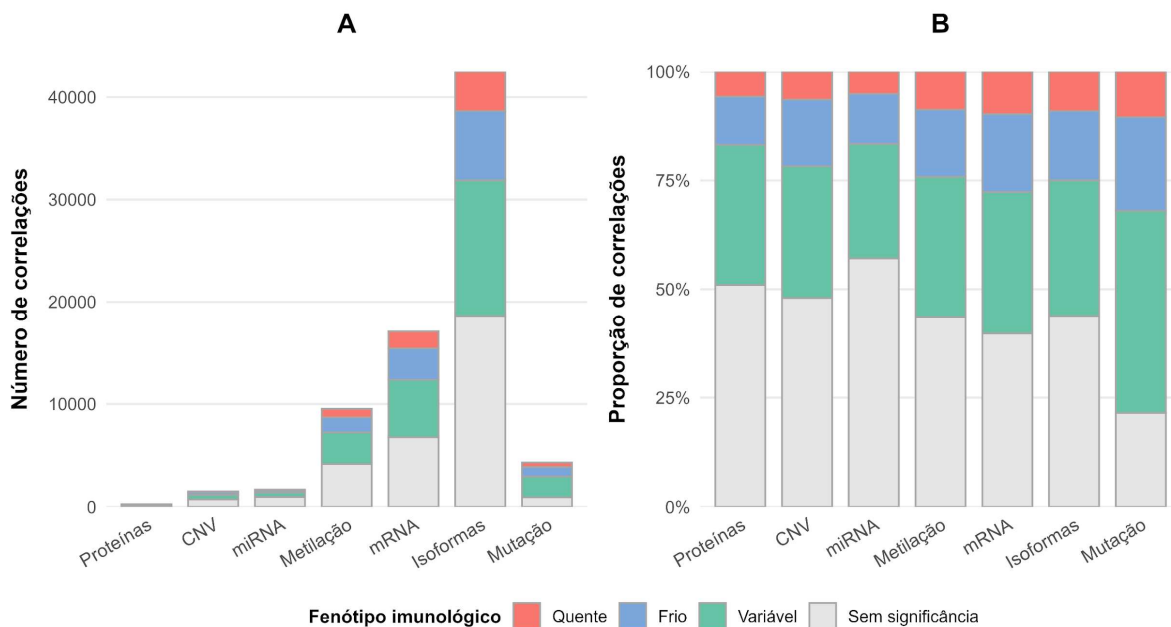
correlações antitumorais 692 (41,12%), acompanhada de fração expressiva de efeito dual 622 (36,96%), enquanto o padrão pró-tumoral representou 273 (16,22%); 96 (5,70%) miRNAs não foram significativos. Em metilação, o padrão pró-tumoral foi predominante 4.548 (47,70%), com 2.644 (27,73%) correlações duais e 1.911 (20,04%) antitumorais, além de 432 (4,53%) genes sem significância. Na camada de mRNA, o padrão antitumoral representou a maior fração 7.363 (42,63%), seguido de 4.874 (28,22%) pró-tumoral e 4.637 (26,85%) duais, com 396 (2,29%) genes sem significância. De forma semelhante, em isoformas de transcritos, predominou o padrão antitumoral 18.215 (42,51%), enquanto as proporções de padrões pró-tumoral 11.476 (26,78%) e dual 11.456 (26,74%) foram próximas, com 1.700 (3,97%) transcritos sem significância. Por fim, na camada de mutações, destacou-se a alta proporção de genes sem significância 10.176 (71,29%); entre os significativos, observou-se maior proporção de efeito dual 2.364 (16,56%) em relação ao padrão antitumoral 1.575 (11,03%) e pró-tumoral 159 (1,11%) (Figura 8).



**Figura 8. Gráfico de barras representativo para o perfil do microambiente tumoral (TME) nas diferentes camadas ômicas.** Em (A), temos o número absoluto de correlações classificadas de acordo com o perfil do microambiente tumoral — antitumoral, pró-tumoral, dual e sem significância estatística — em cada camada ômica. Em (B), temos a proporção relativa das correlações em cada camada, evidenciando a distribuição percentual dos perfis do TME ao longo das diferentes camadas ômicas.

#### 4.2.6. Fenótipo imunológico tumoral

Na classificação do fenótipo imunológico tumoral, observou-se que, na camada proteômica, as correlações se distribuíram em quente 15 (5,75%), frio 29 (11,11%) e variável 84 (32,18%), com predominância de sem significância/sem dados 133 (50,96%). Em CNV, foram registradas correlações quentes 97 (6,45%), frias 230 (15,28%) e variáveis 456 (30,30%), além de sem significância/sem dados 722 (47,97%). Na camada de miRNAs, observaram-se correlações quentes 86 (5,11%), frias 194 (11,53%) e variáveis 442 (26,26%), com maior proporção de sem significância/sem dados 961 (57,10%). Em metilação, foram identificadas correlações quentes 836 (8,77%), frias 1.467 (15,39%) e variáveis 3.073 (32,23%), além de sem significância/sem dados 4.159 (43,61%). Na camada de mRNA, foram registradas correlações quentes 1.671 (9,78%), frias 3.053 (17,88%) e variáveis 5.575 (32,65%), além de sem significância/sem dados 6.775 (39,69%). Para isoformas de transcritos, foram observadas correlações quentes 3.852 (9,07%), frias 6.757 (15,91%) e variáveis 13.265 (31,23%), além de sem significância/sem dados 18.613 (43,79%). Por fim, na camada de mutações, foram identificadas correlações quentes 452 (10,47%), frias 928 (21,49%) e variáveis 2.011 (46,56%), além de sem significância/sem dados 928 (21,49%) (Figura 9).

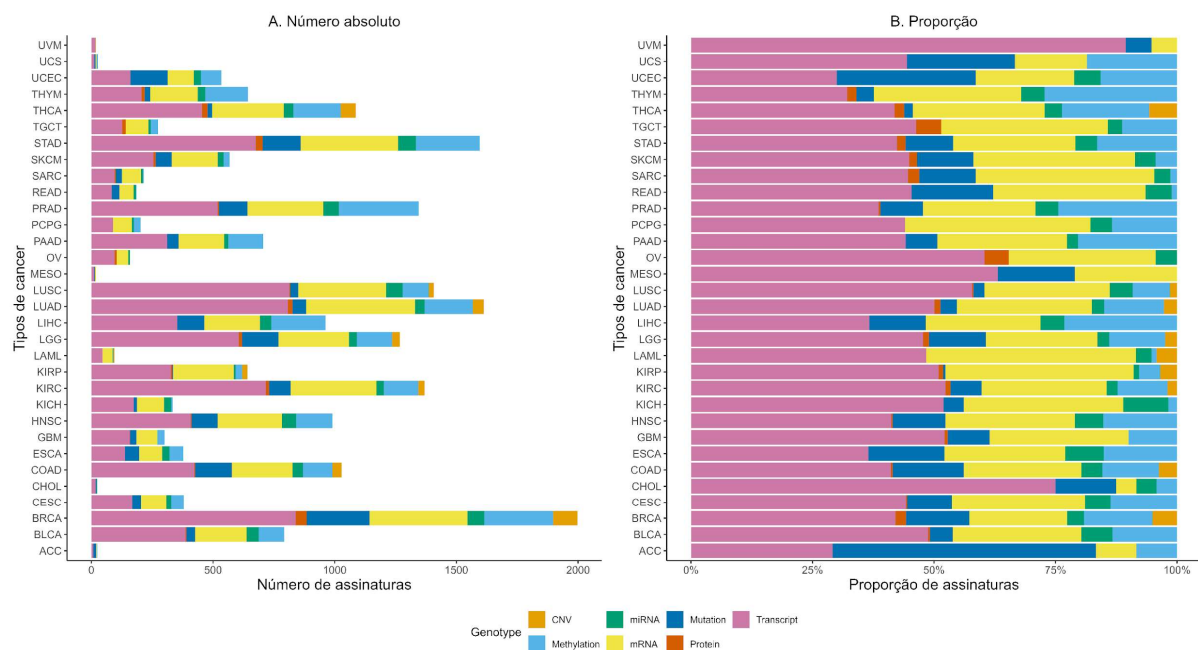


**Figura 9. Gráfico de barras representativo do perfil do microambiente tumoral (TME) nas diferentes camadas ômicas.** Em (A), temos o número absoluto de correlações classificadas de acordo com o perfil do microambiente tumoral — antitumoral, pró-tumoral, dual e sem significância estatística — em cada camada ômica. Em (B), temos a proporção relativa das correlações em cada camada, evidenciando a distribuição percentual dos perfis do TME ao longo das diferentes camadas ômicas.

### 4.3. Formação e reanálise das assinaturas

Com base nos resultados da análise individual (Seção 4.2), foram consolidadas assinaturas a partir de elementos moleculares que compartilham um mesmo comportamento biológico e estatístico dentro da mesma camada ômica e tipo tumoral. Em seguida, essas assinaturas foram reavaliadas no nível de conjunto para verificar a consistência das associações observadas.

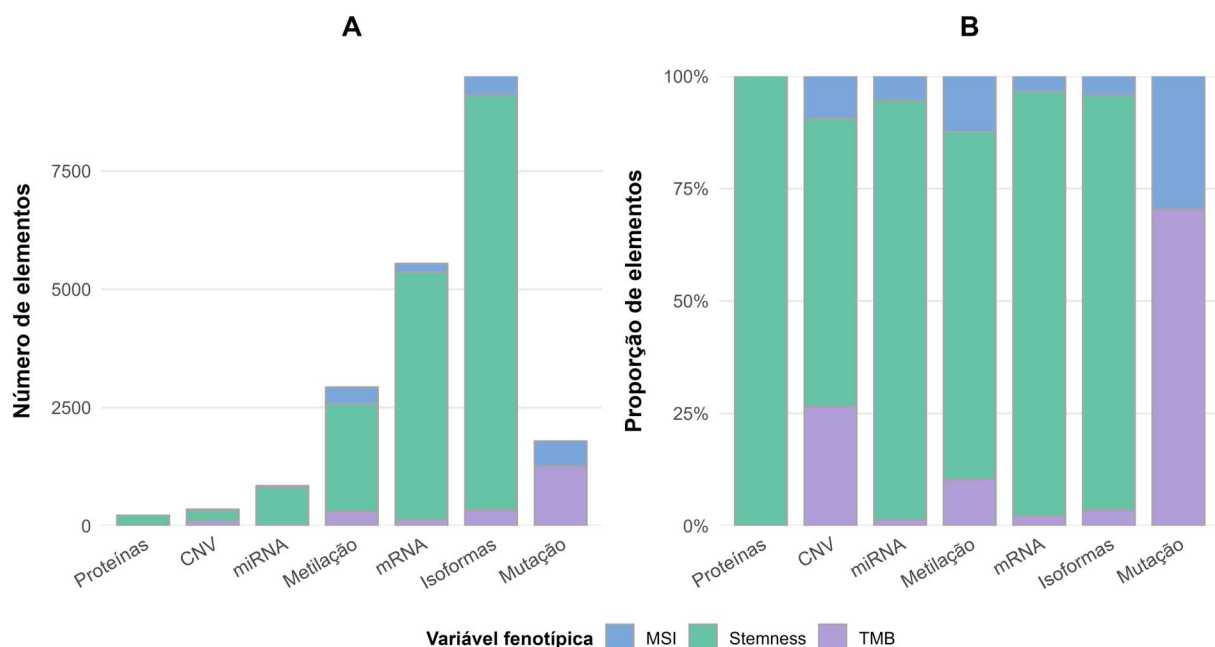
Após a execução das análises individuais, foram formadas 21.184 assinaturas nos 32 tipos tumorais, distribuídas nas camadas ômicas na seguinte forma: proteínas, 218 (1,03%); CNV, 348 (1,64%); miRNAs, 846 (3,99%); metilação, 2.930 (13,83%); mRNA, 5.545 (26,18%); isoformas de transcritos, 9.507 (44,88%); e mutações, 1.792 (8,46%) ([Tabela suplementar 5](#); Figura 10). Do total, 13.913 (65,7%) correspondem a assinaturas compostas por apenas um elemento (por exemplo, apenas um gene), enquanto 7.271 (34,3%) são constituídas por dois ou mais elementos (por exemplo, dois ou mais genes) ([Tabela suplementar 6](#); Figura 10).



