



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

EXPRESSÃO DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE MRNA NO CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS E NO CARCINOMA DE MAMA

FERNANDA FERREIRA DA SILVA

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para obtenção
de Título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Oncologia**

Orientadora: Dra. Gláucia Noeli Maroso Hajj

São Paulo

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

S586e Silva, Fernanda Ferreira
Expressão de enzimas modificadoras de MRNA no carcinoma renal de células claras e no carcinoma de mama / Fernanda Ferreira da Silva - São Paulo, 2023.
131p.
Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientadora: Gláucia Noeli Maroso Hajj

1. Descritores: Carcinoma de Células Renais/Carcinoma, Renal Cell. 2. Neoplasias da Mama/Breast Neoplasms. 3. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 4. Biomarcadores Tumorais/ Biomarkers, Tumor

*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: Fernanda Ferreira da Silva

Título da tese: "Expressão de enzimas modificadoras no mRNA no carcinoma renal de células claras e carcinoma de mama."

Aprovado em: 20/01/2023

Banca Examinadora

Orientador(a): Dra. Gláucia Noeli Maroso Hajj

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dr. Flávio Mavignier Cárcano

Instituição: Hospital de Câncer de Barretos

Membro da banca: Dra. Giovana Tardin Torrezan

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dr. Rodrigo Drummond Couto Duarte

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dra. Tathiane Maistro Malta

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

SUORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de auxílio à Pesquisa - 2019/16938-4.

“A lei da mente é implacável.

O que você pensa, você cria;

O que você sente, atrai;

O que você acredita

Torna-se realidade.”

- Buda

Dentro de mim, sempre existiu uma força maior que nunca permitiu que eu desistisse de qualquer desafio que tenha passado pelo meu caminho.

Tal força, além de ser intrínseco do meu “Eu superior”, sempre foi incentivada por muito amor que recebi de muitas pessoas que fizeram ou fazem parte da minha trajetória pessoal e profissional.

Dedico esta tese, a todas as pessoas que contribuíram com a minha jornada, me proporcionando vivências e sentimentos que me fizeram acreditar no meu potencial para que eu conseguisse finalizar um ciclo tão importante em minha vida.

Em especial, dedico esta tese a dois seres que já não estão mais neste plano (In memoriam), minha avó Zulmira e minha cachorrinha Tiffani. Elas foram fundamentais para a construção da pessoa que me tornei, pois foram fontes de amor genuíno que tive a honra de ter em minha vida.

Também dedico esta tese, a todos os pacientes que se doaram a ciência em prol do bem maior, permitindo assim a realização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir que nesta existência eu consegui chegar até aqui para contribuir com a ciência em prol de obter junto com outros projetos, avanços científicos que irão proporcionar melhores condições de tratamento e mais tempo de vida para os pacientes oncológicos.

Agradeço a meus pais, Antônio e Lara e minha irmã Flavia, pela minha criação e por sempre acreditarem que eu iria conseguir. Mesmo com todas as condições adversas e dificuldades que tive durante meu percurso, nunca disseram que eu deveria deixar de tentar, amo vocês.

Dani minha prima, sempre com seu jeito nada meigo, me diz o quanto sou incrível e mereço o mundo.

Minha irmã de coração Tatiane, nossa história vem de outra vida, uma amizade que só trouxe flores e bons momentos em nossas vidas.

Minha amiga Aline, é a pessoa que diz que é minha fã, que sou muito determinada. Também sou sua fã, miga.

Adriana e Reis, me deram tanto apoio e incentivo quando comecei minha jornada com bióloga. Sempre que eu ficava exausta por ter que trabalhar e estudar no começo da carreira científica o Reis me dizia “Usa isso como impulso para melhorar sua vida”, obrigada.

A minha terapeuta Aline, juntas estamos fazendo um belo trabalho transformando meu ser em uma pessoa cada vez mais brilhante.

A minha orientadora desde a 2016, começando na iniciação científica, a Dra. Glaucia Hajj. Foram muitos anos de ensinamentos e momentos que contribuíram para que eu me tornasse uma profissional com iniciativa e que sabe correr atrás do que é preciso.

A meus amigos e colegas de grupo “Ex alunos”, pois eu sou a última da nossa turma a defender. Danielle Nascimento, lembro de nós rindo de nervoso por não conseguir fazer uma conta. Fernanda Lupinacci, foi quase minha coorientadora na iniciação científica e me ajuda e incentiva até o presente momento, sabemos que podemos contar uma com a outra. Denise Harumi, uma pesquisadora nata, que apesar de sua trajetória não ter continuado na ciência, você é uma inspiração de pessoa resiliente e forte. Julia Avian, “miga” além de parceira de equipe, se tornou parceira da vida que pretendo sempre estar por perto. Dimas Pontes, se tornou meu irmão mais novo, nos divertimos com absolutamente tudo que aparece em nossa frente, o que permite passar por tudo com mais leveza. Vocês são incríveis.

A todos outros profissionais e alunos que contribuíram para que este projeto fosse construído e finalizado; da facilitie, Janaina Germano e Alexandre Defelicibus; alunos Amanda Ikegami e Adriano Oliveira; do departamento de Anatomia Patológica do AC.Camaro Cancer Center, as médicas patologistas, Dra. Stephania Martins, Dra. Cynthia Apareida de Bueno e Dr. Victor Piana; aos técnicos do BCM; o escritório de projetos; a pós graduação da Fundação Antônio Prudente, por me proporcionar ótimas instalações tornando possível a realização deste protejo.

RESUMO

Silva FF. **Expressão de enzimas modificadoras de mRNA no carcinoma renal de células claras e no carcinoma de mama.** [Tese] São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

Após a transcrição, as moléculas de RNA podem ser alteradas por uma infinidade de modificações químicas distintas que ocorrem de maneira dinâmica, constituindo o epitranscriptoma. A primeira modificação de mRNA identificada foi a N6-metiladenosina (m6A), afetando quase todas as etapas do metabolismo do RNA, desde o processamento no núcleo até a tradução e decaimento no citoplasma, alterando assim os níveis de expressão gênica. A m6A é controlada por três grupos de proteínas, *writers*, *readers* e *erasers*. Na literatura estudos relatam que as proteínas que regulam a m6A possam estar mutadas e / ou exibir expressão alterada através de uma variedade de tipos de tumores, mais notavelmente o carcinoma de mama e o CRCC. Neste projeto, tivemos como objetivo determinar os níveis de expressão das enzimas modificadoras de mRNA, e suas correlações com dados clínicos e anatomopatológicos para CRCC e carcinoma de mama, o que pode nos ajudar a ampliar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares associados a estas doenças. Em nossa coorte dos pacientes com CRCC, detectamos que a baixa expressão da *writer* RBM15B, se associa com variáveis relacionadas a progressão tumoral e apresenta pior SR e aumento de risco do paciente recidivar. A baixa expressão da FTO e alta da METTL14, se associam aos estágios mais agressivos de CRCC, podendo serem possíveis marcadores de prognóstico. No carcinoma de mama, os pacientes com expressão baixa da METTL14, apresentaram associação com pior prognóstico para esta doença, especificamente no subtipo molecular TN e aumento de risco em (RR = 4,772; p= 0,01), para óbito global. Sendo assim, acreditamos que interferência no mecanismo de controle da m6A no mRNA desencadeada por alterações de expressão destas proteínas, podem estar ligadas a alterações biológicas levando ao processo de tumorigênese.

Descritores: Carcinoma de Células Renais. Neoplasias da Mama. Imuno-Histoquímica. Biomarcadores Tumorais

ABSTRACT

Silva FF. **[Expression of mRNA-modifying enzymes in clear cell renal cell carcinoma and breast cancer]**. [Tese] São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

After transcription, RNA molecules can be altered by a multitude of different chemical modifications that occur dynamically, constituting the epitranscriptome. The first mRNA modification identified was N6-methyladenosine (m6A), affects almost all steps of RNA metabolism, from processing in the nucleus to translation and decay in the cytoplasm, thus altering gene expression levels. m6A is controlled by three groups of proteins, writers, readers and erasers. Studies in the literature report that proteins that regulate m6A may be mutated and/or exhibit altered expression across a variety of tumor types, most notably breast cancer and ccRCC. In this project, we aimed to determine the expression levels of mRNA-modifying enzymes, and their correlations with clinical and anatomopathological data for ccRCC and breast cancer, which can help to expand our knowledge about the molecular mechanisms associated with these diseases. In our cohort of patients with ccRCC, we detected that the low expression of writer RBM15B is associated with characteristics related to tumor progression showing worse Relapse-Free survival and increased recurrence risk. Low expression of FTO and high expression of METTL14 are associated with more aggressive stages of ccRCC and may be possible prognostic markers. In breast cancer, patients with low METTL14 expression were associated with a worse prognosis, specifically in the TN molecular subtype, with increased death risk (RR = 4.772; p= 0.01). Therefore, we believe that interference in the m6A control mechanism in the mRNA triggered by changes in the expression of these proteins may be linked to biological alterations leading to the process of tumorigenesis.

Key words: Carcinoma, Renal Cell. Breast Neoplasms. Immunohistochemistry. Biomarkers, Tumor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	m6A é regulada por três grupos de proteínas <i>writers, readers e erasers</i>	4
Figura 2	Tratamento de primeira e segunda linha para pacientes com o CRCC metastático	9
Figura 3	Subtipos moleculares do carcinoma de mama	12
Figura 4	Figura representativa de um TMA.	19
Figura 5	Validação da especificidade dos anticorpos	25
Figura 6	Expressão da writer METTL14 nos TMAs de CRCC e metastático.....	26
Figura 7	Expressão global da METTL14 nos tecidos normal adjacente, tecido tumoral incluídos nos TMAs de CRCC e tecido de metástase incluídos no TMA de metastático	28
Figura 8	Expressão da METTL14 nos casos de CRCC.....	31
Figura 9	Expressão da <i>writer</i> RBM15B no TMA de CRCC e metastático.....	36
Figura 10	Expressão global da RBM15B nos tecidos normal adjacente, tecido tumoral inclusos nos TMAs de CRCC e tecido de metástase incluídos no TMA de metastático	37
Figura 11	Curva de comparação da expressão baixa e alta da RBM15B em todos os casos de CRCC, incluindo os metastáticos	40

Figura 12	Curva de comparação da expressão baixa e alta da RBM15B nos casos não metastáticos de CRCC	41
Figura 13	Expressão da <i>reader</i> HNRNPC1/C2 nos TMAs de CRCC e metastático	45
Figura 14	Expressão global da METTL14 nos tecidos normal adjacente, tecido tumoral inclusos nos TMAs de CRCC e tecido de metástase incluídos no TMA de metastático	46
Figura 15	Expressão da <i>reader</i> YTHDF2 nos TMAs de CRCC e metastático	53
Figura 16	Expressão global da YTHDF2 nos tecidos normal adjacente, tecido tumoral inclusos nos TMAs de CRCC e tecido de metástase incluídos no TMA de metastático	54
Figura 17	Curva de comparação da expressão baixa e alta da YTHDF2 nos casos não metastáticos de CRCC	57
Figura 18	Expressão da <i>eraser</i> FTO em CRCC.....	62
Figura 19	Expressão global da FTO nos tecidos normal adjacente, tecido tumoral inclusos nos TMAs de CRCC e tecido de metástase incluídos no TMA de metastático	63
Figura 20	Curva de comparação da expressão baixa e alta da FTO nos casos de CRCC..	66
Figura 21	Heatmap apresenta a expressão quantitativa das proteínas, METTL14, FTO, RBM15B, HNRNP C1/C2 e YTHDF2.....	73
Figura 22	Expressão da <i>writer</i> METTL14 no carcinoma de mama	74
Figura 23	Expressão da METTL14 nos casos de Carcinoma de mama	78

Figura 24	Expressão da METTL14 nos casos de Carcinoma de mama	79
Figura 25	Expressão da proteína KIAA1429 no TMA de carcinoma de mama.....	84
Figura 26	Expressão da <i>eraser</i> FTO apresentando marcação nuclear com diferença de intensidade de marcação	91
Figura 27	Expressão da <i>reader</i> YTHDF2. Expressão nuclear da YTHDF2 no carcinoma de mama.....	98
Figura 28	Expressão da <i>reader</i> HNRNP C1/C2 no tecido de carcinoma de mama	106
Figura 29	Heatmap apresenta a expressão quantitativa das proteínas, METTL14, FTO, KIAA1429, HNRNP C1/C2 e YTHDF2	114
Figura 30	Curva de sobrevida com os pacientes agrupados por clúteres no heatmap...	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Enzimas modificadoras de RNA	2
Tabela 2	Descrição do banco de dados de CRCC utilizados no projeto	15
Tabela 3	Descrição do banco de dados de carcinoma de mama utilizados no projeto	16
Tabela 4	Descrição das principais características e condições aplicadas na reação de IHC para os anticorpos METTL14, HNRNPC1/C2, FATSO, YTHDF2 e RBM15B nos TMAs de CRCC.....	20
Tabela 5	Descrição das principais características e condições aplicadas na reação de IHC nos TMAs de carcinoma de mama	21
Tabela 6	Anticorpos utilizados neste projeto.....	24
Tabela 7	Expressão da METTL14 nos casos pareados de normal adjacente ao tumor, tecido tumoral e tecido de metástase de CRCC	27
Tabela 8	Associação da expressão da METTL14 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos com CRCC.....	29
Tabela 9	Curva de comparação da Expressão da METTL14 nos casos de CRCC	31
Tabela 10	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METTL14 no CRCC: regressão de cox em modelo Simples	32
Tabela 11	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METTL14 no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo	33

Tabela 12	Risco de recidiva na SR presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METTL14 no CRCC: regressão de cox em modelo Simples	33
Tabela 13	Risco de recidiva na SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METTL14 no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo.	34
Tabela 14	Expressão da RBM15B nos casos pareados de normal adjacente ao tumor, tecido tumoral e tecido de metástase dos pacientes com CRCC	37
Tabela 15	Associação da expressão da RBM15B com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos com CRCC.....	39
Tabela 16	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da RBM15B no CRCC: regressão de cox em modelo Simples	42
Tabela 17	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da RBM15B no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo	43
Tabela 18	Risco de recidiva na SR presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da RBM15B no CRCC: regressão de cox em modelo Simples	43
Tabela 19	Risco de recidiva na SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da RBM15B no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo	44
Tabela 20	Expressão da HNRNPC1/C2 nos casos pareados de normal adjacente ao tumor, tecido tumoral e tecido de metástase dos pacientes com CRCC	46
Tabela 21	Associação da expressão da HNRNPC1/C2, com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de CRCC	47
Tabela 22	Curva de comparação da expressão da HNRNPC1/C2 nos casos de CRCC.....	48

Tabela 23	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da HNRNPC1/C2 no CRCC: regressão de cox em modelo simples	49
Tabela 24	Risco de óbito SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da RBM15B no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo	50
Tabela 25	Risco de recidiva na SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da HNRNP C1/C2 no CRCC: regressão de cox em modelo Simples	50
Tabela 26	Risco de recidiva na SR presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da HNRNP C1/C2 no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo.....	51
Tabela 27	Expressão da YTHDF2 nos casos pareados de normal adjacente ao tumor, tecido tumoral e tecido de metástase dos pacientes com CRCC	54
Tabela 28	Associação da expressão da YTHDF2 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de CRCC	55
Tabela 29	Curva de comparação da expressão da YTHDF2 nos casos de CRCC.....	57
Tabela 30	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no CRCC: regressão de cox em modelo Simples .	58
Tabela 31	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa YTHDF2 no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo.....	59
Tabela 32	Risco de recidiva na SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no CRCC: regressão de cox em modelo Simples .	60

Tabela 33	Risco de recidiva na SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo	60
Tabela 34	Expressão da FTO nos casos pareados de normal adjacente ao tumor, tecido tumoral e tecido de metástase dos pacientes com CRCC	63
Tabela 35	Associação da expressão da FTO com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de CRCC	65
Tabela 36	Curva de comparação da expressão da FTO nos casos de CRCC.....	67
Tabela 37	Risco de óbito SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da FTO no CRCC: regressão de cox em modelo Simples	68
Tabela 38	Risco de óbito SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa FTO no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo	69
Tabela 39	Risco de recidiva SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da FTO no CRCC: regressão de cox em modelo Simples	69
Tabela 40	Risco de recidiva SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da FTO no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo	70
Tabela 41	Correlação entre a expressão da METTL14, RBM15B, HNRNP C1/C2, YTHDF2 e FTO	71
Tabela 42	Correlação da expressão quantitativa da METTL14 com a Idade ao diagnóstico, índice mitótico e KI67 aplicando o coeficiente r ² de speraman	75
Tabela 43	Associação da expressão da METTL14 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de Carcinoma de mama.....	77

Tabela 44	Risco de óbito SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METT14 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.....	80
Tabela 45	Risco de óbito global na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da MEETL14 no carcinoma de mama: Regressão de cox em modelo Múltiplo	81
Tabela 46	Risco de progressão da SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METT14 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.....	82
Tabela 47	Risco de progressão da SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METT14 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo	83
Tabela 48	Correlação da expressão quantitativa da KIAA1429 com a Idade ao diagnóstico, índice mitótico e KI67 aplicando o coeficiente r de Spearman	84
Tabela 49	Associação da expressão da KIAA1429 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de Carcinoma de mama.....	85
Tabela 50	Curva de comparação da expressão da KIAA1429 nos casos de Carcinoma de mama	86
Tabela 51	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da KIAA1429 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.....	87
Tabela 52	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da KIAA1429 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo	88

Tabela 53	Risco de progressão pela SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da KIAA1429 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples	89
Tabela 54	Risco de progressão na SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da KIAA1429 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo	90
Tabela 55	Correlação da expressão quantitativa da FTO com a Idade ao diagnóstico, índice mitótico e KI67 aplicando o coeficiente ρ de speraman	91
Tabela 56	Associação da expressão da FTO com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de Carcinoma de mama.....	93
Tabela 57	Curva de comparação da expressão da FTO nos casos de Carcinoma de mama	94
Tabela 58	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da FTO no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.....	95
Tabela 59	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da FTO no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo	96
Tabela 60	Risco de progressão na SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da FTO no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.....	96
Tabela 61	Risco de progressão SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da KIAA1429 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo	97

Tabela 62	Correlação da expressão quantitativa da YTHDF2 com o índice mitótico e KI67 aplicando o coeficiente r de Spearman	98
Tabela 63	Associação da expressão da YTHDF2 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de Carcinoma de mama.....	100
Tabela 64	Curva de comparação da expressão da YTHDF2 nos casos de Carcinoma de mama	101
Tabela 65	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.....	102
Tabela 66	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo	103
Tabela 67	Risco de progressão na SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.....	104
Tabela 68	Risco de progressão na SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo	105
Tabela 69	Correlação da expressão quantitativa da HNRNP C1/C2, com a Idade ao diagnóstico, índice mitótico e KI67 aplicando o coeficiente r de Spearman.....	106
Tabela 70	Associação da expressão da HNRNP C1/C2 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de Carcinoma de mama.....	108
Tabela 71	Curva de comparação da expressão da HNRNP C1/C2 nos casos de Carcinoma de mama	109

Tabela 72	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da HNRNP C1/C2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.....	110
Tabela 73	Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da HNRNP C1/C2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo	111
Tabela 74	Risco de progressão na SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.....	111
Tabela 75	Risco de progressão na SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo	112
Tabela 76	Correlação entre a expressão da METTL14, KIAA1429, HNRNP C1/C2, YTHDF2 e FTO no Carcinoma de mama.....	113
Tabela 77	Alteração da expressão das proteínas <i>writer</i> , <i>reader</i> e <i>eraser</i> no CRCC e Carcinoma de mama	119

