

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente
Área de Oncologia

EXPRESSÃO DE QUINASES POUCO ESTUDADAS E SUA RELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS EM TUMORES SÓLIDOS

Pós-Graduando: José Augusto Stinghen Neto
Nível: Mestrado Acadêmico
Orientador: Dra. Glaucia Noeli Maroso Hajj
Co-Orientador: Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo, (28/12/2024)

FICHA CATALOGRÁFICA

S586e Neto, José Augusto Stinghen Neto
Expressão de quinases pouco estudadas e sua relação com aspectos clínicos e histopatológicos em tumores sólidos/ José Augusto Stinghen Neto - São Paulo, 2024.

111p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Glaucia Noeli Maroso Hajj

Descritores: Proteínas Quinases. Tumores Sólidos. Imuno-Histoquímica.

Protein Kinases. Solid Tumors. Immunohistochemistry.

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

Nome: José Augusto Stinghen Neto

Título: Expressão de quinases pouco estudadas e sua relação com aspectos clínicos e histopatológicos em tumores sólidos

Aprovado em: 29 / 11 / 2024

Banca Examinadora

Orientadora: Dra. Glaucia Noeli Maroso Hajj

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro titular da banca: Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osorio

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro titular da banca: Tiago Góss dos Santos

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro titular da banca: Marilene Hohmuth Lopes

Instituição: Universidade de São Paulo

Membro suplente da banca: Israel Tojal da Silva

Instituição: Fundação Antônio Prudente

*"Pedi, e dar-se-vos-á;
buscai, e achareis;
batei, e abrir-se-vos-á."
(Mateus 7:7)
- Jesus Cristo*

Desde os bancos do ensino médio, nutria um fascínio pelos estudos. Porém, algo me incomodava, uma sensação de incompletude. Foi na faculdade de biomedicina que encontrei a pesquisa, um portal para um universo antes inimaginável: a descoberta e o auxílio ao próximo. Compreendi meu propósito: contribuir para vidas mais saudáveis através da pesquisa científica. Acredito que a busca pelo conhecimento é inerente a todos nós. Sempre fui apaixonado pela física e seus mistérios, mas os números não me acompanhavam, gerando frustração e dúvidas sobre meu potencial. Foi quando desbravei a pesquisa biológica que meus olhos se abriram para um universo novo e palpável, igualmente intrigante.

Dedico esta dissertação a Deus, fonte da minha existência e da capacidade de desvendar, através da ciência, a Sua grandiosidade em cada detalhe.

Dedico à minha amada mulher Denise, meu porto seguro e amor incondicional. Sua crença em mim nunca vacilou, e seus olhos sempre enxergaram meu potencial.

Dedico aos meus familiares e amigos, pilares de força nesta jornada repleta de desafios. Dedico também aos meus queridos pássaros Duke, Denis, Manga (em memória), Luke, Muffi, Nala, e a minha gata Marie. Companheiros fiéis que me agradaram com suas brincadeiras e afeto incondicional.

Nesta dissertação, represento a culminação de um sonho, a realização de um propósito. É a prova de que, com perseverança e principalmente apoio, podemos superar qualquer obstáculo e alcançar objetivos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, no qual me possibilitou estar aqui. Vivo, feliz e realizado por tantas conquistas. Sem Ele e sua misericórdia, eu não conseguiria nenhum dos meus feitos. Sua humildade e Seus ensinamentos me mudaram por completo e me permitiu amadurecer física, mental e espiritualmente. Deus me ajudou em tantos momentos de compreensão e angústias. Momentos que eu sei que não conseguiria sozinho. Até onde cheguei foi pela permissão Dele. Tudo o que fiz e farei será para Ele, tudo me foi cedido, fora-me presenteado por Ele. “Portanto Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.” (Romanos 11:36)

A minha mulher Denise, que me guiou em tantos momentos de dúvida. Tantas incertezas se passaram, mas você ficou comigo até o fim. Eu viveria cada momento novamente, quantas vezes fossem necessárias para poder estar ao seu lado como estou hoje. Nosso amor é incomensurável, tal qual a nossa felicidade. Obrigado por sempre estar o meu lado, dando-me amor e conforto que tanto preciso.

Aos meus pais, Wallace e Gisele, gratidão por serem meus alicerces e por me guiarem nesta jornada. Sua crença inabalável em minhas capacidades me impulsionou a conquistar este sonho. Obrigado por me ensinarem valores inestimáveis e por serem exemplos de amor e dedicação.

A minha irmã Laura, que entre tantas brincadeiras, inspirou-me pela sua dedicação aos estudos e foco aonde pretende chegar.

A minha orientadora Glaucia, seus ensinamentos me moldaram para a pesquisa. Acolheu-me para ser seu aluno de iniciação científica e acreditou em mim para ser seu mestrando. Sem sua fé em mim e em minhas capacidades, eu não poderia chegar longe. Tantos momentos tivemos de discussões promissoras e tantos outros momentos quebrando nossas cabeças. Obrigado por ter me preparado para esse mundo de pesquisas que tanto sonhei.

A minha co-orientadora Dirce, que em meus momentos de dificuldade, abraçou minhas dúvidas e inseguranças e me deu apoio quando precisava.

Aos meus amigos e colegas, Bruno, Cíntia e Scheilla, incontáveis foram os momentos de brincadeiras e risos. Mas muitos outros também foram de ajuda. Meu projeto também não poderia ter avançado sem o conhecimento e visão que tiveram.

A Keila e ao Laboratório de Histologia-IHQ-TMA, indubitavelmente necessários para o andamento de meu projeto.

Aos médicos patologistas Dr. Felipe D'almeida Costa, Dr. Gabriel Oliveira Dos Santos, Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osorio, Dr. Clovis Antônio Lopes Pinto e Dra. Stephania Martins Bezerra do departamento de Anatomia Patológica. Não somente foram essenciais para a conclusão do meu trabalho, mas em cada momento que estávamos juntos, era me dado uma aula particular. O conhecimento que vocês passaram para mim estará sempre gravado em minhas memórias.

A todos aqueles que colaboraram de alguma maneira com o meu projeto, sejam nas rápidas conversas, dicas ou nos conselhos que foram fundamentais.

A toda Pós-Graduação, que ofereceu suporte a mim como aluno, cobrando-me quando necessário e respondendo todas as minhas dúvidas.

A todos os funcionários e técnicos que me deram suporte nos mais diversos momentos.

A Fundação Antônio Prudente que me forneceu todas as instalações, equipamentos e suporte para a realização do meu projeto.

RESUMO

Stinghen Neto JA. **Expressão de quinases pouco estudadas e seus aspectos clínicos e histopatológicos em tumores sólidos.** [Dissertação] São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2024.

O câncer é uma doença complexa caracterizada pela proliferação celular descontrolada e pela capacidade de invadir tecidos adjacentes e formar metástases. As proteínas quinases, uma família de enzimas que catalisam a transferência de grupos fosfato para proteínas-alvo, desempenham um importante papel na regulação de diversos processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose. Alterações na atividade das quinases estão frequentemente associadas ao desenvolvimento e progressão tumoral, tornando-as alvos promissores para o desenvolvimento de novas terapias. Em uma colaboração entre o A.C. Camargo Cancer Center e a Aché Laboratórios Farmacêuticos, este estudo investigou a expressão e o papel de quatro quinases pouco estudadas (VRK1, VRK2, PKMYT1 e LMTK3) em diferentes tipos de tumores sólidos. O objetivo principal foi analisar a expressão dessas quinases em tumores como gliomas, carcinoma hepatocelular, carcinoma de mama, adenocarcinoma pulmonar, adenocarcinoma de cólon e carcinoma renal de células claras, correlacionando os resultados com características histopatológicas e dados clínicos dos pacientes. Através de imuno-histoquímica em *tissue microarrays* (TMAs), nossos dados revelam um perfil complexo de expressão dessas quinases e suas associações com características clínicas e patológicas. Destacamos a alta expressão de VRK1 e VRK2 associada a glioblastomas e astrocitomas anaplásicos; a baixa expressão de PKMYT1 em adenocarcinoma pulmonar, correlacionada com melhor sobrevida, e sua alta expressão em tecidos metastáticos de carcinomas renais de células claras; e a associação entre a baixa expressão de LMTK3 e pior prognóstico no subtipo luminal B do câncer de mama. Esses resultados, somados às nossas demais descobertas sobre a relação entre as proteínas quinases e diferentes aspectos da biologia tumoral, corroboram a hipótese de que essas moléculas desempenham um papel fundamental na tumorigênese e progressão tumoral, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias direcionadas.

Descritores: Proteínas Quinases. Tumores Sólidos. Imuno-Histoquímica.

ABSTRACT

Stinghen Neto JA. **Expression of understudied kinases and their clinical and histopathological aspects in solid tumors.** [Dissertação] São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2024.

Cancer is a complex disease characterized by uncontrolled cell proliferation and the ability to invade adjacent tissues and form metastases. Protein kinases, a family of enzymes that catalyze the transfer of phosphate groups to target proteins, play a crucial role in regulating various cellular processes, including proliferation, differentiation, and apoptosis. Alterations in kinase activity are frequently associated with tumor development and progression, making them promising targets for new therapies. In a collaboration between A.C. Camargo Cancer Center and Aché Laboratórios Farmacêuticos, this study investigated the expression and role of four understudied kinases (VRK1, VRK2, PKMYT1, and LMTK3) in different solid tumors. The primary objective was to analyze the expression of these kinases in tumors such as gliomas, hepatocellular carcinoma, breast adenocarcinoma, lung adenocarcinoma, colon adenocarcinoma, and clear cell renal cell carcinoma, correlating the results with histopathological features and patient clinical data. Through immunohistochemistry on tissue microarrays (TMAs), our data reveal a complex expression profile of these kinases and their associations with clinical and pathological characteristics. We highlight the high expression of VRK1 and VRK2 associated with glioblastoma and anaplastic astrocytoma, the low expression of PKMYT1 in lung adenocarcinoma correlated with better survival, and its high expression in metastatic tissues of clear cell renal cell carcinoma; and the association between low expression of LMTK3 and worse prognosis in the luminal B subtype of breast cancer. These results, together with our other findings on the relationship between protein kinases and different aspects of tumor biology, support the hypothesis that these molecules play a pivotal role in tumorigenesis and progression, opening new avenues for the development of targeted therapies.

Key words: Protein Kinases. Solid Tumors. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 : FOSFORILAÇÃO DE UMA PROTEÍNA.	2
FIGURA 2 : ESTRUTURA BÁSICA DE UMA PROTEÍNA QUINASE E A DIFERENÇA ENTRE INATIVAÇÃO E ATIVAÇÃO.	4
FIGURA 3 : O QUINOMA HUMANO POSSUI DOIS GRUPOS, AS QUINASES PROTEICAS E LIPÍDICAS.	6
FIGURA 4 : VRK1 PARTICIPA NA FOSFORILAÇÃO DE DIVERSAS PROTEÍNAS.	12
FIGURA 5 : PARTICIPAÇÃO DE VRK2A E VRK2B NA REGULAÇÃO DE NFAT1 NO CICLO CELULAR.	14
FIGURA 6 : PARTICIPAÇÃO DE PKMYT1 NA REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR.	17
FIGURA 7 : FUNÇÕES CONHECIDAS DA PROTEÍNA LMTK3.	19
FIGURA 8 : <i>WORKFLOW</i> PARALELO DE DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS BASEADAS NA CARACTERIZAÇÃO DE QUINASES POUCO ESTUDADAS.	22
FIGURA 9 : <i>WORKFLOW</i> DE ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS PARA A PRIORIZAÇÃO DE CANDIDATOS A NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS EM TUMORES.	22
FIGURA 10 : ANTICORPOS VALIDADOS EM DUAS LINHAS LINHAGENS CELULARES, MCF7 E HEK 293T.	33
FIGURA 11 : DIFERENÇAS NAS INTENSIDADES DE VRK1 EM TECIDOS NÃO NEOPLÁSICOS E EM GLIOMAS.	34
FIGURA 12 : CURVA DES SOBREVIDA GLOBAL UTILIZANDO HSCORE DE VRK1 EM GLIOMAS (A) E APENAS COM CASOS DE GLIOBLASTOMA (B).	36
FIGURA 13 : VARIAÇÕES NAS INTENSIDADES DA MARCAÇÃO DE VRK2 EM TECIDOS NÃO NEOPLÁSICOS E GLIOMAS. (A) TECIDO NÃO NEOPLÁSICO, (B) AUSÊNCIA DE MARCAÇÃO, (C) MARCAÇÃO FRACA, (D) MARCAÇÃO MODERADA E (E) MARCAÇÃO FORTE.	36
FIGURA 14 : (A) CURVA DE SOBREVIDA GLOBAL EM GLIOMAS UTILIZANDO PONTO DE CORTE DE HSCORE DE 10. (B) CURVA DE SOBREVIDA GLOBAL EM GLIOBLASTOMA USANDO PONTO DE CORTE DE HSCORE DE 15.	38
FIGURA 15 : CURVAS DE SOBREVIDA GLOBAL VRK1 SOMADO A VRK2.	40
FIGURA 16 : VARIAÇÕES DAS INTENSIDADES DA MARCAÇÃO DE VRK1 EM CARCINOMA HEPATOCELULAR.	41
FIGURA 17 : DIFERENÇAS NAS INTENSIDADES DE MARCAÇÃO DE VRK2 NO CARCINOMA HEPATOCELULAR.	45
FIGURA 18 : DIFERENTES NÍVEIS DE INTENSIDADE DA MARCAÇÃO DE VRK1 EM CARCINOMA	

DE MAMA.	50
FIGURA 19 : VARIAÇÕES GRAUS DE INTENSIDADE NA MARCAÇÃO DE PKMYT1 EM ADENOCARCINOMA PULMONAR SÃO ILUSTRADAS.	55
FIGURA 20 : MARCAÇÕES DE PKMYT1 NOS NUCLEÓLOS DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS EM ADENOCARCINOMA PULMONAR.	56
FIGURA 21 : CURVAS DE SOBREVIDA GLOBAL (A) E SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO (B) UTILIZANDO PONTOS DE CORTE HSCORE DE 75 EM ADENOCARCINOMA PULMONAR.	58
FIGURA 22 : VARIAÇÕES DAS INTENSIDADES DAS MARCAÇÕES NUCLEARES E CITOPLASMÁTICAS DE PKMYT1 (CAT.: MA525034) EM CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS.	59
FIGURA 23 : VARIAÇÕES DAS INTENSIDADES DAS MARCAÇÕES NUCLEARES E CITOPLASMÁTICAS DE LMTK3 (CAT.: SC-100418) EM CARCINOMA DE MAMA.	64
FIGURA 24 : VARIAÇÕES DAS INTENSIDADES DAS MARCAÇÕES DE LMTK3 (CAT.: SC-100418) EM ADENOCARCINOMA COLORRETAL.	73
FIGURA 25 : IMUNOFLUORESCÊNCIA UTILIZANDO PKMYT1 COMO ALVO (EM VERDE) EM TRÊS LINHAGENS CELULARES.	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 : QUINASES PRIORIZADAS NA COLABORAÇÃO ACCCC-ACHÉ E OS TUMORES DE INTERESSE.	23
TABELA 2 : DESCRIÇÃO DOS TMAS UTILIZADOS.	26
TABELA 3 : CONDIÇÕES DAS DIFERENTES REAÇÕES DE IMUNO-HISTOQUÍMICA NOS TMAS DE GLIOMAS, CARCINOMA DE MAMA, GLIOMAS, ADENOCARCINOMA COLORRETAL, CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS, CARCINOMA HEPATOCELULAR E ADENOCARCINOMA PULMONAR.	28
TABELA 4 : MARCAÇÕES UTILIZADAS E SEUS RESPECTIVOS MÉTODOS NAS PROTEÍNAS QUINASES ESTUDADAS.	30
TABELA 5 : VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE TMAS.	32
TABELA 6 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VRK1 COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS RELACIONADAS À GLIOMAS.	35
TABELA 7 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VRK2 COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS RELACIONADAS À GLIOMAS.	37
TABELA 8 : ASSOCIAÇÃO DAS EXPRESSÕES DE VRK1 E VRK2 COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS RELACIONADAS À GLIOMAS. SOMATÓRIA DOS VALORES DE HSCORE VARIAM DE 0 A 600.	39
TABELA 9 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VRK1 COM VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR.	43
TABELA 10 : ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL E SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO EM CARCINOMA HEPATOCELULAR.	44
TABELA 11 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VRK2 COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS RELACIONADAS A CARCINOMA HEPATOCELULAR.	46
TABELA 12 : ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL E SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO DE VRK2 EM CARCINOMA HEPATOCELULAR.	47
TABELA 13 : ASSOCIAÇÃO DAS EXPRESSÕES DE VRK1 E VRK2 COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS RELACIONADAS A CARCINOMA HEPATOCELULAR.	48
TABELA 14 : ANÁLISES DE SOBREVIDA GLOBAL DE CASOS GRUPOS DE VRK1 E VRK2.	49
TABELA 15 : ANÁLISES DE SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO DE CASOS GRUPOS DE VRK1 E VRK2.	49
TABELA 16 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VRK1 COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS RELACIONADAS À CARCINOMA DE MAMA.	51

TABELA 17 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VRK1 COM AS VARIÁVEIS PATOLÓGICAS RELACIONADAS À CARCINOMA DE MAMA.	52
TABELA 18 : ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL DE VRK1 EM CARCINOMA DE MAMA.	53
TABELA 19 : ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO DE VRK1 EM CARCINOMA DE MAMA.	54
TABELA 20 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PKMYT1 COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS EM ADENOCARCINOMA PULMONAR.	57
TABELA 21 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PKMYT1 COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS EM CARCINOMA DE CÉLULAS CLARAS RENAI.	60
TABELA 22 : ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL E SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO DE PKMYT1 CITOPLASMÁTICO EM CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS.	61
TABELA 23 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PKMYT1 COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS EM CARCINOMA DE CÉLULAS CLARAS RENAI.	62
TABELA 24 : ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL E SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO DE PKMYT1 NUCLEAR EM CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS.	63
TABELA 25 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE LMTK3 CITOPLASMÁTICO DO ANTICORPO SANTA CRUZ (CAT: SC-100418) COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS RELACIONADAS A CARCINOMA DE MAMA.	65
TABELA 26 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE LMTK3 CITOPLASMÁTICO DO ANTICORPO SANTA CRUZ (CAT: SC-100418) COM AS VARIÁVEIS PATOLÓGICAS RELACIONADAS A CARCINOMA DE MAMA.	66
TABELA 27 : ANÁLISES DE SOBREVIDA GLOBAL DE LMTK3 CITOPLASMÁTICO UTILIZANDO O ANTICORPO SANTA CRUZ (CAT: SC-100418) EM CARCINOMA DE MAMA PELO TESTE LOG-RANK (MANTEL-COX).	67
TABELA 28 : ANÁLISES DE SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO DE LMTK3 CITOPLASMÁTICO UTILIZANDO O ANTICORPO SANTA CRUZ EM CARCINOMA DE MAMA.	68
TABELA 29 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE LMTK3 NUCLEAR DO ANTICORPO SANTA CRUZ COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS RELACIONADAS A CARCINOMA DE MAMA.	69
TABELA 30 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE LMTK3 NUCLEAR DO ANTICORPO SANTA CRUZ COM AS VARIÁVEIS PATOLÓGICAS RELACIONADAS A CARCINOMA DE MAMA.	70
TABELA 31 : ANÁLISES DE SOBREVIDA GLOBAL DE LMTK3 NUCLEAR UTILIZANDO O ANTICORPO SANTA CRUZ EM CARCINOMA DE MAMA.	71
TABELA 32 : ANÁLISES DE SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO DE LMTK3 NUCLEAR UTILIZANDO O ANTICORPO SANTA CRUZ EM CARCINOMA DE MAMA.	72

TABELA 33 : ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE LMTK3 DO ANTICORPO SANTA CRUZ (CAT: SC-100418) COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS RELACIONADAS A ADENOCARCINOMA COLORRETAL.	74
TABELA 34 : ANÁLISES DE SOBREVIDA GLOBAL E LIVRE DE PROGRESSÃO DE LMTK3 UTILIZANDO O ANTICORPO SANTA CRUZ EM ADENOCARCINOMA COLORRETAL.	75
TABELA 35 : RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS NOS DIFERENTES TIPOS TUMORAIS E SUAS RESPECTIVAS PROTEÍNAS QUINASES.	82

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Astrocitoma Anaplásico
ACCCC	A.C.Camargo Cancer Center
AD	Astrocitoma Difuso
AGC	<i>Protein Kinase A, G and C</i>
AKT	<i>Protein kinase B</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
BRCA	<i>Breast Adenocarcinoma</i>
CAMK	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent Kinase</i>
Cat	Catálogo
ccRCC	Carcinoma Renal de Células Claras
CDC2	<i>Cyclin-Dependent Protein Kinase Cdk1/Cdc2</i>
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CK1	<i>Casein Kinase 1</i>
COAD	<i>Colon Adenocarcinoma</i>
CTK	<i>Cytoplasmic Tyrosine Kinases</i>
ePK	<i>Eukaryotic Protein Kinase</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
ERα	<i>Estrogen Receptors Alpha</i>
GBM	Glioblastoma
GMP	<i>Guanosine-5'-monophosphate</i>
GTP	<i>Guanosine-5'-triphosphate</i>
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>

HER2+	Mutação positiva no gene HER2
HS	<i>HScore</i>
HSa	<i>HScore alto</i>
HSb	<i>HScore baixo</i>
HSLH	Análise entre grupos <i>Low</i> e <i>High</i>
KIRC	<i>Kidney Renal Clear Cell Carcinoma</i>
LA	Luminal A
LB	Luminal B
LIHC	<i>Liver Hepatocellular Carcinoma</i>
LMR	<i>Lemur</i>
LMTK3	<i>Lemur Tyrosine Kinase 3</i>
LRRK	<i>Leucine-rich repeat kinase</i>
LUAD	<i>Lung Adenocarcinoma</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Md	Mediana
MLK	<i>Mixed lineage Kinases</i>
MLKL	<i>Mixed lineage Kinases-Like</i>
nRTK	<i>Non Receptor Tyrosine Kinases</i>
PKMYT1	<i>Protein Kinase, Membrane-associated Tyrosine/Threonine 1</i>
PLK1	<i>Polo-like Kinase 1</i>
RAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RGC	<i>Receptor Guanylyl Cyclases</i>
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinases</i>
SG	Sobrevida Global
SLP	Sobrevida Livre de Progressão

STE	<i>Serine/threonine</i>
STE	STE20, STE11 <i>and</i> STE7
Thr18	Treonina 18
TK	<i>Tyrosine Kinase</i>
TKL	<i>Tyrosine Kinase-Like</i>
TKT	<i>Transketolase</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TN	Triplo Negativo
TTBK	<i>Tau-Tubulin</i>
VRK	<i>Vaccinia-related Kinase</i>
VRK1	<i>Vaccinia-related Kinase 1</i>
VRK2	<i>Vaccinia-related Kinase 2</i>
VRK2A	<i>Vaccinia-related Kinase 2A</i>
VRK2B	<i>Vaccinia-related Kinase 2B</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 PROTEÍNAS QUINASES	1
1.2 CLASSIFICAÇÃO	5
1.2.1 GRUPO TK	6
1.2.2 GRUPO TKL	7
1.2.3 GRUPO STE	7
1.2.4 GRUPO CK1	8
1.2.5 GRUPO AGC	8
1.2.6 GRUPO CAMK	9
1.2.7 GRUPO CMGC	9
1.2.8 GRUPO RGC	10
1.3 QUINASES POUCO ESTUDADAS	10
1.3.1 VRK1	12
1.3.2 VRK2	13
1.3.3 PKMYT1	16
1.3.4 LMTK3	18
1.4 ESTRATÉGIAS DE DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS UTILIZANDO QUINASES POUCO ESTUDADAS	20
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 CASUÍSTICA, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	25
3.2 TÉCNICA DE MICROARRANJOS TECIDUAIS	26
3.3 REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	27
3.4 <i>HSCORE</i>	29
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	30
3.6 CULTURA CELULAR	31
3.7 VALIDAÇÃO DE ANTICORPOS ATRAVÉS DE ENSAIO DE <i>WESTER BLOT</i>	32
4. RESULTADOS	33

4.1 CONFIRMAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS	33
4.2 GLIOMAS	33
4.2.1 VRK1	34
4.2.2 VRK2	36
4.2.3 ANÁLISE COMBINADA DE VRK1 E VRK2	38
4.3 CARCINOMA HEPATOCELULAR	40
4.3.1 VRK1	41
4.3.2 VRK2	44
4.3.3 ANÁLISE COMBINADA DE VRK1 E VRK2	47
4.4 carcinoma	Error! Indicador Não Definido .
4.4.1 VRK1	51
4.5 ADENOCARCINOMA PULMONAR	55
4.5.1 PKMYT1	57
4.6 CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS	58
4.6.1 PKMYT1	59
4.7 carcinoma	Error! Indicador Não Definido .
4.7.1 LMTK3	63
4.7.2 ADENOCARCINOMA COLORRETAL	72
5. DISCUSSÃO	76
6. CONCLUSÃO	83
7. REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 PROTEÍNAS QUINASES

As proteínas quinases são importantes enzimas que conduzem a fosforilação de proteínas, regulando diversos processos biológicos. Sua importância é tamanha que elas constituem a maior família de proteínas em eucariotos, com mais de 50 famílias distintas (Fabbro et al., 2015). No organismo humano, centenas delas desempenham um papel crucial no crescimento e na multiplicação celular, além de estarem intimamente envolvidas na resposta imunológica. O genoma humano possui 518 proteínas quinases, cerca de 20 quinases lipídicas e 156 fosfatases, que controlam a fosforilação e desempenham papéis vitais em processos biológicos como proliferação e apoptose (Castelo-Soccio et al., 2023; Theivendren et al., 2021).

A fosforilação, um processo catalisado pelas quinases, consiste na adição de um grupo fosfato a um resíduo de aminoácido específico (serina, treonina ou tirosina) em uma proteína-alvo. Essa modificação pós-traducional induz alterações conformacionais na proteína, impactando significativamente sua função (Lodish, 2021; Weber, 2010). As consequências da fosforilação são diversas, incluindo a ativação ou inativação de enzimas, a regulação da localização subcelular de proteínas, o controle da expressão gênica e a modulação de interações proteicas (Bhullar et al., 2018; Roskoski, 2023).

A especificidade da fosforilação é conferida pela estrutura das quinases, que reconhecem sequências de aminoácidos específicas nos seus substratos (Kobe & Kemp, 2010). A família das quinases é extremamente diversificada, com centenas de membros em humanos, cada uma com funções celulares distintas (Duong-Ly & Peterson, 2013). A ativação de diferentes quinases desencadeia uma cascata de eventos moleculares que regulam processos biológicos fundamentais, como a proliferação celular, adesão celular, o desenvolvimento embrionário, a resposta imune e o metabolismo (Bhullar et al., 2018; Roskoski, 2023).

A fosforilação atua como um “interruptor molecular”, ativando ou desativando proteínas diretamente (Duong-Ly & Peterson, 2013; Essegian et al., 2020). Entre os fosfatos α (alfa), β (beta) e γ (gama), o fosfato α é o mais próximo à ribose, o fosfato β está localizado entre os fosfatos α e γ , e o fosfato γ é o mais distante da ribose (sendo o fosfato α o primeiro a ser removido durante a hidrólise do ATP, seguido pelo fosfato β e, por último, o fosfato γ). As quinases, atuando como fosfotransferases, ligam-se especificamente ao γ -fosfato (Castelo-

Soccio et al., 2023). A ligação ocorre em cadeias de serina com mais frequência. Já a fosforilação de tirosina acontece de forma menos comum, mas também significativa, especialmente no domínio de tirosina quinase. Outros aminoácidos, como histidina e aspartato, também podem ser fosforilados, mas acontecem com menos frequência. As fosfatases reverterem esse processo, removendo o grupo fosfato (Theivendren et al., 2021).

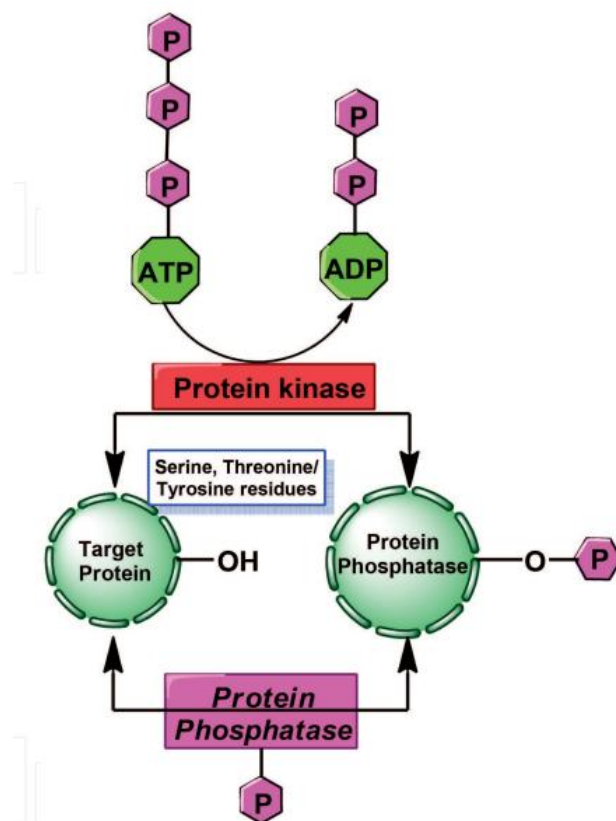


Figura 1: Fosforilação de uma proteína. O processo ocorre através da transferência de um fosfato (P) presente no ATP (trifosfato de adenosina) de uma quinase para o resíduo de serina, treonina ou tirosina de sua proteína alvo. O processo pode ser revertido através de proteínas fosfatases.

Fonte: Adaptado de Theivendren et al, 2021.

As proteínas quinases, por serem críticas, necessitam de uma rigorosa regulação para exercerem suas funções corretamente. Erros na regulação podem levar a problemas, como diversas neoplasias (Cheng et al., 2011). A regulação de proteínas quinases pode ser dividida em mecanismos intrínsecos (autofosforilação, domínios regulatórios e isoformas) e extrínsecos (proteínas regulatórias, modificações pós-traducionais, estresse celular e moléculas pequenas) (Fabbro; Cowan-Jacob; Moebitz, 2015; Reinhardt; Leonard, 2023).

Tomando partida dos mecanismos intrínsecos, as proteínas quinases podem possuir

sítios de autofosforilação, podendo modular sua atividade catalítica e assim ativar, inibir ou alterar a especificidade do substrato da quinase (Reinhardt; Leonard, 2023). Os domínios estruturais intrínsecos à quinase, ou domínios regulatórios, como os lóbulos N e C, que são domínios estruturais responsáveis pela ligação do ATP e do substrato, respectivamente, facilitando a transferência do grupo fosfato, podendo adotar diferentes conformações, expondo ou ocultando o sítio alvo. Alterações conformacionais induzidas por ligantes ou modificações pós-traducionais podem regular a atividade da quinase (Fabbro; Cowan-Jacob; Moebitz, 2015). As proteínas quinases podem possuir diversas isoformas, e diferentes isoformas de uma mesma quinase podem apresentar propriedades cinéticas e regulatórias distintas, expandindo o repertório funcional da família de quinases (Fabbro; Cowan-Jacob; Moebitz, 2015; Theivendren et al., 2021).

Os mecanismos extrínsecos possuem as proteínas reguladoras, que como o seu próprio nome diz, são proteínas que regulam a atividade de quinases. Temos as proteínas reguladoras, que se ligam tanto à quinase quanto ao substrato, facilitando o processo de fosforilação (Reinhardt; Leonard, 2023). Existem também as proteínas *scaffold*, ou proteínas estruturais, as quais desempenham um papel fundamental na organização de cascata de sinalização, favorecendo a eficácia desses processos. Essas proteínas são altamente dinâmicas, passíveis de mudanças conformacionais que exercem influência sobre a sinalização em questão (Dirusso; Dashtiahangar; Gilmore, 2022). Por fim, a respeito de proteínas reguladoras, há os inibidores, que se ligam ao sítio ativo ou a outros sítios alostéricos da quinase, bloqueando sua atividade (Castelo-Soccio et al., 2023).