**Figura 10. Gráfico de barras representativo da distribuição das assinaturas identificadas em 32 tipos de câncer do TCGA, estratificadas por camada ômica.** Em (A), temos o número absoluto: número de assinaturas identificadas e estratificadas por camada ômica em cada tipo de câncer. Em (B), temos a proporção: contribuição relativa de cada camada ômica para o total de assinaturas em 32 tipos de câncer do TCGA.

### 4.3.1. Camadas ômicas e variáveis fenotípicas

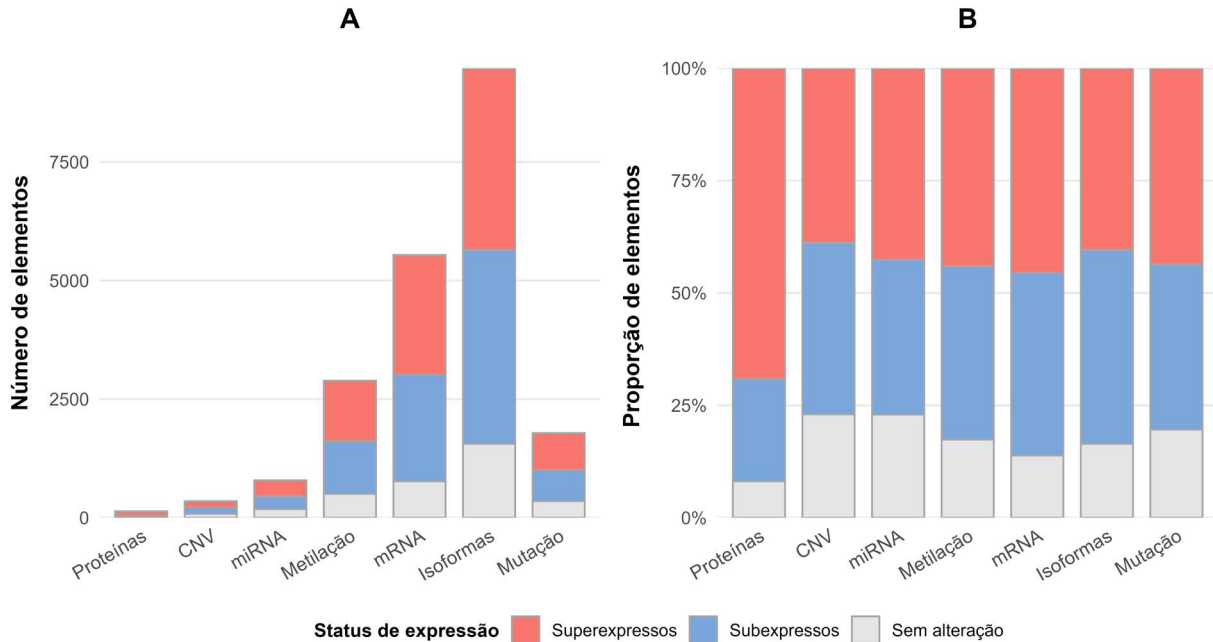
Na análise de correlação das assinaturas entre as sete camadas ômicas e as variáveis fenotípicas tumorais, a categoria *stemness* concentrou o maior número de correlações significativas ( $n = 17.498$ ), totalizando 218 (1,25%) correlações com proteínas, 223 (1,27%) com CNV, 789 (4,51%) com miRNAs, 2.264 (12,94%) com metilação, 5.235 (29,92%) com expressão de mRNA e 8.769 (50,12%) com isoformas de transcritos; para *stemness*, a camada de mutações não apresentou correlações significativas. Para TMB ( $n = 2.112$ ), foram observadas correlações significativas de 92 (4,36%) com CNV, 11 (0,52%) com miRNAs, 302 (14,30%) com metilação, 116 (5,49%) com mRNA, 331 (15,67%) com isoformas de transcritos e 1.260 (59,66%) com mutações; para TMB, a camada proteômica não apresentou correlações significativas. Já para MSI ( $n = 1.574$ ), foram identificadas correlações significativas de 33 (2,10%) com CNV, 46 (2,92%) com miRNAs, 364 (23,13%) com metilação, 194 (12,33%) com mRNA, 407 (25,86%) com isoformas de transcritos e 530 (33,67%) com mutações; para MSI, a camada proteômica também não apresentou correlações significativas ([Tabela complementar 7](#); Figura 11).



**Figura 11. Gráfico de barras representativo das correlações significativas das assinaturas entre camadas ômicas e variáveis fenotípicas.** (A) Número absoluto de correlações significativas identificadas entre as diferentes camadas ômicas (proteínas, CNV, miRNA, metilação, mRNA, isoformas de transcritos e mutações) e as variáveis fenotípicas MSI, *stemness* e TMB. (B) Proporção relativa das correlações em cada camada ômica, evidenciando a contribuição percentual de cada variável fenotípica no conjunto de correlações significativas.

### 4.3.2. Expressão entre tecidos tumorais e não tumorais das assinaturas

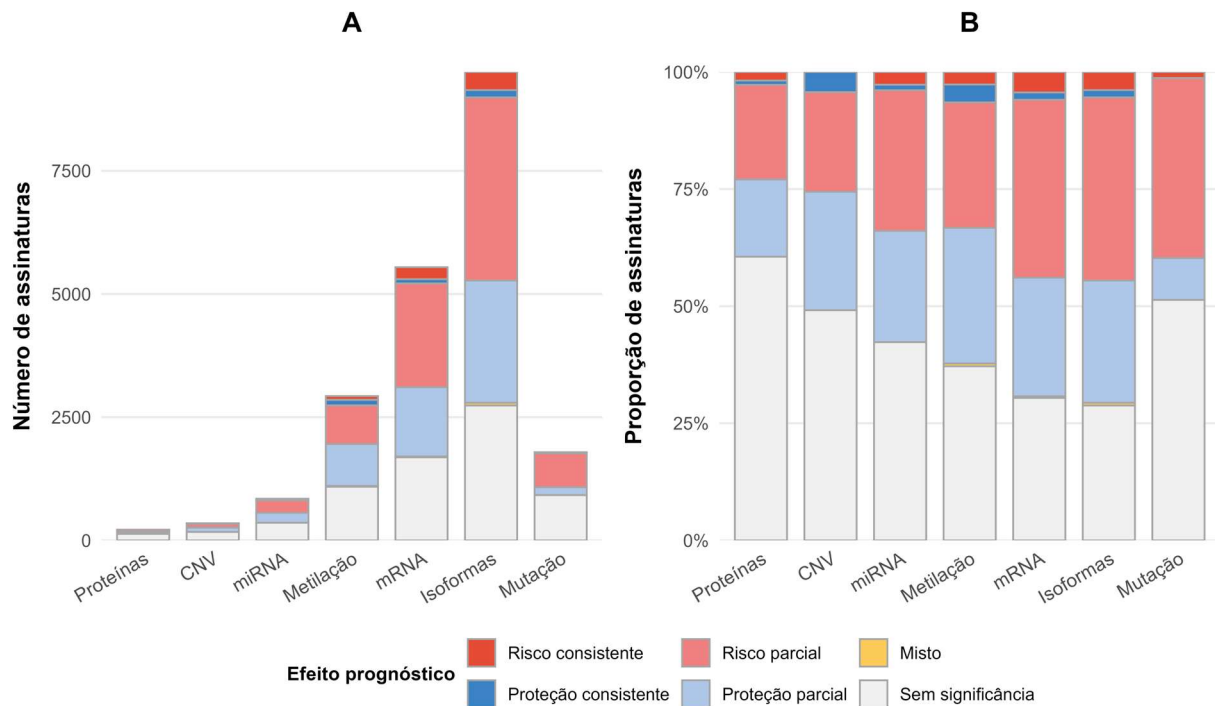
Na análise comparativa entre tecido tumoral e normal das assinaturas, na camada de proteínas foram identificadas 94 (42,73%) proteínas superexpressas, 31 (14,09%) subexpressas e 93 (43,18%) sem alteração significativa. Em CNV foram registrados 135 (38,79%) genes superexpressos, 133 (38,22%) subexpressos e 80 (22,99%) sem alteração significativa. Na camada de miRNA, foram identificados 336 (42,59%) miRNAs superexpressos, 272 (34,47%) subexpressos e 181 (22,94%) sem alteração significativa. Em metilação, foram observados 1.273 (44,05%) genes superexpressos, 1.115 (38,58%) subexpressos e 502 (17,37%) sem alteração significativa. Na camada de mRNA, foram identificados 2.518 (45,45%) genes superexpressos, 2.256 (40,72%) subexpressos e 766 (13,83%) sem alteração significativa. Para isoformas de transcritos, foram identificados 3.829 (40,40%) transcritos superexpressos, 4.093 (43,18%) subexpressos e 1.556 (16,42%) sem alteração significativa. Por fim, na camada de mutações, foram observados 779 (43,62%) genes superexpressos, 657 (36,79%) subexpressos e 350 (19,60%) sem alteração significativa ([Tabela suplementar 8](#); Figura 12).



**Figura 12. Gráfico de barras representativo da distribuição da expressão das assinaturas e as camadas ômicas.** (A) Número absoluto de assinaturas diferencialmente expressas nas diferentes camadas ômicas (proteínas, CNV, miRNA, metilação, mRNA, isoformas de transcritos e mutações), classificados como superexpressos, subexpressos ou sem alteração. (B) Proporção relativa dessas assinaturas em cada camada ômica, evidenciando a contribuição percentual de cada status de expressão.