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALKBH5	<i>Alkb homologue 5</i>
APA	Poliadenilação Alternativa
ATCC	<i>American Type Collection</i>
BAP1	<i>BRCA1 Associated Protein 1</i>
CCR	Carcinoma de Células Renais
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CIPE	Centro Internacional de Pesquisa e Ensino
CRCC	Carcinoma Renal de Células Claras
CCRcr	Carcinoma de Células Renais Cromóforo
CCRp	Carcinoma de Células Renais Papilífero
CTLA4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen 4</i>
eIF3	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 3</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FTO	<i>Fat mass and obesity-associated protein</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HIF1a	<i>Hypoxia-inducible fator 1-alpha</i>
IFNα	Interferon-alfa
IHC	Imunohistoquímica
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
KIAA1429	<i>Vir like m6A methyltransferase associated</i>
LA	Luminal A
LB	Luminal B
LDH	Lactato Desidrogenase
MAL	<i>Mal, T Cell Differentiation Protein</i>
MeRIP-seq	Imunoprecipitação e sequenciamento
METTL3	<i>Methyltransferase-like 3</i>
METTL14	<i>Methyltransferase-like 14</i>

m1A	N1-metiladenosina
m6A	N6-metiladenosina
ncRNA	RNA não codificante
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	<i>Poly ADP-ribose polymerase</i>
PBRM1	<i>Polybromo-1</i>
PD-1	<i>Programmed Cell Death 1</i>
RE	Receptor de Estrógeno
RH	Receptores Hormonais
RP	Receptor de Progesterona
RBM15	<i>RNA Binding Motif Protein 15</i>
SETD2	<i>SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase</i>
SG	Sobrevida Global
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
SR	Sobrevida Livre de Recidiva
TC	Tomografia Computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TN	Triplo Negativo
TNM	<i>Tumour-Node-Metastasis</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>
VIRMA	<i>Vir like m6A methyltransferase associated</i>
WTAP	Proteína Associada ao Tumor 1 de Wilms
YTHDC2	<i>YTH Domain Containing 2</i>
YTHDF1	<i>YTH N6-Methyladenosine RNA Binding Protein 1</i>
YTHDF1	<i>YTH N6-Methyladenosine RNA Binding Protein 2</i>
5mC	5-metilcitosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Modificações no mRNA e o Controle Traducional	1
1.2	Modificações no mRNA e Câncer	4
1.3	Carcinoma Renal de Células Claras.....	6
1.4	Câncer de Mama.....	9
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral.....	13
2.2	Objetivo Específicos.....	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Casuística	15
3.2	CrITÉrios de Inclusão e Exclusão	18
3.3	TÉcnica de Tissue Microarray (TMA)	18
3.4	Reação de Imunohistoquímica (IHC)	19
3.5	Análise das Reações de Imunohistoquímica (IHC).....	21
3.6	Variáveis Clínicas e Anatomopatológicas	22
3.7	Análise Estatística	23
3.8	Cultura Celular	24
3.9	Padronização de Anticorpos por Ensaios de Western Blot.....	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Especificidade dos Anticorpos	25
4.2	Carcinoma Renal de Células Claras.....	25
4.2.1	Expressão <i>writer</i> METTL14	25
4.2.2	Expressão da <i>writer</i> RBM15B.....	35
4.2.3	Expressão da <i>reader</i> HNRNP C1/C2	44
4.2.4	Expressão da <i>reader</i> YTHDF2	51
4.2.5	Expressão <i>eraser</i> FTO.....	61

4.2.6	Correlação entre <i>writer</i> , <i>readers</i> e <i>erasers</i>	70
4.3	Carcinoma de Mama.....	74
4.3.1	Expressão <i>writer</i> METTL14	74
4.3.2	Expressão da <i>writer</i> VIRMA (KIAA1429)	83
4.3.3	Expressão da <i>eraser</i> FTO.....	90
4.3.4	Expressão da <i>reader</i> YTHDF2	95
4.3.5	Expressão da <i>reader</i> HNRNP C1/C2	105
4.3.6	Correlação entre <i>writer</i> , <i>readers</i> e <i>erasers</i>	112
5	DISCUSSÃO.....	116
6	CONCLUSÃO	120
7	REFERÊNCIAS.....	121

ANEXOS

Anexo 1 Pontos de corte definidos para a categorização de expressão baixa e expressão alta para os casos de CRCC

Anexo 2 Pontos de corte definidos para a categorização de expressão baixa e expressão alta para os casos de Carcinoma de mama.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MODIFICAÇÕES NO MRNA E O CONTROLE TRADUCIONAL

No dogma central da biologia molecular, a informação genética é direcionada do DNA para o RNA até a proteína. Sabe-se que no passado, estudos sobre modificações químicas em ácidos nucleicos concentraram-se principalmente nas modificações epigenéticas do DNA genômico ¹.

O papel das modificações químicas pós-transcricionais de RNA, no entanto, permaneceu em grande parte desconhecido ². Apesar de as modificações de RNA terem sido identificadas pela primeira vez em espécies de RNA altamente abundantes (por exemplo, rRNA e tRNA), um número crescente de modificações mostra-se também presente em mRNA. Até o momento foram caracterizadas mais de 100 modificações químicas distintas no RNA ². Tais modificações podem variar de alterações nas estruturas do anel de base (uridina, pseudouridina e adenosina), até adição de pequenos grupos químicos como, por exemplo, um grupo metil ³.

O papel da primeira modificação de mRNA identificada, a N6-metiladenosina (m6A), na regulação da expressão gênica foi recentemente identificado ¹. Posteriormente, foram descobertas modificações de mRNA adicionais, incluindo pseudouridina (Ψ) ⁴⁻⁶, 5-metilcitidina (5mC) ⁷ e N1-metiladenosina (m1A) ⁸, e suas funções estão atualmente sendo exploradas. Estas modificações de RNA constituem o "epitranscriptoma", em que o destino e a função dos RNAs são decididos através de modificações químicas dinâmicas reversíveis, semelhante ao descrito anteriormente para DNA e proteínas. Ao contrário do DNA e das proteínas, no entanto, as funções precisas das modificações de mRNA, em particular, os mecanismos pelos quais eles afetam a expressão gênica e os processos biológicos, ainda são mal compreendidos. Essas descobertas indicam que o "idioma" do RNA é muito mais complexo do que se pensava anteriormente.

A descoberta de modificações químicas no mRNA foi acompanhada pela descoberta das proteínas que adicionam, removem e interpretam diferentes modificações de RNA (**Tabela 1**). As proteínas que adicionam modificações ao RNA são chamadas *writers*, as

enzimas que removem as modificações são chamadas *erasers* e as proteínas que identificam as modificações presentes são as chamadas *readers*.

Tabela 1 - Enzimas modificadoras de RNA.

Modification	Writer	Eraser	Reader
N ⁶ -Methyladenosine	<ul style="list-style-type: none"> Methyltransferase-like 3 (METTL3 and METTL14) Wilms tumour 1-associated protein (WTAP) RNA-binding motif 15 (RBM15 and RBM15B) Protein virilizer homologue (KIAA1429) 	<ul style="list-style-type: none"> AlkB homologue 5 (ALKBH5) Fat mass and obesity-associated protein (FTO) 	<ul style="list-style-type: none"> YTH domain family protein 1-3 (YTHDF1-3) YTH domain-containing protein 1 (YTHDC1) Eukaryotic factor 3 (eIF3) complex Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (HNRNPA2B1) Serine/arginine-rich splicing factor 2 (SRSF2)
N ¹ -Methyladenosine	Unknown	ALKBH3	Unknown
2'-O-methylation	Unknown	Unknown	Unknown

Fonte: Tabela adaptada a partir de Lewis et al. ⁹.

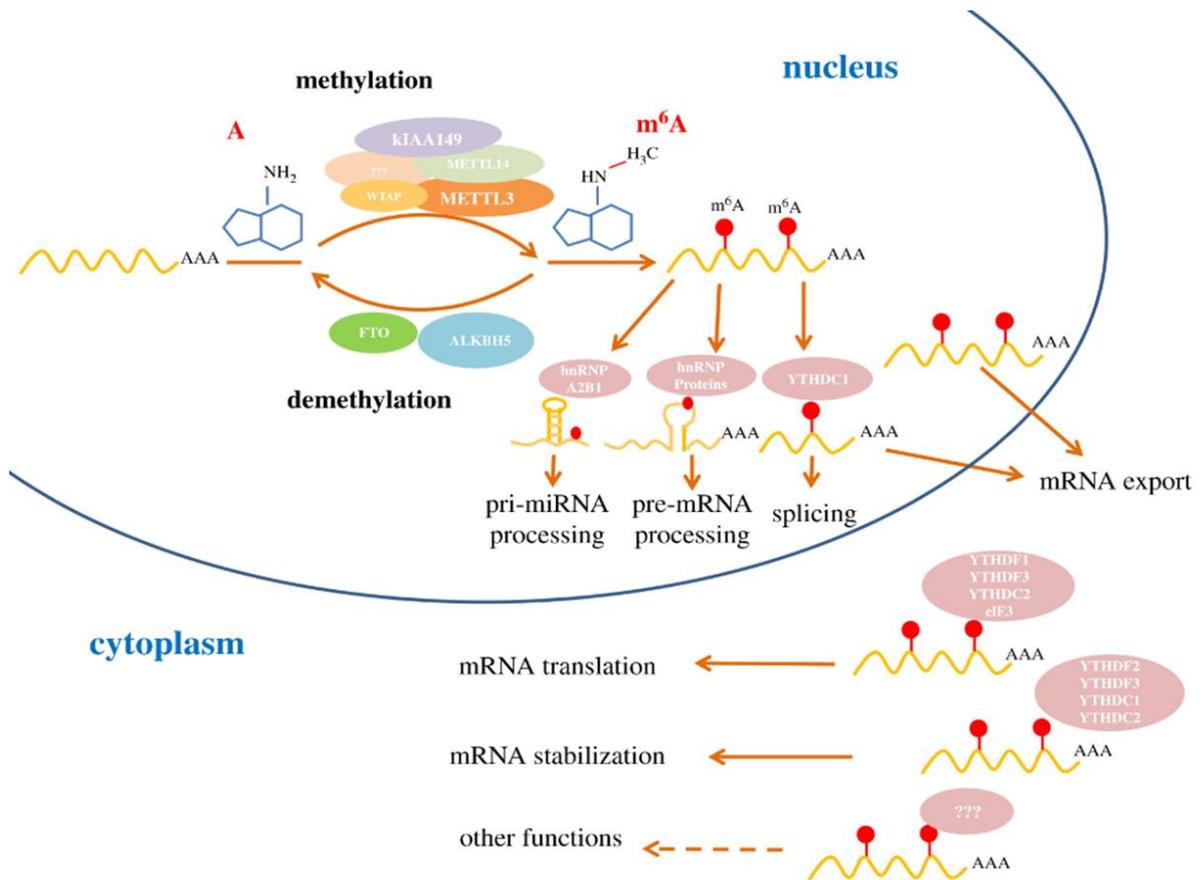
N⁶-metiladenosina (m⁶A) foi descrita em ¹⁰ e é a modificação de mRNA eucariótico mais prevalente descrita até o momento, sendo adicionada em aproximadamente 0.1 a 0.4% ^{11,12} em adeninas no mRNA distribuída em mais de 7.000 mRNAs e 300 RNAs não codificantes (ncRNA) ¹. Pela técnica de MeRIP-seq (imunoprecipitação e sequenciamento), Dan Dominissini e seus colaboradores identificaram as posições de enriquecimento do sinal da adição da m⁶A em mRNA sendo o consenso “motif” DRACH (D = G/A/U, R = G/A, H = A/U/C) ¹. Em células humanas, m⁶A é enriquecida ao redor de códons de parada na região 3' não traduzida (3'UTR). Essa modificação também pode estar presente em íntrons, sugerindo que ela possa ser adicionada antes ou conjuntamente com o Splicing no RNA ¹. A m⁶A é depositada por um complexo de *writers* que compreende as metiltransferases METTL3 (*Methyltransferase-like 3*), METTL14 (*Methyltransferase-like 14*), o componente regulador WTAP (Proteína Associada ao Tumor 1 de Wilms) ^{13,14}, uma proteína adicional VIRMA (*Vir like m⁶A methyltransferase associated*) também conhecida como KIAA1429 ¹⁵ e a proteína de ligação RBM15 ¹⁶. Duas desmetilases que removem m⁶A, FTO (*Fat mass and obesity-associated protein*) ¹⁷ e ALKBH5 (*Alkb homologue 5*) ¹⁸, foram identificadas em mamíferos. A descoberta de proteínas de ligação a m⁶A designadas como *readers* se revelaram fundamentais para a descoberta da função e mecanismo de ação do m⁶A ¹⁹.

A m6A afeta quase todas as etapas do metabolismo do RNA, desde o processamento no núcleo até a tradução e decaimento no citoplasma (**Figura 1**). A tradução de mRNAs é profundamente alterada pelas modificações químicas observadas no mRNA. Por exemplo, YTHDF1 estimula a tradução de mRNAs m6A-metilados recrutando os fatores de início de tradução eIF3 (*eukaryotic translation initiation fator 3*), o que aumenta as taxas de tradução dependentes do 5'cap ²⁰. METTL3 aumenta a tradução dependente de eIF4E (*eukaryotic translation initiation fator 4E*) ²¹ e pode também inibir a exportação do mRNA, enquanto ALKBH5 pode aumentar a exportação do mRNA para o citoplasma ²².

Outros dois estudos recentes indicaram ainda que a presença de m6A na 5' UTR (região 5' não traduzida) melhora a tradução independente do Cap ao mediar a ligação direta de eIF3 e recrutar a subunidade 43S do ribossomo ^{23,24}. A presença de m6A na 5'UTR pode ser resultado de estresse celular, levando a um aumento da tradução independente do 5'Cap em genes de resposta ao estresse ^{24,25}.

Outro mecanismo de regulação relacionado à metilação é a poliadenilação alternativa (APA), que pode ocorrer em mRNAs que contém mais de um sitio de poliadenilação na 3'UTR. APA se correlaciona com processos biológicos como: diferenciação, proliferação e tumorigênese ²⁶. A *writer* VIRMA está associada ao complexo de poliadenilação e quando ocorre a depleção de VIRMA e METTL3, dá-se o aumento da 3'UTR em inúmeros mRNAs facilitando a APA ²⁷.

Deste modo, uma alteração nos níveis de expressão das enzimas relacionadas ao processo de metilação pode levar a um desbalanço nos mecanismos de controle da expressão gênica.



Fonte: Ru et al. ²⁸

Figura 1 - m⁶A é regulada por três grupos de proteínas *writers*, *readers* e *erasers*. As *writers* formam um complexo de metiltransferases (METTL13, METTL14, WTAP, VIRMA, RBM15), que depositam a m⁶A, as *erasers* (FTO e ALKBH) removem a m⁶A, já as proteínas *readers* (YTHDF1/2/3 e HNRNP) são as que identificam a modificação m⁶A.

1.2 MODIFICAÇÕES NO mRNA E CÂNCER

Considerando que as modificações químicas de mRNA regulam a expressão gênica em vários níveis, é esperado que alterações nesses mecanismos possam influenciar o surgimento do câncer. De fato, diversos trabalhos mostraram a influência de m⁶A e suas enzimas modificadoras em tumores.

Em glioblastomas, a redução dos níveis de m⁶A, através do knockdown de METTL3 ou METTL14, resultou em um aumento da capacidade de crescimento e tumorigênese de células tumorais do tipo "stem" ²⁹. Por outro lado, o knockdown de METTL3 em duas linhagens celulares de câncer de pulmão resultou em uma diminuição significativa de migração e proliferação celular em comparação com as células controle ³⁰.

Em pacientes com glioblastoma, a alta expressão da desmetilase ALKBH5 está associada a pior prognóstico, através de redução dos níveis de m6A e aumento da proliferação celular³¹. Por outro lado, aumento de expressão de WTAP também foi associada a um pior prognóstico³².

Na leucemia mielóide aguda, a redução dos níveis de m6A através da superexpressão da desmetilase FTO leva ao crescimento celular e diminuição da apoptose³³. Entretanto, outro estudo correlacionou a redução de expressão desta desmetilase com os estágios mais agressivos de CRCC e pior sobrevida dos pacientes³⁴.

Além disso, a presença de mutações ou alteração no número de cópias de METTL3, METTL14, YTHDF1, YTHDF2, FTO e ALKBH5 estão correlacionadas a pior prognóstico e presença de mutações em p53 em pacientes³⁵. Já a translocação cromossômica t(1;22), encontrada na leucemia megacarioblástica aguda ou leucemia mielóide aguda, leva a formação de uma proteína de fusão entre a metilase RBM15 e o gene MAL, cuja implicação para a tumorigênese não está completamente elucidada³⁶. Por outro lado, foi observada a superexpressão da metilase WTAP em pacientes e o silenciamento desta enzima levou a uma redução na capacidade proliferativa e formação de tumores in vivo³⁷.

No câncer de mama, o aumento de expressão da desmetilase ALKBH5 pode ser observado em resposta a hipóxia, o que leva a redução dos níveis de m6A e diminuição da capacidade tumorigênica³⁸, e altos níveis de expressão da desmetilase FTO foi correlacionada com baixa sobrevida em pacientes com câncer de mama³⁹. No câncer de cólon, a *reader* YTHDC2 possui atividade de helicase desfazendo estruturas secundárias mRNA facilitando a tradução de alvos como HIF1a (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*). Em pacientes, a expressão de YTHDC2 se correlaciona com estágio tumoral e presença de metástase⁴⁰. Em adenocarcinoma de pâncreas e carcinoma renal, a expressão da metilase METTL3 está aumentada, elevando a taxa de tradução de vários mRNAs, crescimento, sobrevida e invasão de células tumorais³³. Além disso, baixos níveis de YTHDF1 foram associados a melhor sobrevida de pacientes com carcinoma hepatocelular⁴¹.

1.3 CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS

O carcinoma de células renais (CCR) representa, aproximadamente, 2% dos tumores e mortes globais por câncer em adultos, é o segundo tipo de câncer mais comum do sistema urinário, sendo 400.000 novos casos diagnosticados em 2018 com mais de 175.000 mortes anuais ⁴². As taxas de incidência variam globalmente, com valores altos em países desenvolvidos como América do Norte e Europa (nos Estados Unidos é o 6° câncer mais frequentemente diagnosticado nos homens e o 8° nas mulheres) e baixas taxas na Ásia e África ^{43,44}.

A incidência do câncer renal varia de homens para mulheres na razão 1,5:1,0, sendo que nos homens é o nono tipo de câncer que mais frequente e nas mulheres o décimo quarto. A média de idade acometida está entre 60 e 70 anos, embora possa ocorrer em qualquer idade. Dentre os fatores de risco estão: obesidade, tabagismo e hipertensão por uso crônico de diuréticos. O aumento da incidência, entretanto, levou à correlação do câncer renal com outros fatores como possuir parente de primeiro grau com a doença, hábitos de dieta específicos, diabetes, infecções do trato urinário, exposição ocupacional a agentes carcinogêneos, como asbesto e radiação e hepatite viral, porém os dados na literatura ainda são inconclusivos.

Em grande parte, o diagnóstico é tido após a realização de exames de imagem para outros fins, como ressonância magnética, tomografia computadorizada e ultrassonografia, pois o CCR tende a ser assintomático. Apenas 10% dos pacientes apresentam a tríade clássica de sintomas: hematúria, dor no flanco e massas palpáveis. Outros sintomas comuns são febre, perda de peso e leucocitose ⁴⁴.

Devido à heterogeneidade dos subtipos histológicos do CCR, cada um possui curso clínico e resposta terapêutica própria e variada. A Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve estes subtipos, sendo os três mais comuns: células claras (CCRCC), que representa 75% do total de casos que compreende uma neoplasia maligna originada dos túbulos renais proximais e recebem essa nomenclatura devido à coloração amarelada presente no citoplasma de suas células tumorais devido à presença de lipídios, papilífero (CCRp – tipo I e tipo II), com 10 a 15% de incidência e cromóforo (CCRcr) com 4 a 5% ⁴⁵.