Além das proteínas reguladoras, existem as modificações pós-traducionais. Dentre elas, a fosforilação de resíduos de aminoácidos específicos pode ativar ou inibir a atividade da quinase. Já a ubiquitinação pode direcionar a quinase para a degradação proteossomal (Castelo-Soccio et al., 2023). Por fim temos a sumoilação (*sumoylation*). Ela ocorre em proteínas quinases através da conjugação covalente de proteínas SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) a estas enzimas, um processo que pode alterar a função, estabilidade ou localização da proteína quinase (Chen et al., 2023; Huang; Sahin; De Thé; Lallemand-Breitenbach, 2022; Huang; Yang; Lin, 2024; Yang; Lin, 2024).

O estresse celular também pode desempenhar um papel regulador. Em determinadas circunstâncias de estresse, como exposição a altas temperaturas e danos ao material genético, podem desencadear vias de sinalização que controlam a atividade de enzimas quinases (Arter et al., 2022). Já as moléculas pequenas, como AMPc, Ca^{2+} e diacilglicerol também participam da regulação de proteínas quinases. Elas se ligam as quinases dependes de segundo

mensageiro, ativando-as (Arter et al., 2022; Reinhardt; Leonard, 2023; Theivendren et al., 2021). Por fim temos os fármacos, utilizados em diversos tipos de tratamentos patológicos, e atuam diretamente como inibidores de proteínas quinases (Castelo-Soccio et al., 2023).

O núcleo funcional da proteína quinase é o domínio catalítico, caracterizado por uma estrutura altamente conservada (Arter et al., 2022; McClendon et al., 2014). Este domínio contém os resíduos catalíticos essenciais para a transferência do grupo fosfato e geralmente adota uma conformação bilobular, composta por um lobo N-terminal e um lobo C-terminal, interligados pelas regiões *R-spine* e *C-spine*. A fenda catalítica, localizada entre ambos, abriga o sítio ativo onde ocorre a reação de fosforilação (Arter et al., 2022). A *R-spine*, também chamada de coluna regulatória, funciona como um gatilho que sinaliza a ativação da quinase. A *C-spine*, ou coluna catalítica, age como as engrenagens do mecanismo, sendo ancorada na α F-hélice, o que garante a estabilidade da proteína (Kornev, Taylor, & Ten Eyck, 2008). A α C-hélice, localizada no domínio N, participa da ativação da quinase, movendo-se como um gatilho para permitir a ligação com o substrato e a fosforilação (Palmieri & Rastelli, 2013).

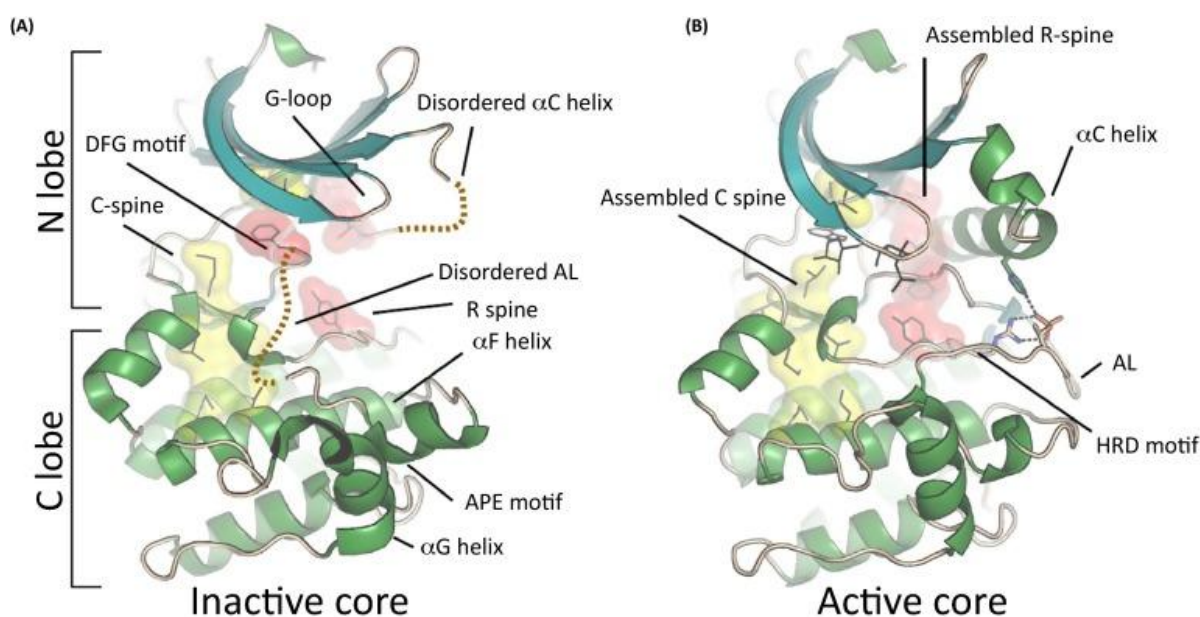


Figura 2: Estrutura básica de uma proteína quinase e a diferença entre inativação e ativação. (A) Quando a quinase está inativa, seus dois lobos não estão corretamente conectados. (B) Para ativar a quinase, é necessário que o ATP se ligue a ela, o que faz com que os lobos se conectem corretamente. Isso permite que as estruturas *R-spine* e *C-spine* se alinhem, ativando a proteína, com a ajuda da alça de ativação (AL).

Fonte: Adaptado de Gógl et al. (2019)

Uma característica marcante das proteínas quinases é sua alta flexibilidade

conformacional, que permite a essas enzimas adotarem múltiplas formas para interagir com diferentes moléculas ou ambientes, desempenhando diversas funções biológicas de maneira eficiente (Huse; Kuriyan, 2002). A conformação do domínio catalítico pode variar significativamente entre os estados ativo e inativo, e a transição entre estes estados é frequentemente mediada por interações com outras proteínas ou pequenas moléculas (Huse; Kuriyan, 2002).

Além do domínio catalítico, muitas proteínas quinases possuem domínios regulatórios que modulam sua atividade. Estes domínios podem interagir com outras proteínas, pequenas moléculas ou modificações pós-traducionais, como a fosforilação, para controlar a atividade enzimática (Kornev; Taylor; Ten Eyck, 2008).

Muitas proteínas quinases formam complexos com outras proteínas, o que pode influenciar sua atividade e especificidade. A formação destes complexos é frequentemente mediada por motivos estruturais específicos, como hélices anfipáticas que podem servir como andaimes para a montagem de estruturas maiores (Kornev; Taylor; Ten Eyck, 2008).

1.2 CLASSIFICAÇÃO

A classificação das quinases se baseia na estrutura de seus domínios catalíticos, compostos por 250 a 290 aminoácidos aproximadamente (Kostich et al., 2002). A conservação de muitos desses aminoácidos é essencial para a categorização das quinases em oito grupos principais, cada um com características distintas e funções específicas em processos celulares (Fabbro et al., 2015). As quinases são classificadas pelo aminoácido que fosforilam, sendo a maioria serina/treonina quinase. Elas podem ser ativadas ou desativadas de várias maneiras, incluindo autofosforilação e interação com proteínas ativadoras ou inibidoras. (WURTZ et al., 2011)

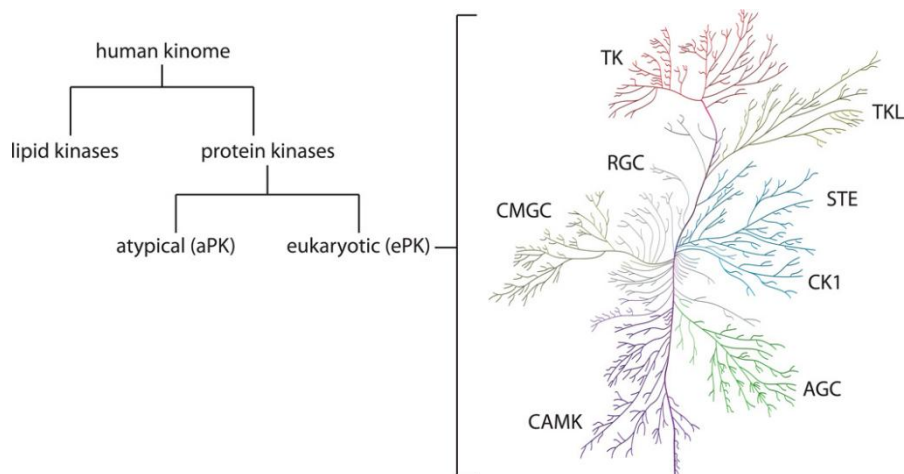


Figura 3: O quinoma humano possui dois grupos, as quinases proteicas e lipídicas. A árvore das ePKs (proteínas quinases eucarióticas) é formada por 8 grupos que se ramificam em diferentes famílias.

Fonte: Adaptado de Duolong-Ly; Peterson (2013).

1.2.1 GRUPO TK

As tirosinas quinases (TKs) constituem uma ampla família de enzimas responsáveis pela fosforilação do aminoácido tirosina em proteínas substrato, desempenhando papéis fundamentais na regulação de diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação, sobrevivência e motilidade (Alberts et al., 2015; Yang et al., 2020). Dentre esse grupo, mais da metade são as receptoras tirosina quinases (RTKs), proteínas transmembrana que atuam na cascata de sinalização iniciada pela ligação de fatores de crescimento a seus domínios extracelulares (K. Bhanumathy et al., 2021; Rozen; Shohet, 2021). A ativação das RTKs desencadeia rotas de sinalização intracelulares complexas, mediadas por proteínas adaptadoras e quinases efetoras, culminando em respostas celulares variadas (Esteban-Villarrubia et al., 2020). O genoma humano abriga 20 subfamílias de RTKs, enquanto outras 9 subfamílias, chamadas de CTKs ou nRTKs, estão presentes no citoplasma (Lemmon & Schlessinger, 2010).

O desbalanço na sinalização mediada por TKs está implicado na patogênese de diversas doenças, incluindo o câncer. Mutações ativadoras em genes codificadores de RTKs, ou amplificações gênicas, podem promover a proliferação celular descontrolada e a sobrevivência de células tumorais (Hartmann et al., 2009; Shyam Sunder; Sharma; Pokharel, 2023). O desenvolvimento de inibidores de tirosina quinase (TKIs) representou um avanço terapêutico significativo no tratamento do câncer, bloqueando especificamente a atividade dessas enzimas oncogênicas (Gao et al., 2023). No entanto, a resistência a TKIs é uma

limitação clínica importante, exigindo a busca por novas estratégias terapêuticas (Bai et al., 2019).

1.2.2 GRUPO TKL

A família de proteínas *tyrosine kinase-like* (TK-like) representa um grupo diversificado de receptores transmembrana que, embora não possuam a atividade enzimática intrínseca de fosforilação de tirosina característica das tirosinas quinases receptoras (RTKs), compartilham similaridades estruturais e funcionais com estas últimas. Essas proteínas desempenham um papel crucial na transdução de sinais extracelulares para o interior da célula, modulando uma variedade de processos biológicos, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência e resposta imune (Baier & Szyszka, 2020; Schaefer et al., 2007).

1.2.3 GRUPO STE

Serina/treonina quinases são enzimas que catalisam a transferência de um grupo fosfato do ATP para os resíduos de serina ou treonina em proteínas alvo, processo fundamental na regulação de diversas funções celulares. Essa modificação pós-traducional confere versatilidade funcional a essas quinases, influenciando processos como proliferação, diferenciação, resposta ao estresse e apoptose (Hunter, 2001; Hurst & Dohlman, 2013). A especificidade por substratos distintos é determinada por complexas interações proteína-proteína e motivos de reconhecimento de sequência (Ma; Nicolet, 2023).

Conservadas evolutivamente, as serina/treonina quinases desempenham papéis essenciais em diferentes organismos. Em bactérias, regulam processos como virulência e formação de biofilmes (Sathya Narayanan Nagarajan; Lenoir; Christophe Grangeasse, 2022). Em eucariotos, a Proteína Quinase C (PKC) exemplifica a diversidade funcional dessas quinases, estando envolvida em processos de transdução de sinais celulares (Garcia-Concejo; Larhammar, 2021).

A desregulação dessas quinases está associada a diversas patologias, especialmente o câncer (Manning et al., 2002). A quinase Akt, por exemplo, desempenha papel central na proliferação celular e sobrevivência, sendo sua ativação constitutiva um marcador de prognóstico desfavorável em cânceres como o de mama (Miricescu et al., 2020).

1.2.4 GRUPO CK1

Conhecido por sua distinção estrutural e funções celulares essenciais, o grupo CK1 (*Cell Kinase 1*, ou mais conhecida como *Caseína Kinase 1*) é pequeno, mas desempenha um papel fundamental na regulação da proliferação celular, segregação cromossômica e ritmo circadiano (Fulcher; Sapkota, 2020; Knippschild et al., 2005).

As quinases da família CK1 (*Cell Kinase 1*, ou mais conhecida como *Caseína Kinase 1*) constituem um grupo diversificado de enzimas que desempenham papéis cruciais em uma ampla gama de processos celulares em eucariotos (Fulcher; Sapkota, 2020; Knippschild et al., 2005). Caracterizadas por sua especificidade para os aminoácidos serina e treonina, essas quinases atuam como reguladores-chave em diversas vias de sinalização, incluindo Wnt, ritmos circadianos, transporte nucleocitoplasmático de fatores de transcrição, reparo do DNA e transcrição gênica (Niehrs, 2012).

A família CK1 exibe uma complexidade notável, com múltiplas isoformas que apresentam padrões de expressão tecidual e subcelular distintos. Essa diversidade funcional permite que as CK1s participem em uma variedade de processos biológicos. Este grupo inclui 11 quinases diferentes, separadas em três grupos: CK1, VRK e TTBK e sua importância das CK1s na tumorigênese tem sido amplamente reconhecida, com diversas isoformas sendo associadas ao desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de câncer (Ikezu & Ikezu, 2014; Knippschild et al., 2005).

1.2.5 GRUPO AGC

O grupo de quinases AGC é composto por 63 quinases de proteínas relacionadas evolutivamente, incluindo PDK1, PKB/Akt, SGK, PKC, PRK/PKN, MSK, RSK, S6K, PKA, PKG, DMPK, MRCK, ROCK, NDR, LATS, CRIK, MAST, GRK, Sgk494 e YANK12. Essas quinases são ativadas fisiologicamente a jusante da sinalização do fator de crescimento e são efetores a jusante de uma ampla gama de sinais (Leroux; Schulze; Biondi, 2018; Pearce et al., 2010). A conformação do domínio catalítico de muitas quinases AGC é regulada alostericamente através da modulação da conformação de um local regulatório no pequeno lobo do domínio da quinase, o "bolso PIF" (*PIF-pocket*) (Arencibia et al., 2013; Leroux; Schulze; Biondi, 2018).

1.2.6 GRUPO CAMK

As quinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (CAMKs) são uma família de proteínas serina/treonina quinases que desempenham papéis fundamentais em muitos processos biológicos, incluindo a transdução de sinal de cálcio, a plasticidade sináptica e a regulação da expressão gênica (Brzozowski; Skelding 2019). As CAMKs são ativadas pela ligação de Ca^{2+} /calmodulina, que resulta em uma mudança conformacional que alivia a autoinibição do domínio quinase (Brzozowski; Skelding 2019; Simon Dontoro Dekomah et al. 2022)

É composto por 17 quinases categorizadas em oito famílias e existem vários subtipos de CAMKs, incluindo CAMK1, CAMK2, CAMK4 e CAMKK, cada um com funções e localizações subcelulares distintas (Bayer; Schulman, 2019; Junho et al., 2020). Por exemplo, a CAMK2 é abundantemente expressa no cérebro e é crucial para a plasticidade sináptica e a memória, enquanto a CAMK1 e a CAMK4 estão envolvidas na regulação da expressão gênica através da fosforilação de fatores de transcrição (Bayer; Schulman, 2019; Junho et al., 2020; Simon Dontoro Dekomah et al. 2022)

1.2.7 GRUPO CMGC

As quinases CGMC, nomeadas a partir das iniciais de suas principais famílias de quinases, CDKs, MAPKs, GSKs e CLKs, desempenham papéis críticos em muitos processos celulares. A desregulação dessas quinases tem sido associada ao desenvolvimento e progressão do câncer, destacando sua importância na biologia do câncer (Chowdhury; Dashi; Keskitalo, 2023; Garai et al. 2012; Varjosalo et al. 2013). As quinases CGMC, que incluem as quinases dependentes de ciclina (CDKs), as quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), as quinases de glicogênio sintase (GSKs) e as quinases semelhantes a Cdc2 (CLKs), desempenham papéis fundamentais nas vias de sinalização celular, incluindo a regulação do ciclo celular, proliferação, diferenciação, apoptose e regulação da expressão gênica (Chowdhury; Dashi; Keskitalo, 2023).

1.2.8 GRUPO RGC

O grupo de quinases RGC (Receptor Guanylate Cyclases) é caracterizado por uma estrutura incomum: são receptores transmembranares de passagem única que possuem um domínio de guanilato ciclase ativo e um domínio de quinase cataliticamente inativo no lado intracelular (Duda et al. 2011). O domínio de guanilato ciclase produz o segundo mensageiro cGMP, enquanto o domínio de quinase pode ter um papel regulatório e pode se ligar ao ATP1.

Os domínios de quinase dos RGCs animais carecem do motivo catalítico HRD e são classificados como pseudocinasas (Duda et al. 2011; Duong-Ly; Peterson, 2013). No entanto, sabe-se que alguns se ligam ao ATP1 e isso é pensado para causar mudança conformacional e regular a atividade do domínio de guanilato ciclase (Duda et al. 2011). As quinases de proteínas são enzimas intracelulares que regulam o crescimento e a proliferação celular, bem como o desencadeamento e a regulação das respostas imunológicas. As quinases de proteínas são alvos terapêuticos importantes no câncer devido ao seu papel crítico nos mecanismos de sinalização que impulsionam as características das células malignas (Theivendren et al., 2021).

1.3 QUINASES POUCO ESTUDADAS

Historicamente, a maioria das pesquisas tem focado em quinases bem conhecidas devido às suas claras implicações em muitas doenças, especialmente o câncer (Baier; Szyszka, 2020; Bhullar et al., 2018; Southekal et al., 2021). No entanto, o *dark kinome*, composto por quinases pouco estudadas, representa uma fronteira relativamente inexplorada que pode conter chaves fundamentais para novos entendimentos e terapias (Berginski et al., 2020; Essegian et al., 2023; Flax et al., 2024; Moret et al., 2020; Nguyen et al., 2017).

Essas quinases pouco estudadas, também conhecidas como quinases órfãs, abrangem aproximadamente 20% do kinoma humano. Isso significa que aproximadamente 160 quinases ainda têm sua função e importância largamente desconhecidas (Moret et al., 2020). Iniciado em 2014, o projeto *Illuminating the Druggable Genome* (IDG) tem sido importante para trazer atenção para essas proteínas negligenciadas, visando preencher as lacunas no conhecimento sobre proteínas que são potenciais alvos terapêuticos, mas que têm sido subexploradas pela pesquisa biomédica convencional (Sharma et al., 2024).

A abordagem sistemática de consórcios como o IDG inclui a utilização de tecnologias de ponta, como CRISPR-Cas9 para edição de genes e RNA-Seq para análise de expressão gênica, possibilitando a análise funcional dessas quinases de maneira inédita (Moret et al.,

2020; Soleymani et al., 2023; Safer et al., 2024). Esses avanços na tecnologia de biologia molecular permitem a investigação funcional dessas quinases com uma precisão sem precedentes, facilitando a identificação de novas funções e interações (Soleymani et al., 2023).

A caracterização funcional dessas quinases envolve uma combinação de abordagens experimentais e computacionais. Ferramentas como o já dito CRISPR-Cas9 permitem a edição precisa do genoma para criar modelos de knockout e estudar a função de quinases específicas. Estudos de proteômica e transcriptômica de alto rendimento são essenciais para mapear as vias de sinalização e as redes de interação proteica dessas quinases. Ensaios fenotípicos de alto rendimento têm sido particularmente úteis na identificação de funções biológicas dessas quinases em diferentes contextos celulares (Moret et al., 2020).

A necessidade de estudar essas quinases pouco caracterizadas advém de sua potencial contribuição para novas descobertas em biologia celular e molecular. Quinases pouco estudadas podem desempenhar papéis cruciais em vias celulares não convencionais ou redundantes que só se tornam aparentes sob condições patológicas específicas, como em certos tipos de tumores sólidos (Sharma et al., 2024). Estudos recentes indicam que algumas dessas quinases podem influenciar o microambiente tumoral, modulando interações entre células tumorais e células do estroma, e influenciando processos como angiogênese, invasão e metástase (Essegian et al., 2020; Gomez et al., 2024).

A relevância clínica das quinases pouco estudadas é ressaltada pela descoberta de mutações específicas em genes dessas quinases em tumores sólidos, como as mutações em PKMYT1 em câncer de pulmão de células não pequenas e TLK2 em leucemia mieloide aguda (Asquith; Laitinen; East, 2019; Jin et al., 2024). Identificar e caracterizar essas mutações pode levar ao desenvolvimento de terapias personalizadas que visem essas alterações específicas, melhorando a eficácia do tratamento e minimizando os efeitos colaterais. Este desequilíbrio no conhecimento é atribuído a uma combinação de desafios técnicos e uma histórica falta de interesse devido à ausência de dados preliminares promissores (Gomez et al., 2024; Oprea et al., 2018). O estudo das quinases pouco exploradas oferece a oportunidade de desenvolver inibidores específicos para essas proteínas, resultando em novas abordagens terapêuticas para diversos tipos de câncer (Essegian et al., 2020). Em colaboração com a Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., o A.C. Camargo Cancer Center está identificando e validando quatro quinases pouco estudadas como potenciais alvos terapêuticos em tumores sólidos: VRK1, VRK2, PKMYT1 e LMTK3. Essas quinases, embora pouco conhecidas na literatura, têm o potencial de oferecer novas opções de tratamento em oncologia.

1.3.1 VRK1

VRK1 (*Vaccinia-related kinase 1*) pertence à família de proteínas quinases VRK, composta por três membros: VRK1, VRK2 e VRK3. Classificada no grupo CK1, a VRK1 é amplamente expressa em todos os tecidos humanos e ao longo do ciclo celular, localizando-se predominantemente no citoplasma (Elke P.F. Klerkx; Lazo; Askjaer, 2009).

A VRK1 atua ativamente no checkpoint de G2/M, prevenindo a divisão celular na presença de DNA danificado, um mecanismo estritamente regulado e necessário para a manutenção da integridade genômica (Lopez-Serrano et al., 2014). Entre os seus substratos estão p53, Sox2 e Jun, cuja fosforilação por VRK1 modula suas atividades e funções, influenciando processos celulares como proliferação, diferenciação e apoptose (Campillo-Marcos; Lazo, 2018). Esta capacidade de fosforilar múltiplas proteínas sublinha a versatilidade e importância da VRK1 em diversas vias celulares (Monte-Serrano; Lazo, 2023).

A estrutura da VRK1 revela uma típica configuração de quinase com domínio catalítico bem conservado, similar ao de outras proteínas do grupo CK1. Esta quinase também possui domínios regulatórios que facilitam suas interações com outras proteínas, tanto dentro do núcleo quanto no citoplasma (Salzano et al., 2014).

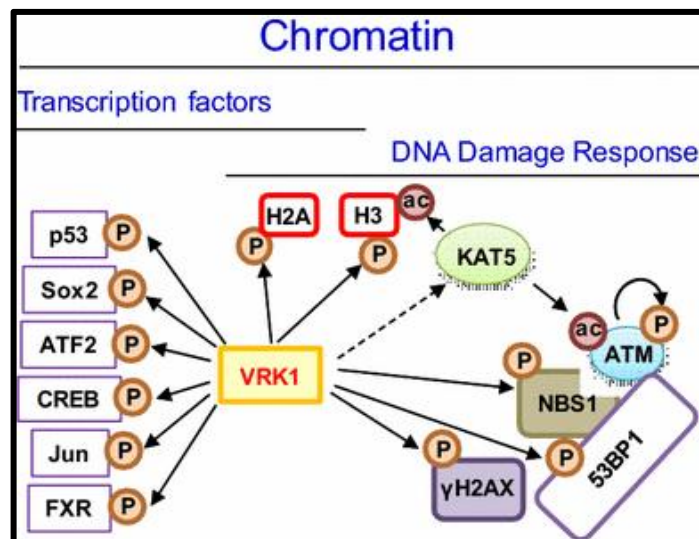


Figura 4: VRK1 participa na fosforilação de diversas proteínas.

Fonte: Adaptado de Campillo-Marcos; Lazo (2018).

No contexto das interações proteicas, a VRK1 é conhecida por interagir com vários parceiros moleculares, incluindo proteínas envolvidas em vias de reparo de DNA, como a proteína p53. A fosforilação de p53 pela VRK1 é um evento crítico que influencia a

estabilidade e atividade transcricional de p53, promovendo a resposta celular ao dano no DNA (Campillo-Marcos; Lazo, 2018). Além disso, a VRK1 interage com fatores de transcrição e proteínas de estrutura nuclear, refletindo seu papel multifacetado na regulação da expressão gênica e manutenção da estrutura cromatínica (Navarro-Carrasco e Lazo, 2021).

Em gliomas, particularmente no glioblastoma, a expressão de VRK1 tem sido associada à resistência ao tratamento (Ben; Gong; Qiu, 2018). Estudos demonstraram que a ausência de VRK1 aumenta a sensibilidade das células tumorais a baixas concentrações de Temozolomida e Olaparib, sugerindo um papel protetor da VRK1 contra danos no DNA induzidos por esses agentes quimioterápicos (Navarro-Carrasco e Lazo, 2021). Adicionalmente, a VRK1 foi identificada como um alvo sintético letal em glioblastomas deficientes de VRK2, indicando uma potencial vulnerabilidade terapêutica nestes tumores (So et al., 2022).

No carcinoma hepatocelular, estudos mostraram que baixos níveis de VRK1 inibem a proliferação celular, sugerindo um papel oncogênico da VRK1 nesta patologia. Mecanismos exatos ainda estão sendo investigados, mas a fosforilação de proteínas chave envolvidas na regulação do ciclo celular e apoptose parece ser um fator contribuinte significativo (Huang et al., 2016; Lee et al., 2017; Lee et al., 2015).

Já em carcinoma, a VRK1 também está associada à resistência a tratamentos que causam danos no DNA. A alta expressão de VRK1 tem sido correlacionada com uma resposta adaptativa das células tumorais que lhes confere uma vantagem proliferativa em ambientes de estresse genotóxico, como aqueles induzidos por quimioterapias (Mon et al., 2018; Salzano et al., 2014). Esses achados destacam a importância da VRK1 na biologia do câncer e como um potencial alvo terapêutico para melhorar a eficácia dos tratamentos atuais.

1.3.2 VRK2

VRK2 (*Vaccinia-related Kinase 2*) é o segundo membro da família VRK, pertencente também ao grupo CK1, compartilhando 61% de seu domínio catalítico com VRK1 (Blanco et al., 2006; Nichols; Traktman, 2004). Esta serina/treonina quinase possui duas isoformas principais, VRK2A e VRK2B, que diferem em suas expressões e localizações subcelulares, desempenhando papéis distintos em diversas vias celulares.

VRK2A é uma proteína de maior comprimento quando comparada com VRK2B que reside no citosol, ancorada ao retículo endoplasmático e membranas mitocondriais, desempenhando um importante papel em respostas contra hipóxias e estímulos de citocinas

(Blanco, Santos, & Lazo, 2007). Em contraste, VRK2B é uma proteína de menor tamanho em relação a VRK2A presente tanto no citosol quanto no núcleo. Embora sua função não seja totalmente compreendida, sabe-se que VRK2B fosforila a treonina 18 e a histona H3 de p53, além de regular o fator de transcrição nuclear NFAT1 junto com VRK2A (Blanco et al., 2006; Vázquez-Cedeira; Lazo, 2012).

A localização subcelular das isoformas da VRK2 é determinante para suas diferentes funções biológicas. VRK2A, localizada na membrana do retículo endoplasmático, influencia a estabilidade da proteína p53 em linhas celulares tumorais (Blanco, 2006). Esta diferença de localização subcelular é crítica, pois determina a interação da VRK2 com diferentes substratos e parceiros de sinalização.

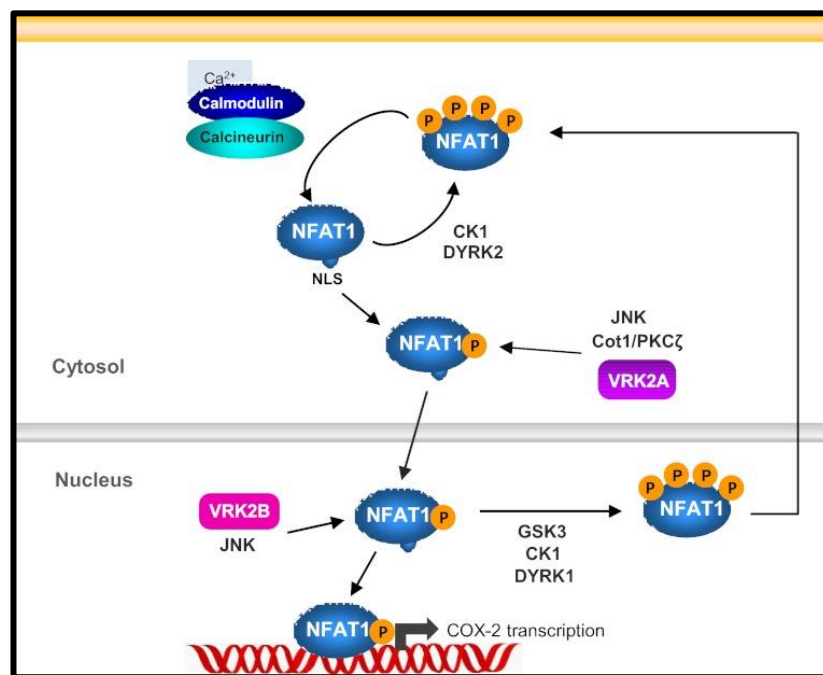


Figura 5: Participação de VRK2A e VRK2B na regulação de NFAT1 no ciclo celular.

Fonte: Adaptado de Vázquez-Cedeira; Lazo (2012).

Estudos recentes sugerem que VRK2A pode desempenhar um papel crucial em diferentes tipos de câncer. Pesquisas de Chen et al. (2021) indicam que células de carcinoma hepatocelular com superexpressão de VRK2A podem apresentar resistência ao tratamento com sorafenib, tornando-a um possível alvo terapêutico para carcinoma hepatocelular. A inibição ou a redução da expressão de VRK2 pode reduzir a fosforilação, a ubiquitinação e a atividade de TKT, bem como a proliferação e migração de células de carcinoma hepatocelular (Zhang et al., 2023). Estudos recentes também identificaram a VRK2A como um modulador

da evasão imunológica em cânceres hepáticos, através da ativação da via ROS-mTOR mediada pela transcetolase, enzima que transfere fragmentos de dois carbonos entre açúcares (Zhang et al., 2023). Esta função imunomoduladora de VRK2 pode ter implicações significativas para o desenvolvimento de terapias imunológicas contra o câncer.

Em glioblastoma, altos níveis de VRK2A estão associados a um prognóstico mais favorável e maior sobrevida em comparação com pacientes com baixa expressão de VRK2A (Rodríguez-Hernández et al., 2013). Além disso, Shields et al. (2022) e So et al. (2022) descobriram uma relação sinérgica-letal entre VRK2A metilado que é uma modificação epigenética onde grupos metil são adicionados ao gene VRK2A, afetando sua expressão e função, e a ausência de VRK1 em gliomas, apontando para potenciais estratégias terapêuticas para gliomas e tumores do sistema nervoso central.