### 4.3.3. Regressão de Cox

Na regressão de Cox, as assinaturas foram classificadas de acordo com a direção e a consistência do efeito prognóstico ao longo de OS, DSS, PFI e DFI, sendo agrupadas em risco consistente, proteção consistente, risco parcial, proteção parcial, misto ou sem significância. Seguindo a ordem das camadas ômicas, na camada de proteínas foram registradas 4 (1,83%) assinaturas com risco consistente, 2 (0,92%) com proteção consistente, 44 (20,18%) com risco parcial, 36 (16,51%) com proteção parcial e 132 (60,55%) sem significância. Em CNV, observaram-se 15 (4,31%) com proteção consistente, 74 (21,26%) com risco parcial, 88 (25,29%) com proteção parcial e 171 (49,14%) sem significância. Na camada de miRNA, foram identificadas 23 (2,72%) com risco consistente, 10 (1,18%) com proteção consistente, 254 (30,02%) com risco parcial, 201 (23,76%) com proteção parcial e 358 (42,32%) sem significância. Em metilação, foram identificadas 78 (2,66%) com risco consistente, 112 (3,82%) com proteção consistente, 785 (26,79%) com risco parcial, 848 (28,94%) com proteção parcial, 18 (0,61%) mistas e 1.089 (37,17%) sem significância. Na camada de mRNA, foram observadas 243 (4,38%) com risco consistente, 86 (1,55%) com proteção consistente, 2.106 (37,98%) com risco parcial, 1.405 (25,34%) com proteção parcial, 19 (0,34%) mistas e 1.686 (30,41%) sem significância. Para isoformas de transcritos, foram registradas 367 (3,86%) com risco consistente, 149 (1,57%) com proteção consistente, 3.717 (39,10%) com risco parcial, 2.480 (26,09%) com proteção parcial, 57 (0,60%) mistas e 2.737 (28,79%) sem significância. Por fim, na camada de mutações, foram identificadas 23 (1,28%) com risco consistente, 688 (38,44%) com risco parcial, 160 (8,94%) mistas e 919 (51,34%) sem significância ([Tabela suplementar 9](#); Figura 13).

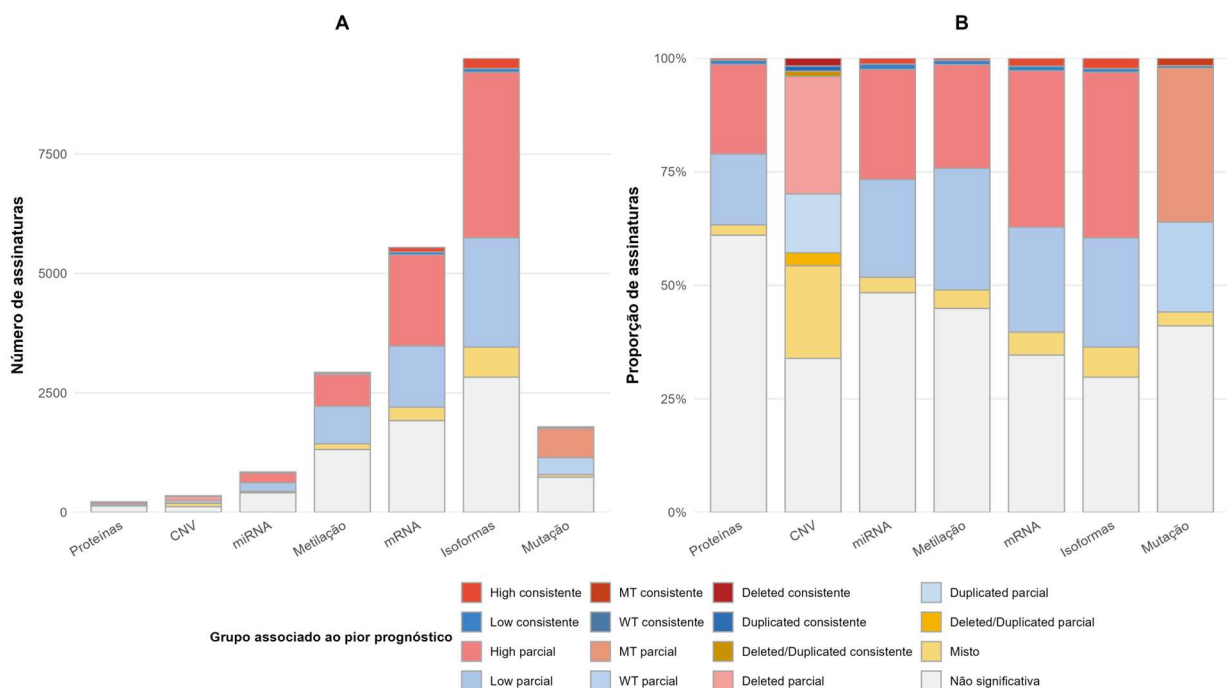


**Figura 13. Gráfico de barras representativo da direção do efeito prognóstico das assinaturas por camada ômica.** As categorias indicam risco ou proteção significativa para as diferentes métricas de sobrevivência (OS, DSS, PFI e DFI), estimadas por modelo de Cox para risco ou proteção em pelo menos uma métrica, padrão misto ou ausência de associação significativa. Em (A), temos o número absoluto e em (B), temos a proporção relativa para cada camada ômica.

#### 4.3.4. Kaplan–Meier/Log-Rank

Nas análises de Kaplan–Meier/log-rank, as assinaturas foram avaliadas quanto ao grupo associado ao pior prognóstico (por exemplo, *High* vs *Low*; MT vs WT; categorias de CNV), ao longo de OS, DSS, PFI e DFI. Seguindo a ordem das camadas ômicas, na camada de proteínas foram identificadas 1 (0,46%) assinatura *High* significativa nas quatro métricas e 2 (0,92%) *Low* nas quatro; adicionalmente, 43 (19,72%) exibiram *High* em pelo menos uma métrica (sem *Low*), 34 (15,60%) exibiram *Low* em pelo menos uma (sem *High*), 5 (2,29%) apresentaram padrão misto e 133 (61,01%) foram NS. Em CNV, foram identificadas 6 (1,72%) assinaturas deletado nas quatro métricas, 4 (1,15%) Duplicado nas quatro e 4 (1,15%) Deletado/Duplicado nas quatro; adicionalmente, 90 (25,86%) exibiram deletado em pelo menos uma métrica, 45 (12,93%) Duplicado em pelo menos uma, 10 (2,87%) Deletado/Duplicado em pelo menos uma, 71 (20,40%) apresentaram padrão misto entre categorias e 118 (33,91%) foram NS. Na camada de miRNA, observaram-se 11 (1,30%) assinaturas *High* nas quatro métricas e 10 (1,18%) *Low* nas quatro; além disso, 205 (24,23%) apresentaram *High* em pelo menos uma (sem *Low*), 182 (21,51%) *Low* em pelo menos uma (sem *High*), 29 (3,43%) foram mistas e 409

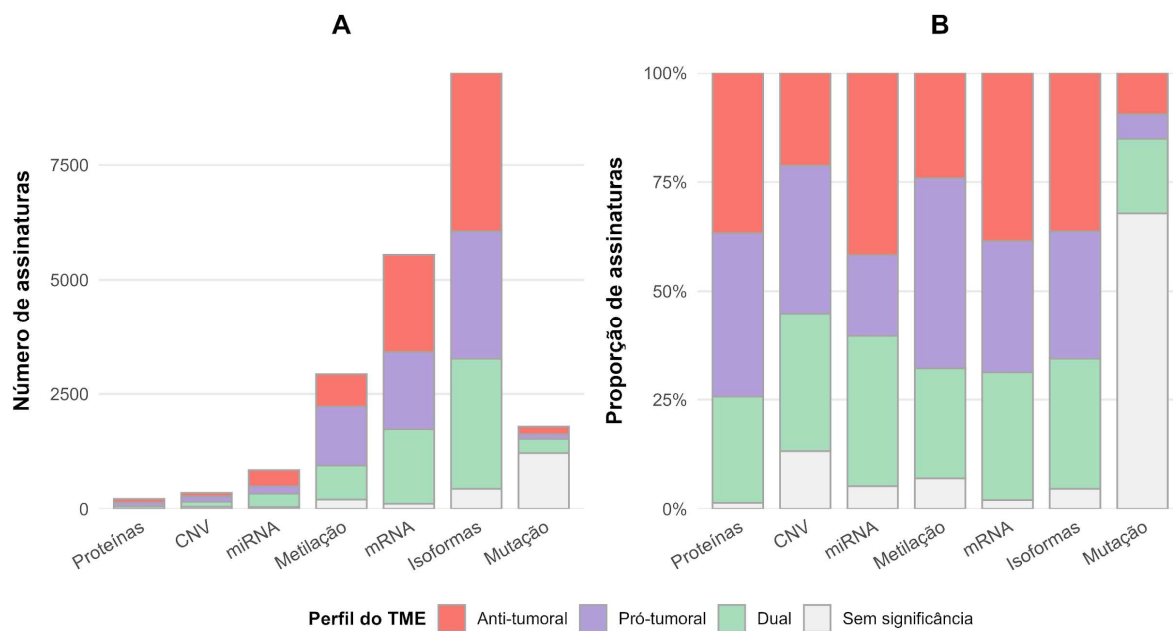
(48,35%) foram NS. Em metilação, foram observadas 14 (0,48%) assinaturas *High* nas quatro métricas e 28 (0,96%) *Low* nas quatro; adicionalmente, 669 (22,83%) exibiram *High* em pelo menos uma (sem *Low*), 784 (26,76%) exibiram *Low* em pelo menos uma (sem *high*), 120 (4,10%) foram mistas e 1.315 (44,88%) foram NS. Na camada de mRNA, foram identificadas 97 (1,75%) assinaturas *High* nas quatro métricas e 58 (1,05%) *Low* nas quatro; adicionalmente, 1.908 (34,41%) exibiram *High* em pelo menos uma (sem *Low*), 1.282 (23,12%) exibiram *Low* em pelo menos uma (sem *High*), 280 (5,05%) foram mistas e 1.920 (34,63%) foram NS. Para isoformas de transcritos, foram registradas 216 (2,27%) assinaturas *High* nas quatro métricas e 78 (0,82%) *Low* nas quatro; além disso, 3.467 (36,47%) exibiram *High* em pelo menos uma (sem *Low*), 2.286 (24,05%) exibiram *Low* em pelo menos uma (sem *High*), 630 (6,63%) foram mistas e 2.830 (29,77%) foram NS. Por fim, na camada de mutações, foram registradas 30 (1,68%) assinaturas MT nas quatro métricas e 9 (0,50%) WT nas quatro; adicionalmente, 607 (33,91%) exibiram MT em pelo menos uma (sem WT), 354 (19,78%) exibiram WT em pelo menos uma (sem MT), 55 (3,07%) foram mistas e 735 (41,06%) foram NS ([Tabela suplementar 10](#); Figura 14).