Mutações e deleções no gene Von Hippel-Lindau (*VHL*) (cromossomo 3p25) são as alterações genéticas mais frequentemente encontradas no CRCC em casos familiares e

esporádicos sendo um importante fator de risco. A inativação deste gene não foi encontrada em outros subtipos histológicos de CCR, sugerindo que a perda de função desse gene se relaciona com o CRCC especificamente ⁴⁶. O VHL tem um importante papel na regulação dos fatores induzidos por hipóxia *Hypoxia-inducible factors* (HIFs). Com a inativação do VHL a subunidade HIF α é estabilizada levando a ativação constitutiva de HIF1/2, que são consideradas uma das principais causas do desenvolvimento de CRCC ⁴⁷. Mecanismo de expressão genica ativados por HIFs incluem angiogênese, metabolismo anaeróbico, inflamação e metástase ⁴⁸. Outros genes frequentemente encontrados mutados em pacientes com CRCC após o VHL são, *complex subunit Polybromo-1 (PBRM1)*, *SET domain containing 2, histone lysine methyltransferase (SETD2)* e *BRCA1 Associated Protein 1 (BAP1)*, correspondendo respectivamente a 40%, 13% e 10% dos pacientes com este tipo tumoral ⁴⁹.

O diagnóstico histológico do câncer renal além de definir o subtipo tumoral inclui o estadiamento, que prevê a avaliação do grau nuclear, características sarcomatóides, invasão vascular e o sistema de coleta, necrose tumoral e gordura peri-renal ⁵⁰.

Desde a década de 70, foram propostas algumas classificações para o grau histológico de CCR, sendo a classificação de Fuhrman em 1982 a mais aceita pela comunidade internacional para CRCC, este sistema avalia simultaneamente o tamanho, irregularidade e destaque nuclear. Porém, mesmo com grande aceitação essa classificação apresentou alguns problemas, sendo a maior crítica sobre a classificação de Fuhrman é que o sistema proposto analisa três parâmetros diferentes simultaneamente. Em 2012, foi proposta uma nova classificação de grau histológico pela *International Society of Urological Pathology (ISUP)* ⁵¹. Outra variável histológica muito importante é a necrose tumoral, podendo afetar o prognóstico de pacientes com CCR, apresentando maior risco de progressão da doença ⁵².

De acordo com a *American Joint Committee on Cancer*, o estadiamento do câncer renal é realizado através do sistema *Tumour-Node-Metastasis (TNM)*, que é uma ferramenta muito importante para estratificação dos pacientes em que: T indica o tamanho do tumor e se existe disseminação para outras áreas; N descreve disseminação para os linfonodos regionais e M indica se há metástase em outras partes do corpo ⁵³. Esse sistema é periodicamente submetido a revisões. Os casos analisados por este estudo foram classificados pela 7ª edição.

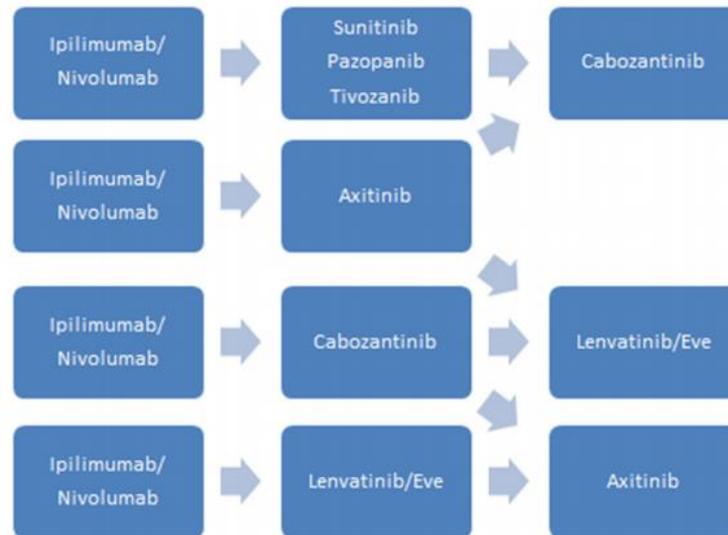
As técnicas de imagem como a tomografia computadorizada (TC) associada à análise histopatológica do material proveniente de biópsia compõem o diagnóstico clínico. Conhecer o estadio do tumor auxilia na escolha do tratamento e no conhecimento do prognóstico do

paciente. O câncer de rim tende a ser assintomático em suas fases iniciais, o que dificulta o diagnóstico precoce. Com isso, estima-se que 20 a 30% dos pacientes são diagnosticados em estadios avançados ou já com metástases. As taxas de sobrevida dos pacientes caem para 50% quando diagnosticados no estadio III e <10% quando o tumor se encontra no estadio IV ^{54,55}.

Existem determinados fatores que são relacionados com um menor tempo de sobrevida para pacientes em estágio avançado da doença, como: nível de lactato desidrogenase (LDH) e cálcio sanguíneo alto, anemia, doença disseminada para dois ou mais órgãos, intervalo menor que um ano desde o diagnóstico até a necessidade de tratamento sistêmico e estado geral de saúde ruim. Em geral, pacientes que não possuem nenhum desses fatores são considerados com bom prognóstico, enquanto os que apresentam 1 ou 2 fatores são considerados com prognóstico intermediário e os que têm 3 ou mais com prognóstico reservado e pouca probabilidade de responder bem aos tratamentos oferecidos.

O tratamento eletivo para o CCR é a ressecção cirúrgica por nefrectomia e as características do paciente e extensão da doença são fatores que influenciam o tratamento. O tumor pode ser ablacionado e biopsiado para coloração por imuno-histoquímica para determinar a terapia sistêmica ⁵⁶. Por algum tempo, os únicos tratamentos para o CCR sistêmico eram os agentes imunoterápicos, como interleucina-2 e interferon-alfa (IFN α), que apresentavam taxa de resposta de 10 a 22%. Contudo, pequenas moléculas e anticorpos como sunitinib, sorafenib e bevacizumab surgiram para o tratamento do CCR e atuam por diferentes mecanismos moleculares ⁵⁷.

Para a doença CRCC metastática, tem ocorrido um avanço substancial no tratamento, e foi aprovado pelo FDA em 2018 como primeira linha de tratamento, os imunoterápicos em combinação Nivolumab (*anti-programmed cell death 1* (PD-1)) e Ipilimumab (*anti-cytotoxic T-lymphocyte – associated antigen 4* (CTLA-4)) ⁵⁸. Mesmo com os inibidores de checkpoint Nivolumabi/Ipilimumab apresentando bons resultados para os pacientes com risco intermediário e alto risco da doença, outros medicamentos também são indicados, sendo avaliado a resposta de cada caso ⁵⁹ (**Figura 2**).



Fonte: de Velasco et al. ⁵⁹.

Figura 2 - Tratamento de primeira e segunda linha para pacientes com o CRCC metastático

A doença que apresenta recidiva após a cirurgia com progressão metastática pode acometer mais comumente os órgãos como pulmões, fígado, ossos e cérebro, porém as glândulas suprarrenais e o rim contralateral também podem ser invadidos ⁶⁰. Sendo assim, é necessário um aumento da compreensão dos mecanismos biológicos associados a estes tumores para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

1.4 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama acomete uma em cada oito mulheres em países desenvolvidos e continua sendo o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, o segundo mais frequente na população e a quinta causa de morte por neoplasias ⁶⁰. No Brasil, é o segundo tipo mais comum, após o câncer de pele não melanoma, afetando mulheres de todas as regiões, com taxas mais altas no Sul e Sudeste. Em 2022, a estimativa para novos casos de câncer de mama é de 66.280. O câncer de mama é uma doença com incidência aumentada a partir dos 50 anos e homens também podem ser acometidos, mas estima-se que apenas 1% dos casos de câncer de mama são representados por homens ⁶¹.

Devido a melhoria dos tratamentos e detecção precoce, a mortalidade decorrente do câncer de mama em países desenvolvidos diminuiu nos últimos anos, em contrapartida, a incidência tem sido aumentada devido ao número de diagnósticos que podem ser explicados

pela implantação de exame de mamografia como rastreamento. Este cenário, no entanto, também reflete falha nas estratégias de prevenção, uma vez que a prevenção representa a melhor relação custo-benefício para o controle do câncer, pois o câncer de mama ainda é a principal causa de morte relacionada ao câncer em mulheres em todo o mundo ⁶².

O diagnóstico precoce do câncer de mama é fundamental para que ocorra um tratamento eficaz e o paciente obter bom prognóstico. Os exames de imagem contribuem para o rastreamento e avaliação precisa das lesões, como: ultrassonografia, mamografia e ressonância magnética. A combinação dos exames de imagem com o exame clínico e avaliação anatomopatológico formam o diagnóstico completo para o câncer de mama ⁶³. Aproximadamente um terço dos casos de câncer de mama são diagnosticados em massas palpáveis. Nos Estados Unidos, 62% dos casos diagnosticados são tumores confinados às mamas, 31% já acometeram os linfonodos regionais e 6% são metastáticos, com envolvimento de locais distantes da mama e linfonodos regionais ⁶⁴.

Os principais fatores de risco são: predisposição genética, exposição à radiação ionizante, alta densidade mamária, histórico de neoplasias atípicas, exposição a estrogênios (endógenos e exógenos, incluindo reposição hormonal de longa duração. Estilo de vida que inclui dieta, consumo de álcool e obesidade também são fatores que contribuem para o aumento da incidência do câncer ⁶².

O câncer de mama é uma doença altamente heterogênea, composta por inúmeras entidades distintas que têm diferentes características biológicas e de comportamento clínico que afeta a resposta à terapia e o que o torna um grande desafio para tratamento. De acordo com a histologia, o câncer de mama pode ser classificado em três principais categorias: carcinoma ductal invasivo (50-75% dos pacientes), carcinoma lobular invasivo (5-15%) e outras histologias raras, como misto de ductal e lobular ⁶⁴.

O grau histológico do tumor e tipo histológico são duas das mais importantes características intrínsecas. Um grande número de tipos histológicos e variantes tem sido descritos na literatura, no entanto, o seu reconhecimento como entidades histológicas distintas tem sido um assunto de debate. Atualmente, a OMS reconhece a existência de pelo menos 18 tipos histológicos distintos de câncer de mama invasivo ⁶⁵. A classificação é separada em quatro grupos distintos (**Figura 3**) associados com diferentes prognósticos. O tipo tumoral chamado luminal A (LA), são os mais comuns e possuem o melhor prognóstico, sendo positivos para os receptores de Estrógeno (RE), Progesterona (RP) (Podendo ser esses dois marcadores

agrupados e chamados de Receptores Hormonais (RH)) e negativo para a superexpressão do gene HER2 e positivo para Ki67 em menos de 20% dos casos ⁶⁶. A principal forma de tratamento é a terapia endócrina com Tamoxifeno e inibidores de Aromatase.

Os tumores positivos para RE, expressão de Ki-67 superior a 20% ou aumento no número de cópias do gene HER2 são chamados de luminal B (LB). Embora muitos pacientes de câncer de mama do tipo luminal possuam bom prognóstico com o tratamento terapia endócrina, o risco de recorrência pode se estender por 20 anos ou mais, principalmente em pacientes jovens ^{67,68}.

O terceiro grupo é caracterizado pela superexpressão do gene HER2 por um aumento no número de cópias neste gene. Estes tumores mamários apresentam um índice mitótico elevado e um pior prognóstico. Tumores deste grupo apresentam negatividade para a expressão dos RH e, de uma maneira geral, expressão de Ki-67 superior a 20% ou aumento da expressão proteica de HER2 sendo estas expressões confirmadas por Imunohistoquímica (IHC) ou *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) quando necessário para confirmar a amplificação do gene *HER2*. Este grupo apresenta uma incidência em torno dos 10-20%, sendo utilizados na terapia os anticorpos monoclonais (Trastuzumab) e inibidores de tirosina quinase (Lapatinibe) ^{69,70}.

O último grupo é conhecido como Basal-like e compreende uma considerável 9 quantidade de tipos tumorais que não se enquadram nos outros 3 grupos anteriores. Dentre eles, o subgrupo mais conhecido é o câncer de mama chamado de Triplo Negativo (TN). O triplo-negativo (sem expressão de RE, receptor de progesterona RP e HER2), tem como opção a quimioterapia a base de platina e utilização de inibidores de Poly ADP-ribose polymerase (PARP), para os paciente que apresentação mutações em BRCA1 ⁷¹. Este tipo tumoral apresenta altas taxas proliferativas e prognóstico clínico extremamente desfavorável. O subtipo basal e os subtipos luminais possuem etiologias distintas e para vários propósitos podem ser considerados doenças distintas ^{67,68}

Molecular Subtypes	Luminal A	Luminal B		HER2+	TN
		(HER2-)	(HER2+)		
Biomarkers	ER+ PR+ HER2- Ki67low	ER+ PR- HER2- Ki67high	ER+ PR-/+ HER2+ Ki67low/high	ER- PR- HER2+ Ki67high	ER- PR- HER2- Ki67high
Frequency of Cases (%)	40–50	20–30		15–20	10–20
Histological Grade	Well Differentiated (Grade I)	Moderately Differentiated (Grade II)		Little Differentiated (Grade III)	Little Differentiated (Grade III)
Prognosis	Good	Intermediate		Poor	Poor
Response to Therapies	Endocrine	Endocrine Chemotherapy	Endocrine Chemotherapy Target Therapy	Target Therapy Chemotherapy	Chemotherapy PARP Inhibitors

ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2.

Fonte: Nascimento e Otoni ⁶⁹.

Figura 3 - Subtipos moleculares do carcinoma de mama

Para pacientes com HER2 baixo o consenso é de que a terapia seja direcionada da mesma forma que pacientes com HER2 negativo. São realizadas terapias endócrinas: tamoxifeno, inibidores da aromatase com ou sem inibidores da quinase 4 e 6 dependentes de ciclina ou everolimus ou alpelisib. A imunoterapia pode ser direcionada a pacientes que possuem expressão do receptor de ligante de morte 1 programado (PD-L1) ou inibidores de poli ADP ribose polimerase para aqueles com mutações germinativas BRCA ⁷².

Deste modo, ampliar o conhecimento para estes tipos tumorais pode levar ao desenvolvimento de novas terapias para os subtipos de pior prognóstico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Neste projeto, pretendemos verificar a expressão das proteínas *writers*, *readers* e *erasers* por imunohistoquímica (IHC) e as relações destas com aspectos, clínicos e histopatológicos e taxas de sobrevida global e livre de recidiva e progressão no Carcinoma Renal de Células Claras e Carcinoma de Mama.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Padronização da técnica de IHC para os anticorpos correspondentes as proteínas FTO, HNRNP C1/C2, RBM15B, KIAA1429, METTL14, YTHDF2 em tecidos de CRCC e carcinoma de mama;
- Quantificação da expressão das proteínas FTO, HNRNP C1/C2, RBM15B, KIAA1429, METTL14, YTHDF2 em CRCC e carcinoma de mama;
- Associação e correlação dos níveis de expressão das proteínas FTO, HNRNP C1/C2, RBM15B, KIAA1429, METTL14, YTHDF2 com os dados clínicos e histopatológicos no CRCC e Carcinoma de mama.
- Análise do impacto da expressão imunohistoquímica das proteínas FTO, HNRNP C1/C2, RBM15B, KIAA1429, METTL14, YTHDF2 em CRCC e carcinoma de mama.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Para este projeto, foram incluídas amostras de tecido normal adjacente ao tumor de CRCC, tecido de tumor primário de CRCC e produto de metástase dos pacientes com CRCC organizados em 7 tissue microarray (TMAs), construídos previamente pela Dra. Isabela Werneck da Cunha no Departamento de Urologia da Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. Foram também, incluídas amostras de carcinoma de mama organizados em 2 TMAs previamente construídos por outros pesquisadores e médicos patologistas da instituição A.C.Camargo Cancer Center. 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 Cancer A. C. Camargo.

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 2440/17D, foi liberado o acesso ao sistema de prontuário eletrônico da instituição H2TC, onde foram coletados os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes que as amostras de tecidos foram incluídas no TMAs de CRCC. Foi realizada uma revisão dos bancos de dados pré existentes em planilha de Excel, previamente disponibilizados pelos Profs. Dr. Walter Henrique da Costa e Dr. Stenio de Cassio Zequi do Departamento de Urologia do A.C.Camargo Cancer Center. O banco de dados pré existente dos pacientes incluídos no TMAs de Carcinoma de Mama, foram coletados e organizados em planilha de Excel pela Dra. Glauca Hajj, pesquisadora no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center.

Todos os dados clínicos retirados dos prontuários, para o banco de dados de CRCC e Carcinoma de Mama estão armazenados na ferramenta de captura de dados eletrônicos (REDCap)^{73,74}, hospedados no servidor do A.C.Camargo Cancer Center. A descrição do banco de dados de CRCC e Carcinoma de Mama utilizados para análise neste projeto, encontram-se disponíveis na **(Tabela 2)** e **(Tabela 3)**, respectivamente.

Este projeto é um estudo retrospectivo, não solicitando a participação direta dos pacientes, não acarretando interferência e nem alteração da estratégia terapêutica ou

seguimento pós-operatório. Todo material utilizado nesta pesquisa, encontram-se armazenados em bloco de parafina e a utilização dos mesmos não necessitou solicitação do consentimento pós-informado dos pacientes, pois a autorização da utilização dos materiais armazenados em blocos de parafina encontra-se nos TCLEs assinados pelos pacientes previamente.

Tabela 2 - Descrição do banco de dados de CRCC utilizados no projeto.