A identificação inicial de VRK2A, juntamente com VRK1, revelou sua semelhança estrutural com a quinase B1R do vírus vaccinia, sugerindo uma possível origem evolutiva comum (J Nezu et al., 1997). Estudos subsequentes demonstraram que VRK2A desempenha um papel crítico na modulação da apoptose através da interação com a proteína Bcl-xL e da regulação da expressão do gene BAX (Monsalve et al., 2013). Esta função antiapoptótica de VRK2 é particularmente relevante em células tumorais, onde a resistência à apoptose é uma característica comum.

VRK2A também tem sido associada a distúrbios psiquiátricos e neurológicos. Estudos de expressão gênica identificaram VRK2A, que pode apresentar mutações pontuais e variações na expressão, como um gene candidato para esquizofrenia e transtorno bipolar, com essas variações na expressão e mutações, como a substituição de aminoácidos específicos (por exemplo, a substituição de serina por treonina) e a presença de exons alternativos (como os exons 1a, 1b e a ausência do exon 13), correlacionando-se com a suscetibilidade a esses distúrbios (Li; Yue, 2018; Tesli et al., 2016; Yin et al., 2023). A modulação da expressão da VRK2 pode, portanto, representar uma nova abordagem para o tratamento de doenças neuropsiquiátricas. Em termos de interação com outras proteínas, VRK2 foi demonstrada como um modulador da interação lisossoma, que envolve a fusão de lisossomos, organelas responsáveis pela digestão intracelular, com outras estruturas celulares, permitindo a degradação de moléculas e a reciclagem de componentes celulares, com a proteína Akt, influenciando a sobrevivência celular e a resposta ao estresse (Hirata et al., 2018). Esta interação é particularmente relevante em células cancerígenas, onde a sinalização de Akt é frequentemente desregulada.

1.3.3 PKMYT1

A quinase PKMYT1, também conhecida como proteína quinase membrana-associada tirosina/treonina 1, é um membro da família de quinases WEE1 e do grupo CK1, desempenhando um papel crucial como regulador negativo do ponto de checagem G2/M. Isso ocorre por meio da fosforilação das treoninas 14 e 15 em CDK1 e pela inibição do complexo CDK1-Ciclina B, impedindo sua entrada no núcleo (Asquith, Laitinen, & East, 2019; Long et al., 2020; Liu et al., 2017). Durante a fase M do ciclo celular, a PKMYT1 é regulada por fosforilação por PLK1 e CDC2 (Nakajima et al., 2003).

A regulação de PKMYT1 é complexa e envolve múltiplos níveis de controle, incluindo fosforilação, localização subcelular e interação com outras proteínas reguladoras do ciclo celular. PKMYT1 é regulada negativamente pela fosfatase CDC25, que remove os grupos fosfato de Thr14 e Tyr15, permitindo a ativação de CDK1 e a progressão para a mitose. Além disso, a regulação negativa de PKMYT1 também pode ocorrer através da degradação mediada pelo proteassoma, onde a ubiquitinação marca PKMYT1 para degradação, reduzindo seus níveis na célula e facilitando a entrada na mitose (Asquith, Laitinen, & East, 2019 (Schmidt et al., 2017; Wang et al., 2022)). Além disso, PKMYT1 pode ser regulada por vias de sinalização como a via PI3K/AKT, que modula sua atividade e estabilidade. A ativação da via PI3K/AKT pode levar à fosforilação de PKMYT1, alterando sua localização subcelular e promovendo sua degradação mediada pelo proteassoma, o que reduz seus níveis na célula e facilita a entrada na mitose (Wang et al., 2022). Além de sua função inibitória sobre a CDK1, PKMYT1 também está envolvida na manutenção da estabilidade genômica. PKMYT1 desempenha um papel na resposta ao dano ao DNA, essencial para a sobrevivência celular sob estresse genotóxico (Ghelli Luserna Di Rorà et al., 2020). Ela ajuda a prevenir a entrada prematura na mitose até que o reparo do DNA seja concluído, evitando a “catástrofe mitótica” e a morte celular. Essa função de “recuperação do checkpoint” permite que as células normais mantenham a integridade genômica, enquanto em células cancerígenas, pode proporcionar tempo para a recuperação de danos severos (Asquith; Laitinen; East, 2019 Ghelli Luserna Di Rorà et al., 2020). A inibição de PKMYT1 pode levar à entrada prematura na mitose, resultando em catástrofe mitótica e apoptose celular, especialmente em células cancerígenas que dependem de mecanismos de reparo de DNA. PKMYT1 normalmente atua como um regulador negativo da CDK1, impedindo a ativação prematura do complexo CDK1/ciclina B. Quando PKMYT1 é inibida, essa regulação é perdida, permitindo que as células entrem na mitose antes que o reparo do DNA esteja completo, o que pode causar danos irreparáveis ao

DNA e levar à morte celular (Ghelli Luserna Di Rorà et al., 2020).

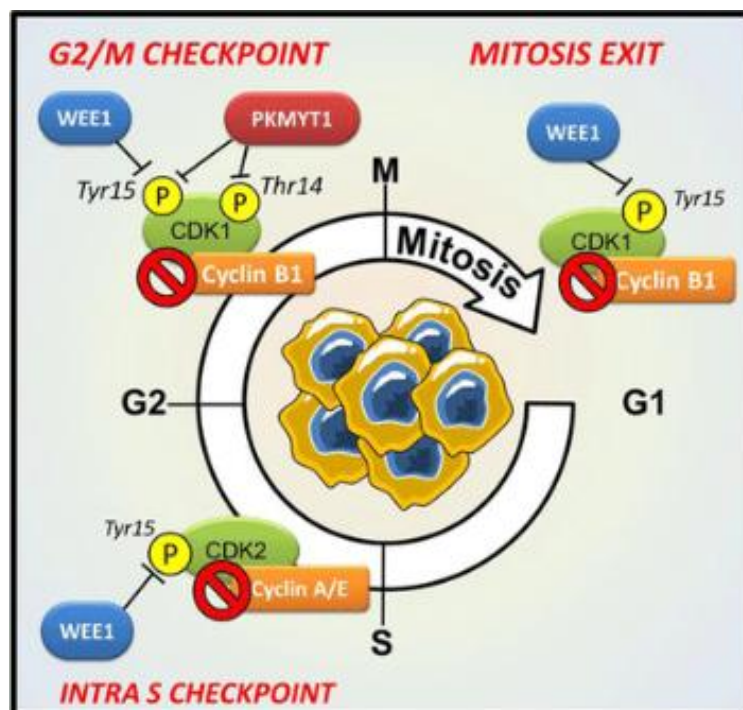


Figura 6: Participação de PKMYT1 na regulação do ciclo celular.

Fonte: Adaptado de Ghelli Luserna di Rorà et al. (2020).

Em relação ao carcinoma renal de células claras (CRCC), PKMYT1 tem sido implicada como um biomarcador promissor para diagnóstico e prognóstico. A expressão de PKMYT1 é significativamente elevada em tumores de CRCC comparados a tecidos normais, e sua alta expressão está correlacionada com estágios patológicos avançados e menor sobrevida global (Chen et al., 2021). A análise funcional sugere que PKMYT1 pode promover a transição epitelio-mesenquima, um processo crítico para a invasão e metástase tumoral (Chen et al., 2021). A supressão de PKMYT1 em linhas celulares de ccRCC resultou em redução da proliferação, migração e invasão celular, além de promover apoptose celular (Chen et al., 2021).

No carcinoma hepatocelular, PKMYT1 também desempenha um papel crucial. A superexpressão de PKMYT1 em Carcinoma Hepatocelular (CHC) está associada a um prognóstico desfavorável e à progressão tumoral. Estudos indicam que PKMYT1 pode promover a tumorigênese ao regular negativamente a autofagia e induzir apoptose. Além disso, PKMYT1 pode promover a tumorigênese ao interagir com a via PI3K/AKT, modulando a atividade e estabilidade de proteínas envolvidas na sobrevivência celular e proliferação (Asquith, Laitinen, & East, 2019). A inibição de PKMYT1 em modelos de HCC

resultou em supressão significativa do crescimento tumoral, sugerindo que PKMYT1 pode ser um alvo terapêutico potencial para HCC (Asquith, Laitinen, & East, 2019). A alta expressão de PKMYT1 promove o crescimento e a motilidade celular, contribuindo para a progressão tumoral. PKMYT1 regula negativamente a autofagia e interage com a via PI3K/AKT, modulando a atividade e estabilidade de proteínas envolvidas na sobrevivência celular e proliferação. Essa interação promove a reorganização do citoesqueleto e a formação de protrusões celulares, facilitando a migração e invasão celular. Por outro lado, sua inativação resulta no efeito oposto, reduzindo o crescimento e a motilidade celular (Liu et al., 2017; Wu et al., 2023).

Em adenocarcinoma pulmonar, PKMYT1 tem sido identificada como um supressor tumoral significativo. Estudos demonstram que a expressão reduzida de PKMYT1 em tecidos de adenocarcinoma pulmonar está associada a um prognóstico desfavorável. PKMYT1 exerce funções antitumorais potentes ao inibir a ativação da AKT1, uma quinase crucial para a progressão do ciclo celular e sobrevivência celular (Wang et al., 2022). A inibição de AKT1 por PKMYT1 resulta na repressão da progressão do ciclo celular, o que é essencial para a supressão do crescimento tumoral (Wang et al., 2022). Além disso, a inativação de PKMYT1 aumenta a sensibilidade das células à radioterapia (Long et al., 2020).

1.3.4 LMTK3

A quinase LMTK3 (*Lemur Tyrosine Kinase 3*) é uma proteína transmembranar pertencente à família LMR e ao grupo TK, desempenhando um papel crucial na regulação de diversas vias celulares. LMTK3 é conhecida por sua capacidade de regular a atividade da proteína fosfatase-1 (PP1), atuando como uma proteína estrutural que facilita a interação entre PP1 e seus substratos. LMTK3 foi inicialmente identificada em um estudo de triagem de quinases reguladoras do receptor de estrogênio alfa (RE α) em câncer de mama. Este estudo revelou que LMTK3 promove a super-regulação do RE α através da inibição da proteína quinase C (PKC) e impede a degradação de RE α por meio da fosforilação direta, que é o processo de adição de um grupo fosfato diretamente a uma proteína ou molécula alvo, alterando sua atividade, localização ou interação com outras moléculas (Stebbing et al., 2012). Presente no citoplasma e núcleo, LMTK3 regula o receptor de estrógeno alfa no citoplasma, influenciando a expressão do RNA mensageiro e níveis proteicos (Giamas et al., 2011; Xu et al., 2014). Além disso, é substrato do complexo HSP90-CDC37, essencial para sua estabilidade, e está envolvida na proliferação, invasão e migração (Ditsiou et al., 2020; Vella;

Giamas; Ditsiou, 2021). Desde então, estudos recentes têm destacado a importância de LMTK3 na progressão tumoral, resistência a terapias e metástase, tornando-a um alvo promissor para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer (Agnarelli et al., 2023; Cho et al., 2024).

A função fisiológica mais bem caracterizada da LMTK3 está no sistema nervoso central, onde é expressa em regiões como o córtex cerebral, estriado, cerebelo, hipocampo e bulbo olfatório. Estudos em modelos de camundongos *knockout* para LMTK3 mostraram que esses animais apresentam hiperatividade, menor ansiedade e comportamentos relacionados a esquizofrenia e transtorno bipolar. Esses achados destacam a importância da LMTK3 na regulação da excitabilidade neuronal e no comportamento (Cho et al., 2024). LMTK3 facilita a invasão e migração aumentando a abundância de integrina $\alpha5\beta1$, interagindo com GRB2 e ativando Ras e CDC42. Também regula o tráfego de EphA2 para a membrana (Gundry C et al., 2017). No núcleo, LMTK3 remodela a cromatina, ligando-se a PP1 α e KAP1, resultando na condensação da cromatina e na repressão de genes supressores de tumor (Xu Y et al., 2014).

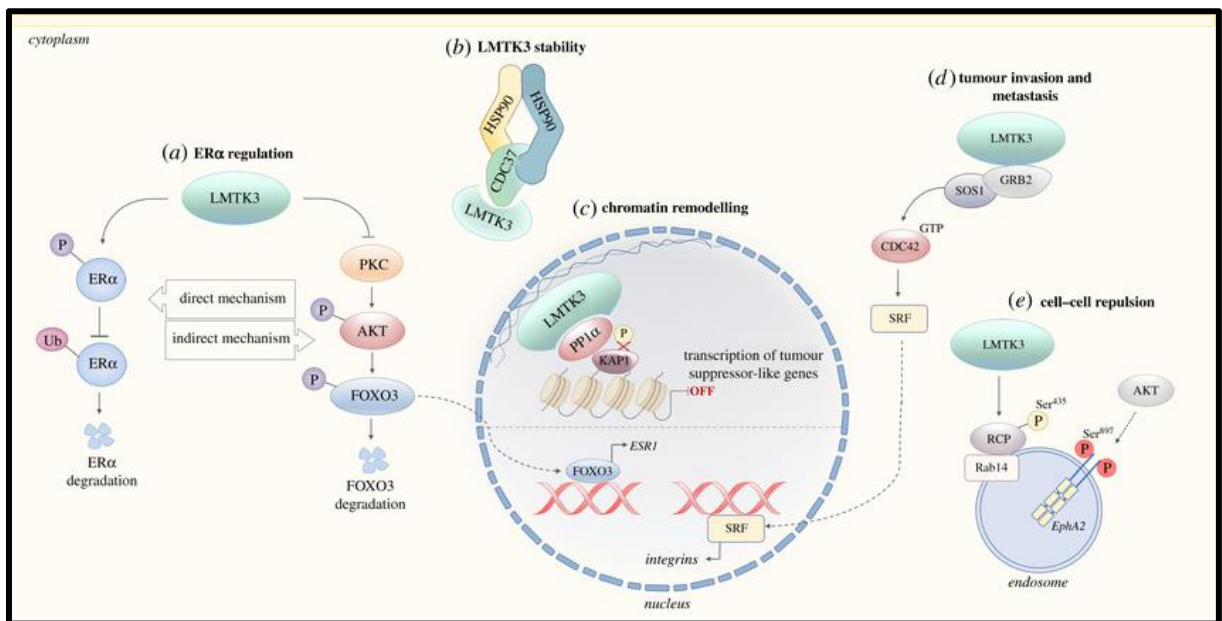


Figura 7: Funções conhecidas da proteína LMTK3. (A) Regulação do receptor de estrógeno alpha, (B) estabilidade de LMTK3, (C) remodelação da cromatina, (D) invasão e metástase tumoral e (D) repulsão célula-célula.

Fonte: Adaptado de Ditsiou et. al (2021).

Em carcinoma, LMTK3 tem se mostrado um fator crítico na progressão da doença e na resistência a terapias hormonais (Stebbing et al., 2018). Estudos demonstraram que a

inibição de LMTK3 pode levar à redução da proliferação celular e à indução de apoptose em células de câncer de mama. Além disso, LMTK3 foi implicada na regulação da dinâmica dos microtúbulos, afetando a estabilidade celular e a capacidade de invasão das células tumorais (Stebbing et al., 2011; Lu et al., 2017). LMTK3 também tem sido associada à resistência a terapias em câncer de mama, mediando a resistência ao tamoxifeno, um medicamento amplamente utilizado no tratamento do câncer de mama ER α -positivo. A inibição de LMTK3 pode potencialmente restaurar a sensibilidade ao tamoxifeno, oferecendo uma nova abordagem para superar a resistência terapêutica (Gundry et al., 2017).

No adenocarcinoma pulmonar, LMTK3 foi implicada na regulação da via de sinalização do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que é frequentemente alterada em cânceres de pulmão. A inibição da LMTK3 pode interferir na sinalização do EGFR, resultando em uma diminuição da proliferação celular e na indução de apoptose (Ditsiou et al., 2020). Pesquisas indicam que a superexpressão de LMTK3 está correlacionada com um pior prognóstico e maior agressividade tumoral (Sun et al., 2019). A inibição da LMTK3 em modelos de adenocarcinoma pulmonar resultou em uma diminuição da viabilidade celular e na supressão da capacidade metastática. Esses achados sugerem que LMTK3 pode ser um biomarcador útil para a progressão da doença e um alvo terapêutico potencial (Lesly Torres-Gonzalez et al., 2024).

Estudos recentes revelaram o papel de LMTK3 em câncer colorretal, promovendo resistência ao Cetuximabe, um anticorpo monoclonal quimérico humano-murino que se liga ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), através da via ERK/MAPK. Além disso, em câncer de mama, LMTK3 contribui para o crescimento tumoral e a invasão (Giamas et al., 2011; Wang et al., 2021; Xu et al., 2014).

1.4 ESTRATÉGIAS DE DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS UTILIZANDO QUINASES POUCO ESTUDADAS

Importante mencionar que o presente estudo dá continuidade a um projeto iniciado em 2019, fruto de uma colaboração entre a Unicamp, o Grupo Aché e o AC Camargo Cancer Center, cujo objetivo era identificar e explorar o potencial terapêutico de proteínas quinases menos estudadas (GAP quinases) em tumores sólidos. A iniciativa visava selecionar um grupo de quinases promissoras para aprofundar estudos que pudessem revelar seu papel como alvos terapêuticos. A abordagem integrou ferramentas de bioinformática, biologia celular e

molecular e química medicinal, contando com a expertise complementar de cientistas das três instituições envolvidas.

No projeto inicial, foi realizada uma triagem a partir de 272 proteínas quinases listadas por Drewry et al. (2017), focando naquelas sem sondas químicas suficientemente seletivas descritas na literatura. O resultado desse trabalho prévio permitiu a seleção de 40 proteínas para investigação detalhada para investigação da expressão proteica de algumas quinases por imunohistoquímica em tecidos tumorais do arquivo do AC Camargo. A etapa inicial contou com contribuições significativas de pesquisadores das instituições parceiras, incluindo os seguintes pesquisadores das três instituições. Ache Laboratórios: Cristiano Guimarães, Hatylas Azevedo e Alessandra Mascarello do AC Camargo Cancer Center: Vilma R Martins, Dirce M Carraro, Israel Tojal da Silva e Martin Roffe, e mais recentemente, Glaucia Hajj, e da UNICAMP- Centro De Biologia Molecular E Engenhariaia Genética CBMEG: Katlin Massirer e Mario Henrique Bengtson.

Alguns detalhes do trabalho anterior foram trazidos em seguida para melhor compreensão. As quinases selecionadas estão sendo investigadas simultaneamente em várias instituições, seguindo um fluxo de trabalho bem definido. Este processo inclui o desenvolvimento de drogas inibidoras direcionadas a esses alvos, testes em modelos *in vitro* e *in vivo*, bem como a avaliação da expressão proteica dessas quinases em tumores de interesse. Além disso, está sendo analisada a relação entre a expressão dessas quinases e as características clínicas e histopatológicas dos pacientes, bem como seu impacto no prognóstico. Esses estudos ajudam a entender melhor como essas quinases influenciam o desenvolvimento e a progressão dos tumores (conforme ilustrado nas Figuras 8 e 9).

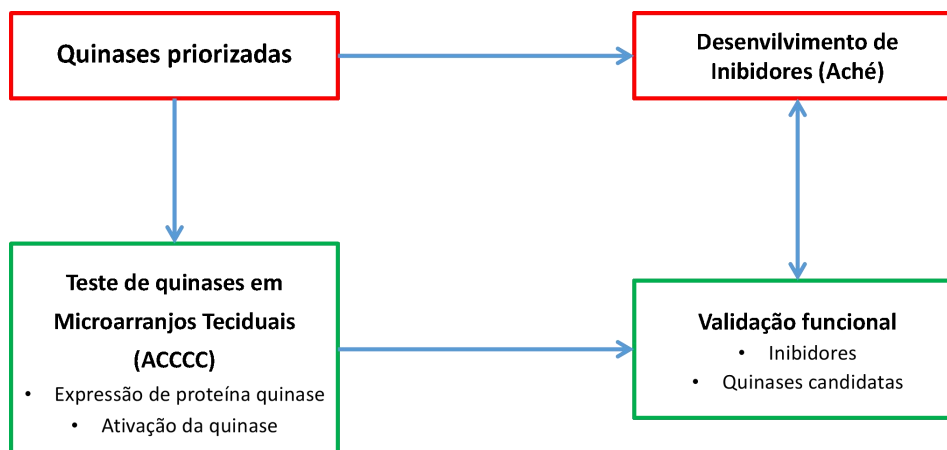


Figura 8: *Workflow* paralelo de desenvolvimento de novas drogas baseadas na caracterização de quinases pouco estudadas.

Fonte: própria autoria.

No A.C.Camargo Cancer Center (ACCCC), esforços foram direcionados para identificar os padrões de expressão das quinases VRK1, VRK2, PKMYT1 e LMTK3, correlacionando-os com características clínicas, histopatológicas, além do prognóstico. Para alcançar esses objetivos, foram utilizados microarranjos de tecido (TMAs) previamente confeccionados em estudos anteriores, assim como TMAs produzidos especificamente para este projeto. Nesses TMAs, a expressão das quinases de interesse foi avaliada por meio de imuno-histoquímica (**Tabela 1**). Essa abordagem tinha o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de novas terapias destinadas ao tratamento de tumores sólidos.

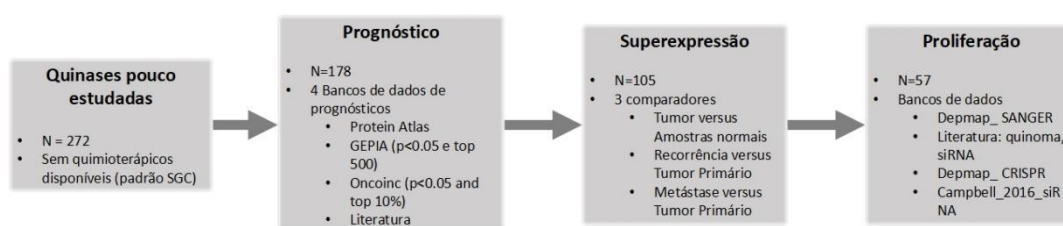


Figura 9: *Workflow* de análises bioinformáticas para a priorização de candidatos a novos alvos terapêuticos em tumores.

Fonte: própria autoria.

O estudo, como comentado anteriormente, teve início com a identificação de quinases pouco exploradas em bancos de dados especializados. Métodos de predição, foram utilizados para avaliar a propensão dessas quinases em participar de processos biológicos relevantes. Em seguida, as quinases mais promissoras foram selecionadas para estudos de superexpressão,

nos quais seus perfis funcionais foram analisados por meio de dados de bancos previamente estabelecidos. A partir dessas análises, 57 proteínas quinases foram previamente identificadas, culminando na seleção de VRK1, VRK2, LMTK3 e PKMYT1 como candidatas mais promissoras para as fases iniciais da pesquisa por novos inibidores. A caracterização detalhada dessas quinases foi objetivo dessa dissertação. Como mostrado na **Tabela 1**, essas quinases foram escolhidas para estudo em diferentes tumores sólidos, nos quais demonstraram características favoráveis, como dados de superexpressão.

Tabela 1: Quinases priorizadas na colaboração ACCCC-Aché e os tumores de interesse.

Quinase	Tipo Tumoral (código TCGA)
VRK1	Gliomas, LIHC, BRCA
VRK2	LIHC, LUAD, Gliomas
PKMYT1	LUAD, LIHC, KIRC
LMTK3	BRCA, COAD

LIHC: Carcinoma Hepatocelular, BRCA: Carcinoma de Mama Invasivo, LUAD: Adenocarcinoma Pulmonar, KIRC: Carcinoma Renal de Células Claras, COAD: Adenocarcinoma de Cólon.

Fonte: própria autoria.

2. OBJETIVOS

- 2.1** Analisar a expressão das quinases VRK1, VRK2, PKMYT1 e LMTK3 através de imuno-histoquímica de amostras tumorais de Gliomas, Carcinoma Hepatocelular, Carcinoma de Mama, Adenocarcinoma Pulmonar, Adenocarcinoma de Cólon e Carcinoma Renal de Células Claras organizadas em TMAs,
- 2.2** Correlacionar a expressão das proteínas com aspectos histopatológicos relevantes para a doença,
- 2.3** Correlacionar a expressão das proteínas com dados clínicos dos tumores de interesse, assim como seu impacto na sobrevida.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Após aprovação do projeto no Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Fundação Antônio Prudente no A.C.Camargo Cancer, para este projeto numerado como 2709/19, foi utilizado um conjunto de 18 TMAs para a realização das reações de imuno-histoquímica nos tecidos estudados. O acervo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo forneceu 1326 amostras parafinadas, organizadas em TMAs. Dados clínicos e patológicos foram obtidos a partir de prontuários médicos da instituição. As informações utilizadas para este estudo constam na **Tabela 2**. Todo material desta pesquisa, representado pelo bloco de parafina e suas respectivas lâminas estão arquivados no Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo. As amostras que não possuírem representação adequada das neoplasias nos blocos de parafinas serão excluídas, além dos casos que apresentassem menos de um mês de permanência no hospital.

Os prontuários médicos forneceram dados clínicos detalhados sobre diversos diagnósticos, como gliomas, carcinoma de mama, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma renal de células claras, carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma colorretal. Essas informações foram então inseridas em um sistema de captura de dados eletrônicos conhecido como *REDCap* (Harris, 2019; Harris, 2009). Todo o conjunto de dados está armazenado de forma segura nos servidores do A.C. Camargo Cancer Center, garantindo a integridade e confidencialidade dos registros médicos.

Tabela 2: Descrição dos TMAs utilizados.

Tecido	Tipo Tumoral	Subtipos tumorais	Quantidade de amostras	Quantidade de TMAs	TMAs e a quantidade de amostras em cada
Mamário	BRCA	Carcinoma de Mama	486	3	Mama 45 = 143 Mama 46 = 123 Mama 59 = 187
Hepático	LIHC	Macrotrabecular-massivo Esteatohepático Carcinoma fibrolamelar	48	1	CHC = 48
Pulmonar	LUAD	Sem Origem Específica	56	2	Pulmão 03 = 32 Pulmão 05 = 24
Cerebral	Glioma	Astrocitoma Difuso Astrocitoma Anaplásico Glioblastoma	192	3	GBM 02 = 114 GBM 03 = 20 GBM HCP = 58
Renal	RCC	Carcinoma Renal de Células Claras	201	1	Rim-10 = 150 Rim-16 = 51
Intestinal	COAD	SOE	376	2	Colón 08 = 202 Colón 09 = 174

LIHC: Carcinoma Hepatocelular, BRCA: Carcinoma de Mama Invasivo, LUAD: Adenocarcinoma Pulmonar, KIRC: Carcinoma Renal de Células Claras, COAD: Adenocarcinoma de Cólon.

Fonte: própria autoria.

3.2 TÉCNICA DE MICROARRANJOS TECIDUAIS

A utilização de Microarranjos Teciduais, ou TMAs, possibilita o estudo da expressão proteica de tumores em larga escala através de ensaios de imuno-histoquímica, com uma acurácia comprovada. Seu emprego é justificado uma vez que oferece vantagens de custo e tempo para pesquisas em grandes centros com grandes bancos de dados (Milanes-Yearsley et al. 2002; Gulmann et al. 2003).

As construções dos TMAs foram realizadas após ser escolhida e identificada, por um patologista, a área adequada na neoplasia através de uma marcação circular em cada nova

lâmina de vidro na região mais representativa do tumor e correspondente ao bloco de parafina escolhido. Usando o *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland) a área de interesse foi retirada com um *core* de 0,6 mm de cada bloco doador e transferido para outro bloco chamado de receptor. Todos os TMAs foram montados com amostras em duplicata. A partir desse novo bloco foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro cortadas através de microtomia mecânica na espessura de 4 µm. Estas lâminas foram examinadas no microscópio óptico para observar a representatividade das células neoplásicas. A avaliação da representação celular da neoplasia foi definida como aproveitamento do TMA. Para uma amostragem ser considerada satisfatória foi necessária uma representação de pelo menos 10% de área circular do core de 0,6 mm após uma análise no microscópio de campo claro de vários níveis de corte.

3.3 REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os cortes provenientes dos TMAs foram desparafinizados pela incubação a 60°C por 24 horas, seguido de banhos sucessivos em três soluções de xilol por 10 minutos cada, posteriormente hidratados em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 80%, 70%) e lavadas em água corrente e destilada. Para a recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em solução tampão de citrato 10 mM pH 6.0 em câmara de pressão (DAKO S2801, USA) por 15 minutos até elevação de temperatura a 125 °C, 18-24 psi e posterior resfriamento. Para o bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram imersas em H₂O₂ 10% (3 lavagens de 10 minutos cada) (Merck, Germany). Após etapa adicional de lavagem em água corrente (5 minutos), foi realizado bloqueio de interações inespecíficas com Dako Protein Block (Dako, USA) por 1 hora em cuba escura. A seguir, todas as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (Tabela 3) diluído em título a ser estabelecido, em solução de bloqueio por 18 horas a 4 °C em câmara úmida. Após este período foi realizada lavagem com PBS (duas lavagens de 5 minutos cada) e posterior incubação de todas as lâminas com polí-mero HRP link (DAKO, USA) por 30 minutos em cuba escura. Após as lavagens, as lâminas foram incubadas com HRP enzyme (DAKO, USA) por 30 minutos em cuba escura. Após a lavagem, a revelação foi feita utilizando cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (Biocare Medical, USA), diluído em DAB 24 Substrate Buffer (1:50). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina e montadas em Tissue-Tek® Prisma®/Film (Sakura, USA).

Após etapa adicional de lavagem em água corrente (5 minutos), foi realizado bloqueio de interações inespecíficas com reagentes específicos para cada anticorpo, variando o tempo de bloqueio conforme necessário. A seguir, todas as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário, cada um com seu tempo de incubação específico, em solução de bloqueio por 18 horas a 4 °C em câmara úmida. Após este período foi realizada lavagem com PBS (duas lavagens de 5 minutos cada) e posterior incubação de todas as lâminas com polímero HRP link (DAKO, USA) por 30 minutos em cuba escura.

Após as lavagens, as lâminas foram incubadas com HRP *enzyme* (DAKO, USA) por 30 minutos em cuba escura. Após lavagem, a revelação foi feita utilizando cromógeno 3,3'-*Diaminobenzidine* (DAB) (Biocare Medical, USA), diluído em DAB 24 *Substrate Buffer* (1:50). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina e montadas em Tissue-Tek® Prisma®/Film (Sakura, USA). Todas as reações específicas para cada anticorpo e TMA correspondente podem ser observadas na **Tabela 3**.

Tabela 3: Condições das diferentes reações de imuno-histoquímica nos TMAs de Glioblastomas, Carcinoma de Mama, Gliomas, Adenocarcinoma Colorretal, Carcinoma Renal de Células Claras, Carcinoma Hepatocelular e Adenocarcinoma Pulmonar.