**Figura 14. Gráfico de barras representativo da correlação das assinaturas ao pior prognóstico entre camadas ômicas.** Em (A), temos o número absoluto de assinaturas moleculares associadas ao pior prognóstico nas análises de sobrevivência, estratificadas por camada ômica (proteínas, CNV, miRNA, metilação, mRNA, isoformas e mutação). Em (B), temos a proporção relativa dessas correlações em cada camada ômica, normalizada para 100%, permitindo a comparação entre categorias prognósticas independentemente do número total de assinaturas.

#### 4.3.5. Microambiente tumoral

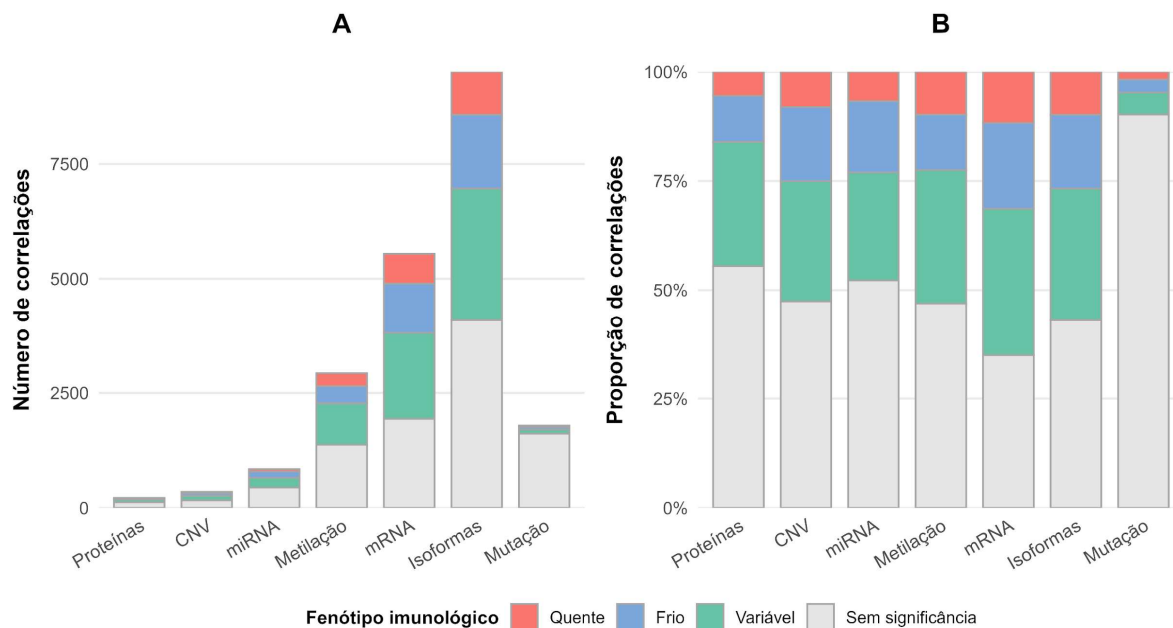
Na classificação do perfil do microambiente tumoral (TME), observou-se que, entre as assinaturas, a camada proteômica apresentou distribuição equilibrada entre o padrão antitumoral 80 (36,7%) e o padrão pró-tumoral 82 (37,61%), com efeito dual em 53 (24,31%) e apenas 3 (1,38%) assinaturas sem significância. Em CNV, predominou o padrão pró-tumoral 118 (33,91%), seguido de efeito dual 110 (31,61%) e padrão antitumoral 74 (21,26%), com 46 (13,22%) assinaturas sem significância. Na camada de miRNAs, houve maior proporção de assinaturas no padrão antitumoral 353 (41,73%), acompanhada de fração expressiva de efeito dual 291 (34,40%), enquanto o padrão pró-tumoral representou 158 (18,68%); 44 (5,20%) assinaturas não foram significativas. Em metilação, o padrão pró-tumoral foi predominante 1.281 (43,72%), com efeito dual em 738 (25,19%) e padrão antitumoral em 707 (24,13%), além de 204 (6,96%) assinaturas sem significância. Na camada de mRNA, o padrão antitumoral representou a maior fração 2.135 (38,50%), seguido do padrão pró-tumoral 1.678 (30,26%) e de efeito dual 1.619 (29,20%), com 113 (2,04%) assinaturas sem significância. De forma semelhante, em isoformas de transcritos, predominou o padrão antitumoral 3.448 (36,27%), enquanto as proporções de padrão pró-tumoral 2.791 (29,36%) e efeito dual 2.831 (29,78%) foram próximas, com 437 (4,60%) assinaturas sem significância. Por fim, na camada de mutações, destacou-se a alta proporção de assinaturas sem significância 1.214 (67,82%); entre as significativas, observou-se maior proporção de efeito dual 306 (17,09%) em relação ao padrão antitumoral 170 (9,50%) e ao padrão pró-tumoral 100 (5,59%) ([Tabela suplementar 11](#); Figura 15).



**Figura 15. Gráfico de barras representativo da classificação das assinaturas no microambiente tumoral ao longo das camadas ômicas.** Em (A), temos o número absoluto de assinaturas classificadas segundo o perfil do microambiente tumoral — antitumoral, pró-tumoral, dual e sem significância estatística — em cada camada ômica. Em (B), temos a proporção relativa desses perfis em cada camada, evidenciando diferenças na distribuição dos padrões de interação entre as assinaturas e o microambiente tumoral ao longo das camadas ômicas.

#### 4.3.6. Fenótipo imunológico tumoral

Na classificação do fenótipo imunológico tumoral, observou-se que, a camada proteômica foram registradas 12 (5,50%) assinaturas “quentes”, 23 (10,55%) “frias” e 62 (28,44%) “variáveis”, além de 121 (55,50%) sem significância estatística. Em CNV, foram identificadas 28 (8,05%) assinaturas “quentes”, 59 (16,95%) “frias” e 96 (27,59%) “variáveis”, com 165 (47,41%) sem significância estatística. Na camada de miRNAs, observaram-se 57 (6,74%) assinaturas “quentes”, 138 (16,31%) “frias” e 209 (24,70%) “variáveis”, além de 442 (52,25%) sem significância estatística. Em metilação, foram observadas 288 (9,83%) assinaturas “quentes”, 370 (12,63%) “frias” e 897 (30,61%) “variáveis”, com 1.375 (46,93%) sem significância estatística. Na camada de mRNA, foram identificadas 649 (11,70%) assinaturas “quentes”, 1.090 (19,66%) “frias” e 1.869 (33,71%) “variáveis”, além de 1.937 (34,93%) sem significância estatística. Para isoformas de transcritos, foram registradas 935 (9,83%) assinaturas “quentes”, 1.607 (16,90%) “frias” e 2.881 (30,30%) “variáveis”, além de 4.084 (42,96%) sem significância estatística. Por fim, na camada de mutações, foram identificadas 32 (1,79%) assinaturas “quentes”, 53 (2,96%) “frias” e 90 (5,03%) “variáveis”, com 1.615 (90,22%) sem significância estatística (Figura 16).

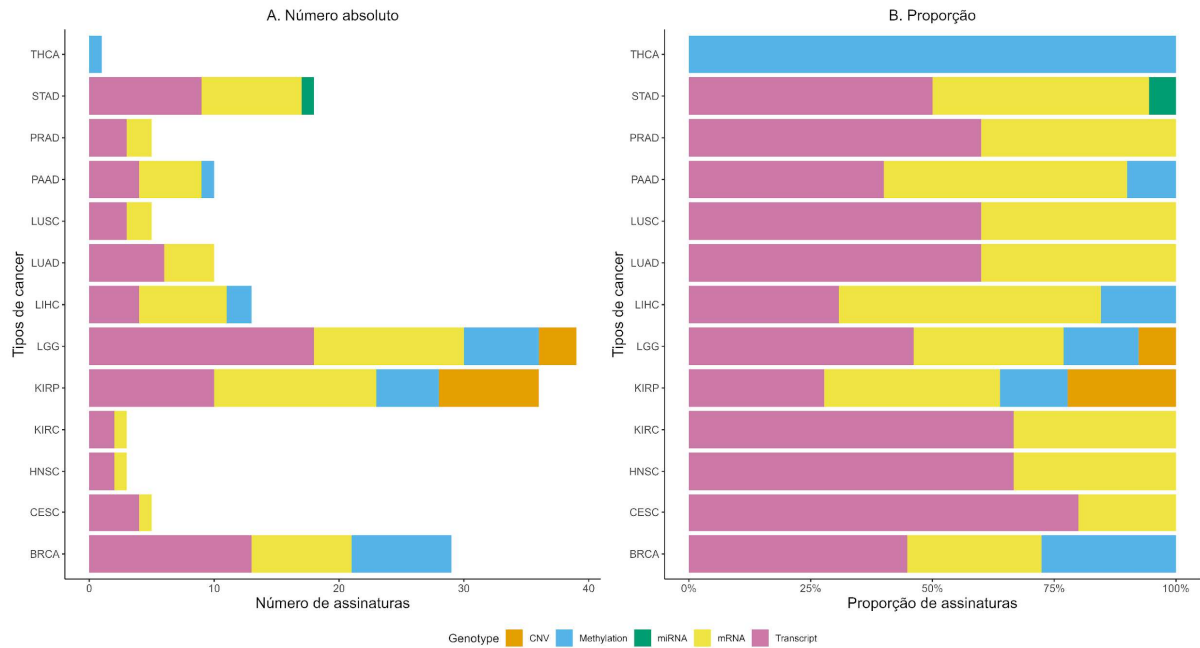


**Figura 16. Gráfico de barras representativo do fenótipo imunológico tumoral associado às camadas ômicas.** Em (A), temos o número absoluto de correlações significativas entre assinaturas moleculares e fenótipos imunológicos tumorais, estratificadas por camada ômica (proteínas, CNV, miRNA, metilação, mRNA, isoformas e mutação). Em (B), temos a proporção relativa dessas correlações em cada camada ômica, normalizada para 100%, permitindo a comparação da distribuição dos fenótipos imunológicos independentemente do volume total de assinaturas.

#### 4.4. Análise de robustez das assinaturas

Com o objetivo de avaliar a consistência das assinaturas identificadas ao longo das diferentes análises realizadas, foi conduzido um exercício analítico adicional para identificar assinaturas que permanecessem simultaneamente significativas em todas as variáveis investigadas. Essa abordagem, de caráter exploratório, foi utilizada como estratégia para evidenciar o subconjunto de assinaturas com maior consistência entre as análises, dentro do conjunto total analisado.