		Carcinoma Renal de Células Claras				
Variável		METTL14 N (%)	FTO N (%)	RBM15B N (%)	YTHDF2 N (%)	HNRNPC1/C2 N (%)
Sexo	Feminino	244 (36,85)	229 (37,35)	213 (36,78)	220 (36,91)	233 (37,39)
	Masculino	418 (63,14)	384 (21,21)	366 (63,21)	376 (63,08)	390 (62,60)
	Total	662 (100)	613 (100)	579 (100)	596 (100)	623 (100)
Outra neoplasia	Sim	157 (30,90)	147 (31,27)	135 (39,47)	140 (30,30)	150 (31,12)
	Não	351 (69,09)	323 (68,72)	207 (60,52)	322 (69,69)	332 (68,87)
	Total	508 (100)	470 (100)	342 (100)	462 (100)	482 (100)
Risco de histórico familiar	Sim	275 (68,57)	253 (67,82)	240 (67,22)	253 (67,64)	260 (68,42)
	Não	126 (31,42)	120 (32,17)	117 (32,77)	121 (32,35)	120 (31,57)
	Total	401 (100)	373 (100)	357 (100)	374 (100)	380 (100)
Estadiamento clínico	I	440 (67,48)	409 (67,94)	383 (67,19)	395 (67,40)	415 (68,70)
	II	50 (7,66)	44 (7,30)	43 (7,54)	43 (7,33)	36 (5,96)
	III	111 (17,02)	103 (17,10)	101 (17,71)	101 (17,23)	106 (17,54)
	IV	51 (7,82)	46 (7,64)	43 (7,54)	47 (8,02)	47 (7,78)
	Total	652 (100)	602 (100)	570 (100)	586 (100)	604 (100)
Metástase ao diagnóstico	Sim	44 (6,79)	41 (6,79)	39 (6,83)	43 (7,28)	41 (6,68)
	Não	604 (93,20)	562 (93,20)	532 (93,16)	547 (92,71)	572 (93,31)
	Total	648 (100)	603 (100)	571 (100)	590 (100)	613 (100)
Presença de necrose	Sim	171 (37,33)	162 (47,36)	156 (47,85)	159 (46,90)	168 (46,28)
	Não	287 (62,66)	180 (52,63)	170 (52,14)	180 (53,09)	195 (53,71)
	Total	458 (100)	342 (100)	326 (100)	339 (100)	363 (100)
PRBM1	Sim	430 (77,06)	442 (78,78)	316 (72,31)	388 (76,98)	406 (77,92)
	Não	128 (22,93)	119 (21,21)	121 (27,68)	116 (23,01)	115 (22,07)
	Total	558 (100)	561 (100)	451 (100)	504 (100)	521 (100)
Isup	1	8 (2,17)	7 (3,07)	7 (2,18)	7 (2,09)	6 (1,70)
	2	184 (50,13)	165 (72,36)	158 (49,22)	168 (50,29)	173 (49,28)
	3	133 (36,23)	120 (8,77)	117 (36,44)	118 (35,2)	131 (37,32)
	4	42 (11,44)	36 (15,78)	39 (12,14)	41 (12,27)	41 (11,68)
	Total	367 (100)	228 (100)	321 (100)	334 (100)	351 (100)

Cont/ Tabela 2

		Carcinoma Renal de Células Claras				
Variável		METTL14 N (%)	FTO N (%)	RBM15B N (%)	YTHDF2 N (%)	HNRNPC1/C2 N (%)
Estadiamento	pT1	457 (69,03)	427 (69,65)	398 (68,7)	411 (68,95)	429 (68,86)
	pT					
	pT2	57 (8,61)	49 (7,99)	50 (8,63)	50 (8,38)	53 (8,50)
	pT3	139 (20,99)	130 (21,20)	125 (21,58)	129 (21,64)	133 (21,34)
	pT4	9 (1,35)	7 (1,14)	6 (1,03)	6 (1,00)	8 (1,28)
	Total	662 (100)	613 (100)	579 (100)	596 (100)	623 (100)
Estadiamento	pN0	169 (25,60)	158 (25,90)	150 (26,08)	150 (24,23)	159 (25,64)
	pN					
	pN1	16 (2,42)	16 (2,62)	14 (2,43)	15 (2,42)	16 (2,58)
	pNX	475 (71,96)	436 (71,47)	411 (71,47)	454 (73,34)	445 (71,77)
	Total	660 (100)	610 (100)	575 (100)	619 (100)	620 (100)
Estadiamento	pM0	619 (94,64)	577 (94,74)	542 (94,75)	557 (94,40)	584 (94,49)
	pM					
	pM1	35 (5,35)	32 (5,25)	30 (5,24)	33 (5,59)	34 (5,50)
	Total	654 (100)	609 (100)	572 (100)	590 (100)	618 (100)
Sobrevida	0	565 (85,47)	526 (85,66)	494 (85,46)	509 (85,54)	536 (86,17)
	Global					
	1	96 (14,52)	88 (14,33)	84 (14,53)	86 (14,45)	86 (13,82)
	Total	661 (100)	614 (100)	578 (100)	595 (100)	622 (100)
Sobrevida	0	496 (85,22)	464 (85,76)	432 (85,71)	448 (86,31)	469 (85,42)
	livre de					
	1	86 (14,77)	77 (14,23)	72 (14,28)	71 (13,68)	80 (14,57)
	Total	582 (100)	541 (100)	504 (100)	519 (100)	549 (100)

Tabela 3 - Descrição do banco de dados de carcinoma de mama utilizados no projeto.

		Carcinoma de mama				
Variável		METTL4 N (%)	FTO N (%)	KIAA1429 N (%)	YTHDF2 N (%)	HNRNP C1/C2 N (%)
Menopausa	Pré	57 (45,23)	55 (39,85)	47 (38,21)	56 (41,48)	55 (39,85)
	Pós	69 (54,76)	83 (60,14)	76 (61,78)	79 (58,51)	83 (60,14)
	Total	126 (100)	138 (100)	123 (100)	135 (100)	138 (100)
Risco de	Sim	83 (68,59)	96 (72,72)	85 (72,64)	61 (46,56)	94 (71,21)
	histórico					
	Não	38 (31,40)	36 (27,27)	32 (27,35)	70 (53,43)	38 (28,78)
	Total	121 (100)	132 (100)	117 (100)	131 (100)	132 (100)
Outra neoplasia	Sim	18 (15,25)	25 (19,08)	22 (17,88)	23 (17,96)	23 (71,21)
	Não	100 (84,74)	106 (80,91)	101 (82,11)	105 (82,03)	107 (28,78)
	Total	118 (100)	131 (100)	123 (100)	128 (100)	132 (100)
Estadiamento	I	34 (25,95)	39 (27,46)	36 (28,80)	41 (29,28)	41 (28,47)
	clínico					
	II	74 (56,48)	75 (52,81)	65 (52,00)	73 (52,14)	75 (52,08)
	III	20 (15,26)	25 (17,60)	21 (16,80)	22 (15,71)	25 (17,36)
	IV	3 (2,29)	3 (2,11)	3 (2,40)	4 (2,85)	3 (2,08)
	Total	131 (100)	142 (100)	125 (100)	140 (100)	144 (100)
Presença de	Sim	57 (43,18)	56 (38,88)	44 (35,2)	55 (39,00)	57 (34,96)
	necrose					
	Não	75 (56,81)	88 (61,11)	81 (64,8)	86 (60,99)	106 (65,03)
	Total	132 (100)	144 (100)	125 (100)	141 (100)	163 (100)

Cont/ Tabela 4

Carcinoma de mama						
Variável		METTL4 N (%)	FTO N (%)	KIAA1429 N (%)	YTHDF2 N (%)	HNRNP C1/C2 N (%)
Grau Histológico	I	12 (8,95)	12 (8,45)	15 (12,19)	13 (9,42)	13 (9,15)
	II	61 (45,52)	67 (47,18)	64 (52,03)	64 (46,37)	66 (46,47)
	III	60 (44,77)	62 (43,66)	43 (34,95)	60 (43,47)	62 (43,66)
	IV	1 (0,74)	1 (0,70)	1 (0,81)	1 (0,72)	1 (0,70)
	Total	134 (100)	142 (100)	123 (100)	138 (100)	142 (100)
Grau nuclear	1	1 (0,75)	1 (0,68)	2 (1,61)	2 (1,41)	2 (1,39)
	2	26 (19,69)	31 (22,06)	32 (25,80)	31 (21,99)	31 (21,67)
	3	105 (79,54)	112 (77,24)	90 (72,58)	108 (76,60)	110 (76,92)
	Total	132 (100)	145 (100)	124 (100)	141 (100)	143 (100)
Tipo Histológico	IDC	122 (5,42)	126 (88,11)	107 (86,29)	115 (88,46)	126 (88,11)
	ILC	7 (94,57)	17 (11,88)	17 (13,70)	15 (11,53)	17 (11,88)
	Total	129 (100)	143 (100)	124 (100)	130 (100)	143 (100)
Estadiamento T	T1	48 (36,6)	59 (41,25)	59 (41,25)	60 (42,85)	59 (41,54)
	T2	68 (51,90)	65 (45,45)	65 (45,45)	63 (45,00)	65 (45,77)
	T3	11 (8,39)	12 (8,39)	10 (6,99)	12 (8,57)	11 (7,74)
	T4	4 (3,05)	7 (4,89)	9 (6,29)	5 (3,57)	7 (4,92)
	Total	131 (100)	143 (100)	143 (100)	140 (100)	142 (100)
Estadiamento N	N0	62 (47,32)	71 (47,97)	65 (50,00)	70 (50,00)	71 (50,00)
	N1	56 (42,74)	56 (37,83)	50 (38,46)	57 (40,71)	56 (39,43)
	N2	13 (9,92)	21 (14,18)	15 (11,53)	13 (9,28)	15 (10,56)
	Total	131 (100)	148 (100)	130 (100)	140 (100)	142 (100)
Subtipo molecular	LA	41 (31,06)	50 (34,72)	51 (54,83)	48 (34,28)	45 (32,14)
	LB	35 (26,51)	35 (24,30)	34 (3,22)	34 (24,28)	37 (26,42)
	HER2+	7 (5,30)	6 (4,16)	6 (6,45)	5 (3,57)	6 (4,28)
	TN	49 (37,12)	53 (36,80)	33 (35,48)	53 (37,85)	52 (37,14)
	Total	132 (100)	144 (100)	93 (100)	140 (100)	140 (100)
Expressão p53	Positivo	33 (36,26)	45 (39,47)	40 (37,03)	42 (38,88)	44 (39,63)
	Negativo	58 (63,73)	69 (60,52)	68 (62,96)	66 (61,11)	67 (60,36)
	Total	91 (100)	114 (100)	108 (100)	108 (100)	111 (100)
Expressão KI67	0% -100%	126	144	125	141	143
Índice mitótico	0 – 100	131	144	125	140	143
Sobrevida Global	0	115 (87,78)	129 (89,58)	115 (92,00)	126 (89,36)	128 (89,51)
	1	16 (12,21)	15 (10,41)	10 (8,00)	15 (10,63)	15 (10,48)
	Total	131 (100)	144 (100)	125 (100)	141 (100)	143 (100)
Sobrevida livre de progressão	0	105 (81,39)	117 (82,39)	104 (84,55)	114 (82,01)	117 (82,97)
	1	24 (18,60)	25 (17,60)	19 (15,44)	25 (17,98)	24 (17,02)
	Total	129 (100)	142 (100)	123 (100)	139 (100)	141 00)

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídas amostras de pacientes com CRCC e Carcinoma de Mama já organizadas em TMAs pelo Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Center, com prontuários disponíveis no H2TC e TCLE previamente assinado pelos pacientes.

Foram excluídas amostras onde não houve representação adequada da neoplasia no bloco de parafina, presença de necrose ou fibrose excessiva ou material inadequado que impossibilitou a quantificação do tecido.

3.3 TÉCNICA DE TISSUE MICROARRAY (TMA)

Essa técnica, possibilita o estudo da expressão proteica de tumores em larga escala através de ensaios de imunohistoquímica (IHC). Permite a análise rápida de até mil casos diferentes em apenas uma lâmina histológica, com uma acurácia comprovada que justifica seu emprego com vantagens de custo e de tempo para pesquisas em grandes centros com grandes bancos de dados ^{75,76}.

As construções dos TMAs foram realizadas após serem escolhidas e identificadas as áreas adequadas nas neoplasias através de uma marcação circular em cada nova lâmina de vidro na região mais representativa do tumor e correspondente ao bloco de parafina escolhido.

Utilizando o tissue microarray (Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland) a área de interesse foi retirada com um “core” de 0,6mm de cada bloco doador e transferido para outro bloco chamado de receptor. A partir desse novo bloco foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro cortadas através de microtomia mecânica na espessura de 4µm. Para uma amostragem ser considerada satisfatória é necessária uma representação de pelo menos 10% (**Figura 4**) de área circular do core de 0,6mm após uma análise no microscópio óptico de vários níveis de corte.

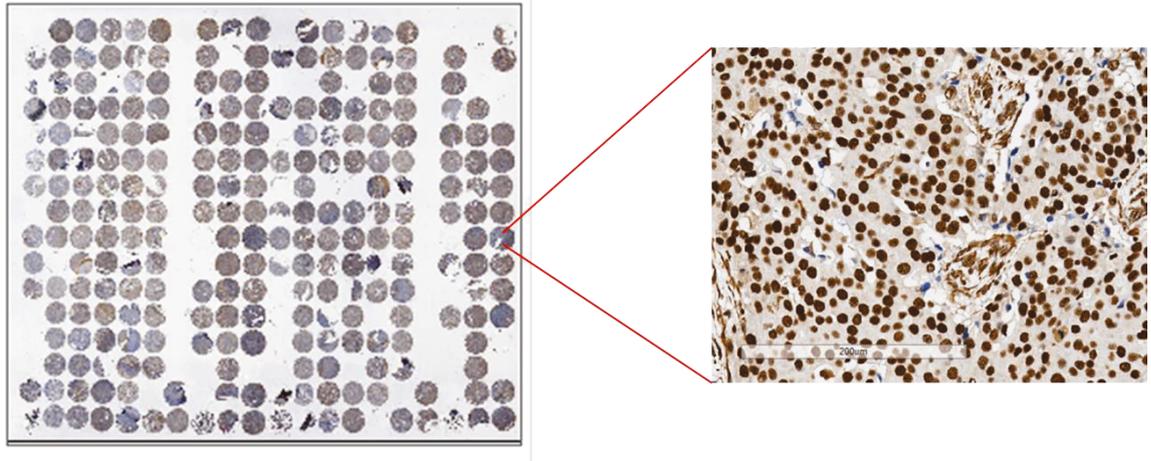


Figura 4 - Figura representativa de um TMA. Imagem retirada do acervo pessoal.

3.4 REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)

Os cortes provenientes dos TMAs de CRCC foram desparafinizados através de banhos em xilol. A recuperação antigênica foi padronizada podendo ser utilizados os seguintes tampões: citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 10 mM + 0,05% Tween, pH 6,0 ou tris base 10 mM + EDTA 1 mM+ 0,05% Tween, pH9,0. A reação foi realizada na panela de pressão durante o período de 20 ou 40 minutos. Para bloquear atividade de peroxidase endógena, utilizamos a solução de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) 10V, lavando a lâmina 4 vezes por 5 minutos. Para o bloqueio de reações inespecíficas foi utilizada a solução de Protein Block (abcam® - ab64226) por 60 minutos, em temperatura ambiente, dentro de câmara úmida. Cada anticorpo primário foi incubado por um período de 12 a 16 horas on (*overnight*) a 4°C diluído em Tris-HCl (50 mM) pH 7,5 + 1% BSA. Para os anticorpos, METTL14 (cat. HPA038002, Sigma Aldrich), hnRNP C1/C2 (cat. sc-32308, Santa Cruz Biotechnology) Fatso (cat. sc-271713, Santa Cruz Biotechnology), YTHDF2 (cat. HPA059621, Sigma Aldrich) e RBM15B (cat. HPA036645, Sigma Aldrich) foi realizada a padronização da titulação. Na revelação utilizamos o Kit Dako® - Liquid DAB + Substrate Chromogen System – K3468 de acordo com as instruções do fabricante. Os cortes foram corados com hematoxilina (cat. HHS32-1L, Sigma Aldrich). Após o ensaio de IHC, as lâminas foram montadas com meio de montagem Entellan (cat. 107961, Merck). A descrição da reação para todos os anticorpos está na **(Tabela 4)**.

Tabela 5 - Descrição das principais características e condições aplicadas na reação de IHC para os anticorpos METTL14, HNRNPC1/C2, FATSO, YTHDF2 e RBM15B nos TMAs de CRCC. ON*=overnight.

Tecido	Anticorpo	Recuperação Antigênica	Bloqueio proteico	Tempo de incubação	Título do anticorpo
CRCC	METTL14	Citrato 10mM pH6 20 min	Protein block	ON* 4°C	1:100
	HNRNP C1/C2	Tris base 10mM + EDTA 1mM+ Tween 0,05% pH9 20 min	Protein block	ON* 4°C	1:100
	Fatso	Tris base 10mM + EDTA 1mM+ Tween 0,05% pH9 20 min	Protein block	ON 4°C	1:20
	YTHDF2	Tris base 10mM + EDTA 1mM+ Tween 0,05% pH9 20 min	Protein block	ON 4°C	1:100
	RBM15B	Citrato 10mM pH6 40 min	Protein block	ON 4°C	1:100

As reações para os anticorpos hnRNP C1/C2 (cat. sc-32308, Santa Cruz Biotechnology), METTL14 (cat. HPA038002, Sigma-Aldrich) e KIAA1429 (cat. HPA031530, Sigma-Aldrich) no TMA de carcinoma de mama, foram realizadas no sistema automatizado Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems) seguindo as instruções do fabricante pela Core Facility de Histologia-IHQ-TMA do AC Camargo. Brevemente, as lâminas foram desparafinizadas utilizando a solução EZprep (cat. 950-102, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). As recuperações antigênica foram feitas com os reagentes *cell conditioning 1* (cat. 950-224, Ventana Medical Systems, Inc.) ou *cell conditioning 2* (cat. 950-223, Ventana Medical Systems, Inc.) a 95°C. Em alguns casos, um kit de amplificação foi utilizado (cat. 760-099 Ventana Medical Systems, Inc.). Os anticorpos foram incubados através dos kits de detecção Ultraview (cat. 760-500, Ventana Medical Systems) ou OptiView DAB IHC Detection Kit (cat. 760-700, Ventana Medical Systems) por 60 minutos. Todos os anticorpos foram previamente diluídos na solução Antibody diluent (cat. ab64211, Abcam). Os detalhes da recuperação e da diluição dos anticorpos estão descritos na **(Tabela 5. A)**. Após o ensaio de IHC, as lâminas foram montadas com meio de montagem Entellan (cat. 107961, Merck). Para os anticorpos Fatso (cat. sc-271713, Santa Cruz Biotechnology) e YTHDF2 (cat. HPA059621, Sigma Aldrich) e no TMA de carcinoma de mama, foram realizadas reações de IHC manual, seguindo as mesmas especificações do protocolo dos TMAs de CRCC descrito acima. Os detalhes da recuperação e da diluição dos anticorpos estão descritos na **(Tabela 5. B)**.

Tabela 6 - Descrição das principais características e condições aplicadas na reação de IHC no carcinoma de mama. (A) Condições aplicadas na reação de IHC pelo sistema automatizado Ventana BenchMark XT para os anticorpos METTL14 e HNRNP C1/C2 KIAA1429 no TMA de carcinoma de mama. (B) Condições aplicadas na reação de IHC manual para os anticorpos YTHDF2 e Fatso no TMA de carcinoma de mama.

Tecido	Anticorpo	Recuperação antigênica	Kit detecção	Tempo de incubação	Título do anticorpo	Amplificação
Carcinoma de mama	METTL14	Cell conditioning 2 30 min	Optiview	60 min	1:100	Não se aplica
	HNRNP C1/C2	Cell conditioning 1 30 min	Ultraview	60 min	1:5000	Não se aplica
	KIAA1429	Cell conditioning 2 30 min	Optiview	60 min	1:100	4 min

Tecido	Anticorpo	Recuperação Genica	Bloqueio proteico	Tempo de incubação	Título do anticorpo
Carcinoma de mama	Fatso	Tris base 10mM + EDTA 1mM+ Tween 0,05% pH9 20 min	Protein block	ON 4°C	1:20
	YTHDF2	Tris base 10mM + EDTA 1mM+ Tween 0,05% pH9 20 min	Protein block	ON 4°C	1:100

3.5 ANÁLISE DAS REAÇÕES DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)

As análises das reações de IHC para os TMAs de CRCC, foram realizadas manualmente pela Dra. Stephania Bezerra do Departamento da Anatomia patológica do A.C. Camargo Cancer Center e a Dra. Isabela Werneck da Cunha do Departamento da Anatomia Patológica da Rede D'OR São Luiz. As reações de IHC nos TMAs de Carcinoma de Mama foram analisadas pela Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo do Departamento da Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center. Para realizar as quantificações, as médicas Patologistas não tinham conhecimento das informações clínicas das amostras analisadas. O parâmetro determinado para a quantificação dos TMAs de CRCC foi classificar quantitativamente em escala de 0% a 100% a marcação positiva do núcleo das células do tecido normal adjacente ao tumor, tumor primário e tecido de metástase. Para os TMAs de Carcinoma de mama, foram estabelecidos os parâmetros positividade da marcação dos núcleos neoplásicos em escala de 0% a 100% e intensidade da marcação dos núcleos neoplásicos nas categorias: 0 = marcação negativa; 1 = marcação fraca; 2 = marcação moderada e 3 = marcação forte. Após a

quantificação, foi determinado um HSCORE para cada amostra, onde foi feita a multiplicação da % gerada na positividade da marcação nuclear das células neoplásicas com a intensidade da marcação do núcleo da célula neoplásica. Desta forma, a variação do HSCORE é de 0% a 300%.