Tecido	Anticorpo	TMA	Recuperação antigênica	Bloqueio	Titulação do anticorpo	Tempo de incubação
Gliomas	VRK1 Cell Signaling 1F6 mAb#3307	GBM 02	pH 9 em banho-maria	3 vezes de 5 min (peróxido de hidrogênio) e 1 vez de 20 min Soro de Cabra	1/500	1 hora
		GBM 03	pH 9 em banho-maria	3 vezes de 5 min (peróxido de hidrogênio) e 1 vez de 20 min Protein Block	1/100	1 hora
		GBM HCP	pH 9 em banho-maria	3 vezes de 5 min (peróxido de hidrogênio) e 1 vez de 20 min Soro de Cabra	1/200	1 hora
	VRK2 (H-5) Santa Cruz sc-365199	GBM 02	pH 6.0 em panela de pressão	3 vezes de 5 min (peróxido de hidrogênio) e 1 vez de 60 min Soro de Cabra	1/10	Durante a noite
		GBM 03	pH 9.0 em panela de pressão	3 vezes de 5 min (peróxido de hidrogênio) e 1 vez de 60 min Soro de Cabra	1/10	Durante a noite
Carcinoma de Mama	LMTK3 (I-17) Santa Cruz: sc-100418	Mama 45 Mama 46	pH 9.0 em panela de pressão	3 vezes de 5 min (peróxido de hidrogênio) e 1 vez de 20 min em Protein Block	1/200	Durante a noite
	VRK1 Cell Signaling 1F6 mAb#3307	Mama 45 Mama 59	Cell conditioning 2 60 min	60Ab	1/50	1 hora
Adenocarcinoma Colorretal	LMTK3 (I-17) Santa Cruz: sc-100418	Colon 08 Colon 09	pH 9.0 em panela de pressão	3 vezes de 5 min (peróxido de hidrogênio) e 1 vez de 20 min Soro de Cabra	1/200	Durante a noite
Carcinoma Renal de Células Claras	PKMYT1 Invitrogen (0T15E1): MA525034	Rim 10 Rim 16	pH 9.0 em panela de pressão	3 vezes de 5 min (peróxido de hidrogênio) e 1 vez de 20 min em Protein Block	1/100	1 hora
Carcinoma Hepatocelular	VRK1 Cell Signaling 1F6 mAb#3307	CHC	pH 9 em banho-maria	3 vezes de 5 min (peróxido de hidrogênio) e 1 vez de 20 min em Protein Block	1/200	1 hora
	VRK2 (H-5) Santa Cruz sc-365199		pH 9 em banho-maria	3 vezes de 5 min (peróxido de hidrogênio) e 1 vez de 20 min em Protein Block	1/10	1 hora
Adenocarcinoma Pulmonar	PKMYT1 Invitrogen (0T15E1): MA525034	Pulmão 03 Pulmão 05	pH 9.0 em panela de pressão	3 vezes de 5 min (peróxido de hidrogênio) e 1 vez de 20 min em Protein Block	1/100	1 hora

Fonte: própria autoria.

3.4 HSCORE

As lâminas foram examinadas por patologistas que avaliaram a presença de tecido da histologia correta e a qualidade da marcação. Todos os patologistas consideraram que um spot deveria conter ao menos 25% de área tumoral avaliável; caso contrário, era considerado não avaliável. Além disso, verificou-se a presença do anticorpo no *spot* e a ocorrência de artefatos durante a aplicação na lâmina. Todos os spots que não mais representassem área tumoral original devido à perda de tecido durante a reação de imunohistoquímica, que apresentassem áreas de necrose ou qualquer padrão tecidual não condizente com o objetivo deste estudo foram excluídos da análise.

Os TMAs de Gliomas, Carcinoma Hepatocelular, Carcinoma de Mama, Adenocarcinoma Pulmonar e Carcinoma Renal de Células Claras foram quantificados juntamente com os patologistas Dr. Felipe D'almeida Costa, Dr. Gabriel Oliveira Dos Santos, Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osorio, Dr. Clovis Antônio Lopes Pinto e Dra. Stephania Martins Bezerra do departamento de Anatomia Patológica do ACCCC, respectivamente. Dr. Felipe quantificou VRK1 e VRK2 em gliomas; Dr. Gabriel quantificou VRK1 e VRK2 em carcinoma hepatocelular e LMTK3 em adenocarcinoma colorretal; Dra. Cynthia quantificou VRK1 e LMTK3 em Carcinoma de Mama; Dr. Clovis quantificou PKMYT1 em adenocarcinoma pulmonar; e Dra. Stephania quantificou PKMYT1 em carcinoma renal de células claras.

O patologista avaliou a porcentagem de células marcadas e a intensidade de marcação na amostra. A determinação do HScore é definida pela porcentagem de células marcadas (variando-se de 0-100%) multiplicada pela intensidade. Em nosso estudo, investigamos uma variedade de tipos tumorais, cada um exibindo padrões únicos de intensidade de marcação, aqui definidas como zero igual à ausência de marcação, um para fraca, dois para moderada e três para forte/intensa. Estas duas grandezas serão utilizadas para as análises estatísticas e poderão ser utilizadas em separado ou compondo um escore histoquímico, ou HScore.

Tabela 4: Marcações utilizadas e seus respectivos métodos nas proteínas quinases estudadas.

Proteína Quinase	Tipo Tumoral (Abreviação)	Localização da Marcação	Método Utilizado
VRK1	Gliomas	Citoplasmática	HScore
	BRCA	Cit.	HScore
	LIHC	Cit.	Contingência
VRK2	Gliomas	Cit.	HScore
	LIHC	Cit.	Contingência
PKMYT1	LUAD	Total	HScore
	KIRC	Cit. e Nuclear	HScore
LMTK3	BRCA	Cit. e Nuclear	HScore
	COAD	Total	Contingência

BRCA - Carcinoma de Mama, LIHC - Carcinoma Hepatocelular, LUAD - Adenocarcinoma Pulmonar, KIRC - Carcinoma Renal de Células Claras, COAD - Adenocarcinoma de Cólon.

Cit = Citoplasmático.

Fonte: própria autoria.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas deste estudo foram conduzidas utilizando o *software GraphPad Prism 8*. Para comparar a distribuição de variáveis quantitativas entre diferentes grupos, foram empregados testes não paramétricos como o teste de Mann-Whitney (para duas amostras) e o teste de Kruskal-Wallis (para três ou mais grupos). A associação entre variáveis categóricas foi avaliada utilizando o teste exato de Fisher e o teste do qui-quadrado. A relação entre variáveis quantitativas foi avaliada por meio do coeficiente de correlação de Spearman, quando apropriado.

A análise de sobrevida, tanto global quanto livre de progressão, foi realizada utilizando o estimador de Kaplan-Meier e o teste de Log Rank. O teste de Log Rank foi utilizado para comparar as curvas de sobrevivência entre os diferentes grupos, e o *Hazard Ratio* (HR) foi calculado para quantificar o risco relativo de ocorrência do evento de interesse em cada grupo. Um HR maior que 1 indica um maior risco de ocorrência do evento no grupo em questão, enquanto um HR menor que 1 indica um menor risco.

Em todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5%.

A análise de sobrevida permitiu avaliar a influência de fatores prognósticos na sobrevivência dos pacientes. Os pacientes foram estratificados com base no primeiro quartil dos níveis de expressão das proteínas analisadas, possibilitando a identificação de subgrupos de pacientes com diferentes prognósticos. As análises de associação entre variáveis categóricas, como o tipo de tumor e a presença de metástases, foram realizadas utilizando o teste exato de Fisher e o teste do qui-quadrado. A análise de correlação, por sua vez, auxiliou na identificação de associações entre variáveis quantitativas, como a intensidade de biomarcadores e o histórico familiar de câncer dos pacientes. As análises de medianas, realizadas através dos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, permitiram comparar a expressão de biomarcadores entre diferentes grupos de pacientes, identificando diferenças significativas.

3.6 CULTURA CELULAR

Para a condução deste projeto, adquirimos linhagens celulares: MCF7, um carcinoma de mama obtido de uma paciente do sexo feminino com 69 anos de idade (ATCC® HTB-22™) e a linhagem renal HEK-293T, que deriva de rim embrionário (ATCC® CRL-3216™). Ambas as linhagens foram selecionadas a partir do acervo do Biobanco da *American Type Culture Collection* (ATCC). Para garantir a integridade e confiabilidade dos nossos resultados, seguimos rigorosamente as diretrizes e orientações fornecidas pelo ATCC para a manutenção e cultivo dessas linhagens celulares.

3.7 VALIDAÇÃO DE ANTICORPOS ATRAVÉS DE ENSAIO DE *WESTERN BLOT*

Utilizamos a técnica de *Western blot* para avaliar a especificidade dos anticorpos em relação às proteínas do nosso projeto, seguindo o protocolo de Roffé et al. 2013. Os detalhes sobre os anticorpos utilizados estão na **Tabela 5**.

Tabela 5: Validação dos anticorpos utilizados nas reações de TMAs.

Anticorpo	Célula	Titulação	Solvente
VRK1 Cell Signaling: 1F6 mAb#3307	HEK-293T	1:1000	TBS-T + BSA 5%
	MCF7	1:1000	TBS-T + BSA 5%
VRK2 (H-5): Santa Cruz: sc-365199	HEK-293T	1:500	TBS-T + Leite 5%
	MCF7	1:500	TBS-T + Leite 5%
LMTK3 (I-17) Santa Cruz: sc-100418	HEK-293T	1:500	TBS-T + Leite 5%
	MCF7	1:1000	TBS-T + Leite 5%
PKMYT1 (OTI5E1) Invitrogen: MA525034	HEK-293T	1:500	TBS-T + Leite 5%
	MCF7	1:1000	TBS-T + BSA 5%

Fonte: própria autoria.

4. RESULTADOS

4.1 CONFIRMAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS

Para garantir a especificidade dos anticorpos usados nos ensaios de imuno-histoquímica nos TMAs, conduzimos a validação por meio da técnica de *Western blot* (Figura 13). Utilizamos a linhagem celular de câncer de mama MCF7 (Figura 13.A) e a linhagem de rim embrionário HEK-293T (Figura 13.B) como padrão de validação dos anticorpos.

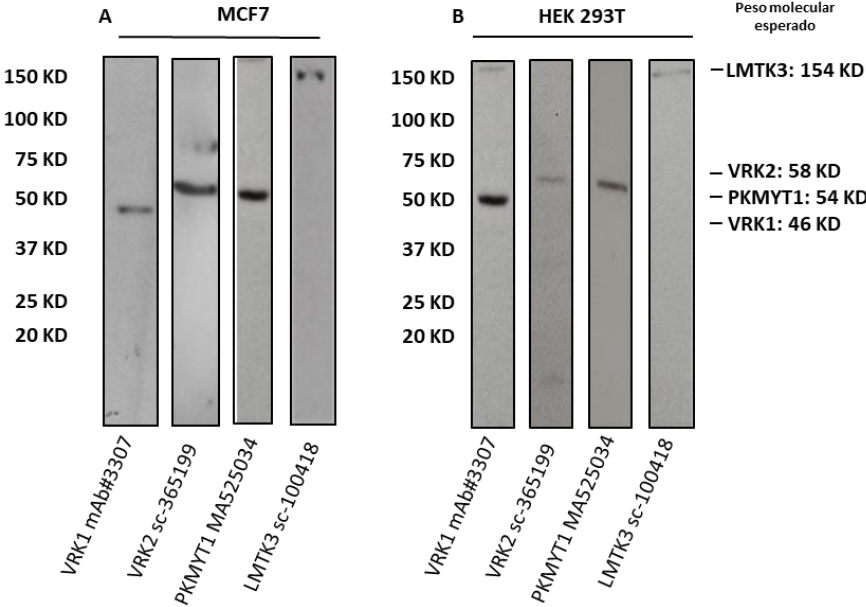


Figura 10: Anticorpos validados em duas linhas linhagens celulares, MCF7 e HEK 293T.

Fonte: própria autoria.

4.2 GLIOMAS

Os gliomas foram selecionadas para avaliar a expressão das quinases VRK1 e VRK2 através de imuno-histoquímica, para isso foram construídos três TMAs contendo 157 casos. Retirando os casos não avaliáveis, o número foi reduzido para 121, que abrangem os estadiamentos clínicos II (15), III (13) e IV (89). Os tecidos não neoplásicos foram retirados das margens livres de neoplasia dos mesmos pacientes que tiveram tumores. Para evitar duplicidade, esses tecidos foram incluídos apenas na análise de estadiamento clínico, onde foram comparados com Astrocitoma Anaplásico, Astrocitoma Difuso e Glioblastoma

Multiforme, totalizando 143 casos. Os casos descritos como “ignorados”, observados nas **Tabelas 6, 7 e 8** são aqueles que não possuíam dados para aquela variável, logo não fizeram parte da análise.

4.2.1 VRK1

Para investigar a expressão de VRK1 em gliomas, utilizamos o anticorpo da *Cell Signaling* (cat.: 1F6 mAb#3307). Em nossas quantificações, a proteína VRK1 mostrou expressão predominantemente citoplasmática, enquanto a marcação nuclear foi majoritariamente negativa na maioria dos gliomas examinados. Portanto, ao calcular o *HScore* relacionado à VRK1, focamos nas marcações citoplasmáticas. As variações nas diferentes intensidades de VRK1 estão ilustradas na **Figura 10**, onde é possível observar uma alta quantidade de marcações citoplasmáticas e um baixo número de núcleos marcados.

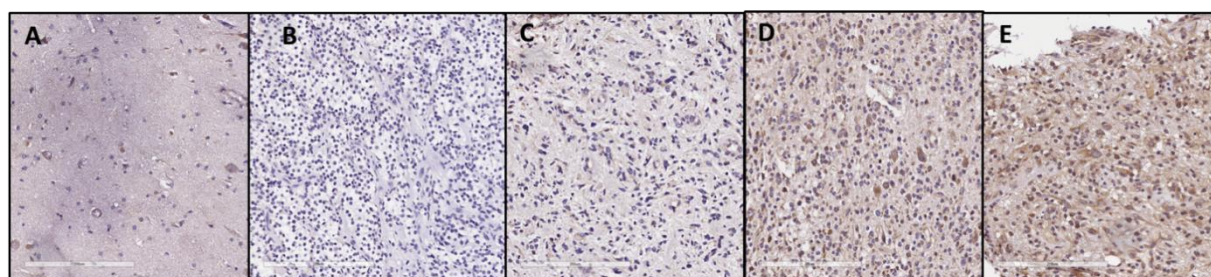


Figura 11: Diferenças nas intensidades de VRK1 em tecidos não neoplásicos e em gliomas. (A) Tecido não neoplásico, (B) sem marcação, (C) marcação fraca, (D) marcação moderada e (E) marcação intensa.

Fonte: própria autoria.

Ao analisar a proteína VRK1, não observamos associação entre VRK1 e as variáveis clínicas e patológicas, como histórico familiar de câncer, presença de outra neoplasia e presença de mutação no gene PTEN. No entanto, observamos uma alteração significativa na expressão de VRK1 ($p = 0,0001$) ao comparar tecido normal com os estágios II, III e IV de gliomas. Em neoplasias do sistema nervoso central de mais alto grau, houve um aumento na expressão de VRK1 de 175% em Astrocitoma Anaplásico e de 183% em Glioblastoma Multiforme.

Tabela 6: Associação da expressão de VRK1 com as variáveis clínicas e patológicas relacionadas à gliomas. Teste de Mann-Whitney não-paramétrico para duas variáveis e teste de Kruskal-Wallis para três ou mais variáveis.

VRK1 - HSCORE						
Variável	Categoria	N (%)	Q1	HScore (Mediana)	Q3	p valor
Histórico Familiar	Não	8 (9)	163	170	195	0,402
	Sim	4 (4)	82,5	225	270	
	Ignorado	77 (87)				
	Total	89 (100)				
Outra neoplasia	Não	72 (81)	92,5	175	240	0,2009
	Sim	10 (13)	87,5	155	170	
	Ignorado	7 (6)				
	Total	89 (100)				
Estadiamento Clínico	Normal	31 (20)	30	60	140	0,0001
	II (AD)	13 (8)	65	80	165	
	III (AA)	10 (7)	90	165	192,5	
	IV (GBM)	89 (58)	90	170	210	
	Ignorado	10 (7)				
	Total	153 (100)				
Mutação PTEN	Perda total	8 (9)	90	155	175	0,5795
	Perda parcial	25 (28)	105	180	210	
	Selvagem	35 (39)	80	170	225	
	Ignorado	21 (24)				
	Total	89 (100)				

AD: Astrocitoma Difuso; AA: Astrocitoma Anaplásico; GBM: Glioblastoma Multiforme.

Q1: Quartil 1; Q2: Quartil 2.

Fonte: própria autoria.

A análise de sobrevida global foi subdividida em duas categorias. Primeiramente, avaliamos os estadiamentos clínicos II, III e IV, onde, o valor de p, com um ponto de corte de 190, foi de 0,2515 (**Figura 12A**). Também conduzimos uma análise específica para o grau IV, glioblastoma, que revelou um valor de p = 0,2585 com um valor de corte de 100 (**Figura 12B**). Em ambas as análises os resultados não se apresentaram significativos, podendo-se entender que a expressão de VRK1 não está associada à sobrevida global e a progressão em gliomas. Para a **Figura 13A**, foram ignorados 25 casos que não possuíam dados relacionados a sobrevida global, já a **Figura 13B** foram ignorados 17 casos que compreendiam aos estadiamentos II e III, junto com os 25 casos previamente mencionados.

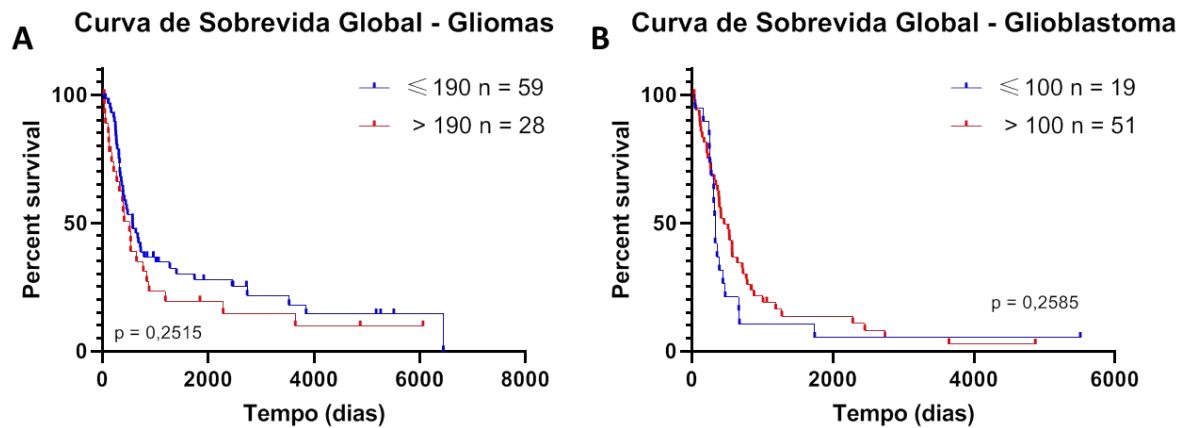


Figura 12: Curva des sobrevida global utilizando *HScore* de VRK1 em gliomas (A) e apenas com casos de glioblastoma (B). Teste *Log-rank* (Mantel-Cox).

Fonte: própria autoria.

4.2.2 VRK2

Para analisar a expressão de VRK2 em gliomas, utilizamos o anticorpo VRK2 (H-5) Santa Cruz (cat.: sc-365199). Também optamos por empregar o *HScore* e aplicamos as mesmas variáveis utilizadas para VRK1 em gliomas nos mesmos números de casos analisados em VRK1. É relevante observar que, assim como em VRK1, a marcação nuclear de VRK2 frequentemente apresentou poucos resultados positivos, tornando-a menos significativa em nossas análises estatísticas. Portanto, concentramo-nos nas marcações citoplasmáticas, que podem ser observadas na **Figura 12**, das amostras para avaliar VRK2, na qual podemos observar também a alta positividade de citoplasma e baixa de núcleos.

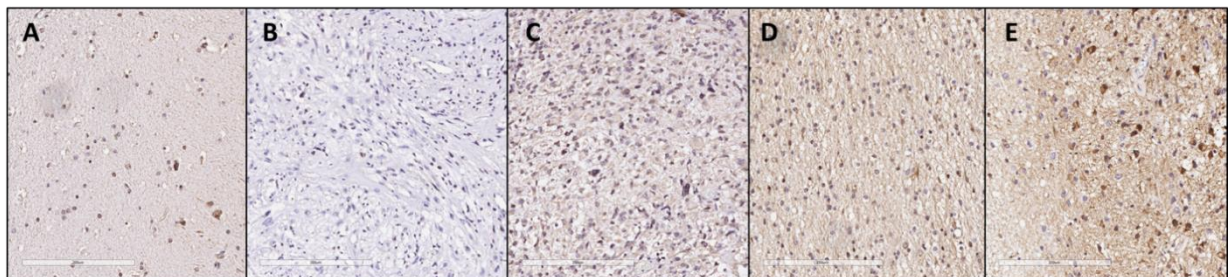


Figura 13: Variações nas intensidades da marcação de VRK2 em tecidos não neoplásicos e gliomas. (A) Tecido não neoplásico, (B) ausência de marcação, (C) marcação fraca, (D) marcação moderada e (E) marcação forte.

Fonte: própria autoria.

Ao investigar as correlações entre VRK2 e diferentes variáveis clínicas e histopatológicas (Tabela 7), não observamos associação com variáveis como histórico familiar de câncer, presença de outra neoplasia e presença de mutação no gene PTEN. No entanto, observamos que o estadiamento clínico foi significativamente alterado pela expressão de VRK2 ($p=0,0007$), apresentando um aumento de 333% para Astrocitoma Difuso, 833% para Astrocitoma Anaplásico e 233% para Glioblastoma Multiforme.

Tabela 7: Associação da expressão de VRK2 com as variáveis clínicas e patológicas relacionadas à gliomas. Teste de Mann-Whitney não-paramétrico para duas variáveis e teste de Kruskal-Wallis para três ou mais variáveis.

VRK2 - HScore						
Variável	Categoria	N (%)	Q1	HScore (Mediana)	Q3	p valor
Histórico Familiar	Não	8 (9)	37,5	130	157,5	0,6545
	Sim	4 (4)	22,5	115	147,5	
	Ignorado	78 (87)				
	Total	90 (100)				
Outra Neoplasia	Não	79 (87)	5	50	90	0,6979
	Sim	11 (12)	20	35	130	
	Ignorado	1 (1)				
	Total	90 (100)				
Estadiamento Clínico	Normal	32 (21)	0	15	38,75	0,0007
	II (AD)	14 (9)	13,5	65	110	
	III (AA)	10 (7)	33,75	140	168,8	
	IV (GBM)	97 (63)	4	50	92,5	
	Ignorado	0 (0)				
	Total	153 (100)				
Mutação PTEN	Perda total	8 (9)	0	15	32,5	0,213
	Perda parcial	27 (30)	5	50	90	
	Selvagem	38 (42)	0	52,5	81,25	
	Ignorado	17 (19)				
	Total	90 (100)				

AD: Astrocitoma Difuso; AA: Astrocitoma Anaplásico; GBM: Glioblastoma Multiforme.

Q1: Quartil 1; Q2: Quartil 2.

Fonte: própria autoria.

Posteriormente realizamos análise de sobrevida global para todos os gliomas demonstrou um valor de p igual a 0,0338, utilizando um ponto de corte de ≤ 10 para *Low* e > 10 para *High* (**Figura 13A**). Esse ensaio sugere que a expressão de VRK2 pode influenciar a sobrevida dos pacientes com gliomas de forma substancial, com o grupo de baixa expressão (*low*) apresentando aproximadamente 72% maior de óbito (*Hazard Ratio*: 1,719). Ao isolar os

casos de glioblastoma de definirmos um ponto de corte de ≤ 15 para *Low* e >15 para *High* (**Figura 13B**), obtivemos um valor de p de 0,1792, significando não haver relação clara na sobrevida global dos casos de glioblastoma e a expressão de VRK2.

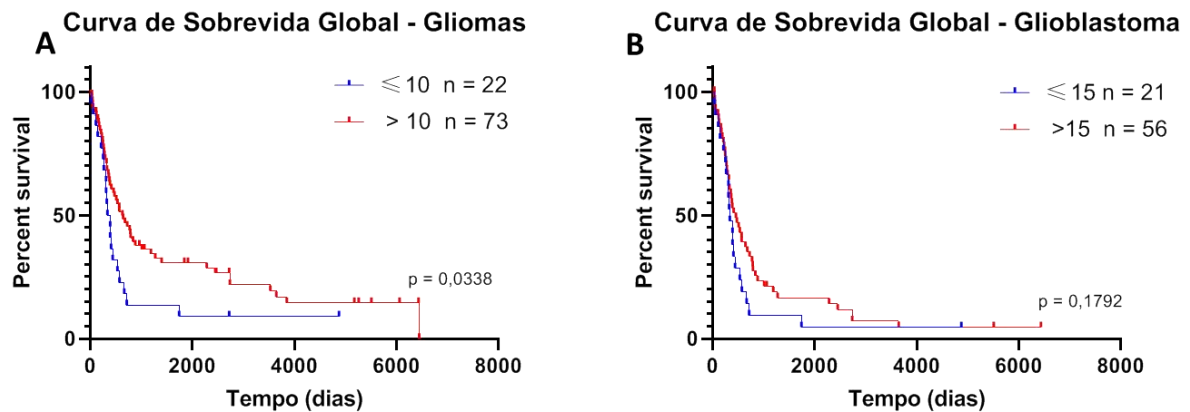


Figura 14: (A) Curva de Sobrevida Global em gliomas utilizando ponto de corte de *HScore* de 10. (B) Curva de Sobrevida Global em Glioblastoma usando ponto de corte de *HScore* de 15. Teste de *Log-rank* (Mantel-Cox).

Fonte: própria autoria.

Os resultados sugerem uma associação entre a expressão de VRK2 e o prognóstico dos pacientes com gliomas, bem como sua relação com características clínicas, destacando a importância de investigações futuras para elucidar completamente o papel dessa quinase nesses tumores cerebrais.

4.2.3 ANÁLISE COMBINADA DE VRK1 E VRK2

Através dos estudos de Shields et al. (2022) e So et al (2022) tomamos a decisão de realizar análises combinadas de VRK1 com VRK2, já VRK2 pode ter um papel redundante em certos momentos do ciclo celular. Com isso em mente, seguimos uma abordagem semelhante àquelas utilizadas previamente para VRK1 e VRK2 separadamente, com algumas adaptações. Aqui os valores de *HScore* podem variar de 0 a 600, devido a soma de ambas as proteínas. Como nas análises anteriores, consideramos apenas a marcação citoplasmática de ambas as proteínas, uma vez que a marcação nuclear não demonstrou relevância estatística devido à sua baixa expressão. Consideramos aqui somente os casos avaliáveis que possuíam tanto VRK1 quanto VRK2, logo descartamos aqueles casos que apenas possuíam um de dois resultados para avaliação.

Ao combinar os *HScore* de VRK1 e VRK2 (**Tabela 8**), nossa análise revelou um achado interessante em relação ao estadiamento clínico. O valor de *p* obtido para essa análise foi de $<0,0001$, o que sugere uma correlação mais significativa do que aquela observada quando analisamos VRK1 e VRK2 separadamente. Além da comparação com tecidos não neoplásicos, o destaque se vale também novamente para a alta expressão de VRK1 citoplasmático em tecidos neoplásicos de alto grau (III e IV). Essa alta expressão é ainda mais evidente especificamente no grau III, onde apresenta cerca de 32% mais expressa quando se comparado ao glioblastoma (grau IV).

Tabela 8: Associação das expressões de VRK1 e VRK2 com as variáveis clínicas e patológicas relacionadas à gliomas. Somatória dos valores de *HScore* variam de 0 a 600. Teste de Mann-Whitney não-paramétrico para duas variáveis e teste de Kruskal-Wallis para três ou mais variáveis.

VRK1 + VRK2 - HScore						
Variável	Categoria	N (%)	Q1	HScore (Mediana)	Q3	p valor
Histórico Familiar	Não	8 (9)	222,5	275	327,5	0,5697
	Sim	4 (4)	105	340	417,5	
	Ignorado	78 (87)				
	Total	90 (100)				
Outra neoplasia	Não	72 (80)	132,5	214	307,5	0,9083
	Sim	10 (11)	150	197,5	300	
	Ignorado	8 (9)				
	Total	90 (100)				
Estadiamento clínico	Normal	31 (13)	45	75	167,5	<0,0001
	II (AD)	13 (5)	80	170	272,5	
	III (AA)	10 (4)	211,3	280	345	
	IV (GBM)	89 (38)	140	213	295	
	Ignorado	94 (40)				
	Total	237 (100)				
Mutação PTEN	Perda total	8 (9)	116,3	165	208,8	0,3451
	Perda parcial	25 (28)	140	220	315	
	Selvagem	35 (39)	120	190	270	
	Ignorado	22 (24)				
	Total	90 (100)				

AD: Astrocitoma Difuso; AA: Astrocitoma Anaplásico; GBM: Glioblastoma Multiforme.

Q1: Quartil 1; Q2: Quartil 2.

Fonte: própria autoria.

Ao examinarmos a sobrevida global, a análise combinada de VRK1 e VRK2 em todos os gliomas, usando um ponto de corte de *HScore* ≤ 290 para baixa expressão e > 290 para alta expressão, resultou em uma diferença não tão significativa quando comparada ao resultado de

VRK2 individual (**Figura 14A**). Isso demonstra que para gliomas em um aspecto geral, a combinação de ambas as quinases não demonstra tanto impacto na sobrevida global, mesmo apresentando relativa diferença entre os grupos de baixa e alta expressão, com o grupo de baixa expressão possuindo relativo pior prognóstico e assim pior sobrevida

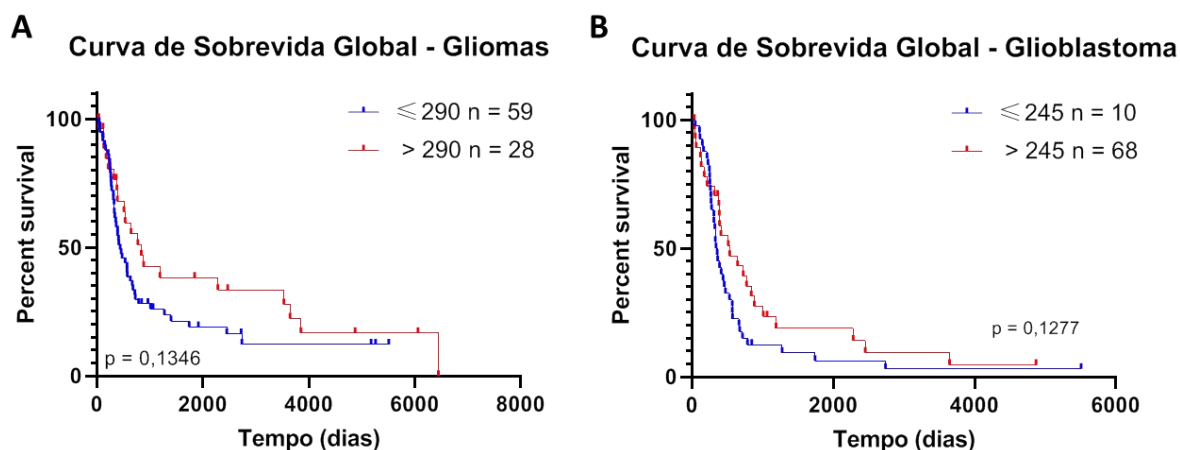


Figura 15: Curvas de Sobrevida Global VRK1 somado a VRK2. (A) Somente gliomas utilizando ponto de corte de *HScore* de 290. (B) Somente com glioblastoma usado o ponto de corte *HScore* de 90. Valores de *HScore* presentes variam de 0 a 600. Teste de *Log-rank* (Mantel-Cox).

Fonte: própria autoria.

O mesmo se aplica quando analisamos somente o grau IV dos gliomas, o glioblastoma. Aqui vemos que, quando utilizamos um ponto de corte de *HScore* ≤ 245 para baixa expressão e > 245 para alta expressão, a mesma tendência de sobrevida pior para a baixa expressão de VRK1 e VRK2 se mantém (**Figura 14B**), o que indicar uma tendência para a observação da baixa expressão de ambas as proteínas em glioblastoma.