Nesta etapa, foram identificadas 177 assinaturas que permaneceram significativas em todas as análises aplicadas, distribuídas em 13 tipos tumorais (BRCA, CESC, HNSC, KIRC, KIRP, LGG, LIHC, LUAD, LUSC, PAAD, PRAD, STAD e THCA) e em 5 camadas ômicas, na seguinte ordem: CNV, 11 (6,21%); miRNA, 1 (0,56%); metilação, 23 (12,99%); mRNA, 64 (36,16%); e isoformas de transcritos, 78 (44,07%) ([Tabela suplementar 12](#); Figura 17).

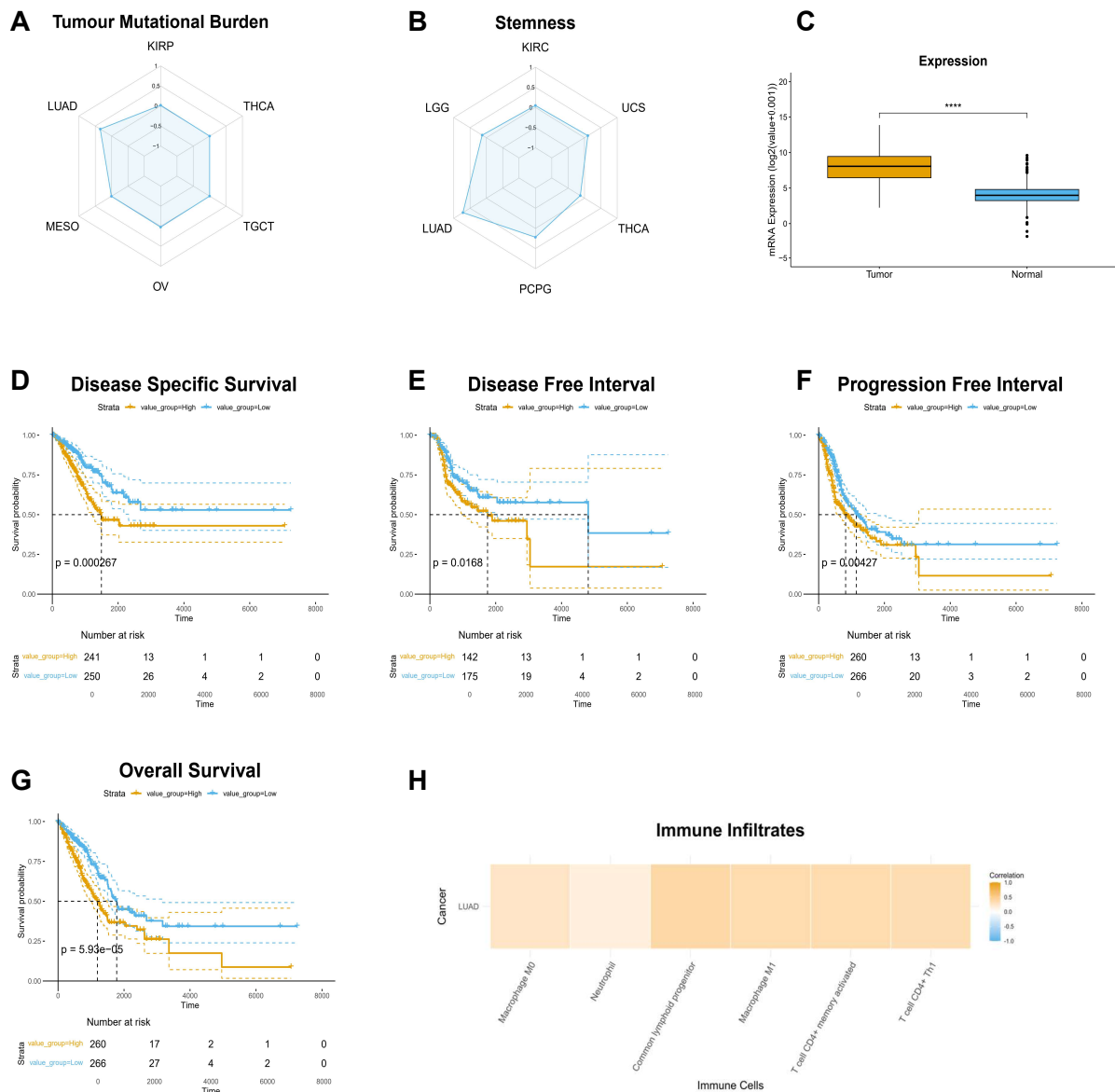


**Figura 17. Gráfico de barras representativo da distribuição da robustez das assinaturas identificadas e estratificadas por camada ômica.** Em (A), observamos a contagem absoluta: número de assinaturas identificadas, 177 assinaturas por camada ômica em 13 tipos de cânceres diferentes, provenientes do TCGA. Em (B), temos a proporção: contribuição relativa de cada camada ômica, estratificada, para o total de assinaturas em cada tipo tumoral.

Em relação às correlações com variáveis fenotípicas, 67 (37,85%) assinaturas exibiram correlação positiva (*stemness*: 61; MSI: 1; TMB: 5) enquanto 110 (62,15%) correlação negativa (*stemness*: 95; MSI: 12; TMB: 3). Na expressão (tumor vs normal), 105 (59,32%) assinaturas foram classificadas como superexpressas e 72 (40,68%) como subexpressas. Na regressão de Cox (OS, DSS, DFI e PFI), 106 (59,89%) assinaturas apresentaram padrão de risco, 68 (38,42%) padrão protetor e 3 (1,69%) padrão misto (risco e proteção em métricas distintas). Nas análises de Kaplan–Meier/log-rank, considerando a associação ao pior prognóstico nas quatro métricas, observaram-se 78 (44,07%) assinaturas em que o grupo *High* foi correlacionado ao pior prognóstico, 31 (17,51%) em que o grupo *Low* foi correlacionado ao pior prognóstico, 5 (2,82%) associadas ao estado deletado e 31 (17,51%) com padrão misto; além disso, 32 (18,08%) assinaturas não apresentaram associação ao pior prognóstico nas quatro métricas. Na caracterização do microambiente tumoral (TME), 74 (41,81%) assinaturas foram classificadas como antitumorais, 56 (31,64%) como pró-tumorais e 47 (26,55%) como duais. Por fim, a classificação do fenótipo imunológico indicou 38 (21,47%) assinaturas correlacionadas a tumores quentes, 50 (28,25%) a tumores frios e 89 (50,28%) a tumores de perfil variável.

Como exemplo, os genes (*KPNA2* + *RAD51*) compuseram duas assinaturas distintas no adenocarcinoma de pulmão (LUAD). A assinatura LUAD-477.6.3.P.3.43.43.1.1 corresponde à variável *stemness* e exibiu correlação positiva robusta ( $r = 0,71$ ;  $p = 2,7 \times 10^{-27}$ ) (Figura 18A), enquanto a assinatura LUAD-478.6.1.P.3.43.43.1.1 corresponde à variável TMB e apresentou correlação positiva ( $r = 0,34$ ;  $p = 2 \times 10^{-14}$ ) (Figura 18B). Ambas apresentaram superexpressão significativa no tecido tumoral em relação ao não tumoral ( $p = 5,7 \times 10^{-99}$ ) (Figura 18C) e estão correlacionadas à camada de expressão de mRNA; por isso, recebem nomenclaturas diferentes por estarem vinculadas a variáveis fenotípicas tumorais distintas.

Nas análises de sobrevivência de Cox, a assinatura apresentou efeito risco consistente para os principais desfechos (OS, DSS, DFI e PFI), com valores de  $p$  entre  $8,4 \times 10^{-5}$  e  $3,4 \times 10^{-2}$ , reforçando sua correlação com pior prognóstico clínico. Nas análises de Kaplan-Meier, as amostras classificadas como *High* para ambos os genes mostraram pior probabilidade de sobrevida nas quatro métricas (OS, DSS, DFI e PFI) (Figura 18D; G). Na análise do TME, foi evidenciado um perfil antitumoral, caracterizado pela predominância de linfócitos T cell CD4+ Th1, macrófagos M1 e linfócitos T CD4+ de memória ativados, compondo um fenótipo imune “quente” (Figura 18H). Adicionalmente, a isoforma *ENST00000330459* (uma entre as 21 isoformas de transcritos de *KPNA2*) foi identificada na assinatura LUAD-292.5.3.P.3.43.43.1.2, apresentando superexpressão significativa no tecido tumoral em relação ao não tumoral ( $p = 4,1 \times 10^{-58}$ ) e com correlação positiva em *stemness* ( $r = 0,57$ ;  $p = 1,1 \times 10^{-48}$ ). Nas análises de Cox, essa assinatura também apresentou efeito de risco nos desfechos OS, DSS, DFI e PFI, com  $p$  entre  $1,5 \times 10^{-4}$  e 0,02, além de curvas de Kaplan–Meier consistentes com pior sobrevida no grupo *High*. No TME, o padrão foi classificado como antitumoral, enquanto o fenótipo imune foi anotado como variável. Como exemplo complementar, foi identificada a assinatura BRCA-618.7.3.P.3.90.89.1.2 contendo o gene canônico *ATG7* na camada de metilação, classificada como superexpressa no tumor em relação ao tecido normal. Essa assinatura esteve associada à variável *stemness* e apresentou efeito protetor nas análises de Cox, além de perfil antitumoral no TME e fenótipo imunológico classificado como variável ([Tabela suplementar 13](#)).



**Figura 18. Painel representativo dos resultados obtidos para assinatura gênica *KPNA2 + RAD51*.** Os gráficos de radar (A) e (B), demonstram a relevância dessas assinaturas para a carga mutacional tumoral (TMB) e para o escore de potencial de *stemness*, respectivamente. O gráfico de barras (C), apresenta a expressão entre tecidos tumorais e normais. Os gráficos de sobrevivência (D) a (G) exibem curvas de sobrevivência de Kaplan–Meier para sobrevivência específica da doença (DSS), intervalo livre de doença (DFI), intervalo livre de progressão (PFI) e sobrevivência global (OS), todas mostrando separação significativa entre os grupos de expressão. Por fim, o mapa de calor (H) ilustra o perfil de infiltrados imune, destacando o aumento de células imunes efetoras, como macrófagos M1, indicando um microambiente tumoral imune “quente”.

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo integra o conjunto de investigações pan-câncer que empregam abordagens multiômicas integrativas para compreender programas biológicos complexos associados à progressão tumoral. A partir da integração de dados tumorais do TCGA e de tecidos não tumorais do GTEx como referência comparativa, foram analisados 33 tipos tumorais, avaliando-se sistematicamente a relação entre genes associados à autofagia e variáveis fenotípicas centrais da biologia do câncer, além de desfechos clínicos e imunológicos. Nesse contexto, os achados posicionam a autofagia não como um evento isolado, mas como um processo adaptativo integrado a eixos fundamentais da heterogeneidade tumoral, com impacto direto sobre o comportamento clínico e imunológico dos tumores.