Cada spot foi analisado individualmente em duplicata e para cada caso foi utilizada a média aritmética dos dois spots nas análises estatísticas.

3.6 VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS

Os resultados das reações de IHC foram comparados entre si utilizando correlações, associações entre os marcadores e em relação a diferentes aspectos clínicos e anatomopatológicos. Os aspectos anatomopatológicos são aqueles relacionados ao tumor como tipo histológico, estágio patológico, invasão microvascular, tamanho tumoral, grau de diferenciação e outros achados referentes ao tumor. Os fatores clínicos são relacionados ao paciente, como os sintomas, estágio clínico, seu estado em geral (CAMPBELL et al. 2007).

A partir do banco de dados dos pacientes do A.C.Camargo Cancer Center, foram selecionadas as seguintes variáveis clínicas e anatomopatológicas para analisar a expressão das proteínas no carcinoma de mama: estadiamento clínico (no momento da coleta da amostra), status da menopausa, histórico familiar de câncer, presença de outra neoplasia, grau histológico, subtipo molecular, estadiamento patológico Tumour-Node-Metastasis (TNM), índice mitótico, %KI67, expressão P53, grau nuclear, presença de necrose, sobrevida global (SG) e sobrevida livre de progressão (SLP). Para analisar a expressão das proteínas nos casos de CRCC foram selecionadas as seguintes variáveis: sexo, idade ao diagnóstico, estadiamento clínico (no momento do diagnóstico), presença de metástase sincrônica no primeiro diagnóstico, risco de histórico familiar, outra neoplasia; expressão PRBM1, estadiamento patológico (TNM) 7ª edição, grau histológico tumoral ISUP (International Society of Urological Pathology), necrose tumoral, sobrevida global (SG) e sobrevida livre de recidiva (SR).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelos softwares *GraphPad Prism 8*, *Statistical Package for Social Science (SPSS)* e pelo R. Para comparar a expressão quantitativa das proteínas *writers*, *readers* e *erasers* nos casos de CRCC (tecido normal adjacente ao tumor, tumor primário e metástase) foi realizado o teste não-paramétrico U de *Mann-Whitney*. Para comparar a expressão quantitativa das proteínas *writers*, *readers* e *erasers* nos casos de CRCC, tecido normal adjacente e tumor primário pareados (ambos tecidos do mesmo paciente), foi realizado o teste paramétrico teste t de *Student*. Para analisarmos a expressão qualitativa das proteínas *writers*, *readers* e *erasers*, nos casos de CRCC e carcinoma de mama, foi definido um ponto de corte utilizando do pacote *maxstat*. Consideramos a estatística long-rank maximizada selecionada para pontos de corte entre 5 % e 95% nos casos de CRCC e pontos de corte entre 5% e 300% nos casos de Carcinoma de mama. Esta etapa foi fundamental, para classificarmos as expressões das proteínas *writers*, *readers* e *erasers*, categoricamente em expressão baixa e expressão alta. Cada ponto de corte definido, para a expressão das proteínas METTL14, FTO, YTHDF2, HNRNP C1/C2 e RBM15B nos casos de CRCC, encontram-se disponíveis no **Anexo 1** e os pontos de cortes definidos para a expressão das proteínas METTL14, FTO, YTHDF2, HNRNP C1/C2 e KIAA1429 nos casos de carcinoma de mama, encontram-se disponíveis no **Anexo 2**. Para avaliar a associação da expressão qualitativa das proteínas *writers*, *readers* e *erasers*, com as variáveis clínicas e anatomopatológicas dos pacientes inclusos nos TMAs de CRCC e carcinoma de mama, foi utilizado o teste de Qui-quadrado de Pearson. Para os casos em que as frequências esperadas foram inferiores a 5 foi utilizado o teste exato de Fisher. Para analisar as SG, SR e SLP foi utilizado estimador Kaplan-Meier e para comparar curvas estimadas em cada categoria, foi realizado o teste não-paramétrico Log-Rank. Os valores de $p < 0,05$, foram considerados significativos e estão indicados nos gráficos tabelas de todos os testes realizados. Para avaliar se as proteínas *writers*, *readers* e *erasers* poderiam ser preditoras do aumento do risco do paciente vir a óbito, apresentar recidiva ter progressão tumoral, foi realizada a regressão de cox Simples e Múltipla. Para entender se a expressão das proteínas *writers*, *readers* e *erasers* tem alguma relação entre si, analisamos a expressão global das proteínas sem ser categorizada aplicando o teste ρ de Spearman e o pacote *pheatmap* utilizando o método de distância euclidiana de clusterização completa.

3.8 CULTURA CELULAR

As seguintes linhagens de carcinoma de mama, MCF7 (mulher, 69 anos; ATCC® HTB-22™) e a linhagem de rim Hek 293T (rim embrionário; ATCC® CRL-3216™) foram obtidas do biobanco da *American Type Collection* (ATCC) e foram utilizadas neste projeto sendo mantidas de acordo com orientação do fornecedor.

3.9 PADRONIZAÇÃO DE ANTICORPOS POR ENSAIOS DE WESTERN BLOT

A técnica de western blot foi utilizada para verificar a especificidade dos anticorpos referente às proteínas relacionada ao projeto, de acordo com protocolo descrito em ⁷⁷. Os anticorpos utilizados encontram-se na **(Tabela 6)**.

Tabela 7 - Anticorpos utilizados neste projeto. Titulação de cada anticorpo e diluente utilizado no ensaio de western blot.

Anticorpo	Títulação	Diluente	Diluente
Linhagem celular	MCF7/HEK 293T	MCF7	HEK 293T
METTL14 (cat. HPA038002)	1/1000	TBST+2.5% leite	TBST+2.5% leite
KIAA1429 (cat. HPA031530)	1/1000	TBST+5% BSA	TBST+5% BSA
RBM15B (cat. HPA036645)	1/1000	TBST+2.5% leite	TBST+5% BSA
hnRNP (cat. sc-32308)	1/500	TBST+5% BSA	TBST+5% BSA
Fatso (cat. sc-271713)	1/250	TBST+5% BSA	TBST+5% BSA
METTL3 (cat. AV39390)	1/1000	TBST+5% leite	TBST+5% leite
YTHDF2 (cat. HPA059621)	1/500	TBST+2.5% leite	TBST+2.5% leite

4 RESULTADOS

4.1 ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS

Iniciamos os ensaios com a padronização dos anticorpos a serem utilizados no projeto. Utilizando células de carcinoma de mama MCF7 (**Figura 5.A**) e rim embrionário HEK 293T (**Figura 5.B**), foi realizada a técnica de western blot para verificar a especificidade dos anticorpos permitindo sua utilização na técnica de IHC.

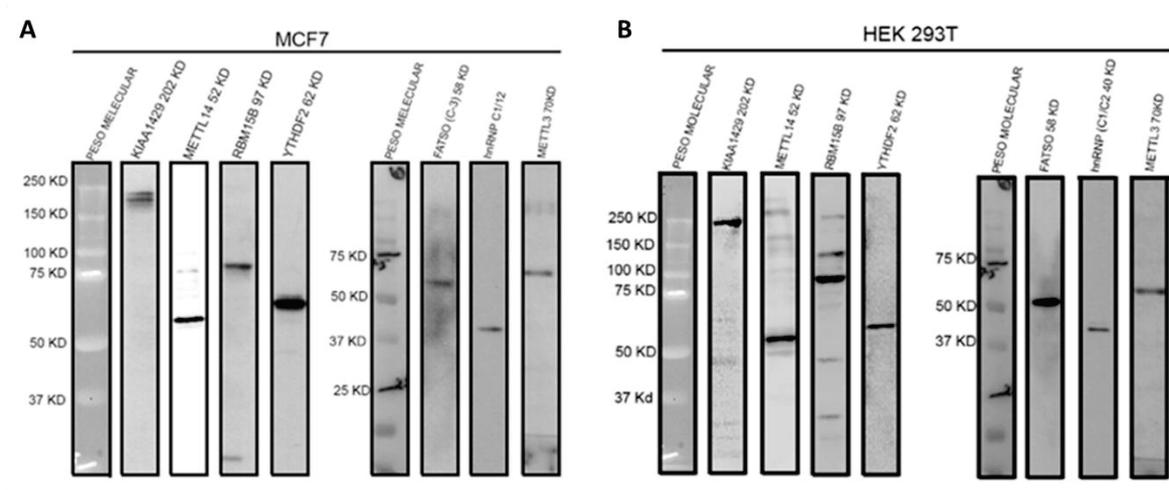


Figura 5 - Validação da especificidade dos anticorpos. Podemos observar somente uma banda na altura do peso esperado para cada uma das proteínas, demonstrando a ausência de reações inespecíficas nos westerns blots. (A) Western blot realizado nas células da linhagem MCF7, utilizamos dois géis um de 8% e 10% respectivamente. (B) Western blot realizado nas células da linhagem HEK 293T, utilizamos dois géis, sendo um de 8% e 10% acrilamida, respectivamente.

4.2 CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS

4.2.1 Expressão *writer* METTL14

Como citado acima, a METTL14 é um importante componente do complexo de metiltransferases, formando um heterodímero altamente conservado com a METTL3, com atividade catalítica. Um estudo sobre a estrutura METTL3 e MELLT14 mostrou que a função da METTL14 é apoiar a METTL3, dando suporte para a ação catalítica, favorecendo assim a ligação do complexo ao mRNA^{78,79}.

Sendo assim, iniciamos as análises da expressão desta importante metilase METTL14 para uma melhor compreensão de seu papel na tumorigênese e controle traducional. Para analisar sua expressão nos tecidos de CRCC, foram realizados experimentos de padronização das reações de IHC. Como controle da especificidade da reação foi omitido o anticorpo primário. A localização subcelular esperada no tecido normal foi avaliada através do site Human Protein Atlas e foi comparada a localização observada nas reações de padronização.

Para quantificar a expressão da METTL14 nos TMAs de CRCC, tecido normal adjacente ao tumor e tecido de metástases de pacientes com CRCC (**Figura 6**), utilizamos a quantificação manual, analisando a % de expressão de positividade de núcleos marcados.

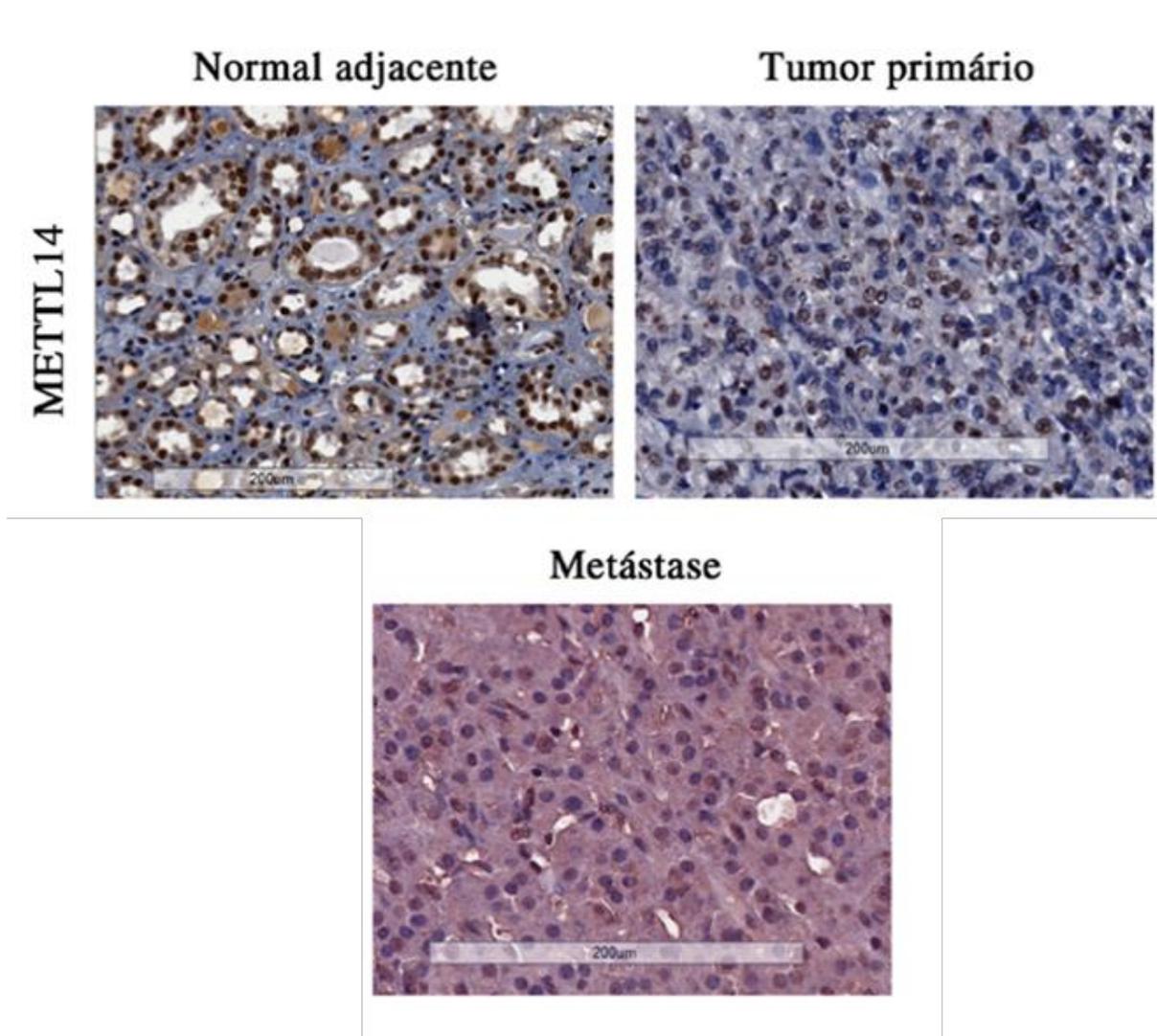


Figura 6 - Expressão da *writer* METTL14 nos TMAs de CRCC e metastático. Expressão nuclear da METTL14 nos tecidos, normal adjacente, tumoral e metastático.

A seguir, observamos expressão quantitativa da METTL14 nos casos pareados de normal adjacente vs tumoral e tumoral vs tecido de metástase. Para os casos pareados, observamos que do tecido normal adjacente para o tumoral ocorre perda estatisticamente significativa de expressão da METTL14 (**Tabela 7**). Entretanto, quando analisamos a expressão desta *writer* do tecido tumoral vs o tecido da metástase, não identificamos alteração significativa de expressão (**Tabela 7**).

Observando a expressão global da METTL14, em todos os casos incluídos nos TMAs de CRCC e metastático, realizando uma análise não paramétrica, identificamos uma perda estatisticamente significativa de expressão da METTL14 do tecido normal adjacente para o tecido tumoral e metastático (**Figura 7**). No tecido tumoral, ocorre um aumento de casos com baixa expressão da METTL14, porém a maior concentração continua sendo os casos com expressão alta.

Tabela 8 - Expressão da METTL14 nos casos pareados de normal adjacente ao tumor, tecido tumoral e tecido de metástase de CRCC. Foi realizada uma análise paramétrica aplicando o teste T de student.

<i>Casos pareados</i>			
<i>Tecido</i>	N	Média	P
<i>Normal adjacente</i>	253	74,50	0,000
<i>Tumoral</i>	253	60,15	
<i>Casos pareados</i>			
<i>Tecido</i>	N	Média	P
<i>Tumoral</i>	9	38,61	0,830
<i>Metástase</i>	9	41,67	

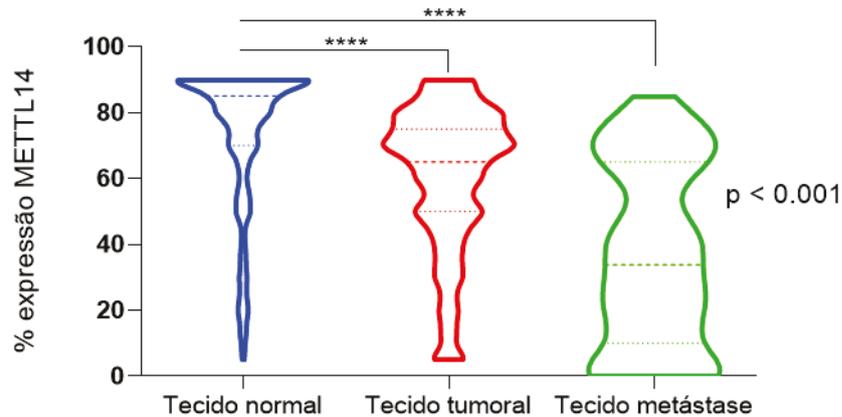


Figura 7 - Expressão global da METTL14 nos tecidos normal adjacente, tecido tumoral incluídos nos TMAs de CRCC e tecido de metástase incluídos no TMA de metastático. Análise não paramétrica, teste kruskal-wallis.

Para uma melhor compreensão da expressão da METTL14 nos tecidos tumorais, buscamos a partir da maximização o melhor ponto de corte pela estatística de Log-Rank. Foram definidos dois pontos de corte, um incluindo todos os casos da nossa coorte (**Anexo 1**) e outro apenas para a Sobrevida livre de recidiva, onde foram excluídos os casos que apresentavam metástase (**Anexo 1**). Neste caso, o melhor ponto de corte encontrado nas duas situações, os que incluía todos os pacientes da nossa casuística e os que excluía os pacientes metastáticos, foram iguais. Desta forma, para as próximas análises utilizamos o ponto de corte que inclui todos os casos da nossa casuística, classificado a expressão da METTL14 categorizada em baixa $\leq 75\%$ e alta $> 75\%$.

Após determinar o melhor ponto de corte, realizamos análise de associação das variáveis clínicas e anatomopatológicas incluída no estudo com a expressão baixa ≤ 75 e alta > 75 da METTL14. Interessantemente, identificamos uma associação estatisticamente significativa da expressão alta da METTL14, com a variável estadiamento clínico, onde observamos que dos estadiamentos baixos I e II para os estadiamentos alto III e IV, ocorre aumento dos casos com alta METTL14, observamos o aumento de alta METTL14 nos casos com metástase ao diagnóstico e necrose tecidual. Detectamos associação estatisticamente significativa, na graduação histológica ISUP agrupada, nos graus altos 3 e 4 onde ocorre aumento de casos com alta METTL14 e redução de baixa METTL14, e o mesmo padrão de associação foi detectado no estadiamento pT, onde do pT1 para o pT4 nota-se aumento da alta METTL14 e no estadiamento M1, ocorre aumento de alta METTL14 comparado com o M0

(Tabela 8). Sendo assim, sugerimos que a alta expressão da METTL14, possa estar associada com os piores estágios da doença CRCC.

Tabela 9 - Associação da expressão da METTL14 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos com CRCC. Os dados foram exportados do Bando de dados de CRCC no REDcap da instituição e analisados aplicando os teste Qui-quadrado e exato de Fisher.