4.3 CARCINOMA HEPATOCELULAR

Ao iniciarmos as avaliações em carcinoma hepatocelular, o médico patologista Dr. Gabriel Oliveira Dos Santos realizou o procedimento de forma similar ao Dr. Felipe. Dos 49 casos disponíveis, distribuídos em um TMA, para avaliação, apenas um caso que não pôde ser avaliado em nosso TMA, sendo este descartado de nossas análises. Os casos ignorados nas tabelas seguintes são aqueles que não possuíam informação da variável analisada.

4.3.1 VRK1

Realizamos as quantificações da expressão de VRK1 utilizando o anticorpo VRK1 Cell Signaling (1F6 mAb#3307). Ao observarmos as marcações de VRK1, notamos que elas quase sempre apresentavam 100% de positividade, apresentando assim pouca heterogeneidade e assim dificultando inicialmente as nossas análises. Com essa dificuldade, optamos por adotar uma abordagem que não usasse o *HScore*, que será explicada no próximo tópico. As marcações de VRK1 em carcinoma hepatocelular apresentaram majoritariamente citoplasmáticas, tornando-se irrelevante a avaliação nuclear para as nossas análises.

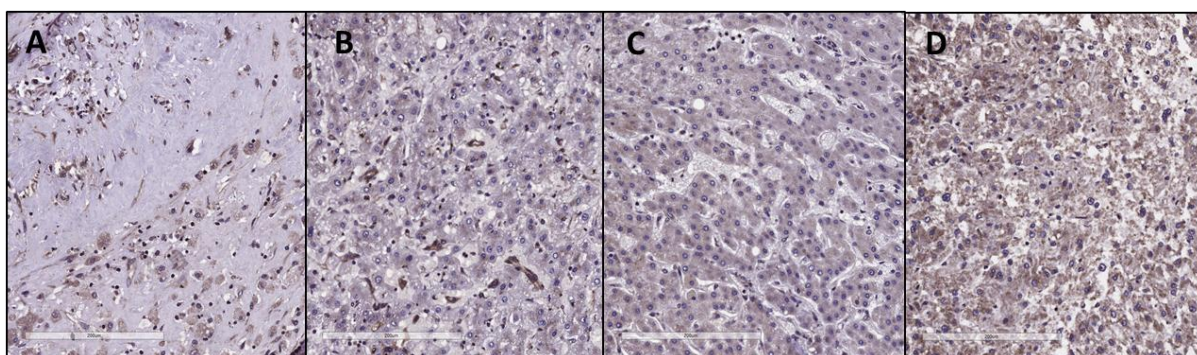


Figura 16: Variações das intensidades da marcação de VRK1 em Carcinoma Hepatocelular. (A) Tecido não neoplásico, (B) ausência de marcação, (C) marcação fraca e (D) marcação moderada.

Fonte: própria autoria.

Na avaliação da expressão de VRK1 no carcinoma hepatocelular (**Tabela 9**), adotamos uma abordagem específica ao dividir os casos em dois grupos distintos: aqueles com positividade de marcação inferior a 100%, chamada de negativa, e aqueles com positividade de marcação igual a 100%, categorizada como positiva. Essa divisão foi baseada na observação de variações sutis na positividade da marcação e na intensidade em muitos casos, tornando ineficiente o uso do *HScore* para conferir relevância estatística.

Ao analisar as variáveis clínicas e patológicas do Carcinoma Hepatocelular em relação à ausência ou presença da expressão de VRK1, não observamos correlação com histórico familiar de câncer, presença de outra neoplasia, estadiamento clínico, tabagismo, etilismo e grau de Edmondson Steiner. No entanto, a variável BCLC (*Barcelona Clinic Liver Cancer*) apresentou uma tendência a uma associação estatisticamente significativa ($p=0,065$). O sistema BCLC classifica a doença em estágios que variam de 0 (muito precoce) a D (terminal),

considerando a extensão do tumor, a função hepática e o estado geral do paciente (“Liver Cancer Stages - NCI”, 2022).

A distribuição dos casos sugere que a expressão de VRK1 pode variar entre os diferentes estágios do sistema BCLC. Especificamente, há uma maior proporção de casos VRK1+ no estágio 0 (46%) em comparação com os estágios A/B (21%) e C/D (4%).

Tabela 9: Associação da expressão de VRK1 com variáveis clínicas e patológicas de Carcinoma Hepatocelular. Analisado pelo teste exato de Fisher.

VRK1				
Variável	Categoria	Negativo	Positivo	p valor
Histórico familiar de câncer	Não	3 (4)	10 (21)	0,7006
	Sim	7 (15)	13 (30)	
	Ignorado	14 (30)		
Outra Neoplasia	Não	7 (14)	12 (25)	0,2401
	Sim	2 (3)	13 (27)	
	Ignorado	15 (31)		
Estadiamento clínico	I	6 (13)	20 (43)	0,6851
	II	2 (4)	3 (6)	
	III/IV	5 (11)	11 (23)	
	Ignorado	0 (0)		
Tabagismo	Não	3 (6)	7 (15)	0,2665
	Ex-fumante	4 (8)	14 (29)	
	Sim	3 (6)	2 (5)	
	Ignorado	15 (31)		
Etilismo	Não	2 (5)	7 (15)	>0,9999
	Sim	6 (12)	18 (37)	
	Ignorado	15 (31)		
Sistema BCLC	0	7 (15)	22 (46)	0,065
	A/B	2 (4)	10 (21)	
	C/D	4 (9)	2 (4)	
	Ignorado	1 (1)		
Cirrose	Não	4 (8)	4 (8)	0,1701
	Sim	6 (13)	24 (50)	
	Ignorado	10 (21)		
Hepatite	A/B	4 (8)	4 (8)	0,1864
	C	2 (4)	8 (17)	
	Sem subtipo	2 (4)	11 (23)	
	Ignorado	17 (36)		
Grau de Edmondson Steiner	II	4 (9)	14 (29)	>0,9999
	III/IV	5 (10)	20 (42)	
	Ignorado	5 (10)		
	Total	48 (100)		

Fonte: própria autoria.

Quanto às análises de sobrevida global e sobrevida livre de progressão (**Tabela 10**), mantivemos a mesma divisão de grupos mencionada anteriormente. No entanto, é importante destacar que nenhuma das análises realizadas para esses grupos apresentou resultados estatisticamente significativos.

Tabela 10: Análise de sobrevida global e sobrevida livre de progressão em carcinoma hepatocelular. Teste *Log-rank* (Mantel-Cox).

VRK1				
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>N (%)</i>	<i>Hazard Ratio</i> (Positivo/Negativo)	<i>p valor</i>
<i>Sobrevida Global</i>	Negativo	29 (60)	0,9077	0,8797
	Positivo	12 (25)		
<i>Sobrevida Livre de Progressão</i>	Negativo	29 (60)	1,788	0,2405
	Positivo	12 (25)		
	Ignorado	7 (15)		
	Total	48 (100)		

Fonte: própria autoria.

4.3.2 VRK2

Para a avaliação da expressão de VRK2 em carcinoma hepatocelular, foi-se usado o anticorpo VRK2 (H-5) Santa Cruz (cat.: sc-365199). Utilizamos o mesmo TMA para avaliar VRK2, sendo descartado um único caso devido a não ser possível a sua avaliação, e também posteriormente descartada em nossas análises. Diferente do que foi encontrado em VRK1, em VRK2 encontramos positividade heterogênea, mas vários casos com intensidades de marcações que beiravam ao negativo. Com isso em mãos, resolvemos não utilizar o *HScore* aqui também e a usar outra abordagem que será mencionada nos tópicos seguintes. VRK2 também apresentou pouca marcação nuclear, fazendo com que não utilizássemos em nossas análises.

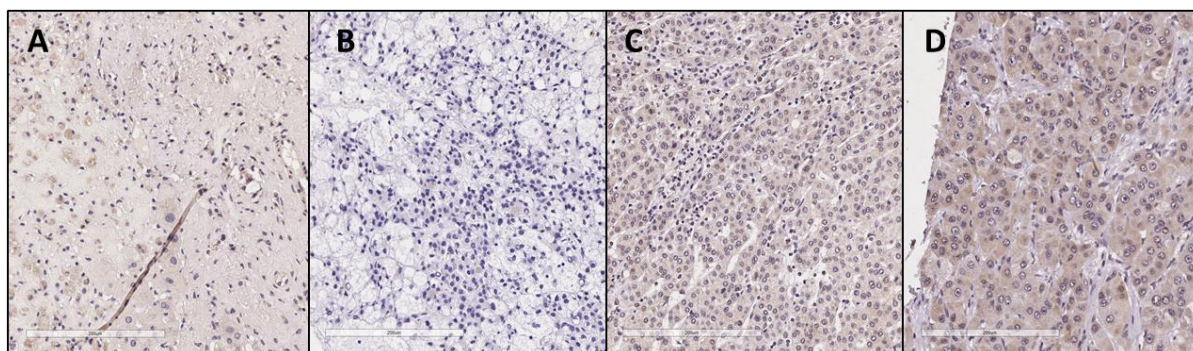


Figura 17: Diferenças nas intensidades de marcação de VRK2 no Carcinoma Hepatocelular. (A) Tecido não neoplásico, (B) ausência de marcação, (C) marcação fraca e (D) marcação moderada.

Fonte: própria autoria.

Conduzimos análises considerando a predominância da marcação citoplasmática, devido à ausência de marcação nuclear nas amostras. Inicialmente, tentamos aplicar o HScore como de praxe, mas observamos que os valores obtidos eram baixos e homogêneos, o que limitou a relevância estatística desses dados. Para superar essa limitação, optamos por criar dois grupos distintos: um composto pelos casos em que a marcação estava presente, adotada como positiva, e outro pelos casos em que a marcação estava ausente, chamada de negativa, devido ao alto número de casos negativos encontrados nas amostras avaliadas.

Não observamos associações entre a expressão de VRK2 e variáveis clínicas e patológicas, como histórico familiar de câncer (**Tabela 11**), presença de outra neoplasia, estadiamento clínico, tabagismo, etilismo, sistema BLCC, cirrose, hepatite e grau de Edmondson Steiner.

Tabela 11: Associação da expressão de VRK2 com as variáveis clínicas e patológicas relacionadas a Carcinoma Hepatocelular. Analisado pelo teste exato de Fisher.

VRK2 Negativo/Positivo				
Variável	Categoria	Negativo	Positivo	p valor
Histórico familiar de câncer	Não	6 (12)	6 (12)	0,7068
	Sim	6 (12)	9 (20)	
	Ignorado	21 (44)		
Outra Neoplasia	Não	9 (19)	9 (19)	0,7345
	Sim	8 (17)	6 (12)	
	Ignorado	16 (33)		
Estadiamento clínico	I/II	16 (33)	12 (25)	>0,9999
	III/IV	8 (17)	7 (15)	
	Ignorado	5 (10)		
Tabagismo	Não	4 (8)	5 (10)	0,4223
	Sim/ex-fumante	13 (27)	7 (15)	
	Ignorado	19 (40)		
Etilismo	Não	4 (8)	5 (10)	0,6999
	Sim/Social/Ex	11 (23)	9 (19)	
	Ignorado	19 (40)		
Sistema BLCC	0	15 (31)	11 (23)	>0,9999
	A/B/C/D	9 (19)	8 (17)	
	Ignorado	5 (10)		
Cirrose	Não	5 (10)	3 (7)	>0,9999
	Sim	16 (33)	12 (25)	
	Ignorado	12 (25)		
Hepatite	A/B/C	9 (19)	8 (17)	0,283
	Sem subtipo	8 (17)	5 (10)	
	Não	1 (2)	4 (8)	
	Ignorado	13 (27)		
Grau de Edmondson Steiner	II	12 (25)	5 (10)	0,2011
	III/IV	11 (23)	13 (27)	
	Ignorado	7 (15)		
	Total	48 (100)		

Fonte: própria autoria.

Realizamos análise quanto a sobrevida global e livre de progressão utilizando novamente os grupos ausente e presente (**Tabela 12**), entretanto os resultados não apresentaram significativos.

Tabela 12: Análise de sobrevida global e sobrevida livre de progressão de VRK2 em carcinoma hepatocelular. Teste *Log-rank* (Mantel-Cox).

		VRK2		
<i>Variável</i>	Categoria	N (%)	<i>Hazard Ratio</i> (Positivo/Negativo)	p valor
<i>Sobrevida Global</i>	Negativo	23 (48)	1,05	0,9366
	Positivo	21 (44)		
	Ignorado	4 (8)		
<i>Sobrevida Livre de Progressão</i>	Negativo	20 (42)	1,932	0,2118
	Positivo	16 (33)		
	Ignorado	12 (25)		
	Total	48 (100)		

Fonte: própria autoria.

A análise isolada da quinase VRK2 não demonstrou potencial como marcador para o diagnóstico ou detecção de carcinoma hepatocelular. Além disso, nossas investigações sobre a sobrevida global e livre de progressão não revelaram significância estatística na expressão de VRK2, sugerindo que essa proteína não possui relevância significativa para essas análises.

4.3.3 ANÁLISE COMBINADA DE VRK1 E VRK2

Devido à possível relação de redundância de VRK2 com VRK1 (Shields et al., 2022; So et al, 2022), partimos para as nossas análises combinadas. Utilizamos os casos onde ambas as proteínas estavam presentes, assim totalizavam 48 casos. Como não foi possível utilizar o *HScore* tanto para VRK1 quanto para VRK2, combinamos os nossos grupos de VRK1 (classificado com "**positivo**" quando a positividade da marcação era **igual a 100%** e "**negativo**" quando essa positividade era **inferior a 100%**) e VRK2 (classificado com "**positivo**" para positividades **acima de 0%** e "**negativo**" para valores **iguais a 0%**) e se totalizaram quatro: **VRK1- e VRK2-**, **VRK1+ e VRK2-**, **VRK1- e VRK2+**, e **VRK1+ e VRK2+**.

Realizamos análises combinando VRK1 e VRK2 com variáveis clínicas e patológicas em Carcinoma Hepatocelular. Não foram encontradas associações com histórico familiar de câncer, estadiamento clínico, tabagismo, etilismo, sistema BLCC e grau de Edmondson Steiner (**Tabela 13**). No entanto, a análise sugere que a expressão combinada de VRK1 e VRK2 está associada à presença de outra neoplasia. Especificamente, a categoria "Sim" (presença de outra neoplasia) apresentou uma maior proporção de casos com VRK1+ | VRK2- (15%) em comparação com a categoria "Não" (2%).

Tabela 13: Associação das expressões de VRK1 e VRK2 com as variáveis clínicas e patológicas relacionadas a Carcinoma Hepatocelular. Analisado pelo teste exato de Fisher.

VRK1 e VRK2 Negativo/Positivo						
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	VRK1- VRK2- (%)	VRK1+ VRK2- (%)	VRK1- VRK2+ (%)	VRK1+ VRK2+ (%)	<i>p valor</i>
<i>Histórico Familiar de Câncer</i>	Não	2 (4)	3 (6)	1 (2)	6 (13)	0,57
	Sim	5 (10)	6 (13)	0 (0)	9 (19)	
	Ignorado				16 (33)	
<i>Outra Neoplasia</i>	Não	4 (8)	1 (2)	4 (8)	9 (19)	0,0368
	Sim	1 (2)	7 (15)	1 (2)	6 (13)	
	Ignorado				15 (31)	
<i>Estadiamento clínico</i>	I/II	6 (13)	9 (19)	2 (4)	12 (25)	0,7729
	III/IV	3 (6)	5 (10)	0 (0)	7 (15)	
	Ignorado				4 (8)	
<i>Tabagismo</i>	Não	1 (2)	2 (4)	1 (2)	5 (10)	0,5433
	Sim	5 (10)	8 (17)	1 (2)	7 (15)	
	Ignorado				18 (30)	
<i>Etilismo</i>	Não	2 (4)	2 (4)	0 (0)	5 (10)	0,7148
	Sim	3 (6)	8 (17)	1 (2)	9 (19)	
	Ignorado				18 (30)	
<i>Sistema BCLC</i>	0	6 (13)	9 (19)	1 (2)	11 (25)	0,9479
	A/B/C/D	3 (6)	5 (10)	1 (2)	8 (17)	
	Ignorado				4 (8)	
<i>Cirrose</i>	Não	4 (8)	1 (2)	0 (0)	3 (6)	0,1551
	Sim	4 (8)	11 (24)	1 (2)	12 (25)	
	Ignorado				12 (25)	
<i>Hepatite</i>	A/B/C	4 (8)	5 (10)	1 (2)	8 (17)	0,4978
	Sem subtipo	1 (2)	6 (13)	1 (2)	5 (10)	
	Sem hepatite	1 (2)	0 (0)	0 (0)	4 (8)	
	Ignorado				12	
<i>Grau de Edmondson Steiner</i>	II	3 (6)	8 (17)	1 (2)	5 (10)	0,0019
	III/IV	5 (10)	0 (0)	6 (13)	13 (27)	
	Ignorado				7	
	Total				48 (100)	

Fonte: própria autoria.

Ao analisar as sobrevidas, inicialmente realizamos as análises para os grupos individuais. Embora nenhum resultado para sobrevida global tenha atingido significância estatística, ao examinar a sobrevida livre de progressão (**Tabela 15**), observamos valores significativos ($p=0,0336$). Decidimos então unir os quatro grupos em apenas dois, devido às curvas de sobrevida se cruzarem. Assim, formamos dois grupos: um com **VRK1 negativo e VRK2 negativo** e outro em que **VRK1 e/ou VRK2 são positivos**.

Tabela 14: Análises de Sobrevida Global de casos grupos de VRK1 e VRK2. Teste *Log-rank* (Mantel-Cox).

VRK1 + VRK2				
Sobrevida Global				
Variável	Categoria	N (%)	Hazard Ratio (A/B)	p valor
VRK1 / VRK2	VRK1- / VRK2 -(A)	9 (19)	-	0,6159
	VRK1 + / VRK2 - (B)	14 (29)		
	VRK1 - / VRK2 + (C)	1 (2)		
	VRK1 + / VRK2 + (D)	19 (40)		
	Ignorado	5 (10)		
VRK1-/VRK2- vs VRK1 e/ou VRK2-	VRK1-/ VRK2- (A)	9 (19)	0,4095	0,3707
	VRK1 e/ou VRK2- (B)	34 (71)		
	Ignorado	5 (10)		
	Total	48 (100)		

Fonte: própria autoria.

Tabela 15: Análises de Sobrevida Livre de Progressão de casos grupos de VRK1 e VRK2. Teste *Log-rank* (Mantel-Cox).

VRK1 + VRK2				
Sobrevida Livre de Progressão				
Variável	Categoria	N	Hazard Ratio (A/B)	p valor
VRK1 / VRK2	VRK1- / VRK2 -(A)	8 (17)	-	0,0336
	VRK1 + / VRK2 - (B)	6 (12)		
	VRK1 - / VRK2 + (C)	1 (2)		
	VRK1 + / VRK2 + (D)	14 (29)		
	Ignorado	19 (40)		
VRK1-/VRK2- vs VRK1 e/ou VRK2-	VRK1-/ VRK2- (A)	8 (12)	0,1552	0,0384
	VRK1 e/ou VRK2- (B)	21 (44)		
	Ignorado	19 (40)		
	Total	48 (100)		

Fonte: própria autoria.

Analisando esses dois grupos combinados, encontramos um valor de p para a sobrevida livre de progressão de 0,0384 (**Tabela 15**), indicando uma diferença estatisticamente significativa, apresentando uma redução de aproximadamente 85% na chance de progressão para o grupo com VRK1 e VRK2 negativos.

4.4 CARCINOMA DE MAMA

Realizamos as quantificações manuais de 315 casos distribuídos em dois TMAs (Mama 45 e Mama 59). Devido a problemas que impossibilitaram as avaliações, como a falta de representatividade tumoral, resultados não conclusivos e pouco tecido presente no spot para avaliação, foram excluídos 149 casos. A avaliação e quantificação foi realizada pela médica patologista Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osorio. Nossa análise de VRK1 em Carcinoma de Mama compreende 166 casos e, como em gliomas e carcinoma hepatocelular, em Carcinoma de Mama notamos também uma expressão nuclear fraca em aspecto geral, tornando-se não relevante para ser incluída em nossas análises. Por esse motivo nos concentramos a usar somente o *HScore* citoplasmático, o que se mostrou bastante heterogêneo tanto para a positividade das marcações quanto para as suas intensidades. Ao estratificar os subtipos moleculares, não tivemos casos suficientes para os grupos HER2+ e Triplo Negativo para analisar as sobrevidas globais e sobrevidas livre de progressão, logo não foram incluídas em nossas avaliações.

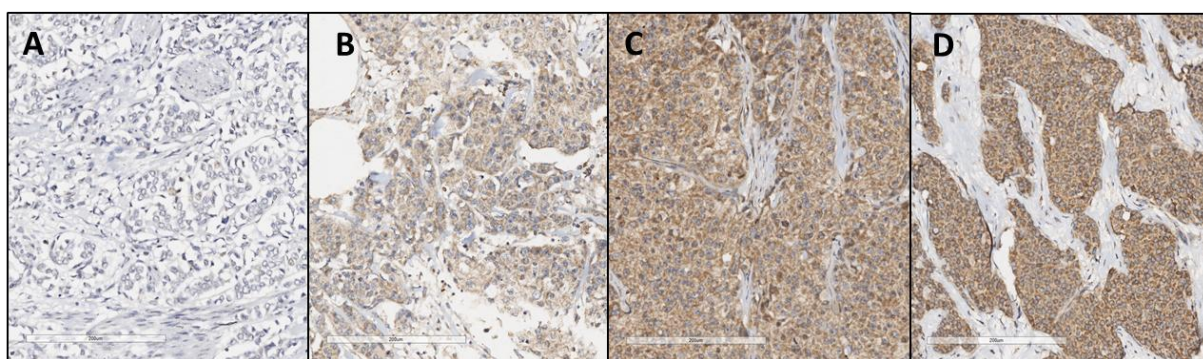


Figura 18: Diferentes níveis de intensidade da marcação de VRK1 em Carcinoma de Mama. (A) Ausência de marcação, (B) marcação fraca, (C) marcação moderada e (D) marcação forte.

Fonte: própria autoria.

Embora não tenhamos encontrado tecidos não neoplásicos para quantificação nos TMAs avaliados, conseguimos identificar quatro diferentes níveis de intensidade de marcação de VRK1 em amostras de Carcinoma de Mama (**Figura 17**).

4.4.1 VRK1

Para avaliarmos a expressão de VRK1 em Carcinoma de Mama, foi utilizado o anticorpo VRK1 Cell Signaling 1F6 (cat.: mAb#3307). Em nossa análise da expressão de VRK1 em carcinoma, não observamos associação com as variáveis clínicas (**Tabela 16**) como status menopausal, presença de outra neoplasia, progressão da doença e subtipo molecular. No entanto, a variável histórico familiar de câncer apresentou uma expressão significativamente maior de VRK1 (cerca de 27%) no grupo “Sim” (com histórico familiar de câncer) em comparação com o grupo “Não”.

Tabela 16: Associação da expressão de VRK1 com as variáveis clínicas relacionadas à Carcinoma de Mama. Teste de Mann-Whitney não-paramétrico para duas variáveis e teste de Kruskal-Wallis para três ou mais variáveis.

VRK1 - HScore						
Variável	Categoria	N (%)	Q1	HScore (Mediana)	Q3	p valor
Histórico familiar de câncer	Não	50 (30)	46,25	75	105,5	0,0053
	Sim	101 (61)	70	95	160	
	Ignorado	15 (9)				
Status Menopausa	Pré	55 (33)	75	98	142,5	0,0977
	Pós	107 (65)	60	90	142,5	
	Ignorado	4 (2)				
Outra Neoplasia	Não	117 (71)	69,5	95	140	0,2858
	Sim	25 (15)	55	135	165	
	Ignorado	23 (14)				
Estadiamento clínico	I	46 (28)	65,63	92,5	152,5	0,4434
	II	83 (50)	70	95	142,5	
	III/IV	36 (21)	60	90	131,7	
	Ignorado	1 (1)				
Houve Progressão	Não	127 (76)	60	95	160	0,3969
	Sim	37 (23)	70	95	120	
	Ignorado	2 (1)				
Classificação	Luminal A	74 (45)	60	90	142,5	0,9227
	Luminal B	44 (27)	62,25	95	140	
	Tripla Negativo	36 (22)	61,88	90	140,6	
	HER2+	11 (6)	70	95	160	
	Ignorado	1 (1)				
	Total	166 (100)				

Q1: Quartil 1; Q2: Quartil 2.

Fonte: própria autoria.

Ao analisarmos as variáveis patológicas com a expressão de VRK1, não observamos

associação com as variáveis grau histológico, grau nuclear, presença de necrose, invasão vascular sanguínea e linfática, invasão peritoneal, infiltrado inflamatório, expressão do receptor de estrógeno e progesterona e expressão de HER2 e TP53.

Tabela 17: Associação da expressão de VRK1 com as variáveis patológicas relacionadas à Carcinoma de Mama. Teste de Mann-Whitney não-paramétrico para duas variáveis e teste de Kruskal-Wallis para três ou mais variáveis.

<i>VRK1 - HScore</i>						
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>N (%)</i>	<i>Q1</i>	<i>HScore (Mediana)</i>	<i>Q3</i>	<i>p valor</i>
<i>Grau Histológico</i>	I	19 (11)	35	80	160	0,6713
	II	81 (49)	60	95	141,3	
	III	61 (37)	68,25	95	146,3	
	Ignorado	5 (3)				
<i>Grau Nuclear</i>	I	3 (2)	30	35	10	0,132
	II	43 (26)	40	80	150	
	III	119 (71)	70	95	142,5	
	Ignorado	1 (1)				
<i>Presença de Necrose</i>	Não	110 (66)	60	90	140,6	0,9745
	Sim	55 (33)	67,5	95	142,5	
	Ignorado	1 (1)				
<i>Invasão Vascular Sanguínea</i>	Não	69 (93)	37,5	80	141,3	0,3291
	Sim	5 (7)	3	70	112,5	
	Ignorado	92 (55)				
<i>Invasão Vascular Linfática</i>	Não	55 (74)	30	80	142,5	0,8804
	Sim	19 (26)	27,5	90	120	
	Ignorado	92 (55)				
<i>Invasão Peritoneal</i>	Não	61 (82)	47,5	80	142,5	0,4241
	Sim	13 (18)	11	90	120	
	Ignorado	92 (55)				
<i>Infiltrado Inflamatório</i>	Ausente/Discreto	40 (24)	20,25	70	141,9	0,2159
	Moderado/Presente	35 (21)	60	90	140	
	Ignorado	91 (55)				
<i>Expressão Receptor de Estrógeno</i>	Negativo	47 (28)	67,5	95	150	0,9465
	Positivo	119 (72)	60	95	140	
	Ignorado	0 (0)				
<i>Expressão Receptor de Progesterona</i>	Negativo	74 (45)	65,63	92,5	140	0,7169
	Positivo	92 (55)	60	65	142,5	
	Ignorado	0 (0)				
<i>Expressão HER2</i>	Negativo	145 (87)	60	95	142,5	0,8972
	Positivo	21 (13)	69,5	95	137,5	
	Ignorado	0 (0)				
<i>Expressão TP53</i>	Negativo	79 (48)	60	90	120	0,1176
	Positivo	44 (26)	70	102,5	160	
	Ignorado	43 (26)				
	Total	166 (100)				

Q1: Quartil 1; Q2: Quartil 2.

Fonte: própria autoria.

Ao analisar a sobrevida global e a sobrevida livre de progressão (Tabelas 18 e 19), bem como a estratificação dos casos em subtipos moleculares, surgiram resultados intrigantes. Utilizamos o mesmo valor de *HScore* como ponto de corte para todas as análises, sendo valores ≤ 95 como *Low* e >95 como *High*. Quando analisamos os estadiamentos mais altos separadamente (III e IV), vemos que a baixa presença de VRK1 oferece uma taxa de 3,57 vezes menor de óbito que a alta expressão.

Tabela 18: Análise de sobrevida global de VRK1 em Carcinoma de Mama. Teste *Log-rank* (Mantel-Cox).

VRK1				
Sobrevida Global				
Variável	HScore 95	N (%)	Hazard Ratio (Low/High)	p valor
Todos os casos	Low	93 (56)	0,66	0,1587
	High	73 (44)		
	Ignorados	0 (0)		
Grupos Moleculares				
Triplo Negativo	Low	20 (12)	1,25	0,7288
	High	16 (9)		
	Ignorados	131 (79)		
Luminal A	Low	40 (24)	0,7211	0,4517
	High	34 (21)		
	Ignorados	92 (55)		
Luminal B	Low	23 (14)	0,3573	0,1107
	High	21 (13)		
	Ignorados	122 (73)		
Estadiamentos				
I/II	Low	71 (43)	0,9018	0,7666
	High	58 (35)		
	Ignorados	37 (22)		
III/IV	Low	21 (13)	0,2803	0,0142
	High	15 (9)		
	Ignorados	130 (78)		
	Total	166 (100)		

Fonte: própria autoria.

A respeito da progressão da doença (Tabela 19), obtivemos resultado próximo ao valor de significância para o grupo molecular Luminal A ($p = 0,0599$). Isso pode significar como a marcação de LMTK3 citoplasmático como potencial marcador molecular na progressão de Carcinoma de Mama, podendo também ser um indicativo de pior sobrevida, visto que possui 137,2% maior chance de acontecer a progressão da doença quando

comparado ao grupo de alta expressão (*high*). Além disso, vale ressaltar a análise de baixo estadiamento (I e II), onde mesmo que o valor de p não tenha chegado a ser significativo (0,0864), é interessante notar que o grupo de baixa expressão também possui maior chance de experimentar a progressão do câncer, com um aumento de 103,3% de chance a mais quando também comparamos com o segundo grupo, de maior expressão.

Tabela 19: Análise de sobrevida livre de progressão de VRK1 em Carcinoma de Mama. Teste Log-rank (Mantel-Cox).

VRK1				
Sobrevida Livre de Progressão				
Variável	HScore 95	N (%)	Hazard Ratio (Low/High)	p valor
Todos os casos	Low	93 (56)	1,794	0,0829
	High	73 (44)		
	Ignorados	0 (0)		
Grupos Moleculares				
Triplo Negativo	Low	20 (12)	0,9704	0,9665
	High	16 (9)		
	Ignorados	131 (79)		
Luminal A	Low	40 (24)	2,372	0,0599
	High	34 (21)		
	Ignorados	92 (55)		
Luminal B	Low	23 (14)	2,687	0,2066
	High	21 (13)		
	Ignorados	122 (73)		
Estadiamentos				
I/II	Low	71 (43)	2,033	0,0864
	High	58 (35)		
	Ignorados	37 (22)		
III/IV	Low	21 (13)	0,8906	0,8656
	High	15 (9)		
	Ignorados	130 (78)		
	Total	166 (100)		

Fonte: própria autoria.

4.5 ADENOCARCINOMA PULMONAR

Partimos para as nossas análises realizadas utilizando a proteína PKMYT1. Começamos em adenocarcinoma pulmonar. Quem nos auxiliou na quantificação foi o Dr. Clovis Antônio Lopes Pinto. Em suas quantificações, considerava como representativos casos que possuísem ao menos 25% de representatividade. Com esse critério, utilizamos 56 casos e ignorados três que não fizeram parte de nossas análises.

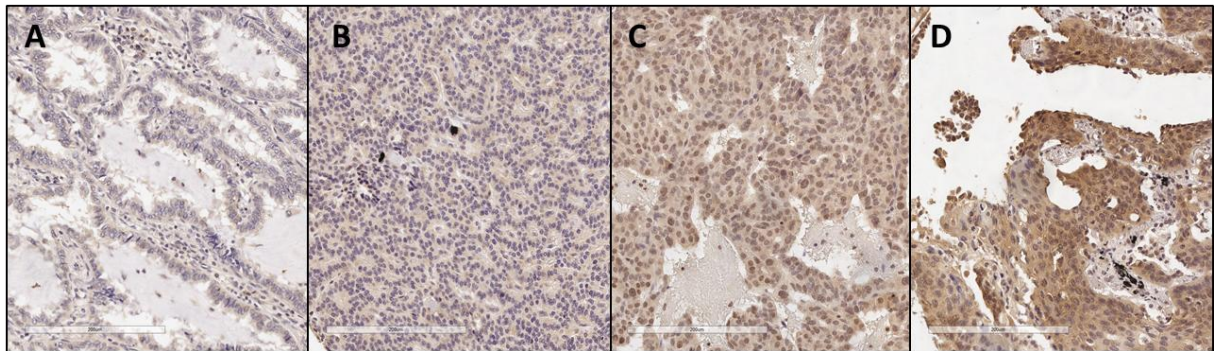


Figura 19: Variações graus de intensidade na marcação de PKMYT1 em Adenocarcinoma Pulmonar são ilustradas. (A) Ausência de marcação, (B) marcação leve, (C) marcação moderada e (D) marcação intensa.