Diferentemente de estudos pan-câncer prévios, que se baseiam predominantemente em listas canônicas restritas de genes autofágicos ou na utilização de um único repositório de anotação (Hou *et al.*, 2020; Murillo Carrasco *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2023), o presente trabalho adotou a consolidação de múltiplas bases independentes. Foram integrados dados provenientes do MSigDB, GeneCards, HADb e NCBI, resultando em um conjunto ampliado de 2.739 genes funcionalmente associados à autofagia. Essa estratégia permitiu capturar não apenas componentes centrais da maquinaria autofágica, mas também elementos periféricos envolvidos em contextos de estresse genômico, remodelação metabólica e adaptação tumoral, ampliando substancialmente o escopo analítico em relação a abordagens mais restritivas descritas na literatura.

Além da ampliação do universo gênico analisado, este estudo se destaca por adotar uma abordagem multiômica. A maioria dos trabalhos anteriores limita-se à análise de poucas camadas ômicas e de associações isoladas, como entre autofagia e sobrevida global ou entre autofagia e um único eixo molecular, por exemplo, TMB ou o infiltrado imune (Luo *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022). Em contraste, a presente análise incorpora, de maneira integrada, correlações entre autofagia, *stemness*, TMB, MSI, microambiente tumoral e quatro desfechos clínicos de sobrevida (OS, DSS, DFI e PFI). Essa abordagem integrativa possibilita identificar de padrões funcionais complexos e interdependentes, que dificilmente seriam revelados por análises unidimensionais (Rodrigues de Souza *et al.*, 2025).

A priorização final de 177 assinaturas totalmente significativas não representa a eliminação de achados relevantes, mas sim um refinamento analítico baseado na convergência estatística e biológica entre múltiplas variáveis fenotípicas e prognósticas. A distribuição das assinaturas totalmente significativas demonstrou participação expressiva de tumores que figuram entre as principais causas de mortalidade mundial segundo o GLOBOCAN (Bray *et al.*, 2024; Sung *et al.*, 2021) incluindo LUAD (5,65%; 10 assinaturas), BRCA (16,38%; 29 assinaturas) e STAD (10,7%; 18 assinaturas). Esse padrão sugere que tumores com maior impacto em morbimortalidade apresentam, com maior frequência, programas moleculares nos quais a autofagia está integrada a processos de estresse genômico, adaptação celular ao estresse e remodelação do microambiente tumoral (Amaravadi; Kimmelman; White, 2016; Galluzzi *et al.*, 2015; Levy; Towers; Thorburn, 2017; White, 2015).

O exemplo ilustrativo de LUAD reforça essa interpretação. As assinaturas LUAD-477.6.3.P.3.43.43.1.1 e LUAD-478.6.1.P.3.43.43.1.1, que incluem os genes *KPNA2* e *RAD51*, apresentaram superexpressão no tecido tumoral, correlação positiva com *stemness* e TMB, além de associação consistente com pior prognóstico clínico. Esses achados são compatíveis com estudos prévios que associam *KPNA2* à progressão tumoral e maior agressividade no câncer de pulmão (Liao, Wei Chao *et al.*, 2022; Lin *et al.*, 2018), bem como com o papel central de *RAD51* em tumores caracterizados por elevada instabilidade genômica. Nesse contexto, a autofagia tem sido descrita como um possível mecanismo compensatório para a manutenção da homeostase celular frente ao acúmulo de danos genéticos (Yang *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2019).

Adicionalmente, essas assinaturas exibiram perfis imunológicos predominantemente classificados como “quentes”, resultado consistente com estudos que descrevem a coexistência entre alta imunogenicidade e a ativação de mecanismos adaptativos de sobrevivência em tumores com elevada carga mutacional (Liao, Wei-Chao *et al.*, 2022; Liu; Weng, 2022). Assim, este exemplo não teve como objetivo destacar uma assinatura específica, mas ilustrar como elementos moleculares, inicialmente analisados de forma independente, podem convergir em seus perfis prognósticos e fenotípicos para a formação de assinaturas integradas, refletindo programas adaptativos coerentes associados à autofagia.

De forma complementar, a identificação de genes canônicos da via autofágica, como *ATG7*, em assinaturas de câncer de mama (BRCA-618.7.3.P.3.90.89.1.2) evidencia outra faceta relevante do processo. Enquanto na assinatura demonstrada anteriormente em LUAD a autofagia parece acoplada a respostas ao dano genômico e manutenção da capacidade de adaptação celular, em BRCA a presença de *ATG7* sugere uma ativação mais direta da maquinaria clássica de formação de autofagossomos (Li *et al.*, 2019; Xue; Chiu; Oleinick, 2010). Esse contraste reforça observações da literatura de que a autofagia pode emergir tanto por vias canônicas quanto por integrações não canônicas com redes de estresse e adaptação tumoral, variando conforme o contexto biológico (Bhardwaj *et al.*, 2020; White; DiPaola, 2009).

Importante salientar que a relação entre autofagia e prognóstico não foi uniforme entre os diferentes tipos tumorais. Em determinados contextos, as assinaturas associaram-se a melhor sobrevida, enquanto em outros se relacionaram a padrões potencialmente pró-tumorais, corroborando a natureza profundamente dependente do contexto biológico da autofagia no câncer, conforme amplamente descrito na literatura (Jia *et al.*, 2025; Verma *et al.*, 2021; Yu; Kim; Baek, 2025).

Do ponto de vista translacional, as assinaturas identificadas devem ser interpretadas como potenciais biomarcadores exploratórios, úteis para geração e priorização de hipóteses, estratificação molecular e direcionamento de estudos futuros (Hasin; Seldin; Lusic, 2017; Simon; Paik; Hayes, 2009). Entretanto, limitações inerentes ao uso de dados bulk de RNA-seq, à inferência indireta de infiltrados celulares e à ausência de validação funcional experimental devem ser consideradas (Avila Cobos *et al.*, 2018; Newman *et al.*, 2015). Adicionalmente, a adoção de p-valores não ajustados ( $p < 0,05$ ) insere-se deliberadamente em um contexto exploratório, visando ampliar a sensibilidade para detecção de sinais biológicos relevantes, e não estabelecer inferência confirmatória definitiva (Benjamin *et al.*, 2017; Rodrigues de Souza *et al.*, 2025).

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo integrou, em escala pan-câncer, múltiplas camadas ômicas provenientes do TCGA e GTEx para investigar o papel de genes associados à autofagia em 33 tipos tumorais. A partir da consolidação de 2.739 genes provenientes de diferentes repositórios, foram identificadas e estruturadas 21.184 assinaturas multiômicas, das quais 177 permaneceram totalmente significativas após refinamento estatístico e biológico. Os resultados demonstraram que a autofagia não atua como uma via isolada, mas como um processo adaptativo dinâmico, associado a contextos de estresse genômico, adaptação celular e remodelação do microambiente tumoral. A presença concomitante de associações com TMB, MSI, *stemness*, desfechos clínicos e fenótipos imunológicos indica que processos autofágicos interagem com múltiplas dimensões do comportamento tumoral.

A análise comparativa também evidenciou que tumores com elevada relevância epidemiológica, como LUAD, BRCA e STAD, concentram maior proporção de assinaturas significativas, o que sugere que a ativação de programas associados à autofagia pode estar particularmente implicada em cenários de maior impacto clínico. Exemplos ilustrativos, como assinaturas envolvendo *KPNA2* e *RAD51* em LUAD e a presença de genes canônicos como *ATG7* em BRCA, destacam a coexistência de mecanismos clássicos e não canônicos de integração da autofagia no processo tumoral. Além disso, a redução progressiva do universo inicial de análises para o conjunto final de 177 assinaturas não implica irrelevância das demais, mas reflete uma estratégia de priorização baseada na convergência entre camadas ômicas. e nas consistências observadas entre variáveis prognósticas, fenotípicas e imunológicas, aliadas à robustez estatística. Muitas assinaturas não priorizadas podem apresentar relevância específica em contextos tumorais particulares e merecem investigação futura.

Do ponto de vista translacional, as assinaturas aqui descritas configuram recursos exploratórios com potencial para orientar novas hipóteses, auxiliar na estratificação molecular de pacientes e subsidiar estudos voltados à identificação de biomarcadores e combinações terapêuticas. Contudo, as inferências devem ser interpretadas com cautela, considerando limitações inerentes ao uso de dados bulk de RNA-seq, inferência indireta de infiltrados celulares, ausência de validação funcional experimental e adoção de p-valores não ajustados. Dessa forma, os achados deste trabalho reforçam o valor das abordagens integrativas multiômicas e destacam a necessidade de investigações

complementares — incluindo análises em coortes independentes, validações experimentais e abordagens em célula única — para aprofundar a compreensão do papel da autofagia na biologia tumoral e avaliar seu real potencial como alvo prognóstico e terapêutico.

## 7. MATERIAL SUPLEMENTAR

O material suplementar referente ao estudo desenvolvido encontra-se disponível em repositório on-line (Google Drive) e inclui todos os códigos, rotinas analíticas, tabelas intermediárias, figuras e descrições detalhadas dos procedimentos computacionais adotados neste estudo. Esse repositório tem como objetivo assegurar transparência, rastreabilidade e reprodutibilidade das análises realizadas. Acesso:

[https://drive.google.com/drive/folders/1kLtJ5taVdTP1iakqcVZtHOCBqcDOH0QO?usp=drive\\_link](https://drive.google.com/drive/folders/1kLtJ5taVdTP1iakqcVZtHOCBqcDOH0QO?usp=drive_link)

## 8. REFERÊNCIAS

- AALTONEN, L. A., ABASCAL, F., ABESHOUSE, A., *et al.* "Pan-cancer analysis of whole genomes", *Nature*, v. 578, n. 7793, p. 82–93, 6 fev. 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-1969-6.
- ADDEO, A., FRIEDLAENDER, A., BANNA, G. L., *et al.* "TMB or not TMB as a biomarker: That is the question", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 163, p. 103374, jul. 2021. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2021.103374.
- AMARAVADI, R., KIMMELMAN, A. C., WHITE, E. "Recent insights into the function of autophagy in cancer", *Genes & Development*, v. 30, n. 17, p. 1913–1930, 1 set. 2016. DOI: 10.1101/gad.287524.116.
- ANDRADE, C. "Survival Analysis, Kaplan-Meier Curves, and Cox Regression: Basic Concepts", *Indian Journal of Psychological Medicine*, v. 45, n. 4, p. 434–435, 1 jul. 2023. DOI: 10.1177/02537176231176986.
- APONTE, P., INTERNATIONAL, A. C.-S. cells, 2017, undefined. "Stemness in cancer: stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment", *hindawi.com* PM Aponte, A Caicedo Stem cells international, 2017 *hindawi.com*, [S.d.]. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/5619472/abs/>. Acesso em: 23 ago. 2023.
- ARAN, D., HU, Z., BUTTE, A. J. "xCell: Digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape", *Genome Biology*, v. 18, n. 1, 15 nov. 2017. DOI: 10.1186/s13059-017-1349-1.
- BALLHAUSEN, A., PRZYBILLA, M. J., JENDRUSCH, M., *et al.* "The shared frameshift mutation landscape of microsatellite-unstable cancers suggests immunoediting during tumor evolution", *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 4740, 21 set. 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-18514-5.
- BHARDWAJ, M., LELI, N. M., KOUMENIS, C., *et al.* "Regulation of autophagy by canonical and non-canonical ER stress responses", *Seminars in Cancer Biology*, v. 66, p. 116–128, nov. 2020. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.11.007.
- BHOL, C. S., SENAPATI, P. K., KAR, R. K., *et al.* Autophagy paradox: Genetic and epigenetic control of autophagy in cancer progression. *Cancer Letters*. [S.l.], Elsevier Ireland Ltd. 10 out. 2025
- BRAY, F., LAVERSANNE, M., SUNG, H., *et al.* "Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries", *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 74, n. 3, p. 229–263, maio 2024. DOI: 10.3322/caac.21834.
- BRUM, D. B., VIEIRA, I. A. "Análise abrangente da regulação da expressão dos genes da autofagia por microRNAs", *Research, Society and Development*, v. 14, n. 3, p. e6514348191, 28 mar. 2025. DOI: 10.33448/rsd-v14i3.48191.
- BUSTOS, S. O., ANTUNES, F., RANGEL, M. C., *et al.* Emerging Autophagy Functions Shape the Tumor Microenvironment and Play a Role in Cancer Progression - Implications for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*. [S.l.], Frontiers Media S.A.