<i>Variável</i>	METTL14			p valor	
	Baixo ≤ 75	Alto > 75	Total		
	N (%)	N (%)			
<i>Sexo</i>	Feminino	192 (79)	52 (21)	244	0,343
	Masculino	314 (75)	104 (25)	418	
<i>Estadiamento clínico</i>	I	354 (80)	86 (20)	440	<0,001
	II	39 (78)	11 (22)	50	
	III	76 (68)	35 (32)	111	
	IV	30 (59)	21 (41)	51	
<i>Estadiamento clínico</i>	I e II	393 (80)	97 (20)	490	<0,001
	III e IV	106 (65)	56 (35)	162	
<i>Metástase ao diagnóstico</i>	Sim	26 (59)	18 (41)	44	0,009
	Não	469 (78)	135 (22)	604	
<i>Risco de histórico familiar</i>	Sim	216 (79)	59 (21)	275	0,896
	Não	98 (78)	28 (22)	126	
<i>Outra neoplasia</i>	Sim	126 (80)	31 (20)	157	0,487
	Não	271 (77)	80(23)	35	
<i>Presença de necrose</i>	Sim	115 (67)	56 (33)	171	<0,001
	Não	180 (87)	27 (13)	207	
<i>PRBM1</i>	Sim	319 (74)	111 (26)	430	>0,999
	Não	95 (74)	33 (26)	128	
<i>Isup</i>	1 e 2	160 (83)	32 (17)	192	0,040
	3 e 4	130 (74)	45 (26)	134	
<i>Isup</i>	1	8 (100)	-	8	0,080
	2	152 (83)	32 (17)	184	
	3	97 (73)	36 (27)	133	
	4	33 (79)	9 (21)	42	
<i>Estadiamento pT</i>	pT1	369 (81)	88 (19)	100	<0,001
	pT2	44 (77)	13 (23)	57	
	pT3	88 (63)	51 (37)	139	
	pT4	5 (56)	4 (44)	9	

Cont/ Tabela 8

		METTL14			
<i>Estadiamento</i> <i>pT</i>	pT1	369 (81)	88 (19)	457	<0.001
	pT2	44 (77)	13 (23)	57	
	pT3 e pT4	93 (63)	55 (37)	148	
<i>Estadiamento</i> <i>pN</i>	pN0	122 (72)	47 (28)	169	0.027
	pN1	9 (56)	7 (44)	16	
	pNX	374 (79)	101 (21)	475	
<i>Estadiamento</i> <i>pM</i>	pM0	481 (78)	138 (22)	619	0.012
	pM1	20 (57)	15 (43)	35	

Após identificar associação estatisticamente significativa da alta METTL14 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas citadas acima, foram realizadas as curvas de comparações da SG com todos os casos de categorizados entre alto e baixo (**Figura 8.A**). Os casos de CRCC com alta METTL14 apresentaram pior SG em comparação com os casos com baixa METTL14. Realizando a SG separada por estadiamento clínico, observamos que nos estadiamentos I e II ocorre diferença estatisticamente significativa de expressão, onde os pacientes com alta METTL14 apresentaram pior SG (**Figura 8.B**). No entanto, nos estadiamentos III e IV não foi identificada diferença estatisticamente significativa de expressão entre os pacientes com alta METTL14 e baixa METTL14 (**Figura 8.C**).

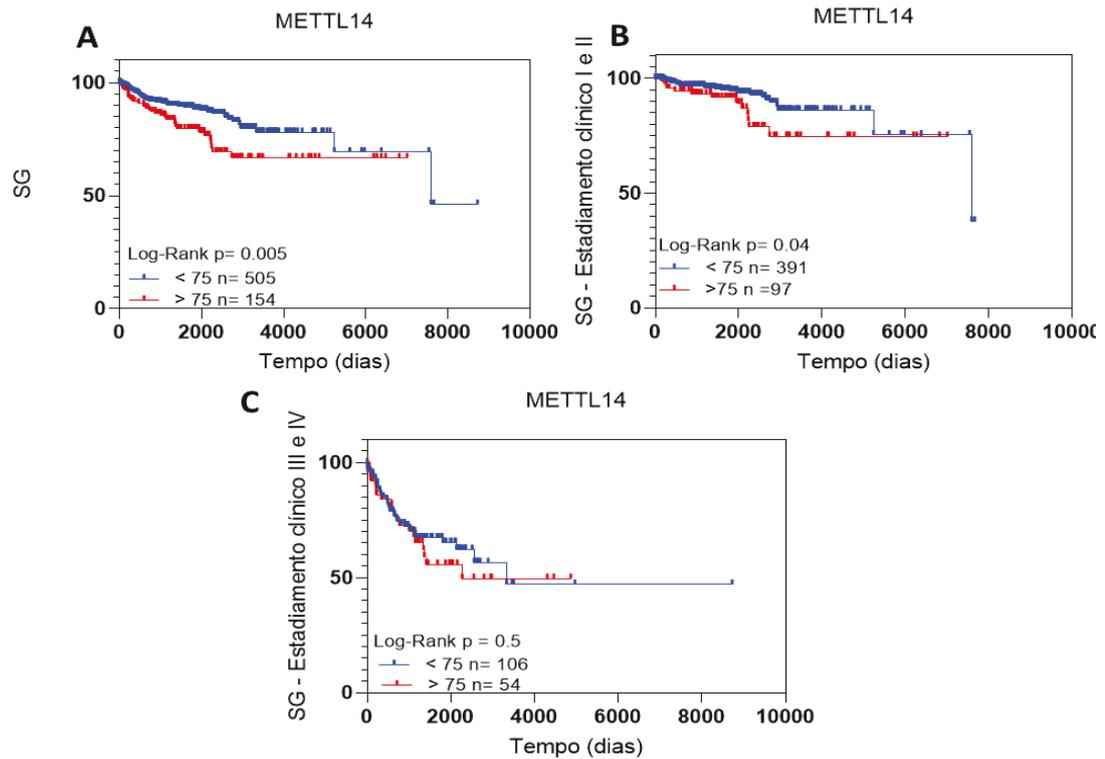


Figura 8 - Expressão da METTL14 nos casos de CRCC. Os dados foram exportados do bando de dados no REDcap da instituição, as curvas de SG foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. (A) Curva de SG. (B) Curva de SG separada por estadiamento clínico I e II. (C) Curva de SG separa por estadiamento clínico III e IV.

Já na SR, não identificamos diferença estatisticamente significativa entre a expressão baixa e alta da METTL14 com todos os casos juntos e separados por estadiamento (**Tabela 9**).

Tabela 10 - Curva de Comparação da Expressão da METTL14 nos Casos de CRCC. Os Dados Foram Exportados do Banco de Dados do Redcap da Instituição. Fizemos As Curvas De SR, Pelo Software Graphpad Prism 8 utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. Curva De SR. Curva De SR Separada Por Estadiamento Clínico I E II. Curva De SR Separa Por Estadiamento Clínico III.

METTL14			
Variável	Categoria	N	P valor
SR	≤75	475	0,463
	>75	126	
SR Estadiamento I e II	≤75	391	0,340
	>75	97	
SR Estadiamento III	≤75	75	0,509
	>75	34	

*SR – Sobrevida livre de recidiva

Para avaliar o risco de o paciente vir a óbito (SG) como principal evento, realizamos a regressão de cox e na análise Simples, foram incluídas as variáveis inseridas na análise de associação. Para esta análise foram incluídos apenas os casos que contém dado da proteína METTL14, sendo excluídos os casos com dados faltantes. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 10**).

Tabela 11 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METTL14: regressão de cox em modelo Simples.

Variável	Categoria	RR	Simples	
			IC 95%	p valor
Sexo	Feminino	1	ref	
	Masculino	1,556	0,999 – 2,422	0,050
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III e IV	5,689	3,768 – 8,589	<0,001
Metástase ao diagnóstico	Não	1	ref	
	Sim	3,768 – 8,589	8,250 – 21,506	<0,001
Outra neoplasia	Não	0,849	0,505 – 1,426	0,530
	Sim	1	ref	
Expressão PRBM1	Não	2,851	1,874 – 4,338	<0,001
	Sim	1	ref	
Isup	1 e 2	1	ref	
	3 e 4	3,438	1,598 – 7,396	0,002
Estadiamento pT	pT1	1	ref	
	pT2	4,416	2,397 – 8,136	<0,001
	pT3 e pT4	6,500	4,107 – 10,289	<0,001
Estadiamento pM			ref	
	M0	1	6,433 – 17,455	
	M1	10,597		<0,001
Expressão METTL14	Baixa ≤75	1	ref	
	Alta >75	1,779	1,164 – 2,719	0,008

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla, onde após a avaliação pela regressão de cox em 4 passos, concluímos que a expressão da METTL14 não se manteve como um preditor associado para o aumento do risco de óbito (**Tabela 11**).

Tabela 12 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METTL14 no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III e IV	3,285	1,056 – 10,213	0,040
Expressão PRBM1	Não	3,977	1,318 – 12,007	0,014
	Sim	1	ref	
Isup	1 e 2	1	ref	
	3 e 4	3,324	0,992 – 11,141	0,052
Estadiamento pM	M0	1	ref	
	M1	3,572	0,939 – 13,590	0,062

Para avaliar o risco de o paciente ter recidiva (SR) como principal evento, realizamos a regressão de cox e na análise Simples, foram incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 12**).

Tabela 13 - Risco de recidiva na SR presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METTL14 no CRCC: regressão de cox em modelo Simples.

Variável	Categoria	RR	Simples	
			IC 95%	p valor
Sexo	Feminino	1	ref	
	Masculino	1,126	0,721 – 1,759	0,602
Histórico familiar	Não	1,439	0,857 – 2,417	0,169
	Sim	1	ref	
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III	5,229	3,356 – 8,149	<0,00
Outra neoplasia	Não	1,187	0,722 – 1,951	0,499
	Sim	1	ref	
Expressão PRBM1	Não	4,185	2,644 – 6,625	<0,001
	Sim	1	ref	
Isup	1 e 2	3,438	1,598 – 7,396	0,002
	3 e 4	1	ref	

Cont/ Tabela 12

<i>Simples</i>				
<i>Estadiamento pT</i>	pT1	1	ref	
	pT2	3,359	1,728 – 6,527	<0,001
	pT3 e pT4	6,612	4,125 – 10,599	<0,001
<i>Estadiamento pM</i>	M0	1	ref	
	M1	2,290	0,311 – 16,840	0,416
<i>Expressão METTL14</i>	Baixa ≤75	1	ref	
	Alta >75	1,199	0,738 – 1,949	0,464

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla, onde após a avaliação pela regressão de cox em 3 passos, concluímos que a expressão da METTL14 não se manteve como um preditor associado para o aumento do risco de recidiva (**Tabela 13**).

Tabela 14 - Risco de recidiva na SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METTL14 no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo.

<i>Múltipla</i>				
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>RR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p valor</i>
<i>Estadiamento clínico</i>	I e II	1	ref	
	III	4,109	0,664 – 25,408	0,128
<i>Expressão PRBM1</i>	Não	3,181	ref	
	Sim	1	1,827 – 5,539	<0,00
<i>Estadiamento pT</i>	pT1	1	ref	
	pT2	2,673	1,176 – 6,080	0,019
	pT3 e pT4	1,218	0,197 – 7,517	0,832

Com os resultados apresentados, detectamos que ocorre diminuição estatisticamente significativa de expressão da METTL14 quando analisamos sua expressão quantitativamente. Entretanto, analisamos a expressão da METTL14 categorizada em baixa e alta, detectamos que nos estágios iniciais da doença, a expressão alta da METTL14 está associada a diminuição de SG e associa-se também, com as variáveis que indicam os agressividade tumoral.

4.2.2 Expressão da *writer* RBM15B

Como descrito anteriormente, a m6A é adicionada pelo complexo de metiltransferases, compostos pela METTL3/METTL14, juntamente com as proteínas associadas WTAP, KIAA1429 e a RNA *binding motif protein* 15B (RBM15B). A RBM15B, não apresenta atividade catalítica, seu papel é se ligar a METTL3 e WTAP e direcionar as duas proteínas a locais específicos onde a m6A pode ser adicionada no mRNA^{16,80}. Nos últimos anos, vem emergindo muito estudos relacionados principalmente a METLL3/METT14 na progressão tumoral, por serem as principais proteínas responsáveis pela adição da m6A ao mRNA. Entretanto, ainda não está completamente claro o papel das proteínas acessórias ao complexo de metiltransferases e se quando alteradas, podem interferir diretamente na adição da m6A ao mRNA. Diante disto, acreditamos que seja de suma importância, analisar se existe alguma alteração a expressão da RBM15B no CRCC.

Para analisar a expressão da RBM15B nos tecidos de CRCC normal adjacente e metástase, foram realizados experimentos de padronização das reações de IHC. Como controle da especificidade da reação foi omitido o anticorpo primário. A localização subcelular esperada no tecido normal foi avaliada através do site *Human Protein Atlas* e foi comparada a localização observada nas reações de padronização. Foi realizada a quantificação manual em colaboração com médica patologista, quantificando a % de núcleos de células marcadas **(Figura 9)**.

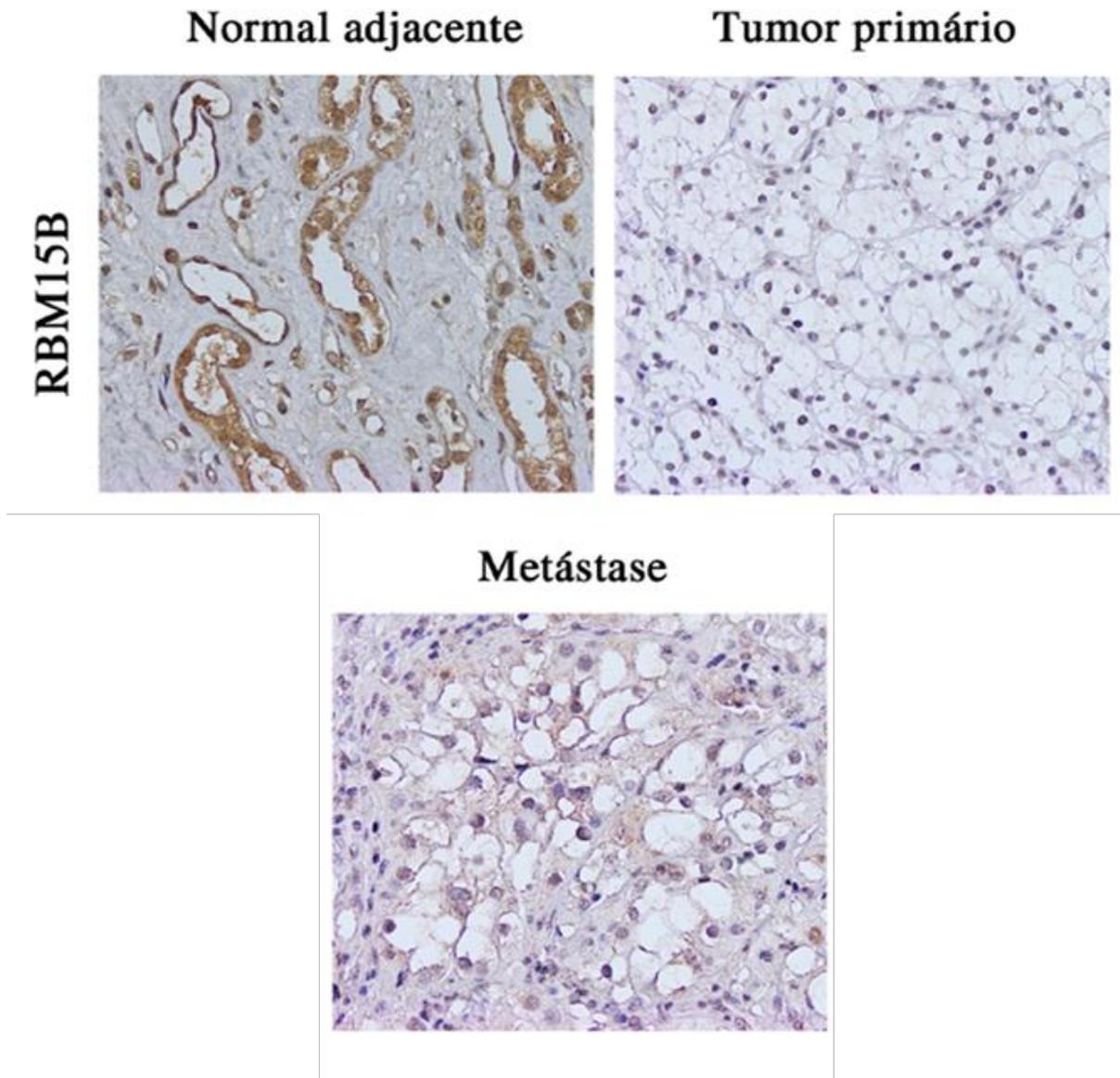


Figura 9 - Expressão da *writer* RBM15B no TMA de CRCC e metastático. Expressão nuclear da RBM15B nos tecidos, normal adjacente, tumoral e metastático, apresentando diferença de expressão.

Analisando quantitativamente a expressão da RBM15B, nos casos pareados de tecido normal adjacente vs tumoral e tumoral vs tecido de metástase, utilizando o teste T, não identificamos diferença estatisticamente significativa entre os tecidos (**Tabela 14**). Analisando a expressão da global da RBM15B, em todos os casos incluídos nos TMAs de CRCC e metastático, fazendo uma análise não paramétrica, observamos que a maioria dos tecidos não tumorais se enquadra no grupo de expressão alta da RBM15B, enquanto nos tecidos tumorais e metastáticos existe uma alteração estatisticamente significativa onde ocorre uma redistribuição e aumento de casos expressão baixa de RBM15B (**Figura 10**).

Tabela 15 - Expressão da RBM15B nos casos pareados de normal adjacente ao tumor, tecido tumoral e tecido de metástase dos pacientes com CRCC. Foi realizada uma análise paramétrica aplicando o teste T de student.

Casos pareados			
Tecido	N	Média	P
Normal adjacente	193	70,8	0,600
Tumoral	193	69,74	
Casos pareados			
Tecido	N	Média	P
Tumoral	8	50,63	0,717
Metástase	8	45,63	

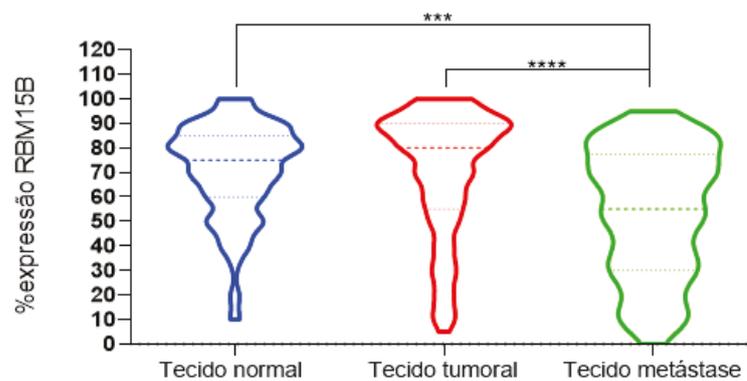


Figura 10 - Expressão global da RBM15B nos tecidos normal adjacente, tecido tumoral inclusos nos TMA's de CRCC e tecido de metástase incluídos no TMA de metastático. Análise não paramétrica, teste kruskal-wallis.

A seguir, para analisar a expressão qualitativa da RBM15B nos tecidos tumorais, buscamos a partir da maximização o melhor ponto de corte pela estatística de Log-Rank. Foram definidos dois pontos de corte expressão baixa $\leq 55\%$ e alta $> 55\%$ da RBM15B, que inclui todos os casos da nossa coorte (**Anexo 1**) e outro apenas para a SR expressão baixa $\leq 50\%$ e alta $> 50\%$, onde foram excluídos os casos que apresentavam metástase (**Anexo 1**). Desta forma, para as próximas análises utilizamos o ponto de corte que inclui todos os casos da nossa casuística, classificado a expressão da RBM15B categorizada em baixa $\leq 55\%$ e alta $> 55\%$.

Com o melhor ponto de corte definido, realizamos a associação da expressão baixa e alta da RBM15B com as variáveis clínicas e anatomopatológicas (**Tabela 15**). Identificamos

uma associação estatisticamente significativa de expressão da RBM15B com a variável estadiamento clínico, e observamos que no estadiamento I ocorre maior prevalência de casos com alta RBM15B e menos casos com baixa RBM15B, no estadiamento II notamos uma redução dos casos com alta expressão e aumento dos casos com baixa expressão de RBM15B. Já nos estadiamentos III e IV, nota-se similaridade da distribuição dos casos, porém quando olhamos do estadiamento I para o IV, observamos a redução dos casos com alta expressão da RBM15B. Detectamos associação estatisticamente significativa da RBM15B também, na variável metástase ao diagnóstico, onde observamos nos casos que apresentam metástase ao diagnóstico, tem aumento de baixa RBM15B. O mesmo padrão de expressão é observado no estadiamento patológico pT, que do pT1 para o pT2 ocorre um aumento dos casos com baixa RBM15B. Interessantemente, o estadiamento pT4 apresenta similaridade com a distribuição dos casos do estadiamento pT2 (**Tabela 15**).