Fonte: própria autoria.

Não foi possível encontrar tecidos não neoplásicos para realizar as avaliações devido ao desgaste das lâminas disponíveis e à falta de tempo hábil para preparar novas. Entretanto, nos tecidos neoplásicos analisados, observamos todas as quatro variações de intensidade (**Figura 19**).

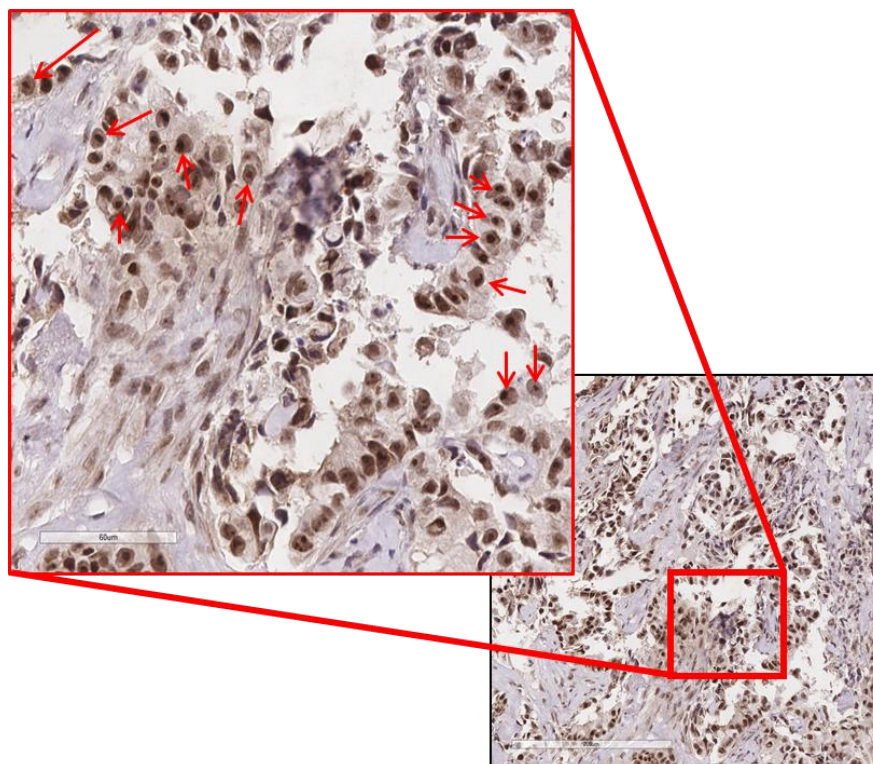


Figura 20: Marcações de PKMYT1 nos nucléolos de células neoplásicas em adenocarcinoma pulmonar. Destaca-se a forte e específica intensidade nessa localização.

Fonte: própria autoria.

Em contrapartida ao que é descrito na literatura, que é frequentemente citado que a expressão de PKMYT1 é citoplasmática (Asquith, Laitinen, & East, 2019; Long et al., 2020; Liu et al., 2017 Nakajima et al., 2003), em nossos casos para Adenocarcinoma Pulmonar e Carcinoma Renal de Células Claras, observamos comumente a expressão nuclear, mais especificamente nucleolar, muitas vezes predominando sobre a expressão citoplasmática (**Figura 20**). Procuramos na literatura para poder entender o motivo dessa peculiaridade e, encontramos uma única informação no *The Human Protein Atlas*, onde nos resultados de imunofluorescência, foi-se percebido expressão de PKMYT1 em alguns nucléolos em células de carcinoma de células renais. Não identificamos um mecanismo bem estabelecido, visto que a expressão dessa quinase deveria ser, teoricamente, apenas citoplasmática, encontrada principalmente no complexo de Golgi e retículos endoplasmáticos.

4.5.1 PKMYT1

Para a análise da expressão de PKMYT1, utilizamos o anticorpo PKMYT1 Invitrogen (0TI5E1) (cat.: MA525034). Não foi possível observar associação entre a expressão de PKMYT1 e as variáveis clínicas e patológicas, como estadiamento clínico, histórico familiar de câncer, presença de mutação EGFR, etilismo ou tabagismo (Tabela 20). No entanto, observamos uma associação significativa ($p=0,0354$) com a variável “Outra neoplasia”. O grupo que não apresentou outra neoplasia mostrou uma expressão de PKMYT1 50% maior em comparação com o grupo que apresentou outra neoplasia.

Tabela 20: Associação da expressão de PKMYT1 com as variáveis clínicas e patológicas em Adenocarcinoma Pulmonar Teste de Mann-Whitney não-paramétrico para duas variáveis e teste de Kruskal-Wallis para três ou mais variáveis.

<i>PKMYT1 - HScore</i>						
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>N (%)</i>	<i>Q1</i>	<i>Mediana</i>	<i>Q3</i>	<i>p valor</i>
<i>Outra neoplasia</i>	Não	23 (39)	50	100	150	0,0354
	Sim	13 (22)	25	50	75	
	Ignorado	23 (39)				
<i>Estadiamento clínico</i>	I - III	20 (34)	25	62,5	100	0,0807
	IV	16 (27)	50	150	150	
	Ignorado	23 (39)				
<i>Histórico familiar de câncer</i>	Não	7 (9)	25	100	150	0,9038
	Sim	22 (37)	50	75	150	
	Ignorado	32 (54)				
<i>Mutação EGFR</i>	Não	12 (20)	31,25	75	150	0,3265
	Sim	8 (14)	56,25	125	150	
	Ignorado	39 (66)				
<i>Etilismo</i>	Não	12 (20)	25	50	150	0,8242
	Sim	6 (11)	43,75	87,5	150	
	Ignorado	41 (69)				
<i>Tabagismo</i>	Sim	7 (12)	25	75	150	0,9723
	Ex-fumante	15 (25)	50	75	150	
	Não	10 (17)	43,75	62,5	150	
	Ignorado	27 (46)				
	Total	59 (100)				

Q1: Quartil 1; Q2: Quartil 2.

Fonte: própria autoria.

Além disso, em nossas análises de sobrevida global, ao estratificar os pacientes com base na expressão de PKMYT1, usando um ponto de corte de $HScore \leq 75$ para *Low* e

$HScore > 75$ para *High*, obtivemos um valor de $p=0,0028$, onde o *Hazard Ratio* apresentou um valor de 0,2866, indicando uma redução para o risco de óbito de 71,34% para o grupo de menor expressão de PKMYT1 (**Figura 21A**). Adicionalmente, a análise da sobrevida livre de progressão (**Figura 21B**), usando os mesmos pontos de corte para a expressão de PKMYT1, resultou em um valor de $p=0,0273$, com um *Hazard Ratio* de 0,383. Isso indica que, com o mesmo ponto de corte de $HScore$ de 75, a baixa expressão continua a indicar um cenário melhor, aqui no caso a progressão, apresentando uma redução na chance de ocorrer de progressão de 62%.

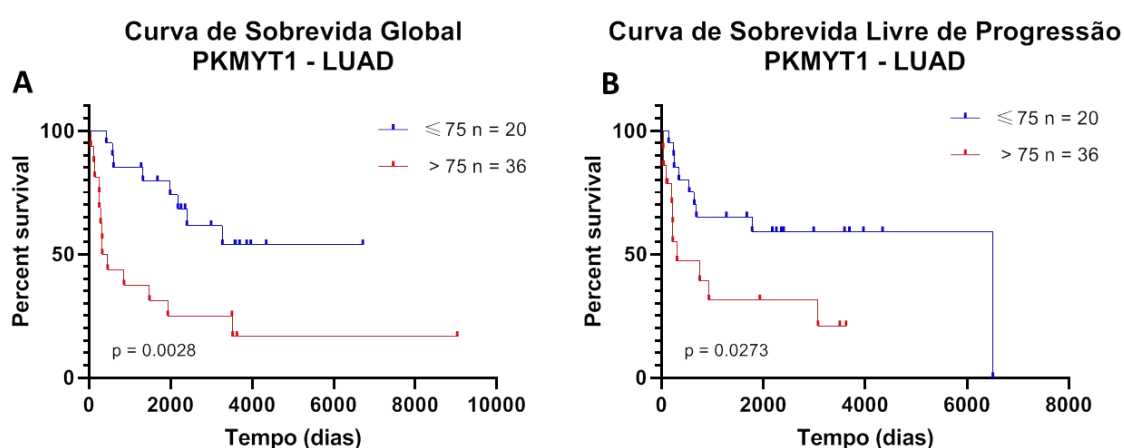


Figura 21: Curvas de sobrevida global (A) e sobrevida livre de progressão (B) utilizando pontos de corte $HScore$ de 75 em adenocarcinoma pulmonar. Teste *Log-rank* (Mantel-Cox).

Fonte: própria autoria.

4.6 CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS

Através da colaboração da médica patologista Dra. Stephania Martins Bezerra, quantificamos os casos de Carcinoma de Células Claras Renais. Observamos que as marcações citoplasmáticas e nucleares apresentavam relativa heterogeneidade. Dos 201 casos totais, 43 foram excluídos por se enquadrarem nos critérios de exclusão. Assim, totalizamos 168 casos em nossas análises, dos quais 35 eram amostras não tumorais provenientes de margens livres de ressecção de casos repetidos. Essas amostras foram incluídas apenas na análise da variável “Normal vs Tumor vs Metástase”. Quando os casos não possuíam dados para determinada variável, foram considerados como “Ignorados” nas tabelas.

4.6.1 PKMYT1

Para realizar a quantificação de PKMYT1, utilizamos o anticorpo PKMYT1 Invitrogen (0TI5E1) (cat.: MA525034). Empregamos o uso de *HScore* e dividimos nossas análises em marcações citoplasmáticas e nucleares devido acharmos alta heterogeneidade entre ambas (**Figura 22**).

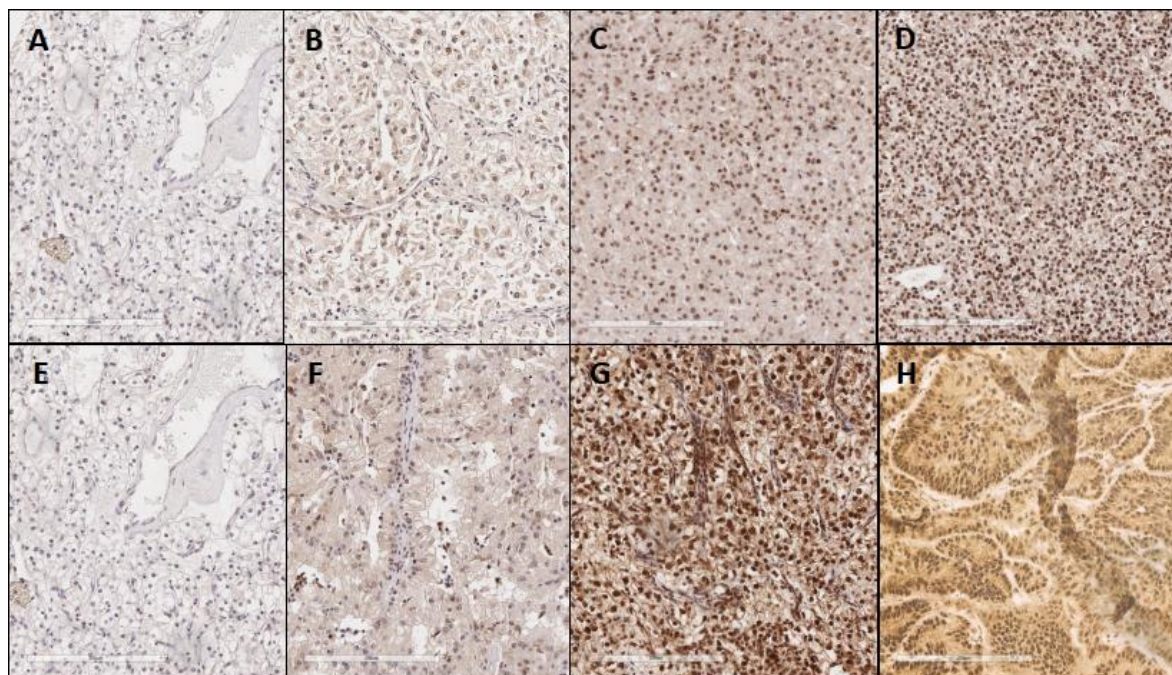


Figura 22: Variações das intensidades das marcações nucleares e citoplasmáticas de PKMYT1 (cat.: MA525034) em carcinoma renal de células claras. Variações nucleares: (A) ausência de marcação, (B) marcação fraca, (C) marcação moderada e (D) marcação forte. Variações citoplasmáticas: (E) ausência de marcação, (F) marcação fraca, (G) marcação moderada e (H) marcação forte.

Fonte: própria autoria.

Não observamos associação entre a expressão citoplasmática de PKMYT1 e as variáveis clínicas e patológicas, como histórico familiar de câncer, presença de outra neoplasia, presença de necrose e invasão vascular sanguínea ou linfática (**Tabela 21**). No entanto, observamos uma alta associação com tecidos metastáticos. Ao comparar a expressão citoplasmática de PKMYT1 em tecidos metastáticos com tecidos não neoplásicos, observamos um aumento de 140% na expressão. Comparando a mesma marcação em tecidos metastáticos com tecidos tumorais, houve um aumento de aproximadamente 243% na expressão citoplasmática de PKMYT1.

Além disso, observamos que graus agressivos (III/IV) de Carcinoma Renal de Células Claras apresentam duas vezes mais expressão citoplasmática em comparação com os graus menos agressivos (I/II).

Tabela 21: Associação da expressão de PKMYT1 com as variáveis clínicas e patológicas em Carcinoma de Células Claras Renais. Teste de Mann-Whitney não-paramétrico para duas variáveis e teste de Kruskal-Wallis para três ou mais variáveis.

PKMYT1 - Invitrogen (citoplasma)						
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>N (%)</i>	<i>Q1</i>	<i>Mediana (Hscore)</i>	<i>Q3</i>	<i>p valor</i>
<i>Normal vs Tumor vs Metástase</i>	Normal	35 (24)	25	50	100	>0,0001
	Tumor	77 (53)	0	35	70	
	Metástase	33 (33)	100	120	200	
	Ignorado	0 (0)				
	Total	145 (100)				
<i>Estadiamento clínico</i>	I-II	56 (73)	0	25	68,75	0,0375
	III-IV	20 (26)	36,25	50	75	
	Ignorado	1 (1)				
<i>Histórico Familiar de câncer</i>	Não	13 (17)	155	180	285	0,2487
	Sim	36 (48)	130	170	236,3	
	Ignorado	28 (35)				
<i>Outra Neoplasia</i>	Não	41 (53)	5	45	82,5	0,0981
	Sim	21 (27)	0	10	57,5	
	Ignorado	15 (20)				
<i>Presença de Necrose</i>	Não	32 (42)	137,5	175	247,5	0,4001
	Sim	38 (49)	127,5	165	213,8	
	Ignorado	7 (9)				
<i>Invasão Vascular Sanguínea</i>	Não	69 (90)	130	170	210	0,2622
	Sim	6 (8)	147,5	205	277,5	
	Ignorado	2 (1)				
<i>Invasão Vascular Linfática</i>	Não	72 (93)	130	170	210	0,4944
	Sim	3 (4)	122,5	200	285	
	Ignorado	2 (3)				
	Total	77 (100)				

Q1: Quartil 1; Q2: Quartil 2.

Fonte: própria autoria.

Na **Tabela 22** realizamos análises com sobrevida global e livre de progressão. Na sobrevida global, utilizando um ponto de corte de *HScore* de 45, podemos perceber que existe diferença significativa entre o grupo de baixa expressão (*low*) e alta expressão (*high*). O teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon demonstrou diferença estatisticamente significativa nas curvas de sobrevida entre os grupos *low* e *high* (p-valor = 0,0174). No entanto, o teste Log-rank não forneceu um *razard ratio* interpretável, apresentando um intervalo de confiança de 95% (-

1.000 a -1.000). A ausência de um *hazard ratio* interpretável no Log-rank pode ser atribuída a diversos fatores, mas nesse caso se deve pelo número reduzido de eventos (óbitos). Embora o *hazard ratio* do Log-rank não tenha sido interpretável, a significância do teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon indica que as curvas de sobrevivência entre os grupos de baixa e alta expressão provavelmente são diferentes.

Tabela 22: Análise de sobrevida global e sobrevida livre de progressão de PKMYT1 citoplasmático em Carcinoma Renal de Células Claras. Teste Log-rank (Mantel-Cox).

PKMYT1 - Invitrogen (citoplasma)					
	Variável	Categoria	N (%)	Hazard Ratio (Low/High)	p valor
	Hscore	45			
	Sobrevida Global	Low	41	0	0,0174
		High	29		
	Sobrevida Livre de Progressão	Low	41	0,403	0,674
		High	29		
			Total		

Fonte: própria autoria.

Continuamos para as nossas análises em Carcinoma Renal de Células Claras, mas nesse caso somente as marcações nucleares (**Tabela 23**). Não observamos associação significativa entre a expressão de PKMYT1 nuclear e as variáveis clínicas e patológicas estadiamento clínico, histórico familiar de câncer, presença de outra neoplasia, presença de necrose, invasão vascular sanguínea ou linfática. Todavia, assim como ocorreu na marcação citoplasmática, percebemos alta associação entre a marcação nuclear de PKMYT1 e a variável “Normal vs Tumoral vs Metástase”. Percebemos que a marcação nuclear de tecidos metastáticos é mais evidente que nos demais tecidos, apresentando 50% mais expressão que nos tecidos não neoplásicos e aproximadamente 41% mais expressão que em tumores primários.

Tabela 23: Associação da expressão de PKMYT1 com as variáveis clínicas e patológicas em Carcinoma de Células Claras Renais. Teste de Mann-Whitney não-paramétrico para duas variáveis e teste de Kruskal-Wallis para três ou mais variáveis.

PKMYT1 - Invitrogen (núcleo)						
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>N (%)</i>	<i>Q1</i>	<i>Mediana (Hscore)</i>	<i>Q3</i>	<i>p valor</i>
<i>Normal vs Tumor vs Metástase</i>	Normal	35 (24)	120	150	180	>0,0001
	Tumor	77 (53)	130	160	205	
	Metástase	33 (33)	165	225	300	
	Ignorado	0 (0)				
	Total	145 (100)				
<i>Estadiamento clínico</i>	I-II	56 (73)	130	160	187,5	0,4022
	III-IV	20 (26)	115	180	236,3	
	Ignorado	1 (1)				
<i>Histórico Familiar de câncer</i>	Não	13 (17)	130	170	180	0,698
	Sim	36 (48)	122,5	160	187,5	
	Ignorado	28 (35)				
<i>Outra Neoplasia</i>	Não	41 (53)	130	170	200	0,4976
	Sim	21 (27)	95	160	185	
	Ignorado	15 (20)				
<i>Presença de Necrose</i>	Não	32 (42)	132,5	170	207,5	0,6573
	Sim	38 (49)	127,5	165	213,8	
	Ignorado	7 (9)				
<i>Invasão Vascular Sanguínea</i>	Não	69 (90)	130	160	195	0,2103
	Sim	6 (8)	147,5	205	277,5	
	Ignorado	2 (1)				
<i>Invasão Vascular Linfática</i>	Não	72 (93)	130	170	207,5	0,9427
	Sim	3 (4)	110	160	240	
	Ignorado	2 (3)				
	Total	77 (100)				

Q1: Quartil 1; Q2: Quartil 2.

Fonte: própria autoria.

Analisando as sobrevidas, mais especificamente a global, o *hazard ratio* foi de 3,91 ($p = 0,1786$). Apesar do *hazard ratio* indicar um risco 3,91 vezes maior no grupo exposto, este resultado não apresentou significância estatística ($p > 0,05$), quando considerado o nível de significância pré-definido de 0,05.

Tabela 24: Análise de sobrevida global e sobrevida livre de progressão de PKMYT1 nuclear em Carcinoma Renal de Células Claras. Teste Log-rank (Mantel-Cox).

PKMYT1 - Invitrogen (núcleo)				
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>N (%)</i>	<i>Hazard Ratio (Low/High)</i>	<i>p valor</i>
<i>Hscore</i>	140			
	Low	30	3,91	0,1786
	High	40		
<i>Sobrevida Global</i>	Low	30	1,326	0,5798
	High	40		
	Ignorado	7 (10)		
	Total	70 (100)		

Fonte: própria autoria.

Embora o *hazard ratio* sugira um risco aumentado de 3,91 vezes para o grupo de baixa expressão de PKMYT1 (*low*), a ausência de significância estatística impede a conclusão definitiva de que este risco seja realmente maior. Fatores como tamanho da amostra e poder do estudo podem ter influenciado o resultado. Isso indica que, diferente da marcação citoplasmática, a nuclear não deve estar relacionada com a sobrevida de pacientes com Carcinoma Renal de Células claras.

4.7 CARCINOMA DE MAMA

A expressão proteica de LMTK3 foi avaliada em tecidos de Carcinoma de Mama, realizadas reações de imunohistoquímica em 288 amostras reunidas em dois TMAs. Na **Figura 23**, podemos encontrar as diferentes marcações encontradas ao quantificar, em carcinoma, o anticorpo LMTK3 (cat.: sc-100418). Podemos observar marcação do anticorpo tanto no citoplasma quanto no núcleo, desde modo optamos por quantificar a marcação em ambos os compartimentos celulares.

4.7.1 LMTK3

Nossas análises da expressão citoplasmática da proteína LMTK3 em Carcinoma de Mama (**Tabelas 29 e 30**), revelaram *insights* significativos, especialmente em relação a associações com mutações genéticas e resultados de sobrevida. Conseguimos observar as diferentes variações nas intensidades em nossas quantificações, observado na **Figura 22**.

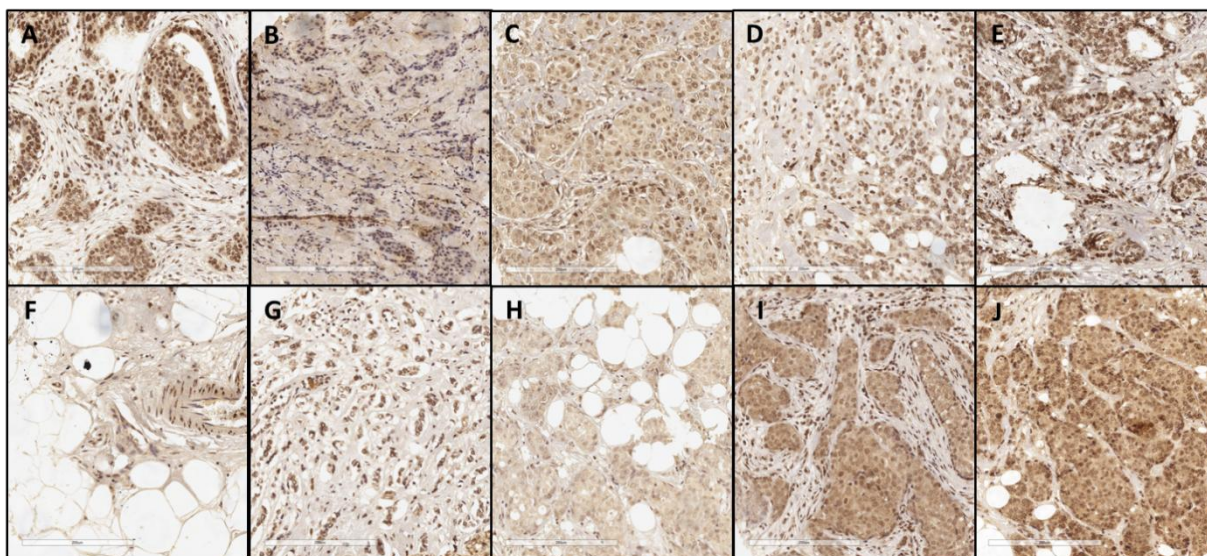


Figura 23: Variações das intensidades das marcações nucleares e citoplasmáticas de LMTK3 (cat.: sc-100418) em Carcinoma de Mama. Variações nucleares: (A) tecido não neoplásico, (B) ausência de marcação, (C) marcação fraca, (D) marcação moderada e (E) marcação forte. Variações citoplasmáticas: (F) tecido não neoplásico, (G) ausência de marcação, (H) marcação fraca, (I) marcação moderada e (J) marcação forte.

Fonte: própria autoria.

A quantificação foi realizada pela médica patologista Dra. Cynthia Bueno de Toledo Osorio. Através de nossas quantificações, notamos a presença heterogênea de LMTK3 citoplasmático e nuclear. Dos 288 casos disponíveis inicialmente, somente 77 casos foram incluídos nas análises, os demais foram excluídos por não apresentarem ao menos 25% de representatividade tumoral na amostra.

A análise de expressão citoplasmática de LMTK3 considerou a intensidade de marcação e a porcentagem de células marcadas, em uma medida de *HScore*. As medidas de *HScore* foram comparadas a dados clínicos e histopatológicos obtidos através dos prontuários dos pacientes (**Tabelas 25 e 26**).

Não observamos associação entre a expressão de LMTK3 no citoplasma e as variáveis clínicas histórico familiar de câncer, status menopausal, presença de outra neoplasia, estadiamento clínico, progressão da doença ou subtipo molecular.

Tabela 25: Associação da expressão de LMTK3 citoplasmático do anticorpo Santa Cruz (cat: sc-100418) com as variáveis clínicas relacionadas a Carcinoma de Mama. Teste de Mann-Whitney não-paramétrico para duas variáveis e teste de Kruskal-Wallis para três ou mais variáveis.

<i>LTMK3 - HScore - Santa Cruz - Citoplasma</i>						
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>N (%)</i>	<i>Q1</i>	<i>HScore (Mediana)</i>	<i>Q3</i>	<i>p valor</i>
<i>Histórico familiar de câncer</i>	Não	33 (39)	68	100	100	0,6973
	Sim	41 (48)	57	98	100	
	Ignorado	11 (13)				
<i>Status Menopausa</i>	Pré	23 (22)	50	98	100	0,7851
	Pós	50 (59)	69	99	100	
	Ignorado	12 (19)				
<i>Outra Neoplasia</i>	Não	53 (62)	59,5	95	100	0,2613
	Sim	5 (6)	30	70	95	
	Ignorado	27 (32)				
<i>Estadiamento clínico</i>	Normal	5 (13)	0	2	90	0,1502
	I	24 (24)	68,25	90	100	
	II	40 (47)	50,75	98	100	
	III/IV	16 (19)	74	100	115	
	Ignorado	0 (0)				
<i>Houve Progressão</i>	Não	62 (73)	53,75	99	100	0,8414
	Sim	19 (22)	80	90	100	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Classificação</i>	Luminal A	42 (52)	52,25	90	100	0,1757
	Luminal B	23 (28)	70	95	100	
	Triplo Negativo	9 (11)	12,5	100	100	
	HER2+	7 (9)	100	100	200	
	Ignorado	4 (5)				
	Total	85 (100)				

Q1: Quartil 1; Q2: Quartil 2.

Fonte: própria autoria.

Não observamos associação entre a expressão de LMTK3 no citoplasma e as variáveis histopatológicas como grau histológico, grau nuclear, necrose, invasão vascular sanguínea e linfática, invasão peritoneal, infiltrado inflamatório, presença de receptor de estrógeno ou progesterona. Entretanto, ao analisar a expressão de TP53, observamos que o grupo com expressão positiva de P53 apresentou os maiores valores de expressão de LMTK3. Especificamente, os valores médios de expressão de LMTK3 foram mais altos no grupo TP53 positivo em comparação com o grupo TP53 negativo. A diferença observada é estatisticamente significativa, com um valor p de 0,0154, indicando que a expressão de TP53 pode estar associada a níveis mais elevados de LMTK3.

Tabela 26: Associação da expressão de LMTK3 citoplasmático do anticorpo Santa Cruz (cat: sc-100418) com as variáveis patológicas relacionadas a Carcinoma de Mama.

<i>LTMK3 - HScore - Santa Cruz - Citoplasma</i>						
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>N (%)</i>	<i>Q1</i>	<i>HScore (Mediana)</i>	<i>Q3</i>	<i>p valor</i>
<i>Grau Histológico</i>	I	14 (16)	4	65	180	0,324
	II	37 (44)	65	90	100	
	III	30 (35)	87,5	100	100	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Grau Nuclear</i>	I	3 (3)	1	30	90	0,1461
	II	21 (25)	47,5	86	140	
	III	57 (67)	73,5	100	100	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Presença de Necrose</i>	Não	63 (74)	55	100	10	0,6355
	Sim	18 (21)	71,5	94	100	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Invasão Vascular Sanguínea</i>	Não	77 (80)	68	98	100	0,5781
	Sim	4 (5)	17	71,5	172,5	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Invasão Vascular Linfática</i>	Não	65 (80)	58,5	90	100	0,1556
	Sim	16 (20)	88,25	100	172	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Invasão Peritoneal</i>	Não	70 (82)	62,75	100	100	0,6747
	Sim	11 (13)	64	86	100	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Infiltrado Inflamatório</i>	Ausente/Discreto	51 (60)	70	98	100	0,9427
	Moderado/Presente	30 (35)	52,25	100	100	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Expressão Receptor de Estrógeno</i>	Negativo	17 (15)	92,5	100	100	0,1115
	Positivo	65 (80)	59,5	90	100	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Expressão Receptor de Progesterona</i>	Negativo	24 (26)	75	100	100	0,2299
	Positivo	57 (67)	54	90	100	
	Ignorado	6 (7)				
<i>Expressão HER2</i>	Negativo	12 (14)	51,5	95	100	0,0978
	Positivo	69 (81)	92	100	100	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Expressão TP53</i>	Negativo	24 (28)	53	95	100	0,0154
	Positivo	27 (32)	92	100	115	
	Ignorado	56 (40)				
	Total	85 (100)				

Q1: Quartil 1; Q2: Quartil 2.

Fonte: própria autoria.

Tabela 27: Análises de sobrevida global de LMTK3 citoplasmático utilizando o anticorpo Santa Cruz (cat: sc-100418) em Carcinoma de Mama pelo teste *Log-rank* (Mantel-Cox).

LMTK3 - Citoplasma (Santa Cruz) - HScore				
Sobrevida Global				
Variável	HScore 50	N (%)	Hazard Ratio (Low/High)	p valor
Todos os casos	Low	17 (20)	0,4524	0,2766
	High	62 (73)		
	Ignorados	6 (7)		
Grupos Moleculares				
Luminal A	Low	10 (11)	0,5328	0,5534
	High	32 (38)		
	Ignorados	43 (51)		
Luminal B	Low	4 (5)	0,2884	0,1933
	High	19 (22)		
	Ignorados	62 (73)		
I/II	Low	15 (18)	0,5421	0,4153
	High	49 (58)		
	Ignorados	21 (24)		
III/IV	Low	7 (8)	2,135	0,3851
	High	8 (9)		
	Ignorados	70 (81)		
	Total	85 (100)		

Fonte: própria autoria.

Tabela 28: Análises de sobrevida livre de progressão de LMTK3 citoplasmático utilizando o anticorpo Santa Cruz (cat: sc-100418) em Carcinoma de Mama. Teste *Log-rank* (Mantel-Cox).