CATALANO, M., D'ANGELO, A., DE LOGU, F., *et al.* Navigating Cancer Complexity: Integrative Multi-Omics Methodologies for Clinical Insights. Clinical Medicine Insights: Oncology. [S.I.], SAGE Publications Ltd.

CHEN, W., LI, Z., LIU, H., *et al.* "MicroRNA-30a targets BECLIN-1 to inactivate autophagy and sensitizes gastrointestinal stromal tumor cells to imatinib", Cell Death and Disease, v. 11, n. 3, 1 mar. 2020. DOI: 10.1038/s41419-020-2390-7.

COHEN, R., PELLAT, A., BOUSSION, H., *et al.* "Immunotherapy and metastatic colorectal cancers with microsatellite instability or mismatch repair deficiency", Bulletin du Cancer, v. 106, n. 2, p. 137–142, fev. 2019a. DOI: 10.1016/j.bulcan.2018.09.004.

COHEN, R., PELLAT, A., BOUSSION, H., *et al.* Immunotherapy and metastatic colorectal cancers with microsatellite instability or mismatch repair deficiency. Bulletin du Cancer. [S.I.], John Libbey Eurotext.

DUAN, Y., TIAN, X., LIU, Q., *et al.* Role of autophagy on cancer immune escape. Cell Communication and Signaling. [S.I.], BioMed Central Ltd.

GALLUZZI, L., PIETROCOLA, F., BRAVO-SAN PEDRO, J. M., *et al.* "Autophagy in malignant transformation and cancer progression", The EMBO Journal, v. 34, n. 7, p. 856–880, 23 abr. 2015. DOI: 10.15252/embj.201490784.

GEORGE, B., SEALS, S., ABAN, I. Survival analysis and regression models. Journal of Nuclear Cardiology. [S.I.], Springer New York LLC.

GLICK, D., BARTH, S., MACLEOD, K. F. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. Journal of Pathology. [S.I.: s.n.].

GOLDMAN, M. J., CRAFT, B., HASTIE, M., *et al.* "Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform", Nature Biotechnology, v. 38, n. 6, p. 675–678, 22 jun. 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0546-8.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, P., KLIONSKY, D. J., JOSEPH, B. Autophagy regulation by RNA alternative splicing and implications in human diseases. Nature Communications. [S.I.], Nature Research.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discovery. [S.I.], American Association for Cancer Research Inc.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell. [S.I.: s.n.].

HEO, Y. J., HWA, C., LEE, G. H., *et al.* "Integrative multi-omics approaches in cancer research: From biological networks to clinical subtypes", Molecules and Cells, v. 44, n. 7, p. 433–443, 2021. DOI: 10.14348/molcells.2021.0042.

HOU, C., CAI, H., ZHU, Y., *et al.* "Development and Validation of Autophagy-Related Gene Signature and Nomogram for Predicting Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma", Frontiers in Oncology, v. 10, 16 out. 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.558596.

HU, J., ZHANG, Z., ZHAO, L., *et al.* "High expression of RAD51 promotes DNA damage repair and survival in KRAS-mutant lung cancer cells.", *BMB reports*, v. 52, n. 2, p. 151–156, fev. 2019. DOI: 10.5483/BMBRep.2019.52.2.213.

HU, Y. J., ZHONG, J. T., GONG, L., *et al.* Autophagy-related beclin 1 and head and neck cancers. *OncoTargets and Therapy*. [S.I.], Dove Medical Press Ltd.

JALALI, P., SHAHMORADI, A., SAMII, A., *et al.* The role of autophagy in cancer: from molecular mechanism to therapeutic window. *Frontiers in Immunology*. [S.I.], Frontiers Media SA.

JIA, H., WEI, J., ZHENG, W., *et al.* "The dual role of autophagy in cancer stem cells: implications for tumor progression and therapy resistance", *Journal of Translational Medicine*, v. 23, n. 1, p. 583, 25 maio 2025. DOI: 10.1186/s12967-025-06595-z.

KIM, D. H., LIM, Y., SONG, S., *et al.* "Predictive role of tumor-infiltrating lymphocytes and immune phenotype for pembrolizumab in relapsed or refractory thymic carcinoma", *Journal of Thoracic Disease*, v. 17, n. 7, p. 4409–4419, 31 jul. 2025. DOI: 10.21037/jtd-2025-526.

LADDHA, S. V., GANESAN, S., CHAN, C. S., *et al.* "Mutational landscape of the essential autophagy gene BECN1 in human cancers", *Molecular Cancer Research*, v. 12, n. 4, p. 485–490, 2014. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0614.

LAPLANTE, M., SABATINI, D. M. MTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. [S.I.], Elsevier B.V.

LEE, S. W. "Kaplan-Meier and Cox proportional hazards regression in survival analysis: statistical standard and guideline of Life Cycle Committee", *Life Cycle*, v. 3, 17 maio 2023. DOI: 10.54724/lc.2023.e8.

LEI, Y., UOSELIS, L., DIALYNAKI, D., *et al.* "Cancer-associated mutations in autophagy-related proteins analyzed in yeast and human cells", *Autophagy*, v. 21, n. 7, p. 1456–1472, 2025. DOI: 10.1080/15548627.2025.2471142.

LEVY, J. M. M., TOWERS, C. G., THORBURN, A. "Targeting autophagy in cancer", *Nature Reviews Cancer*, v. 17, n. 9, p. 528–542, 28 set. 2017. DOI: 10.1038/nrc.2017.53.

LI, D., PENG, X., HE, G., *et al.* Crosstalk between autophagy and CSCs: molecular mechanisms and translational implications. *Cell Death and Disease*. [S.I.], Springer Nature.

LI, M., LIU, J., LI, S., *et al.* "Autophagy-related 7 modulates tumor progression in triple-negative breast cancer.", *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, v. 99, n. 9, p. 1266–1274, set. 2019. DOI: 10.1038/s41374-019-0249-2.

LI, S., PENG, Y., CHEN, M., *et al.* "Facilitating integrative and personalized oncology omics analysis with UCSCXenaShiny", *Communications biology*, v. 7, n. 1, p. 1200, 1 dez. 2024. DOI: 10.1038/s42003-024-06891-2.

LI, X., ZHAO, H. Targeting secretory autophagy in solid cancers: mechanisms, immune regulation and clinical insights. *Experimental Hematology and Oncology*. [S.I.], BioMed Central Ltd.

- LI, Z., LI, J., BAI, X., *et al.* "Tumor microenvironment as a complex milieu driving cancer progression: a mini review", *Clinical and Translational Oncology*, v. 27, n. 5, p. 1943–1952, 28 set. 2024. DOI: 10.1007/s12094-024-03697-w.
- LIAO, W. C., LIN, T. J., LIU, Y. C., *et al.* "Nuclear accumulation of KPNA2 impacts radioresistance through positive regulation of the PLSCR1-STAT1 loop in lung adenocarcinoma", *Cancer Science*, v. 113, n. 1, p. 205–220, 1 jan. 2022. DOI: 10.1111/cas.15197.
- LIN, F., GAO, L., SU, Z., *et al.* "Knockdown of KPNA2 inhibits autophagy in oral squamous cell carcinoma cell lines by blocking p53 nuclear translocation", *Oncology Reports*, v. 40, n. 1, p. 179–194, 1 jul. 2018. DOI: 10.3892/or.2018.6451.
- LONSDALE, J., THOMAS, J., SALVATORE, M., *et al.* The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nature Genetics*. [S.l.: s.n.].
- LUO, M., YE, L., CHANG, R., *et al.* "Multi-omics characterization of autophagy-related molecular features for therapeutic targeting of autophagy", *Nature Communications*, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-33946-x.
- MATHEW, R., KONGARA, S., BEAUDOIN, B., *et al.* "Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability", *Genes & Development*, v. 21, n. 11, p. 1367–1381, 1 jun. 2007. DOI: 10.1101/gad.1545107.
- MENG, X., YANG, S., ZHANG, J., *et al.* Contribution of alternative splicing to breast cancer metastasis. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. [S.l.], OAE Publishing.
- METUR, S. P., LEI, Y., ZHANG, Z., *et al.* Regulation of autophagy gene expression and its implications in cancer. *Journal of Cell Science*. [S.l.], Company of Biologists Ltd.
- MOWERS, E. E., SHARIFI, M. N., MACLEOD, K. F. Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene*. [S.l.], Nature Publishing Group.
- MULCAHY LEVY, J. M., THORBURN, A. Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients. *Cell Death and Differentiation*. [S.l.], Springer Nature.
- MURILLO CARRASCO, A. G., GIOVANINI, G., RAMOS, A. F., *et al.* Insights from a Computational-Based Approach for Analyzing Autophagy Genes across Human Cancers. *Genes*. [S.l.], Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
- NAZIO, F., BORDI, M., CIANFANELLI, V., *et al.* Autophagy and cancer stem cells: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Death and Differentiation*. [S.l.], Nature Publishing Group.
- NAZIO, F., BORDI, M., CIANFANELLI, V., *et al.* Autophagy and cancer stem cells: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Death and Differentiation*. [S.l.], Nature Publishing Group.
- NEPAL, S., JIN KIM, M., TAE HONG, J., *et al.* Autophagy induction by leptin contributes to suppression of apoptosis in cancer cells and xenograft model: Involvement of p53/FoxO3A axis. [S.l.: s.n.], 2015. Disponível em: [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget).