Tabela 16 - Associação da expressão da RBM15B com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos com CRCC. Os dados foram exportados do Bando de dados de CRCC no REDcap da instituição e analisados aplicando os teste Qui-quadrado e exato de Fisher.

Variável	RBM15B			p valor	
	Baixa ≤ 55	Alta > 55	Total		
	N (%)	N (%)			
Sexo	Feminino	55 (26)	158 (74)	213	0,922
	Masculino	93 (25)	273 (75)	366	
Estadiamento clínico	I	75 (20)	308 (80)	383	<0,001
	II	20 (47)	23 (53)	43	
	III	33 (33)	68 (67)	101	
	IV	15 (35)	28 (65)	43	
Estadiamento clínico	I e II	95 (22)	331 (78)	426	0,010
	III e IV	48 (33)	96 (67)	144	
Metástase ao diagnóstico	Sim	15 (38)	24 (62)	39	0,057
	Não	129 (24)	403 (76)	532	
Risco de histórico familiar	Sim	61 (25)	179 (75)	240	0,796
	Não	28 (24)	89 (76)	117	
Outra neoplasia	Sim	35 (26)	100 (74)	135	0,212
	Não	62 (20)	244 (80)	207	
Presença de necrose	Sim	35 (22)	121 (78)	156	0,086
	Não	25 (15)	145 (85)	170	
PRBM1	Sim	79 (21)	294 (79)	316	<0,001
	Não	65 (53)	56 (47)	121	
Isup	1 e 2	22 (13)	149 (87)	171	0,223
	3 e 4	29 (19)	127 (81)	156	
Isup	1	1 (14)	6 (86)	7	0,477
	2	21 (13)	137 (87)	158	
	3	20 (17)	97 (83)	117	
	4	9 (23)	30 (77)	39	
Estadiamento pT	pT1	82 (21)	316 (79)	398	<0,001
	pT2	25 (50)	25 (50)	50	
	pT3	37 (30)	88 (70)	125	
	pT4	3 (50)	3 (50)	6	
Estadiamento pT	pT1	82 (21)	316 (79)	113	<0,001
	pT2	25 (50)	25 (50)	500	
	pT3 e pT4	40 (31)	91 (69)	131	
Estadiamento pN	pN0	67 (45)	83 (55)	150	<0,001
	pN1	5 (36)	9 (64)	14	
	pNX	75 (18)	336 (82)	411	
Estadiamento pM	pM0	131 (24)	411 (76)	542	0,080
	pM1	12 (40)	18 (60)	30	

Na curva de SG de comparação entre os casos com expressão baixa e alta de RBM15B, identificamos diferença estatisticamente significativa, onde os pacientes com baixa RBM15B (**Figura 11.A**), apresentam pior SG comparada com os com alta RBM15B. O mesmo padrão de curva é observado quando separamos por estadiamento clínico baixo (I e II) e alto (III e IV), no estadiamento III e IV observamos que os pacientes com baixa expressão apresentam pior SG (**Figura 11.C**).

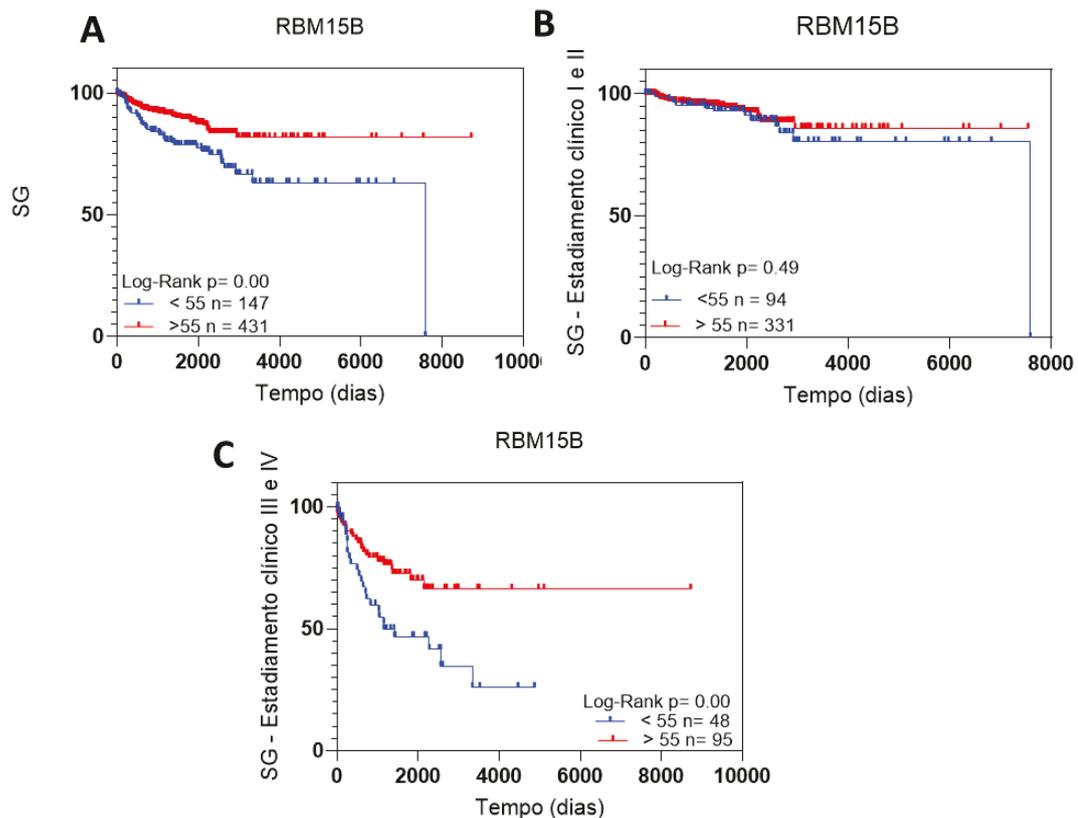


Figura 11 - Curva de comparação da expressão baixa e alta da RBM15B em todos os casos de CRCC, incluindo os metastáticos. Os dados foram exportados do bando de dados no REDcap da instituição, as curvas de SG foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. (A) Curva de SG. (B) Curva de SG separada por estadiamento clínico I e II. (C) Curva de SG separa por estadiamento clínico III e IV.

Na curva SR, também identificamos uma diferença estatisticamente significante de expressão, onde os pacientes com baixa RBM15B apresentam pior SR e observamos o mesmo padrão de curva quando separamos as SR separadas por estadiamento clínico baixo (I e II) e alto (III) (**Figura 14**). Para essas análises foram excluídos os pacientes metastáticos.

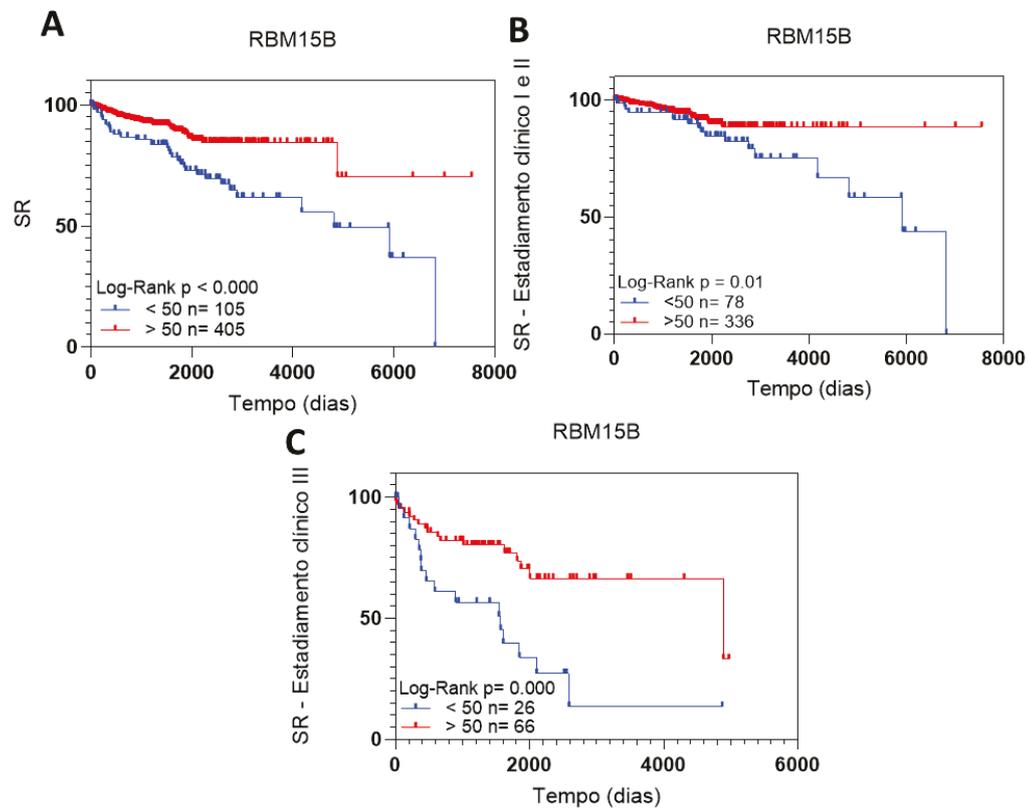


Figura 12 - Curva de comparação da expressão baixa e alta da RBM15B nos casos não metastáticos de CRCC. Os dados foram exportados do bando de dados no REDcap da instituição, as curvas de SR foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. (A) Curva de SR. (B) Curva de SR separada por estadiamento clínico I e II. (C) Curva de SR separa por estadiamento clínico III.

Na análise de regressão de cox Simples, com o risco de óbito na SG sendo o principal evento, incluímos as variáveis presentes na análise de associação e foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada RBM15B. Os casos que são faltantes os dados da proteína foram excluídos desta análise. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 16**).

Tabela 17 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da RBM15B no CRCC: regressão de cox em modelo Simples.

<i>Variável</i>	Categoria	RR	<i>Simples</i>	
			IC 95%	p valor
<i>Sexo</i>	Feminino	1,558	0,969 – 2,505	0,067
	Masculino	1	ref	
<i>Estadiamento clínico</i>	I e II	1	ref	<0,00
	III e IV	5,485	3,528 – 8,528	
<i>Metástase ao diagnóstico</i>	Não	1	ref	<0,00
	Sim	13,504	8,127 – 22,441	
<i>Outra neoplasia</i>	Não	0,830	0,476 – 1,445	0,509
	Sim	1	ref	
<i>Expressão PRBM1</i>	Não	2,941	1,876 – 4,612	<0,00
	Sim	1	ref	
<i>Isup</i>	1 e 2	1	ref	0,002
	3 e 4	5,383	2,031 – 14,266	
<i>Estadiamento pT</i>	pT1	1	ref	<0,00
	pT2	3,385	1,720 – 6,660	
	pT3 e pT4	5,341	3,314 – 8,607	
<i>Estadiamento pM</i>	M0	1	ref	<0,00
	M1	11,095	6,487 – 18,979	
<i>Expressão RBM15B</i>	Baixa ≤55	1	ref	<0,00
	Alta >55	0,492	0,318 – 0,761	

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla, onde após a avaliação pela regressão de cox em 7 passos, concluímos que a expressão qualitativa da RBM15B não se manteve como um preditor associado com o risco de óbito na SG (**Tabela 17**).

Tabela 18 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da RBM15B no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III e IV	5,328	1,676 – 16,940	0,005
Expressão PRBM1	Não	3,459	1,098 – 10,896	0,034
	Sim	1	ref	
Isup	1 e 2	1	ref	
	3 e 4	6,651	1,370 – 32,303	0,019

A seguir, avaliamos o risco de o paciente ter recidiva na SR como principal evento. Realizamos a regressão de cox e na análise Simples, foram incluídas as variáveis inseridas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 18**).

Tabela 19 - Risco de recidiva na SR presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da RBM15B no CRCC: regressão de cox em modelo Simples.

Variável	Categoria	RR	Simples	
			IC 95%	p valor
Sexo	Feminino	1	ref	
	Masculino	1,205	0,740 – 1,962	0,453
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III	4,700	2,938 – 7,519	<0,00
Outra neoplasia	Não	1,320	0,767 – 2,273	0,317
	Sim	1	ref	
Expressão PRBM1	Não	4,348	2,671 – 7,076	<0,00
	Sim	1	ref	
Estadiamento pT	pT1	1	ref	
	pT2	3,721	1,840 – 7,524	<0,00
	pT3 e pT4	5,854	3,523 – 9,729	<0,00
Expressão RBM15B	Baixa ≤50	1	ref	
	Alta >50	0,406	0,254 – 0,648	<0,00

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla, onde após a avaliação pela regressão de cox em 3 passos, identificamos que a expressão alta da RBM15B diminui em RR= 0,518 risco de o paciente ter recidiva quando comparado com os pacientes que apresentam baixa RBM15B (**Tabela 19**).

Tabela 20 - Risco de recidiva na SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da RBM15B no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III	4,268	2,334 – 7,806	<0,00
Expressão PRBM1	Não	2,734	1,529 – 4,889	0,001
	Sim	1	ref	
Expressão RBM15B	Baixa ≤50	1	ref	
	Alta >50	0,518	0,279 – 0,961	0,037

Sendo assim, em nossas análises, identificamos a existência de duas populações tumorais em nossa coorte de pacientes, aquelas com baixa e alta expressão da *writer* RBM15B. Podemos inferir, que a expressão baixa RBM15B se correlaciona com os piores estágios de CRCC, dados observados na análise de associação e curva de comparação SG e SR. Avaliando o risco do paciente apresentar recidiva na regressão de cox, detectamos que pacientes com alta RBM15B, apresentam menos risco de recidivar. O estadiamento clínico II e o estadiamento pT2 são duas variáveis interessantes para prever o risco de o paciente ter recidiva, associado a expressão baixa RBM15B, já que os valores das respectivas variáveis são próximos a do estadiamento IV e estadiamento pT4.

4.2.3 Expressão da *reader* HNRNP C1/C2

A *reader* HNRNP C1/C2 faz parte da família de proteínas de ligação (RBPs) que interage com o processo de splicing alternativo e estabilização do mRNA ⁸¹. A seguir, foram feitos ensaios para padronização do anticorpo HNRNP C1/C2 correspondente a *reader* HNRNP C1/C2 e realização da técnica de IHC nos tecidos normal adjacente ao tumor, tecido tumoral de CRCC e tecido de metástases (**Figura 13**). Como controle da especificidade da reação foi omitido o

anticorpo primário e a localização subcelular esperada no tecido normal foi avaliada através do site *Human Protein Atlas* foi comparada a localização observada nas reações de padronização.

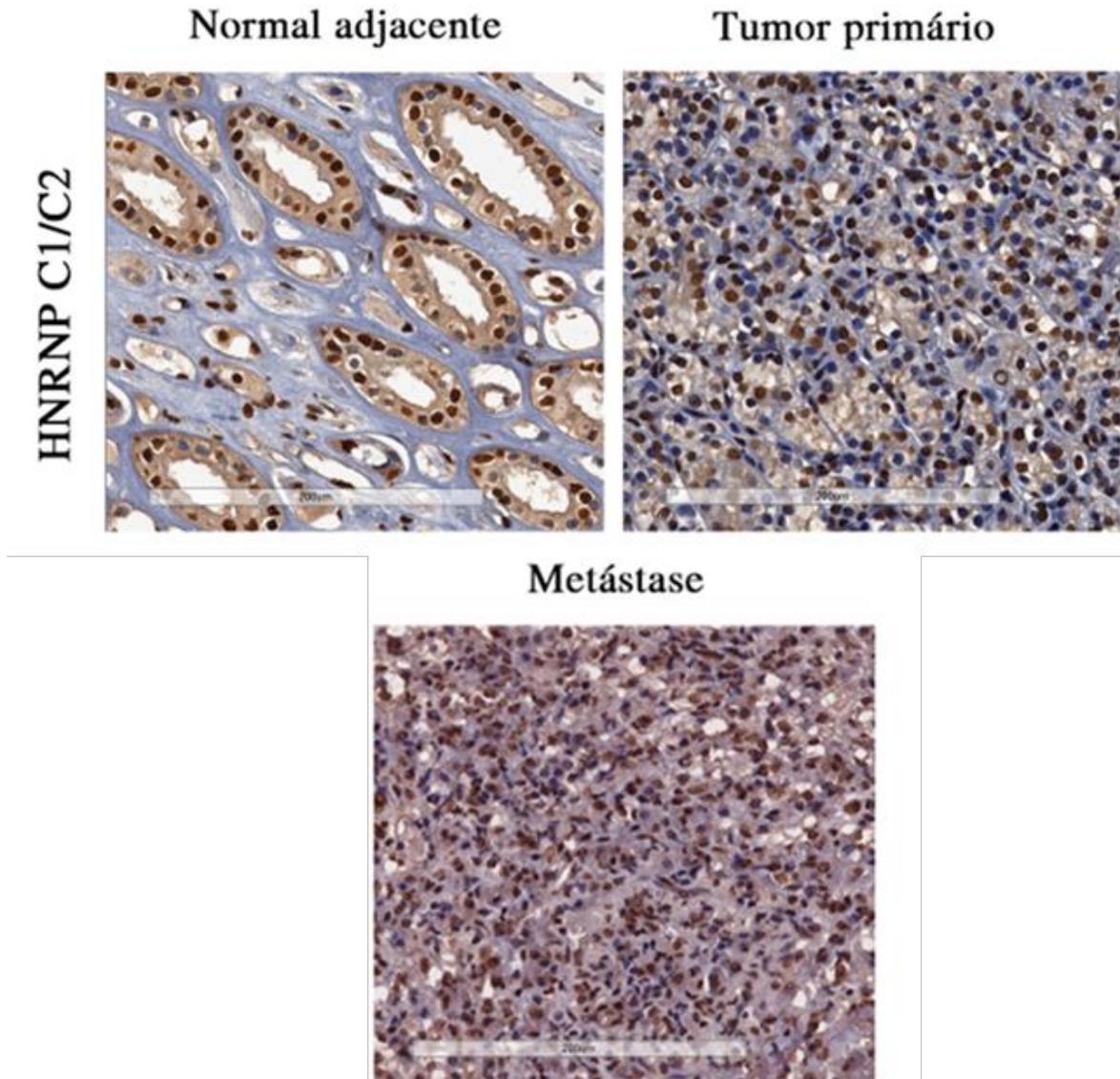


Figura 13 - Expressão da *reader* HNRNPC1/C2 nos TMAs de CRCC e metastático. Expressão nuclear da HNRNPC1/C2 nos tecidos, normal adjacente, tumoral e metastático, apresentando diferença de expressão.

Analisando a expressão da HNRNPC1/C2 nos casos pareados tecido normal adjacente vs tecido tumoral e tecido tumoral vs produto de metástase em análise paramétrica, identificamos uma pequena perda de expressão desta proteína nos tecidos de CRCC em comparação ao tecido normal adjacente ao tumor (**Tabela 20**), porém, não detectamos

diferença de expressão quando comparamos o tecido tumoral de CRCC com o produto de metástases dos mesmos pacientes (**Tabela 20**). Observando a expressão global da HNRNPC1/C2, em todos os casos incluídos nos TMAs de CRCC e metastático, fazendo uma análise não paramétrica, identificamos uma perda estatisticamente significativa de expressão da HNRNPC1/C2 do tecido normal adjacente para o tecido tumoral (**Figura 14**), mas não identificamos diferença de expressão significativa da reader HNRNPC1/C2 dos tecidos normais adjacente e tumorais para os metastáticos (**Figura 14**).