LMTK3 - Citoplasma (Santa Cruz) - HScore				
Sobrevida Livre de Progressão				
Variável	HScore 95	N (%)	Hazard Ratio (Low/High)	p valor
Todos os casos	Low	17 (20)	1,235	0,4732
	High	62 (73)		
	Ignorados	6 (7)		
Grupos Moleculares				
Luminal A	Low	10 (11)	1,58	0,2273
	High	32 (38)		
	Ignorados	43 (51)		
Luminal B	Low	4 (5)	0,5692	0,3613
	High	19 (22)		
	Ignorados	62 (73)		
I/II	Low	15	1,16	0,6441
	High	49		
	Ignorados	21		
III/IV	Low	7 (8)	1,338	0,6024
	High	8 (9)		
	Ignorados	70 (81)		
	Total	85 (100)		

Fonte: própria autoria.

Em nossas análises de sobrevida global e sobrevida livre de progressão (**Tabela 25 e 2**), utilizando um ponto de corte de ≤ 50 para baixa expressão de LMTK3 e > 50 para alta expressão, não foi observada associação entre a expressão de LMTK3 e a sobrevida global, tanto para a coorte completa, quanto para a coorte estratificada por subtipo molecular ou estadiamento.

Para a análise da expressão de LMTK3 no núcleo, também foram consideradas as características de intensidade e porcentagem de células marcadas, compondo o *HScore*. As medidas de *HScore* foram comparadas a dados clínicos e histopatológicos obtidos através dos prontuários dos pacientes (**Tabelas 27 e 28**). Não observamos associação entre a expressão de LMTK3 no núcleo e as variáveis clínicas histórico familiar de câncer, status menopausal, presença de outra neoplasia, estadiamento clínico, progressão da doença ou subtipomolecular. Foi observada a associação entre a expressão de LMTK3 e a presença de outra neoplasia, sendo um aumento de expressão de LMTK3 de 50% observado nas pacientes que apresentaram outra neoplasia.

Tabela 29: Associação da expressão de LMTK3 nuclear do anticorpo Santa Cruz (cat: sc-100418) com as variáveis clínicas relacionadas a Carcinoma de Mama. Teste de Mann-Whitney não-paramétrico para duas variáveis e teste de Kruskal-Wallis para três ou mais variáveis.

LMTK3 - HScore - Santa Cruz - Núcleo						
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>N (%)</i>	<i>Q1</i>	<i>HScore (Mediana)</i>	<i>Q3</i>	<i>p valor</i>
<i>Histórico familiar de câncer</i>	Não	33 (39)	99	196	262,5	0,092
	Sim	41 (48)	108	200	298	
	Ignorado	11 (13)				
<i>Status Menopausa</i>	Pré	23 (22)	98	200	294	0,5164
	Pós	50 (59)	100	190	285	
	Ignorado	12 (19)				
<i>Outra Neoplasia</i>	Não	53 (62)	108	200	289,5	0,0041
	Sim	5 (6)	290,5	300	300	
	Ignorado	27 (32)				
<i>Estadiamento clínico</i>	Normal	5 (13)	0	200	297	0,612
	I	24 (24)	100	193	288	
	II	40 (47)	140	200	294	
	III/IV	16 (19)	95,5	110	300	
	Ignorado	0 (0)				
<i>Houve Progressão</i>	Não	62 (73)	100	285	273,8	0,1425
	Sim	19 (22)	116	196	300	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Classificação</i>	Luminal A	42 (52)	100	198	294,5	0,7649
	Luminal B	23 (28)	120	200	294	
	Triplo Negativo	9 (11)	52,5	270	289,5	
	HER2+	7 (9)	45	100	300	
	Ignorado	4 (5)				
	Total	85 (100)				

Q1: Quartil 1; Q2: Quartil 2.

Fonte: própria autoria.

Analizamos a expressão de LMTK3 no núcleo e as variáveis histopatológicas, entretanto não observamos associação entre as variáveis histopatológicas grau histológico, grau nuclear, necrose, invasão vascular linfática, invasão peritoneal, infiltrado inflamatório, presença de receptor de estrogênio ou progesterona, e expressão proteica de P53. Entretanto, observamos uma associação significativa com a invasão vascular linfática, com uma diminuição de 62,5% na expressão de LMTK3 em casos negativos para invasão vascular linfática.

Tabela 30: Associação da expressão de LMTK3 nuclear do anticorpo Santa Cruz (cat: sc-100418) com as variáveis patológicas relacionadas a Carcinoma de Mama. Teste de Mann-Whitney não-paramétrico para duas variáveis e teste de Kruskal-Wallis para três ou mais variáveis.

LTMK3 - HScore - Santa Cruz - Núcleo						
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>N (%)</i>	<i>Q1</i>	<i>HScore (Mediana)</i>	<i>Q3</i>	<i>p valor</i>
<i>Grau Histológico</i>	I	14 (16)	115	193	297	0,8342
	II	37 (44)	99	200	295	
	III	30 (35)	100	195	294	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Grau Nuclear</i>	I	3 (3)	180	270	270	0,9142
	II	21 (25)	96	200	298	
	III	57 (67)	100	196	294	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Presença de Necrose</i>	Não	63 (74)	100	200	294	0,0853
	Sim	18 (21)	86,25	160	220,5	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Invasão Vascular Sanguínea</i>	Não	77 (80)	100	200	294	0,0501
	Sim	4 (5)	6,25	75	182	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Invasão Vascular Linfática</i>	Não	65 (80)	100	200	295	0,2322
	Sim	16 (20)	98,5	198	230	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Invasão Peritoneal</i>	Não	70 (82)	100	200	294	0,292
	Sim	11 (13)	94	180	200	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Infiltrado Inflamatório</i>	Ausente/Discreto	51 (60)	100	200	294	0,7638
	Moderado/Presente	30 (35)	99,5	198	294	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Expressão Receptor de Estrógeno</i>	Negativo	17 (15)	58,25	200	291,8	0,4368
	Positivo	65 (80)	100	155	294	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Expressão Receptor de Progesterona</i>	Negativo	24 (26)	100	198	294	0,9239
	Positivo	57 (67)	100	200	294	
	Ignorado	6 (7)				
<i>Expressão HER2</i>	Negativo	12 (14)	100	200	294	0,3062
	Positivo	69 (81)	98,5	190	206,5	
	Ignorado	4 (5)				
<i>Expressão TP53</i>	Negativo	24 (28)	100	200	294	0,8251
	Positivo	27 (32)	98,5	193	294	
	Ignorado	56 (40)				
	Total	85 (100)				

Q1: Quartil 1; Q2: Quartil 2.

Fonte: própria autoria.

A seguir, a expressão nuclear de LMTK3 foi correlacionada com a sobrevida global e a sobrevida livre de progressão da doença (**Tabelas 31 e 32**). Não foi observada correlação da expressão de LMTK3 com a sobrevida global ou livre de progressão considerando todos os casos. Estratificando os pacientes de acordo com o subgrupo molecular. Destacamos o grupo Luminal B, apresentando 3,64 vezes menos chance de sofrer óbito quando LMTK3 é pouco expresso no núcleo (≤ 210).

Tabela 31: Análises de sobrevida global de LMTK3 nuclear utilizando o anticorpo Santa Cruz (cat: sc-100418) em Carcinoma de Mama. Teste de *Log-rank* (Mantel-Cox).

LMTK3 - Núcleo (Santa Cruz) - HScore				
Sobrevida Global				
Variável	HScore 210	N (%)	Hazard Ratio (Low/High)	p valor
Todos os casos	Low	51 (59)	0,5942	0,2512
	High	29 (34)		
	Ignorados	5 (7)		
Grupos Moleculares				
Luminal A	Low	27 (32)	1,377	0,731
	High	15 (17)		
	Ignorados	43 (51)		
Luminal B	Low	15 (18)	0,2745	0,065
	High	8 (9)		
	Ignorados	62 (73)		
I/II	Low	40 (47)	0,7171	0,5355
	High	24 (28)		
	Ignorados	21 (25)		
III/IV	Low	10 (12)	0,3846	0,2765
	High	6 (7)		
	Ignorados	69 (81)		
	Total	85 (100)		

Fonte: própria autoria.

Tabela 32: Análises de sobrevida livre de progressão de LMTK3 nuclear utilizando o anticorpo Santa Cruz (cat: sc-100418) em Carcinoma de Mama. Teste de *Log-rank* (Mantel-Cox).

LMTK3 - Núcleo (Santa Cruz) - HScore				
Sobrevida Livre de Progressão				
Variável	HScore 210	N (%)	Hazard Ratio (Low/High)	p valor
Todos os casos	Low	51 (59)	0,8558	0,5527
	High	29 (34)		
	Ignorados	5 (7)		
Grupos Moleculares				
Luminal A	Low	27 (32)	1,339	0,4236
	High	15 (17)		
	Ignorados	43 (51)		
Luminal B	Low	15 (18)	0,2863	0,0049
	High	8 (9)		
	Ignorados	62 (73)		
I/II	Low	40 (47)	0,8223	0,5108
	High	24 (28)		
	Ignorados	21 (25)		
III/IV	Low	10 (12)	0,9946	0,9923
	High	6 (7)		
	Ignorados	69 (81)		
	Total	85 (100)		

Fonte: própria autoria.

O mesmo grupo molecular se destaca novamente, aqui indicando uma redução de 3,49 vezes a chance de progressão da doença ($p=0049$).

4.7.2 ADENOCARCINOMA COLORRETAL

Em adenocarcinoma colorretal, foram realizadas reações de imuno-histoquímicas em 376 amostras reunidas em dois TMAs. Na **Figura 24**, podemos observar marcação homogênea, em praticamente todas as células do tumor, variando somente em intensidade.

A quantificação foi realizada pelo medico patologista Dr. Gabriel Oliveira Dos Santos, que classificou a intensidade da reação em fraco, moderado e forte. Dos 376 casos disponíveis inicialmente, somente 153 casos foram incluídos nas análises, os demais foram excluídos por não apresentarem ao menos 25% de representatividade tumoral na amostra.

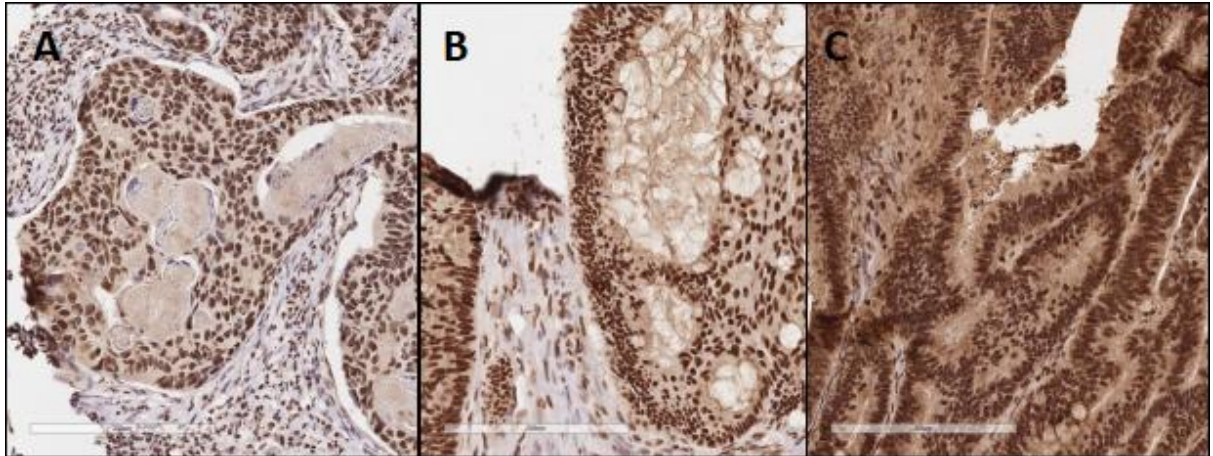


Figura 24: Variações das intensidades das marcações de LMTK3 (cat.: sc-100418) em adenocarcinoma colorretal. (A) marcação fraca, (B) marcação moderada e (C) marcação forte.

Fonte: própria autoria.

É possível perceber a baixa quantidade de casos com marcação fraca, encontrando-se na maior parte dos casos marcação moderadas ou fortes (**Tabela 41**). Não observamos associação da expressão de LMTK3 com as variáveis clínicas e patológicas histórico familiar de câncer, presença de outra neoplasia, estadiamento clínico, tabagismo, idade superior a 50 anos, progressão da doença, genes frequentemente associados a adenocarcinoma colorretal e presença de necrose.

Tabela 33: Associação da expressão de LMTK3 do anticorpo Santa Cruz (cat: sc-100418) com as variáveis clínicas e patológicas relacionadas a adenocarcinoma colorretal. Analisado pelo teste exato de Fisher.

LMTK3 - Adenocarcinoma Colorretal					
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>Fraca (%)</i>	<i>Moderada (%)</i>	<i>Forte (%)</i>	<i>p valor</i>
<i>Histórico familiar de câncer</i>	Não	2 (1)	19 (6)	56 (25)	0,82
	Sim	2 (1)	36 (16)	98 (44)	
	Ignorado		10 (7)		
<i>Outra Neoplasia</i>	Não	4 (2)	50 (22)	137 (61)	0,8158
	Sim	0 (0)	5 (3)	14 (6)	
	Ignorado		13 (6)		
<i>Estadiamento clínico</i>	I	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0,1465
	II	1 (1)	2 (1)	6 (3)	
	III	0 (0)	30 (13)	87 (39)	
	IV	2 (1)	21 (9)	44 (20)	
	Ignorado		29 (13)		
<i>Tabagismo</i>	Não	3 (2)	36 (16)	111 (50)	0,4444
	Sim	1 (1)	21 (9)	43 (18)	
	Ignorado		8 (4)		
<i>Idade superior a 50 anos</i>	Não	1 (1)	19 (9)	31 (12)	0,1673
	Sim	3 (2)	41 (18)	127 (57)	
	Ignorado		1 (1)		
<i>Progressão</i>	Não	0 (0)	0 (0)	2 (1)	0,9049
	Sim	3 (2)	38 (17)	108 (47)	
	Não se aplica	1 (1)	18 (8)	44 (20)	
	Ignorado		9 (4)		
<i>Genes positivos</i>	KRAS	1 (1)	9 (4)	11 (5)	0,1928
	GSL	1 (1)	23 (10)	71 (31)	
	KRAS + GSL	1 (1)	16 (7)	58 (26)	
	Ignorado		32 (14)		
<i>Presença de necrose</i>	Não	2 (1)	40 (18)	116 (52)	0,3053
	Sim	2 (1)	12 (6)	28 (12)	
	Ignorado		23 (10)		
	Total		223 (100)		

GSL: Genes da Síndrome de Lynch

Fonte: própria autoria.

Em seguida, partimos para as análises de sobrevida, detalhadas na Tabela 42. Como podemos observar, não foi possível encontrar nenhuma relação significativa entre as diferentes intensidades de LMTK3 e a sobrevida dos pacientes com Adenocarcinoma Colorretal.

Tabela 34: Análises de sobrevida global e livre de progressão de LMTK3 utilizando o anticorpo Santa Cruz (cat: sc-100418) em adenocarcinoma colorretal. Teste de Log-rank (Mantel-Cox).

LMTK3 - Adenocarcinoma Colorretal				
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>N (%)</i>	<i>Hazard Ratio (Low/High)</i>	<i>p valor</i>
<i>Sobrevida Global</i>	Fraco	4 (20)	-	0,1975
	Moderado	60 (27)		
	Forte	158 (71)		
<i>Sobrevida Livre de Progressão</i>	Fraco	4 (20)	-	0,301
	Moderado	60 (27)		
	Forte	158 (71)		
	Ignorado	1 (1)		
	Total	223 (100)		

Fonte: própria autoria.

Isso demonstra que, assim como encontrado na análise anterior, a expressão de LMTK3 provavelmente não possui uma relação direta com as taxas de sobrevida em pacientes com Adenocarcinoma Colorretal.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos as proteínas quinases VRK1, VRK2, PKMYT1 e LMTK3, que desempenham papéis críticos na regulação do ciclo celular, sinalização celular e progressão tumoral. Nossos resultados demonstram que essas proteínas estão associadas a diferentes aspectos clínicos e patológicos do câncer, com implicações importantes para o prognóstico e tratamento dos pacientes.

Membros da família de quinases, VRK1 e VRK2, pertencentes ao grupo CK1, desempenham funções críticas em processos celulares e apresentam implicações significativas em diversas manifestações neoplásicas (Ben; Gong; Qiu, 2018; Huang et al., 2016; Mon et al., 2018; So et al., 2022). VRK1, ubíqua nos tecidos humanos, assume papel preponderante na regulação dos checkpoints celulares, influenciando a resistência a terapias em glioblastomas e câncer de mama, conforme destacado por Navarro-Carrasco e Lazo (2021) e Mon et al. (2018), em estudos realizados em glioblastomas e câncer de mama, respectivamente. Simultaneamente, VRK2, compartilhando homologia com VRK1, surge como potencial alvo terapêutico em carcinoma hepatocelular, enquanto elevados níveis associam-se a prognóstico mais auspicioso em glioblastomas, segundo Chen et al. (2021) e Rodríguez-Hernández et al. (2013), em estudos realizados em carcinoma hepatocelular e glioblastomas, respectivamente.

Neste estudo, ao realizar nossas análises em gliomas, observamos uma grande diferença na expressão de VRK1 ao comparar tecidos não tumorais com tecidos neoplásicos. Isso indica que, embora VRK1 possua uma expressão homogênea em praticamente todas as células do corpo humano (Martín-Doncel et al., 2019), sua expressão é ainda mais acentuada em Astrocitomas Anaplásicos e Glioblastomas.

No artigo escrito por Ben Z; Gong, L e Qiu, Y (2022), é descrito que foram utilizados um total de 85 casos de pacientes com gliomas recém-diagnosticados para investigar a expressão da proteína VRK1 e sua relação com o prognóstico dos pacientes. Foram coletados tecidos de gliomas de pacientes entre 2007 e 2013. A partir das análises do estudo, os pesquisadores concluíram que a alta expressão de VRK1 está diretamente associada com pior prognóstico para o paciente. Entretanto, a mesma relação não foi observada aqui. Ao analisarmos todos os gliomas no estudo (Astrocitoma Difuso, II, Astrocitoma Anaplásico, III, e Glioblastoma, IV), encontramos pouca concordância na alta expressão de VRK1, com baixa diferença entre as expressões alta e baixa. No entanto, ao analisarmos separadamente o glioblastoma, essa diferença não se aplica. Esse resultado sugere que o estudo mencionado anteriormente pode não ter incluído um número de casos tão grande quanto o nosso (121

casos). Além disso, descartamos casos com menos de 30 dias de sobrevida para minimizar o possível ruído estatístico causado por casos atípicos e para eliminar casos de mortes próximas ao pós-diagnóstico e pós-cirurgia. O estudo anterior não descreveu com precisão os critérios de eliminação dos casos.

Encontramos uma relação similar ao realizar as mesmas análises em VRK2. Por possuir duas principais isoformas, VRK2A e VRK2B, que possuem localidades diferentes quanto as suas expressões — sendo VRK2A citoplasmática e VRK2B nuclear (Blanco, Santos, & Lazo, 2007; Blanco et al., 2006; Vázquez-Cedeira; Lazo, 2012) — observamos que VRK2A é mais expresso especialmente no Astrocitoma Anaplásico, sendo quase dez vezes mais expresso do que em tecidos não neoplásicos.

Ao analisar a sobrevida dos pacientes, encontramos uma relação contrária ao que esperávamos. Notamos que a alta expressão de VRK2 está associada a um melhor prognóstico em pacientes com gliomas. No entanto, ao analisarmos separadamente o grupo de Glioblastoma Multiforme, não observamos a mesma relação e não mais significante. Esse achado provavelmente se deve ao fato de que a expressão de VRK2 em gliomas de grau III é quase dez vezes superior à encontrada em tecidos não neoplásicos e três vezes mais expressa em comparação com os graus II e IV. A diferença nas expressões das isoformas pode contribuir para essa variação observada.

Analizamos conjuntamente VRK1 e VRK2 em gliomas, somando seus *HScores* devido ao possível efeito sinérgico e redundante entre ambas as proteínas (Blanco et al., 2006; Shields et al., 2022). Observamos que, ao somar as expressões, a diferença entre tecidos neoplásicos e não neoplásicos se tornou ainda mais evidente. VRK1 e VRK2 são mais expressos em Astrocitoma Difuso em 126%, em Astrocitoma Anaplásico em 273%, e em Glioblastoma Multiforme em 184%, quando comparados com tecidos não neoplásicos. Além disso, VRK1 e VRK2 são aproximadamente 31% mais expressos em Astrocitoma Anaplásico do que em Glioblastoma Multiforme.

A alta expressão de VRK1 e VRK2 em glioblastomas, ao fosforilar a proteína P53 e ativar vias de sobrevivência celular, cria um ambiente propício à resistência à quimioterapia. Essa redundância funcional confere às células tumorais uma maior capacidade de reparar danos ao DNA induzidos pelos agentes quimioterápicos e de evadir a apoptose. A inibição farmacológica de VRK1 e VRK2 emerge como uma estratégia promissora para sensibilizar os glioblastomas aos tratamentos convencionais e melhorar o prognóstico dos pacientes. A combinação de inibidores de VRK1 e VRK2 com agentes quimioterápicos e

radiossensibilizadores pode representar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento desse tumor altamente agressivo.

Em seu estudo, Huant et al. (2016) analisou a alta expressão de VRK1 nos casos de carcinoma hepatocelular. Todavia, não conseguimos replicar esse feito em nosso estudo, sendo necessário realizar adaptações para analisar as proteínas VRK1 e VRK2 nesse tipo tumoral. Consideramos os valores de positividade encontrados nas quantificações: VRK1 foi considerado positivo quando igual a 100% e negativo quando inferior a 100%, enquanto VRK2 foi considerado positivo quando superior a 0% e negativo quando igual a 0%. Ao analisar ambas as proteínas separadamente, não encontramos associação entre a expressão de cada uma das proteínas e a sobrevida. Entretanto, analisar em conjunto VRK1 e VRK2 observamos um potencial significativo como indicadores prognósticos, com uma redução de 85% para o risco de progressão da doença no grupo classificado como negativo tanto para VRK1 quanto VRK2. Além disso, a expressão de VRK1 e VRK2 está relacionada com agressividade tumoral em hepatocarcinoma celular, havendo mais casos em que a expressão de ambas as proteínas é positiva e também o mesmo grupo relacionado quando o paciente possui outra neoplasia, podendo apresentar interconexões com diferentes tipos de câncer.

No entanto, a análise sugere que a expressão combinada de VRK1 e VRK2 está associada à presença de outra neoplasia. Especificamente, a categoria “Sim” (presença de outra neoplasia) apresentou uma maior proporção de casos com VRK1+ | VRK2- (15%) em comparação com a categoria “Não” (2%). Isso pode indicar que a expressão de VRK1 e VRK2 está relacionada a mecanismos envolvidos na presença de múltiplas neoplasias.

VRK1 foi previamente associada a altos níveis de expressão em Carcinoma de Mama, o que pode indicar resistência a tratamentos quimioterápicos como a doxorubicina (Mon et al., 2018; Salzano et al., 2014). A doxorubicina é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama. Ela atua intercalando-se no DNA e inibindo a enzima topoisomerase II, o que impede a replicação do DNA e a síntese de RNA, levando à morte celular (Thorn et al., 2011).

No entanto, altos níveis de VRK1 podem contribuir para a resistência à doxorubicina por vários mecanismos. VRK1 pode promover a reparação do DNA danificado pela doxorubicina, permitindo que as células cancerígenas sobrevivam ao tratamento. Além disso, VRK1 pode influenciar a expressão de genes como MYC, FOS e CCND1, que são cruciais para a proliferação celular e a progressão do ciclo celular (Valbuena; López-sánchez; Lazo, 2008). Esses genes ajudam a regular a resposta ao estresse e a divisão celular, reduzindo a eficácia da doxorubicina em induzir a morte das células cancerígenas.

Nossos resultados demonstram que a alta expressão está associada ao histórico familiar de câncer do paciente, sugerindo uma possível influência genética ou hereditária. Identificamos que a baixa expressão de VRK1 está associada a um prognóstico mais favorável. Ao analisar separadamente os graus mais elevados (III e IV), observamos que a baixa expressão de VRK1 está significativamente ligada a uma redução de 70% na chance de o paciente vir a óbito. Essa diferença é ainda mais pronunciada ao avaliar o risco de progressão, com uma diminuição de mais de 60% na probabilidade de o evento ocorrer. Essas descobertas destacam a importância de VRK1 como um potencial biomarcador prognóstico, fornecendo *insights* valiosos sobre a evolução e resposta ao tratamento em pacientes com câncer.

PKMYT1, um componente da família WEE e do grupo CK1, atua como um regulador negativo crucial do ponto de checagem G2/M do ciclo celular. Sua função envolve a fosforilação das treoninas 14 e 15 da CDK1, inibindo o complexo CDK1-Ciclina B e impedindo sua entrada no núcleo (Asquith, Laitinen, & East, 2019; Long et al., 2020; Liu et al., 2017). Durante a fase M do ciclo celular, a PKMYT1 é regulada por fosforilação por PLK1 e CDC2 (Nakajima et al., 2003).

Em seu estudo, Sun et al. (2019) aborda a superexpressão da proteína PKMYT1 e sua relação com o câncer de pulmão de células não pequenas. Ele sugere que a superexpressão de PKMYT1 está associada a um prognóstico desfavorável e promove a proliferação e tumorigênese nesse tipo de câncer, através da ativação da via de sinalização Notch. Ao examinar adenocarcinoma pulmonar, confirmamos a mesma correlação indicando que a baixa expressão de PKMYT1 permite uma melhor sobrevida e está associada a uma maior probabilidade de sobrevida dos pacientes, mas além do que foi dito pelo estudo, também concluímos que a alta expressão PKMYT1 pode indicar uma possível progressão da doença. Esta descoberta ressalta a importância de considerar não apenas a sobrevida global, mas também a progressão da doença ao avaliar o impacto das proteínas estudadas neste contexto. Adicionalmente, o presente estudo mostrou que, casos sem o acometimento de outra neoplasia expressam duas vezes mais PKMYT1 do que casos com outro tumor, sugerindo uma possível relação com componentes hereditários.

Diversos estudos associaram a alta expressão de PKMYT1 a um prognóstico desfavorável para a sobrevida (Chen et al., 2021; Chen, Zhang, & Chen, 2020) em carcinoma de células claras renais, entretanto não foi possível identificar a mesma relação em nosso estudo. Por outro lado, assim como descrito em estudos anteriores (Chen et al. 2020), identificamos duas vezes mais expressão citoplasmática dessa quinases em estadiamentos de alto grau (III e IV) quando comparado a XXXXX. Adicionalmente, encontramos alta

expressão de PKMYT1 tanto citoplasmático quanto nuclear em tecidos metastáticos, indicando forte associação dessa proteína com o avanço de ccRCC e assim concluindo ser um marcador molecular consideravelmente importante a ser estudado mais profundamente.

Em nossos estudos, a imuno-histoquímica revelou uma intensa marcação nuclear, com acúmulo proeminente na região nucleolar, para PKMYT1 em células neoplásicas de adenocarcinoma pulmonar e carcinoma renal de células claras. Essa localização nucleolar, embora não seja universalmente descrita para PKMYT1, é consistente com observações prévias em outras linhagens celulares.

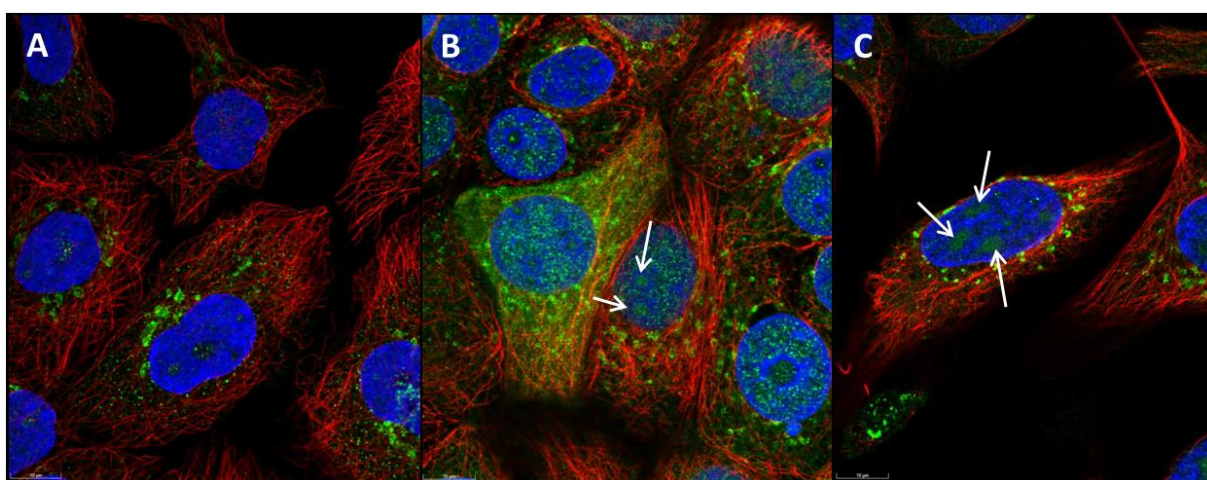


Figura 25: Imunofluorescência utilizando PKMYT1 como alvo (em verde) em três linhagens celulares. (A) Célula HaCaT, célula epitelial queratinócita, (B) MCF-7, adenocarcinoma mamário e (C) U2OS, osteossarcoma. Destaca-se (setas em branco) nas figuras B e C a presença evidente de PKMYT1 localizada nos nucléolos.

Fonte: *The Human Protein Atlas*.

LMTK3, uma quinase multifuncional, exibe expressão heterogênea em diferentes localidades celulares, desempenhando papéis na regulação do regulador de estrógeno alpha no citoplasma e no remodelamento da cromatina no núcleo, desempenhando assim funções distintas em câncer colorretal e de mama (Giamas et al., 2011; Xu et al., 2014). Em nosso estudo, utilizamos inicialmente dois anticorpos específicos para essa proteína: LMTK3 ABCAM (cat.: ab110516) e LMTK3 (I-17) Santa Cruz (cat.: SC-100418).

O anticorpo LMTK3 da Santa Cruz apresentou resultados variados. Na expressão citoplasmática, o grupo positivo para a expressão de TP53 apresentou níveis elevados de LMTK3 em comparação ao grupo negativo. Já na expressão nuclear, houve um aumento de 50% na expressão de LMTK3 no grupo com presença de outra neoplasia. Além disso, na

expressão nuclear de LMTK3, encontramos uma associação positiva com a invasão vascular linfática, mostrando uma diminuição de 62,5% na expressão de LMTK3 em casos negativos.

Na análise da expressão nuclear de LMTK3 em relação à sobrevida global, observamos que, ao estratificar os subgrupos moleculares, a baixa expressão de LMTK3 no grupo luminal B está associada a um aumento de 3,64 vezes na chance de óbito e 3,49 vezes na chance de progressão da doença.

Esses resultados indicam que a expressão de LMTK3, analisada por diferentes anticorpos, está associada a aspectos distintos da biologia tumoral. Considerar essas nuances pode ser fundamental para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes e personalizadas.