NEWMAN, A. M., STEEN, C. B., LIU, C. L., *et al.* "Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry", *Nature Biotechnology*, v. 37, n. 7, p. 773–782, 1 jul. 2019. DOI: 10.1038/s41587-019-0114-2.

NIHARIKA, GARG, M. Understanding the autophagic functions in cancer stem cell maintenance and therapy resistance. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. [S.I.], Cambridge University Press.

ONORATI, A. V., DYCZYNSKI, M., OJHA, R., *et al.* Targeting autophagy in cancer. *Cancer*. [S.I.], John Wiley and Sons Inc.

PEIXOTO, P., GRANDVALLET, C., FEUGEAS, J. P., *et al.* Epigenetic control of autophagy in cancer cells: A key process for cancer-related phenotypes. *Cells*. [S.I.], MDPI.

PERIYASAMY-THANDAVAN, S., JIANG, M., SCHOENLEIN, P., *et al.* "Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology", *Am J Physiol Renal Physiol*, v. 297, p. 244–256, 2009. DOI: 10.1152/ajprenal.00033.2009.-Autophagy. Disponível em: <http://www.ajprenal.org>.

PETITPREZ, F., MEYLAN, M., DE REYNIÈS, A., *et al.* The Tumor Microenvironment in the Response to Immune Checkpoint Blockade Therapies. *Frontiers in Immunology*. [S.I.], Frontiers Media S.A., 7 maio 2020

PETITPREZ, F., SUN, C.-M., LACROIX, L., *et al.* "Quantitative Analyses of the Tumor Microenvironment Composition and Orientation in the Era of Precision Medicine", *Frontiers in Oncology*, v. 8, 25 set. 2018. DOI: 10.3389/fonc.2018.00390.

POILLET-PEREZ, L., SHARP, D. W., YANG, Y., *et al.* "Autophagy promotes growth of tumors with *High* mutational burden by inhibiting a T-cell immune response", *Nature Cancer*, v. 1, n. 9, p. 923–934, 18 set. 2020. DOI: 10.1038/s43018-020-00110-7.

POLO, P., GREMKE, N., STIEWE, T., *et al.* "Robustness of the Autophagy Pathway to Somatic Copy Number Losses", *Cells*, v. 11, n. 11, 1 jun. 2022. DOI: 10.3390/cells11111762.

QIAO, Q., WANG, Y., ZHANG, R., *et al.* "Autophagy related DNA methylation signature predict clinical prognosis and immune microenvironment in *Low-grade glioma*", *Translational Cancer Research*, v. 11, n. 7, p. 2157–2174, 1 jul. 2022. DOI: 10.21037/tcr-22-310.

QU, X. "Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene", *Journal of Clinical Investigation*, v. 112, n. 12, p. 1809–1820, 15 dez. 2003. DOI: 10.1172/jci200320039.

RODRIGUES DE SOUZA, E., ALMEIDA CORDEIRO NOGUEIRA, H., DA SILVA FRANCISCO JUNIOR, R., *et al.* "Integrated multi-optosis model for pan-cancer candidate biomarker and therapy target discovery", *Frontiers in Bioinformatics*, v. 5, 2025. DOI: 10.3389/fbinf.2025.1630518.

RUSSELL, R. C., GUAN, K. "The multifaceted role of autophagy in cancer", *The EMBO Journal*, v. 41, n. 13, 4 jul. 2022. DOI: 10.15252/embj.2021110031.

RYTER, S. W., CLOONAN, S. M., CHOI, A. M. K. Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Molecules and Cells*. [S.l.: s.n.].

SAHIN, I. H., AKCE, M., ALESE, O., *et al.* "Immune checkpoint inhibitors for the treatment of MSI-H/MMR-D colorectal cancer and a perspective on resistance mechanisms", *British Journal of Cancer*, v. 121, n. 10, p. 809–818, 12 nov. 2019. DOI: 10.1038/s41416-019-0599-y.

SANDOVAL-VALENCIA, R. R. "Cancer immunotherapy: Role of the immune system in malignant transformation", *Revista Medica del Hospital General de Mexico*, v. 82, n. 4, 29 out. 2019. DOI: 10.24875/HGMX.M19000029.

SANG, M., GE, J., GE, J., *et al.* "Immune regulatory genes impact the hot/cold tumor microenvironment, affecting cancer treatment and patient outcomes", *Frontiers in Immunology*, v. 15, 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1382842.

SCHAAF, M. B., HOUBAERT, D., MEÇE, O., *et al.* Autophagy in endothelial cells and tumor angiogenesis. *Cell Death and Differentiation*. [S.l.], Nature Publishing Group.

SHAN, C., CHEN, X., CAI, H., *et al.* "The emerging roles of autophagy-related micrnas in cancer", *International Journal of Biological Sciences*, v. 17, n. 1, p. 134–150, 2020. DOI: 10.7150/ijbs.50773.

STEL, V. S., DEKKER, F. W., TRIPEPI, G., *et al.* "Survival Analysis II: Cox Regression", *Nephron Clinical Practice*, v. 119, n. 3, p. c255–c260, 14 set. 2011. DOI: 10.1159/000328916.

SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., *et al.* "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries", *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021. DOI: 10.3322/caac.21660.

TAN, E. S., KNEPPER, T. C., WANG, X., *et al.* Copy Number Alterations as Novel Biomarkers and Therapeutic Targets in Colorectal Cancer. *Cancers*. [S.l.], MDPI.

THORSSON, V., GIBBS, D. L., BROWN, S. D., *et al.* "The Immune Landscape of Cancer", *Immunity*, v. 48, n. 4, p. 812–830.e14, 17 abr. 2018. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.023.

TIWARI, M., SRIVASTAVA, P., ABBAS, S., *et al.* Emerging Role of Autophagy in Governing Cellular Dormancy, Metabolic Functions, and Therapeutic Responses of Cancer Stem Cells. *Cells*. [S.l.], Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).

TSAI, C.-Y., LIN, T.-A., HUANG, S.-C., *et al.* "Is Adjuvant Chemotherapy Necessary for Patients with Deficient Mismatch Repair Gastric Cancer—Autophagy Inhibition Matches the Mismatched", *The Oncologist*, v. 25, n. 7, p. e1021–e1030, 1 jul. 2020. DOI: 10.1634/theoncologist.2019-0419.

TSUKADA, M., OHSUMI, Y. "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*", *FEBS Letters*, v. 333, n. 1–2, p. 169–174, 25 out. 1993. DOI: 10.1016/0014-5793(93)80398-E.

TUFAIL, M., JIANG, C. H., LI, N. Immune evasion in cancer: mechanisms and cutting-edge therapeutic approaches. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. [S.I.], Springer Nature.

VEGA-RUBÍN-DE-CELIS, S. The role of Beclin 1-dependent autophagy in cancer. *Biology*. [S.I.], MDPI AG.

VERMA, A. K., BHARTI, P. S., RAFAT, S., *et al.* Autophagy Paradox of Cancer: Role, Regulation, and Duality. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. [S.I.], Hindawi Limited.

WANG, H., SUN, P., YUAN, X., *et al.* Autophagy in tumor immune escape and immunotherapy. *Molecular Cancer*. [S.I.], BioMed Central Ltd.

WANG, S., XIONG, Y., ZHAO, L., *et al.* "UCSCXenaShiny: an R/CRAN package for interactive analysis of UCSC Xena data", *Bioinformatics*, v. 38, n. 2, p. 527–529, 3 jan. 2022. DOI: 10.1093/bioinformatics/btab561.

WANG, Y., ZHAO, Z., ZHUANG, J., *et al.* "Prognostic value of autophagy, microsatellite instability, and kras mutations in colorectal cancer", *Journal of Cancer*, v. 12, n. 12, p. 3515–3528, 2021. DOI: 10.7150/JCA.51430.

WEINSTEIN, J. N., COLLISSON, E. A., MILLS, G. B., *et al.* "The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project", *Nature Genetics*, v. 45, n. 10, p. 1113–1120, 26 out. 2013. DOI: 10.1038/ng.2764.

WHITE, E. "The role for autophagy in cancer", *Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 1, p. 42–46, 2 jan. 2015. DOI: 10.1172/JCI73941.

WHITE, E., DIPAOLA, R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clinical Cancer Research*. [S.I.: s.n.].

WU, B., ZHANG, B., LI, B., *et al.* Cold and hot tumors: from molecular mechanisms to targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. [S.I.], Springer Nature.

XIE, Y., KANG, R., SUN, X., *et al.* Posttranslational modification of autophagy-related proteins in macroautophagy. *Autophagy*. [S.I.], Landes Bioscience.

XUE, L.-Y., CHIU, S.-M., OLEINICK, N. L. "Atg7 deficiency increases resistance of MCF-7 human breast cancer cells to photodynamic therapy.", *Autophagy*, v. 6, n. 2, p. 248–55, fev. 2010. DOI: 10.4161/auto.6.2.11077.

YAMAMOTO, H., WATANABE, Y., MAEHATA, T., *et al.* "Microsatellite instability in cancer: a novel landscape for diagnostic and therapeutic approach", *Archives of Toxicology*, v. 94, n. 10, p. 3349–3357, 6 out. 2020. DOI: 10.1007/s00204-020-02833-z.

YAMAMOTO, K., VENIDA, A., YANO, J., *et al.* "Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I", *Nature*, v. 581, n. 7806, p. 100–105, 7 maio 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2229-5.

YANG, J., WANG, C., ZHANG, Y., *et al.* "A novel autophagy-related gene signature associated with prognosis and immune microenvironment in ovarian cancer", *Journal of Ovarian Research*, v. 16, n. 1, 1 dez. 2023. DOI: 10.1186/s13048-023-01167-5.

YANG, Q., WU, J., LUO, Y., *et al.* Guaiol regulates RAD51 stability via autophagy to induce cell apoptosis in non-small cell lung cancer. [S.l: s.n.], [S.d.]. Disponível em: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/).

YU, Y. S., KIM, I. S., BAEK, S. H. "Decoding the dual role of autophagy in cancer through transcriptional and epigenetic regulation", *FEBS Letters*, v. 599, n. 16, p. 2237–2249, 1 ago. 2025. DOI: 10.1002/1873-3468.70060.

YUAN, H., ZHU, X., ZHANG, J., *et al.* "Pan-cancer analyses reveal cancer-type-specific autophagy signatures with potential implications for prognosis and therapy response", *Journal of Cancer*, v. 16, n. 1, p. 122–134, 1 jan. 2025. DOI: 10.7150/jca.101046. .

ZHANG, Y., GUO, R., WANG, S.-S., *et al.* "Autophagy-related Proteins in Genome Stability: Autophagy-Dependent and Independent Actions", *International Journal of Biological Sciences*, v. 18, n. 14, p. 5329–5344, 2022. DOI: 10.7150/ijbs.76134.

ZHU, H., WU, H., LIU, X., *et al.* "Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells", *Autophagy*, v. 5, n. 6, p. 816–823, 16 ago. 2009. DOI: 10.4161/auto.9064.