Embora os dados obtidos com o anticorpo ABCAM tenham sido considerados inicialmente, optamos por não serem incluídos na análise final devido à baixa confiabilidade dos mesmos. Assim, optamos por utilizar os dados do anticorpo LMTK3 da Santa Cruz como os resultados reais e conclusões apresentadas neste estudo. A escolha se justifica tanto pela especificidade quanto pela validação do anticorpo LMTK3 da ABCAM. O anticorpo da Santa Cruz (cat.: SC-100418) é monoclonal, enquanto o da ABCAM é policlonal (cat.:ab110516). Anticorpos monoclonais reconhecem um único epítipo específico de um antígeno, enquanto os policlonais podem se ligar a diversos epítopos do mesmo antígeno ou até mesmo de outras proteínas. Essa característica torna os anticorpos monoclonais mais específicos e confiáveis na detecção da proteína alvo, aumentando a confiabilidade dos dados e resultados finais. Na etapa de validação dos anticorpos, observamos que o anticorpo ABCAM (cat.: ab110516) apresentava baixa especificidade, exibindo diversas bandas adicionais no nosso resultado de *Western Blot*, não correspondendo ao peso molecular esperado da proteína LMTK3. Isso pode ter comprometido os nossos dados com esse anticorpo e, consequentemente, a confiabilidade dos nossos resultados. Assim, optamos por considerar unicamente os resultados obtidos a partir dos dados do anticorpo LMTK3 (cat.:SC-100418). Essa decisão visa garantir a robustez dos resultados e conclusões apresentadas neste estudo, priorizando a utilização de dados obtidos com métodos mais confiáveis e específicos.

Apesar das limitações reconhecidas, como o número limitado de casos em carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma pulmonar, este estudo representa um avanço significativo em nossa compreensão das proteínas quinases VRK1, VRK2, PKMYT1 e LMTK3 em diferentes tipos de câncer. Nossos resultados fornecem uma colaboração para pesquisas futuras, destacando a importância dessas proteínas como potenciais alvos terapêuticos e biomarcadores prognósticos.

Tabela 35: Resumo dos resultados encontrados nos diferentes tipos tumorais e suas respectivas proteínas quinases.

Tipo de Câncer	Proteína	Resultado	Tipo de Câncer	Proteína	Resultado	Tipo de Câncer	Proteína	Resultado
Gliomas	VRK1	Associação de estádios avançados (III e IV) com maior expressão citoplasmática (2x do grau II e de tecidos não neoplásicos).	Carcinoma Hepatocelular	VRK1	Não apresentam resultados significativos.	Adenocarcinoma de Mama	VRK1	Casos com histórico familiar de câncer possuem 25% maior expressão citoplasmática. Baixa expressão em alto estadiamento (III e IV) reduz o risco de óbito em 72%.
	VRK2	Associação do Grau III com maior expressão citoplasmática (3x dos demais graus e tecidos não neoplásicos). Baixa expressão de VRK2 associada com pior sobrevida.		VRK2				Alta expressão no subgrupo luminal A aumenta a chance de progressão em 137,2%. Baixa expressão em baixo estadiamento (I e II) aumenta a chance de progressão em 50,3%.
	Combinação VRK1 e VRK2	Alta expressão citoplasmática está associada a todos os estádios (vs. tecidos não neoplásicos), com maior expressão em graus III e IV (destaque para o grau III). Menor expressão combinada está associada a pior sobrevida (sem significância estatística).		Combinação VRK1 e VRK2	Associação do grupo VRK1 e VRK2 positivos a mais casos com histórico de outra neoplasia e graus mais agressivos (III e IV). 85% de chance de progressão quando VRK1 e VRK2 são negativos.		LMTK3	Casos positivos para TP53 possuem alta expressão citoplasmática. Marcação nuclear de LMTK3 é 50% maior em casos com histórico de outra neoplasia. Baixa expressão nuclear de LMTK3 no subgrupo luminal B aumenta a sobrevida em 72,55% e reduz a chance de progressão em 71%.
Tipo de Câncer	Proteína	Resultado	Tipo de Câncer	Proteína	Resultado	Tipo de Câncer	Proteína	Resultado
Adenocarcinoma Pulmonar	PKMYT1	Pacientes com outra neoplasia possuem metade da expressão em relação aos que não possuem. Baixa expressão confere melhor prognóstico para sobrevida global (redução de 72% no risco de óbito) e progressão da doença (redução de 62%).	Carcinoma Renal de Células Claras	PKMYT1	Marcação citoplasmática em metástases é 3,4x maior que em tumores primários e 2,4x maior que em tecidos não neoplásicos. Estádios II e IV possuem 2x a expressão dos estádios menos agressivos (I e III). Marcação nuclear metastática é 1,5x maior que em tecidos não neoplásicos e 1,4x maior que em tumores primários.	Adenocarcinoma Colorretal	LMTK3	Não apresenta resultados significativos.

: Resultados positivos. : Resultados negativos.

Fonte: própria autoria.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que a expressão de VRK1 e VRK2 está significativamente aumentada em glioblastomas quando comparados a tecidos não tumorais, sugerindo um potencial papel dessas quinases como biomarcadores para o diagnóstico desse tipo de tumor. Em particular, a alta expressão de VRK1 e VRK2 em glioblastomas pode estar associada à ativação de vias de sobrevivência celular, podendo conferir às células tumorais maior resistência a tratamentos convencionais. Esses achados, juntamente com a associação da expressão das quinases com o grau tumoral, subtipos moleculares e prognóstico em outros tipos de câncer, sugerem um papel crucial dessas proteínas na oncogênese e progressão tumoral. Esses achados abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias direcionadas, com potencial para melhorar o prognóstico de pacientes com glioblastoma e outros tipos de câncer. Em colaboração com a Aché Laboratórios Farmacêuticos, exploraremos o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas personalizadas.

Nossos achados abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias direcionadas às quinases, que podem representar uma nova abordagem para o tratamento do câncer. No entanto, é importante ressaltar que este estudo apresenta algumas limitações, como o número relativamente pequeno de casos, especialmente para carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma pulmonar. Estudos futuros com coortes maiores e a validação dos resultados em outras populações são necessários para confirmar nossos achados e elucidar o papel exato dessas quinases na tumorigênese.

7. REFERÊNCIAS

- AGNARELLI, A. et al. The Inhibitory Properties of a Novel, Selective LMTK3 Kinase Inhibitor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 865, 3 jan. 2023.
- ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 6. ed. New York, NY: Garland Science, 2015.
- ARTER, Chris; TRASK, Luke; WARD, Sarah; *et al.* Structural features of the protein kinase domain and targeted binding by small molecule inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, p. 102247, 2022.
- ASQUITH, Christopher R. M.; LAITINEN, Tuomo ; EAST, Michael P. PKMYT1: a Forgotten Member of the WEE1 Family. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 3, p. 157–157, 2019.
- BAIER, Andrea; SZYSZKA, Ryszard. Compounds from Natural Sources as Protein Kinase Inhibitors. **Biomolecules**, v. 10, n. 11, p. 1546, 2020.
- BAYER, K. U.; SCHULMAN, H. CaM Kinase: Still Inspiring at 40. **Neuron**, v. 103, n. 3, p. 380–394, ago. 2019.
- BEN, Z.; GONG, L.; QIU, Y. High expression of VRK1 is related to poor prognosis in glioma. **Pathology - Research and Practice**, v. 214, n. 1, p. 112–118, jan. 2018.
- BHULLAR, Khushwant S.; LAGARÓN, Naiara Orrego; MCGOWAN, Eileen M.; *et al.* Kinase-targeted Cancer therapies: progress, Challenges and Future Directions. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, 2018.
- BLANCO, Sandra; KLIMCAKOVA, Lucia; VEGA, Francisco M.; *et al.* The Subcellular Localization of vaccinia-related kinase-2 (VRK2) Isoforms Determines Their Different Effect on p53 Stability in Tumour Cell Lines. **FEBS Journal**, v. 273, n. 11, p. 2487–2504, 2006.
- BLANCO, Sandra; SANTOS, Claudio; LAZO, Pedro A. Vaccinia-Related Kinase 2 Modulates the Stress Response to Hypoxia Mediated by TAK1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 20, p. 7273–7283, 2007.
- BRZOZOWSKI, Joshua S; SKELDING, Kathryn A. The Multi-Functional Calcium/Calmodulin Stimulated Protein Kinase (CaMK) Family: Emerging Targets for Anti-Cancer Therapeutic Intervention. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 8, 2019.
- CAMPILLO-MARCOS, I.; LAZO, P. A. Implication of the VRK1 chromatin kinase in the signaling responses to DNA damage: a therapeutic target? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 13, p. 2375–2388, 20 abr. 2018.
- CASTELO-SOCCIO, Leslie; KIM, Hanna; MASSIMO GADINA; *et al.* Protein kinases: Drug Targets for Immunological Disorders. **Nat Rev Immunol**, 2023.
- CHEN, Peng; ZHANG, Ziyang; CHEN, Xiang. Overexpression of PKMYT1 Facilitates Tumor Development and Is Correlated with Poor Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **Medical Science Monitor**, v. 26, 2020.

- CHEN, Sisi; DU, Yunyan; XU, Bin; *et al.* Vaccinia-related Kinase 2 Blunts Sorafenib's Efficacy against Hepatocellular Carcinoma by Disturbing the apoptosis-autophagy Balance. **Oncogene**, v. 40, n. 19, p. 3378–3393, 2021.
- CHENG, H.-C. *et al.* Regulation and Function of Protein Kinases and Phosphatases. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011.
- CHO, N. *et al.* The brain specific kinase LMTK3 regulates neuronal excitability by decreasing KCC2-dependent neuronal Cl⁻ extrusion. **iScience**, v. 27, n. 4, p. 109512–109512, 1 abr. 2024.
- CHOWDHURY, I.; DASHI, G.; KESKITALO, S. CMGC Kinases in Health and Cancer. **Cancers (Basel)**, v. 15, n. 15, p. 3838–3838, 28 jul. 2023.
- CILIBRASI, Chiara; DITSIOU, Angeliki; PAPAKYRIAKOU, Athanasios; *et al.* LMTK3 Inhibition Affects Microtubule Stability. **Molecular Cancer**, v. 20, n. 1, 2021.
- DIRUSSO, C. J.; DASHTIAHANGAR, M.; GILMORE, T. D. Scaffold proteins as dynamic integrators of biological processes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 12, p. 102628, dez. 2022.
- DITSIOU, Angeliki; CILIBRASI, Chiara; SIMIGDALA, Nikiana; *et al.* The structure-function Relationship of Oncogenic LMTK3. **Science Advances**, v. 6, n. 46, p. eabc3099, 2020.
- DREWRY, D. H. *et al.* Progress towards a public chemogenomic set for protein kinases and a call for contributions. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0181585–e0181585, 2 ago. 2017.
- DUDA, Teresa; YADAV, Prem; SHARMA, Rameshwar K. Allosteric Modification, the Primary ATP Activation Mechanism of Atrial Natriuretic Factor Receptor Guanylate Cyclase. **Biochemistry**, v. 50, n. 7, p. 1213–1225, 2011.
- DUONG-LY, Krisna C.; PETERSON, Jeffrey R. The Human Kinome and Kinase Inhibition as a Therapeutic Strategy. **Current Protocols in Pharmacology / Editorial board, S.J. Enna (editor-in-chief) ... [et al.]**, v. 02, p. Unit2.9, 2013.
- ELKE P.F. KLERKX; LAZO, Pedro A; ASKJAER, Peter. Emerging Biological Functions of the vaccinia-related Kinase (VRK) family. **PubMed**, v. 24, n. 6, p. 749–59, 2009.
- ESSEGAN, Derek J; CHAVEZ, Valery; KHURSHID, Rabia; *et al.* AI-Assisted Chemical Probe Discovery for the Understudied Calcium-Calmodulin Dependent Kinase, PNCK. **PLOS Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. e1010263–e1010263, 2023.
- ESSEGAN, Derek; KHURANA, Rimpi; STATHIAS, Vasileios; *et al.* The Clinical Kinase Index: a Method to Prioritize Understudied Kinases as Drug Targets for the Treatment of Cancer. **Cell Reports Medicine**, v. 1, n. 7, p. 100128, 2020.
- ESTEBAN-VILLARRUBIA, Jorge; SOTO-CASTILLO, Juan José; POZAS, Javier; *et al.* Tyrosine Kinase Receptors in Oncology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8529, 2020.

- FABBRO, Dorian; COWAN-JACOB, Sandra W; MOEBITZ, Henrik. Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 11, p. 2675–2700, 2015.
- FLAX, R. G. et al. Illumination of understudied ciliary kinases. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 11, 8 mar. 2024.
- FULCHER, L. J.; SAPKOTA, G. P. Functions and regulation of the serine/threonine protein kinase CK1 family: moving beyond promiscuity. **Biochemical Journal**, v. 477, n. 23, p. 4603–4621, 11 dez. 2020.
- GAO, J. et al. Screening assays for tyrosine kinase inhibitors: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 223, p. 115166–115166, 1 jan. 2023.
- GARAI, Ágnes; ZEKE, András; GÓGL, Gergő; *et al.* Specificity of Linear Motifs That Bind to a Common Mitogen-Activated Protein Kinase Docking Groove. **Science Signaling**, v. 5, n. 245, 2012.
- GARCIA-CONCEJO, A.; LARHAMMAR, D. Protein kinase C family evolution in jawed vertebrates. **Developmental Biology**, v. 479, p. 77–90, nov. 2021.
- GHELLI LUSERNA DI RORÀ, A. et al. A WEE1 family business: regulation of mitosis, cancer progression, and therapeutic target. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 13, n. 1, 21 2020.
- GÓGL, G. et al. Disordered Protein Kinase Regions in Regulation of Kinase Domain Cores. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 300–311, 2019.
- GOMEZ, S. M. et al. Illuminating function of the understudied druggable kinome. **Drug Discovery Today**, v. 29, n. 3, p. 103881–103881, 1 mar. 2024.
- GULMANN, C; BUTLER, D; KAY, E; *et al.* Biopsy of a biopsy: Validation of Immunoprofiling in Gastric Cancer Biopsy Tissue Microarrays. **Histopathology**, v. 42, p. 70–76, 2003.
- GUNDRY, C. et al. Phosphorylation of Rab-coupling protein by LMTK3 controls Rab14-dependent EphA2 trafficking to promote cell:cell repulsion. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 15 mar. 2017.
- HARRIS, Paul A. *et al.* The REDCap consortium: Building an International Community of Software Platform Partners, **Journal of Biomedical Informatics**, v. 95, n. 1, p. 103208, 2019.
- HARRIS, Paul A.; TAYLOR, Robert; THIELKE, Robert; *et al.* Research Electronic Data Capture (REDCap)—A metadata-driven Methodology and Workflow Process for Providing Translational Research Informatics Support. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 42, n. 2, p. 377–381, 2009.
- HARTMANN, J. T. et al. Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 5, p. 470–481, 1 jun. 2009.
- HIRATA, N. et al. Functional characterization of lysosomal interaction of Akt with VRK2. **Oncogene**, v. 37, n. 40, p. 5367–5386, 5 jun. 2018.

- HUANG, C.-H.; YANG, T.-T.; LIN, K.-I. Mechanisms and functions of SUMOylation in health and disease: a review focusing on immune cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 31, n. 1, 27 jan. 2024.
- HUANG, Wei; CUI, Xiaopeng; CHEN, Yuyan; *et al.* High VRK1 Expression Contributes to Cell Proliferation and Survival in Hepatocellular Carcinoma. **Pathology - Research and Practice**, v. 212, n. 3, p. 171–178, 2016.
- HURST, Jillian H.; DOHLMAN, Henrik G. Dynamic Ubiquitination of the Mitogen-activated Protein Kinase Kinase (MAPKK) Ste7 Determines Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 26, p. 18660–18671, 2013.
- HUSE, M.; KURIYAN, J. The Conformational Plasticity of Protein Kinases. **Cell**, v. 109, n. 3, p. 275–282, 3 maio 2002.
- IKEZU, Seiko; IKEZU, Tsuneya. Tau-tubulin Kinase. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 7, 2014.
- J NEZU *et al.* Identification of Two Novel Human Putative Serine/Threonine Kinases, VRK1 and VRK2, with Structural Similarity to Vaccinia Virus B1R Kinase. **Genomics**, v. 45, n. 2, p. 327–331, 1 out. 1997.
- JUNHO, C. V. C. *et al.* An Overview of the Role of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase in Cardiorenal Syndrome. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 14 jul. 2020.
- K. BHANUMATHY, Kalpana; BALAGOPAL, Amrutha; VIZEACOMAR, Frederick S.; *et al.* Protein Tyrosine Kinases: Their Roles and Their Targeting in Leukemia. **Cancers**, v. 13, n. 2, p. 184, 2021.
- KNIPPSCHILD, Uwe; GOCHT, Andreas; WOLFF, Sonja; *et al.* The Casein Kinase 1 family: Participation in Multiple Cellular Processes in Eukaryotes. **Cellular Signalling**, v. 17, n. 6, p. 675–689, 2005.
- KOBE, Bostjan; KEMP, Bruce E. Principles of Kinase Regulation. **Handbook of Cell Signaling**, p. 559–563, 2010.
- KORNEV, Alexandr P.; TAYLOR, Susan S.; TEN EYCK, Lynn F. A Helix Scaffold for the Assembly of Active Protein Kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 38, p. 14377–14382, 2008.
- KOSTICH, Mitch; ENGLISH, Jessie; MADISON, Vincent; *et al.* Human Members of the Eukaryotic Protein Kinase Family. **Genome Biology**, v. 3, n. 9, p. research0043.1, 2002.
- LEE, Namgyu; KIM, Dae-Kyum ; HAN, Seung Hyun ; *et al.* Comparative Interactomes of VRK1 and VRK3 with Their Distinct Roles in the Cell Cycle of Liver Cancer. **Molecules and Cells**, v. 46, 2017.
- LEE, Namgyu; KWON, Jung-Hee; KIM, Young Bae; *et al.* Vaccinia-related Kinase 1 Promotes Hepatocellular Carcinoma by Controlling the Levels of Cell Cycle Regulators Associated with G1/S Transition. **Oncotarget**, v. 6, n. 30, p. 30130–30148, 2015.

- LEMMON, Mark A.; SCHLESSINGER, Joseph. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117–1134, 2010.
- LEROUX, Alejandro E.; SCHULZE, Jörg O.; BIONDI, Ricardo M. AGC kinases, Mechanisms of Regulation and Innovative Drug Development. **Seminars in Cancer Biology**, v. 48, p. 1–17, 2018.
- LESLY TORRES-GONZALEZ et al. LMTK3 gene expression and the molecular landscape of colorectal cancer (CRC).. **Journal of Clinical Oncology**, v. 42, n. 3_suppl, p. 172–172, 20 jan. 2024.
- LI, M.; YUE, W. VRK2, a Candidate Gene for Psychiatric and Neurological Disorders. **Molecular Neuropsychiatry**, v. 4, n. 3, p. 119–133, 2018.
- LIN, H.-Y. et al. The TLK-ASF1 histone chaperone pathway plays a critical role in IL-1 β -mediated AML progression. **Blood**, v. 143, n. 26, p. 2749–2762, 27 jun. 2024.
- LIU, Lei; WU, Jinsheng; WANG, Shaochuang; *et al.* PKMYT1 Promoted the Growth and Motility of Hepatocellular Carcinoma Cells by Activating beta-catenin/TCF Signaling. **Experimental Cell Research**, v. 358, n. 2, p. 209–216, 2017.
- Liver Cancer Stages - NCI. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/liver/what-is-liver-cancer/stages>>.
- LODISH, Harvey F. **Molecular Cell Biology**. 9th. ed. New York: W.H. Freeman-Macmillan Learning, 2021.
- LONG, Huan-ping; LIU, Jia-qing; YU, Yang-yang; *et al.* PKMYT1 as a Potential Target to Improve the Radiosensitivity of Lung Adenocarcinoma. **Frontiers in Genetics**, v. 11, 2020.
- LU, L. et al. LMTK3 knockdown retards cell growth and invasion and promotes apoptosis in thyroid cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 4, p. 2015–2022, 28 fev. 2017.
- MA, Y.; NICOLET, J. Specificity models in MAPK cascade signaling. **FEBS Open Bio**, v. 13, n. 7, p. 1177–1192, 11 jun. 2023.
- MANNING, Gerard; PLOWMAN, Gregory D; HUNTER, Tony; *et al.* Evolution of Protein Kinase Signaling from Yeast to Man. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 10, p. 514–520, 2002.
- MARTÍN-DONCEL, Elena; ROJAS, Ana M.; CANTARERO, Lara; *et al.* VRK1 Functional Insufficiency Due to Alterations in Protein Stability or Kinase Activity of Human VRK1 Pathogenic Variants Implicated in Neuromotor Syndromes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.
- MCCLENDON, Christopher L.; KORNEV, Alexandr P.; GILSON, Michael K.; *et al.* Dynamic Architecture of a Protein Kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 43, p. E4623–E4631, 2014.
- MILANES-YEARSLEY, Martha; HAMMOND, M. Elizabeth H.; PAJAK, Thomas F.; *et al.* Tissue Micro-Array: a Cost and Time-Effective Method for Correlative Studies by Regional and National Cancer Study Groups. **Modern Pathology**, v. 15, n. 12, p. 1366–1373, 2002.

- MIRICESCU, D. et al. The Serine/Threonine Protein Kinase (Akt)/ Protein Kinase B (Pkb) Signaling Pathway in Breast Cancer. **Journal of Mind and Medical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 34–39, 4 abr. 2020.
- MON, Aye M.; MACKINNON, A. Craig; TRAKTMAN, Paula. Overexpression of the VRK1 kinase, Which Is Associated with Breast cancer, Induces a Mesenchymal to Epithelial Transition in Mammary Epithelial Cells. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0203397, 2018.
- MONSALVE, D. M. et al. Human VRK2 modulates apoptosis by interaction with Bcl-xL and regulation of BAX gene expression. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 2, p. e513–e513, fev. 2013.
- MONTE-SERRANO, Eva; LAZO, Pedro A. VRK1 Kinase Activity Modulating Histone H4K16 Acetylation Inhibited by SIRT2 and VRK-IN-1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4912–4912, 2023.
- MORET, Nienke; LIU, Changchang; GYORI, Benjamin M.; *et al.* A Resource for Exploring the Understudied Human Kinome for Research and Therapeutic Opportunities. 2020.
- MOURA, David S.; CAMPILLO-MARCOS, Ignacio; VÁZQUEZ-CEDEIRA, Marta; *et al.* VRK1 and AURKB Form a Complex That Cross Inhibit Their Kinase Activity and the Phosphorylation of Histone H3 in the Progression of Mitosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 14, p. 2591–2611, 2018.
- NAKAJIMA, Hiroyuki; TOYOSHIMA-MORIMOTO, Fumiko; TANIGUCHI, Eri; *et al.* Identification of a Consensus Motif for Plk (Polo-like Kinase) Phosphorylation Reveals Myt1 as a Plk1 Substrate*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 28, p. 25277–25280, 2003.
- NAVARRO-CARRASCO, Elena; LAZO, Pedro A. VRK1 Depletion Facilitates the Synthetic Lethality of Temozolomide and Olaparib in Glioblastoma Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 2021.
- NGUYEN, Dac-Trung; MATHIAS, Stephen; BOLOGA, Cristian; *et al.* Pharos: Collating Protein Information to Shed Light on the Druggable Genome. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. Database issue, p. D995–D1002, 2017.
- NICHOLS, R. J.; TRAKTMAN, P. Characterization of Three Paralogous Members of the Mammalian Vaccinia Related Kinase Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 9, p. 7934–7946, fev. 2004.
- OPREA, Tudor I.; BOLOGA, Cristian G.; BRUNAK, Søren; *et al.* Unexplored Therapeutic Opportunities in the Human Genome. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 5, p. 317–332, 2018.
- PALMIERI, L.; RASTELLI, G. α C helix displacement as a general approach for allosteric modulation of protein kinases. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 7-8, p. 407–414, 2013.
- PEARCE, Laura R.; KOMANDER, David; ALESSI, Dario R. The Nuts and Bolts of AGC Protein Kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 9–22, 2010.

REINHARDT, R.; LEONARD, T. A. A critical evaluation of protein kinase regulation by activation loop autophosphorylation. **eLife**, v. 12, p. e88210, 20 jul. 2023.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, Irene; VÁZQUEZ-CEDEIRA, Marta; SANTOS-BRIZ, Angel; *et al.* VRK2 Identifies a Subgroup of Primary high-grade Astrocytomas with a Better Prognosis. **BMC Clinical Pathology**, v. 13, p. 23, 2013.

ROFFÉ, Martín; HAJJ, Glaucia N. M.; AZEVEDO, Háttylas F.; *et al.* IMPACT Is a Developmentally Regulated Protein in Neurons That Opposes the Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase GCN2 in the Modulation of Neurite Outgrowth. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 15, p. 10860–10869, 2013.

ROSKOSKI, Robert. Properties of FDA-approved Small Molecule Protein Kinase inhibitors: a 2023 Update. **Pharmacological Research**, v. 187, p. 106552, 2023.

ROZEN, E. J.; SHOHET, J. M. Systematic review of the receptor tyrosine kinase superfamily in neuroblastoma pathophysiology. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 41, n. 1, p. 33–52, 30 out. 2021.

SAFER, J. *et al.* Characterizing 127 understudied kinases through in silico saturation mutagenesis of predicted protein structures. **Biophysical Journal**, v. 123, n. 3, p. 282a282a, 1 fev. 2024.

SAHIN, U.; DE THÉ, H.; LALLEMAND-BREITENBACH, V. Sumoylation in Physiology, Pathology and Therapy. **Cells**, v. 11, n. 5, p. 814, 1 jan. 2022.

SALZANO, Marcella; VÁZQUEZ-CEDEIRA, Marta; SANZ-GARCÍA, Marta; *et al.* Vaccinia-related Kinase 1 (VRK1) Confers Resistance to DNA-damaging Agents in Human Breast Cancer by Affecting DNA Damage Response. **Oncotarget**, v. 5, n. 7, p. 1770–1778, 2014.

SATHYA NARAYANAN NAGARAJAN; LENOIR, C.; CHRISTOPHE GRANGEASSE. Recent advances in bacterial signaling by serine/threonine protein kinases. **Trends in microbiology**, v. 30, n. 6, p. 553–566, 1 jun. 2022.

SCHMIDT, M. *et al.* Regulation of G2/M Transition by Inhibition of WEE1 and PKMYT1 Kinases. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2045, 23 nov. 2017.

SHARMA, K. R. *et al.* Illuminating the druggable genome: Pathways to progress. **Drug Discovery Today**, v. 29, n. 3, p. 103805–103805, 1 mar. 2024.

SHIELDS, Julie A.; MEIER, Samuel R.; BANDI, Madhavi; *et al.* VRK1 Is a Paralog Synthetic Lethal Target in VRK2-methylated Glioblastoma. 2022.

SHYAM SUNDER, S.; SHARMA, U. C.; POKHAREL, S. Adverse effects of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy: pathophysiology, mechanisms and clinical management. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–27, 7 jul. 2023.

SIMON DONTORO DEKOMAH; BI, Zhenzhen; DORMATEY, Richard; *et al.* The Role of CDPKs in Plant development, Nutrient and Stress Signaling. **Frontiers in Genetics**, v. 13, 2022.

- SO, Jonathan; MABE, Nathaniel W.; ENGLINGER, Bernhard; *et al.* VRK1 as a Synthetic Lethal Target in VRK2 promoter-methylated Cancers of the Nervous System. **JCI Insight**, v. 7, n. 19, p. e158755, 2022.
- SOLEYMANI, S. *et al.* Dark kinase annotation, mining, and visualization using the Protein Kinase Ontology. **PeerJ**, v. 11, p. e16087–e16087, 5 dez. 2023.
- SOUTHEKAL, Siddesh; MISHRA, Nitish Kumar; GUDA, Chittibabu. Pan-Cancer Analysis of Human Kinome Gene Expression and Promoter DNA Methylation Identifies Dark Kinase Biomarkers in Multiple Cancers. **Cancers**, v. 13, n. 6, p. 1189, 2021.
- STEBBING, J. *et al.* LMTK3 confers chemo-resistance in breast cancer. **Oncogene**, v. 37, n. 23, p. 3113–3130, 15 mar. 2018.
- STEBBING, J. *et al.* LMTK3 expression in breast cancer: association with tumor phenotype and clinical outcome. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 2, p. 537–544, 14 jun. 2011.
- STEBBING, J. *et al.* LMTK3 is implicated in endocrine resistance via multiple signaling pathways. **Oncogene**, v. 32, n. 28, p. 3371–3380, 6 ago. 2012.
- SUN, Q. *et al.* Overexpression of PKMYT1 indicates the poor prognosis and enhances proliferation and tumorigenesis in non-small cell lung cancer via activation of Notch signal pathway. **PubMed**, v. 23, n. 10, p. 4210–4219, 2019.
- TAYLOR, S. S.; KORNEV, A. P. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 2, p. 65–77, fev. 2011.
- TESLI, M. *et al.* VRK2 gene expression in schizophrenia, bipolar disorder and healthy controls. **The British Journal of Psychiatry**, v. 209, n. 2, p. 114–120, 1 ago. 2016.
- THEIVENDREN, Panneerselvam; KUNJIAPPAN, Selvaraj; MARIAPPA HEGDE, Yashoda; *et al.* Importance of Protein Kinase and Its Inhibitor: a Review. **Protein Kinases - Promising Targets for Anticancer Drug Research**, 2021.
- THORN, C. F. *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440–446, jul. 2011.
- VALBUENA, A.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, I.; LAZO, P. A. Human VRK1 Is an Early Response Gene and Its Loss Causes a Block in Cell Cycle Progression. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. e1642, 20 fev. 2008.
- VARJOSALO, Markku; KESKITALO, Salla; VAN DROGEN, Audrey; *et al.* The Protein Interaction Landscape of the Human CMGC Kinase Group. **Cell Reports**, v. 3, n. 4, p. 1306–1320, 2013.
- VÁZQUEZ-CEDEIRA, M.; LAZO, P. A. Human VRK2 (Vaccinia-related Kinase 2) Modulates Tumor Cell Invasion by Hyperactivation of NFAT1 and Expression of Cyclooxygenase-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 51, p. 42739–42750, 2012.

- VELLA, Viviana; GIAMAS, Georgios; DITSIOU, Angeliki. Diving into the Dark kinome: Lessons Learned from LMTK3. **Cancer Gene Therapy**, 2021.
- WAKATSUKI, T. et al. Prognostic Role of Lemur Tyrosine Kinase-3 Germline Polymorphisms in Adjuvant Gastric Cancer in Japan and the United States. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 10, p. 2261–2272, 2013.
- WANG, Cheng; YANG, Miaomiao; GU, Xi; *et al.* Lemur Tyrosine kinase-3 (LMTK3) Induces Chemoresistance to Cetuximab in Colorectal Cancer via the ERK/MAPK Pathway. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 6594–6605, 2021.
- WANG, Shuang; LIU, Ximeng; ZHOU, Ting; *et al.* PKMYT1 Inhibits Lung Adenocarcinoma Progression by Abrogating AKT1 Activity. **Cellular Oncology**, 2022.
- WEBER, T.J. Protein Kinases. **Comprehensive Toxicology**, p. 473–493, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Central Nervous System Tumours**. 5. ed. [s.l.]: Lyon Internat. Agency for Research of Cancer, 2021.
- WU, Fangnan; TU, Chaoyong; ZHANG, Kun; *et al.* Knockdown of PKMYT1 Is Associated with Autophagy Inhibition and Apoptosis Induction and Suppresses Tumor Progression in Hepatocellular Carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 640, p. 173–182, 2023.
- WURTZ, N. et al. cAMP-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum*: an update. **Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 1–25, 1 jan. 2011.
- XU, Y.; ZHANG, H.; LIT, L. C.; *et al.* The Kinase LMTK3 Promotes Invasion in Breast Cancer through GRB2-Mediated Induction of Integrin $\alpha 1$. **Science Signaling**, v. 7, n. 330, p. ra58–ra58, 2014.
- YIN, M.-Y. et al. Reduced Vrk2 expression is associated with higher risk of depression in humans and mediates depressive-like behaviors in mice. v. 21, n. 1, 14 jul. 2023.
- ZHANG, Jie; LIN, Xiaotong; YU, Hongqiang; *et al.* Elevated FBXL6 Expression in Hepatocytes Activates VRK2-transketolase-ROS-mTOR-mediated Immune Evasion and Liver Cancer Metastasis in Mice. **Experimental and Molecular Medicine**, 2023.