Tabela 21 - Expressão da HNRNPC1/C2 nos casos pareados de normal adjacente ao tumor, tecido tumoral e tecido de metástase dos pacientes com CRCC. Foi realizada uma análise paramétrica aplicando o teste T de student.

<i>Casos pareados</i>			
<i>Tecido</i>	<i>N</i>	<i>Média</i>	<i>P</i>
<i>Normal adjacente</i>	231	66,11	0,011
<i>Tumoral</i>	231	64,45	
<i>Casos pareados</i>			
<i>Tecido</i>	<i>N</i>	<i>Média</i>	<i>P</i>
<i>Tumoral</i>	8	64,55	0,657
<i>Metástase</i>	8	58,13	

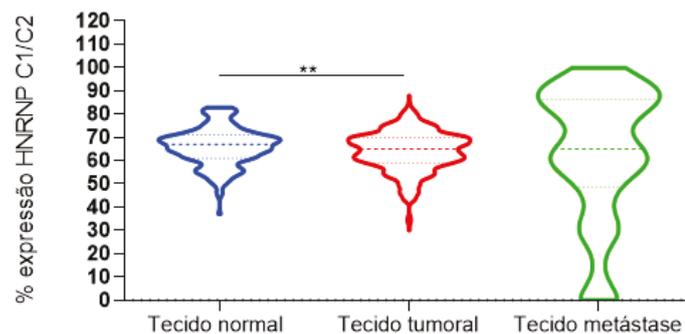


Figura 14 - Expressão global da METTL14 nos tecidos normal adjacente, tecido tumoral incluídos nos TMAs de CRCC e tecido de metástase incluídos no TMA de metastático. Análise não paramétrica, teste kruskal-wallis.

Para analisar a expressão da HNRNPC1/C2 de forma categórica, foi definido o melhor ponto de corte a partir da maximização pela estatística de Log-Rank. Foram definidos dois pontos de corte expressão baixa $\leq 66\%$ e alta $> 66\%$ da HNRNPC1/C2, que inclui todos os casos da nossa coorte e outro apenas para a SR expressão baixa $\leq 59\%$ e alta $> 59\%$, onde foram

excluídos os casos que apresentavam metástase (**Anexo 1**). Desta forma, para as próximas análises utilizamos o ponto de corte que inclui todos os casos da nossa casuística, classificado a expressão da HNRNP C1/C2 categorizada em baixa $\leq 66\%$ e alta $> 66\%$.

Após a definição do melhor ponto de corte, associamos a expressão categorizada da HNRNPC1/C2 em alta e baixa com as variáveis clínicas e anatomopatológicas. Entretanto, não detectamos qualquer alteração significativa de expressão desta proteína que pudesse correlacioná-la ao surgimento tumoral (**Tabela 21**).

Tabela 22 - Associação da expressão da HNRNPC1/C2 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de CRCC. Os dados foram exportados do Bando de dados de CRCC no REDcap da instituição e analisados aplicando os teste Qui-quadrado e exato de Fisher.

Variável	HNRNP C1/C2			P valor	
	Baixo ≤ 66	Alto > 66	Total		
	N (%)	N (%)			
Sexo	Feminino	124 (53)	109 (47)	233	0,155
	Masculino	231 (59)	159 (41)	390	
Estadiamento clínico	I	244 (59)	171 (41)	415	0,224
	II	28 (61)	8 (39)	36	
	III	54 (51)	52 (49)	106	
	IV	22 (47)	25 (53)	47	
Estadiamento clínico	I e II	272 (59)	189 (41)	461	0,048
	III e IV	76 (50)	77 (50)	153	
Metástase ao diagnóstico	Sim	20 (49)	21 (51)	41	0,329
	Não	327 (57)	245 (43)	572	
Risco de histórico familiar	Sim	141 (54)	119 (46)	260	0,506
	Não	70 (54)	50 (42)	120	
Outra neoplasia	Sim	91 (61)	59 (39)	150	0,198
	Não	179 (54)	153 (46)	332	
Presença de necrose	Sim	86 (51)	82 (49)	168	0,140
	Não	115 (59)	80 (41)	195	
PRBM1	Sim	243 (60)	163 (40)	406	0,200
	Não	61 (53)	54 (47)	115	
Isup	1 e 2	109 (61)	70 (39)	179	0,827
	3 e 4	107 (62)	65 (38)	172	
Isup	1	3 (50)	3 (50)	6	0,783
	2	106 (61)	67 (39)	173	
	3	79 (60)	52 (40)	131	

4

28 (68)

13 (32)

41

Cont/ Tabela 21

HNRNP C1/C2					
<i>Estadiamento</i> <i>pT</i>	pT1	252 (59)	117 (41)	429	0,291
	pT2	32 (60)	21 (40)	53	
	pT3	66 (50)	67 (50)	133	
	pT4	5 (62)	3 (38)	8	
<i>Estadiamento</i> <i>pT</i>	pT1	252 (59)	177 (41)	429	0,190
	pT2	32 (60)	21 (40)	53	
	pT3 e pT4	71 (50)	70 (50)	141	
<i>Estadiamento</i> <i>pN</i>	pN0	81 (51)	78 (49)	159	0,152
	pN1	11 (69)	5 (31)	16	
	pNX	261 (59)	184 (41)	445	
<i>Estadiamento</i> <i>pM</i>	pM0	336 (58)	248 (42)	584	0,285
	pM1	16 (47)	18 (53)	34	

Na curva de SG e de SR, não detectamos diferença entre a expressão baixa e alta da HNRNP C1/C2 (**Tabela 22**).

Tabela 22 - Curva de comparação da expressão da HNRNPC1/C2 nos casos de CRCC. Os dados foram exportados do bando de dados no REDcap da instituição, as curvas de SG e SR foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. Curvas de SG incluindo todos os casos da casuística e separadas por estadiamento clínico. Curvas de SR excluindo os casos metastáticos e separadas por estadiamento clínico.

HNRNP C1/C2			
Variável	Categoria	N	p valor
SG	≤66	355	0,348
	>66	267	
SG Estadiamento I e II	≤66	272	0,413
	>66	188	
SG Estadiamento III e IV	≤66	76	0,585
	>66	76	
SR	≤59	150	0,098
	>59	399	
SR Estadiamento I e II	≤59	122	0,096
	>59	338	
SR Estadiamento III	≤59	31	0,793
	>59	74	

*SG – sobrevida global; SR – sobrevida livre de recidiva.

Mesmo sem indícios de associação expressão da HNRNPC1/C2 com a progressão tumoral, avaliamos se sua expressão pode aumentar o risco de óbito na SG. Foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada HNRNP C1/C2 de CRCC e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 23**).

Tabela 23 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da HNRNPC1/C2 no CRCC: regressão de cox em modelo simples.

<i>Simples</i>				
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>RR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p valor</i>
<i>Sexo</i>	Feminino	1	ref	
	Masculino	1,638	1,026 – 2,613	0,03
<i>Estadiamento clínico</i>	I e II	1	ref	
	III e IV	5,532	3,587 – 8,532	<0,00
<i>Metástase ao diagnóstico</i>	Não	1	ref	
	Sim	12,390	7,510 – 20,441	<0,00
<i>Outra neoplasia</i>	Não	1	ref	
	Sim	0,924	0,541 – 1,580	0,77
<i>Expressão PRBM1</i>	Não	3,041	1,952 – 4,737	<0,00
	Sim	1	ref	
<i>Isup</i>	1 e 2	1	ref	
	3 e 4	4,231	1,821 – 9,829	<0,00
<i>Estadiamento pT</i>	pT1	1	ref	
	pT2	4,074	2,092 – 7,932	<0,00
	pT3 e pT4	6,508	4,023 – 10,525	<0,00
<i>Estadiamento pM</i>	M0	1	ref	
	M1	10,374	6,211 – 17,326	<0,00
<i>Expressão HNRNP C1/C2</i>	Baixa ≤66	1	ref	
	Alta >66	1,227	0,800 – 1,880	0,34

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla, onde após a avaliação pela regressão de cox em 6 passos, concluímos que a expressão baixa ou alta da HNRNPC1/C2, não se manteve como como atenuante para aumentar o risco de óbito. (**Tabela 24**).

Tabela 24 - Risco de óbito SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da RBM15B no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III e IV	3,788	1,342 – 10,690	0,012
Expressão PRBM1	Não	3,459	1,249 – 11,799	0,019
	Sim	1	ref	
Isup	1 e 2	1	ref	
	3 e 4	4,886	1,292 – 18,481	0,019

A seguir avaliamos o risco de o paciente ter recidiva (SR) como principal evento. Na regressão de cox Simples, foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada HNRNP C1/C2 e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 25**).

Tabela 25 - Risco de recidiva na SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da HNRNP C1/C2 no CRCC: regressão de cox em modelo Simples.

Variável	Categoria	RR	Simples	
			IC 95%	p valor
Sexo	Feminino	1	ref	
	Masculino	1,112	0,704 – 1,757	0,649
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III	4,774	3,019 – 7,550	<0,00
Outra neoplasia	Não	1,212	0,730 – 2,012	0,457
	Sim	1	ref	
Expressão PRBM1	Não	4,066	2,525 – 6,548	<0,00
	Sim	1	ref	
Estadiamento pT	pT1	1	ref	
	pT2	3,619	1,852 – 7,075	<0,00
	pT3 e pT4	6,194	3,799 – 10,098	<0,00
Expressão HNRNPC1/C2	Baixa ≤59	1	ref	
	Alta >59	0,682	0,431 – 1,077	0,101

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla, onde após a avaliação pela regressão de cox em 3 passos, identificamos que a expressão da HNRNP não aumenta o risco de o paciente apresentar recidiva (**Tabela 26**).

Tabela 26 - Risco de recidiva na (SR) presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da HNRNP C1/C2 no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Expressão PRBM1	Não	3,233	1,975 – 5,295	<0,00
	Sim	1	ref	
Estadiamento pT	pT1	1	ref	
	pT2	3,289	1,589 – 6,807	0,001
	pT3 e pT4	5,395	3,124 – 9,317	<0,00

Embora exista uma diferença de expressão quantitativa da HRNPC1/C2 entre o tecido normal adjacente e tecido tumoral, e essa diferença seja considerada estatisticamente significativa, é difícil mensurar o impacto biológico de uma diferença tão pequena para o surgimento do tumor.

Deste modo, acreditamos que não haja um impacto muito significativo no controle de expressão de HNRNP C1/C2 para surgimento ou agressividade do CRCC.

4.2.4 Expressão da reader YTHDF2

Um grupo de família com contendo domínio YTH (*domain-containing proteins YTH*), são identificadas como *readers* no controle da m6A. No genoma humano, foram identificados cinco membros desta família, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHCD1 e YTHDC2 ⁸². As proteínas YTHDF1/2/3 estão presentes no citoplasma celular ⁸³, porém, um estudo identificou a presença nuclear da YTHDF2. Com citado no acima no item **1.1**, estudos identificaram a presença da m6A na 5' UTR, sendo resultado da presença nuclear da YTHDF2, que migra do citoplasma para o núcleo devido o estresse celular por choque térmico, preservando a metilação da m6A na 5' UTR, limitando a desmetilação pela *eraser* FTO. Quando a presença da m6A encontra-se aumentada na 5' UTR, inicia o processo de tradução independente de cap, favorecendo a tradução seletiva de mRNAs sob estresse celular por choque térmico ²⁴.

WANG et al. (2015) identificaram que a *reader* YTHDF1, aumenta a tradução dos mRNAs metilados enquanto a YTHDF2 degrada os mRNAs no citoplasma celular, sendo uma resposta rápida e controlada. Dentro deste contexto, analisamos a expressão da YTHDF2, pois alteração em sua expressão pode acarretar um aumento ou redução na tradução dos mRNAs metilados pela adição da m6A.

Para analisar a expressão da *reader* YTHDF2, foram realizados experimentos de padronização das reações de IHC. Como controle da especificidade da reação foi omitido o anticorpo primário. A localização subcelular esperada no tecido normal foi avaliada através do site Human Protein Atlas e foi comparada a localização observada nas reações de padronização.

Neste projeto, quantificamos primeiramente a % da marcação nuclear da YTHDF2 nos tecidos normal adjacente, tumoral e metástase dos pacientes com CRCC tratados no A.C.Camargo Cancer Center com a colaboração da médica Patologista **(Figura 15)**.

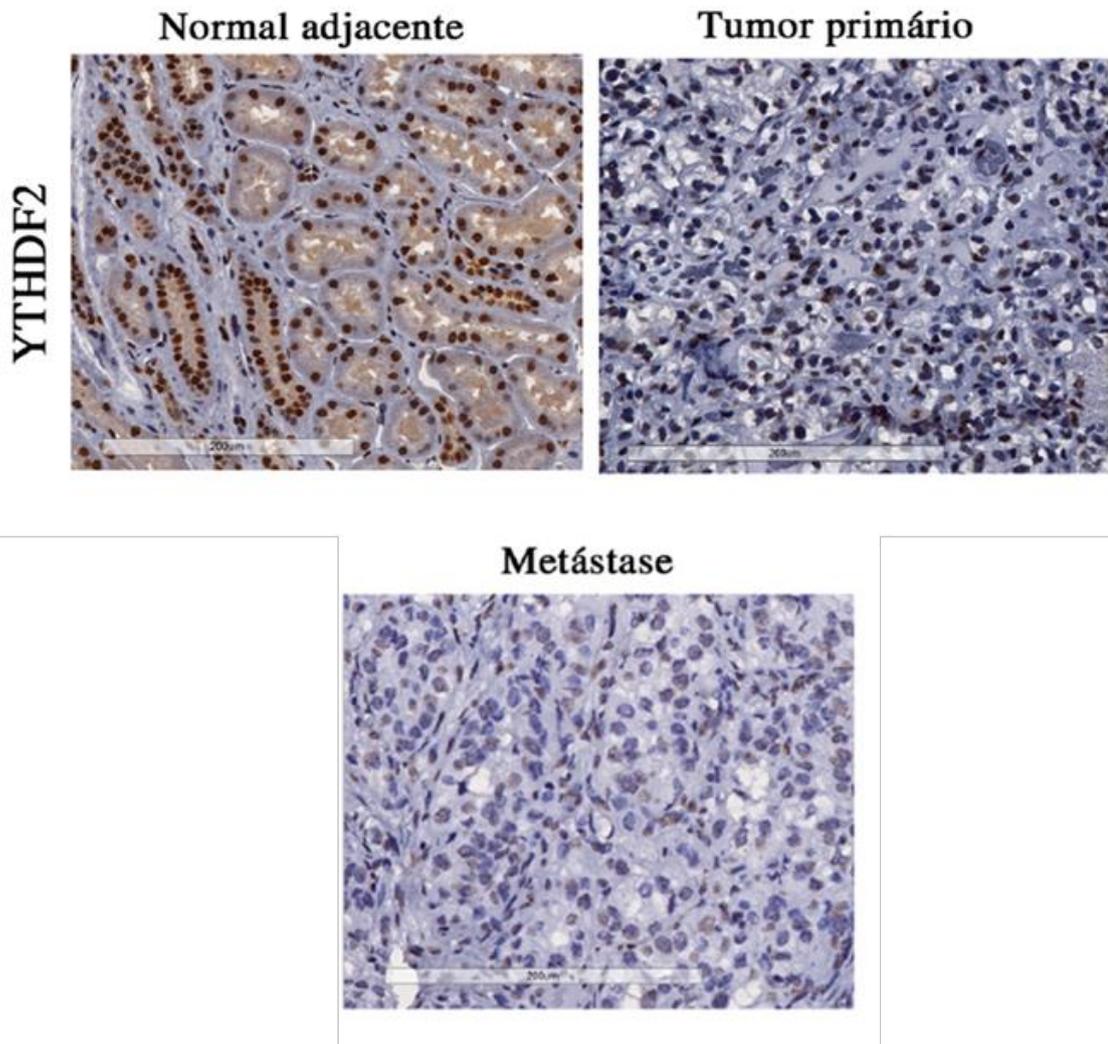


Figura 15 - Expressão da *reader* YTHDF2 nos TMAs de CRCC e metastático. Expressão nuclear da YTHDF2 nos tecidos, normal adjacente, tumoral e metastático, apresentando diferença de expressão.

Posteriormente, observamos a expressão da YTHDF2 entre os casos pareados, tecido normal adjacente vs tecido tumoral e tecido tumoral vs tecido de metástase. Em análise paramétrica, identificamos que ocorre perda de expressão estatisticamente significativa do tecido normal adjacente ao tumor para o tecido tumoral, porém, do tecido tumoral para o tecido de metástase, não identificamos alteração de expressão (**Tabela 27**). Analisando a expressão da YTHDF2 quantitativamente em todos os casos, nos três tipos de tecidos, detectamos diferença estatisticamente significativa de expressão, e no tecido normal adjacente e tumoral, ocorre uma maior concentração de casos com alta expressão de YTHDF2 do que os casos metastáticos, que podemos ver uma redistribuição dos casos, onde aumenta os casos com baixa expressão de YTHDF2 (**Figura 16**).

Tabela 27 - Expressão da YTHDF2 nos casos pareados de normal adjacente ao tumor, tecido tumoral e tecido de metástase dos pacientes com CRCC. Análise paramétrica aplicando o teste T de student.

<i>Casos pareados</i>			
<i>Tecido</i>	N	Média	P
<i>Normal adjacente</i>	205	78,724	0.00
<i>Tumoral</i>	205	68,659	
<i>Casos pareados</i>			
<i>Tecido</i>	N	Média	P
<i>Tumoral</i>	10	54,50	0.921
<i>Metástase</i>	10	55,5	

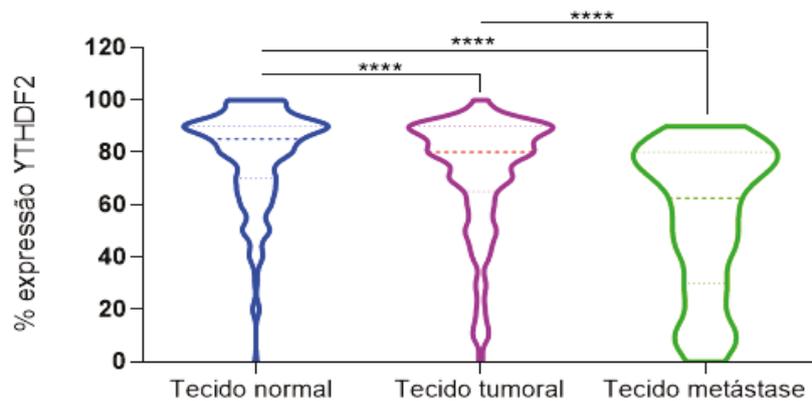


Figura 16 - Expressão global da YTHDF2 nos tecidos normal adjacente, tecido tumoral incluso nos TMAs de CRCC e tecido de metástase incluídos no TMA de metastático. Análise não paramétrica, teste kruskal-wallis.

Para analisar a expressão qualitativa da YTHDF2 nos tecidos tumorais, buscamos a partir da maximização o melhor ponto de corte pela estatística de Log-Rank. Neste caso, o melhor ponto de corte tanto para os que inclui todos os casos e o ponto de corte que exclui os casos metastáticos, foram definidos separadamente, porém o melhor ponto de corte foi comum entre os dois grupos (**Anexo 1**). Sendo assim, para as próximas análises trabalhamos com a expressão categorizada da YTHDF2 em baixa $\leq 82.5\%$ e alta $> 82.5\%$.

Nas análises de associação da expressão baixa e alta da YTHDF2, detectamos diferença estatisticamente significativa de expressão, apenas na graduação histológica ISUP agrupada os

casos I e II e III e IV (**Tabela 28**). Os casos III e IV ocorre um aumento dos casos com alta expressão e diminuição dos casos com baixa expressão, porém olhando para a classificação ISUP separadamente, não detectamos diferença estatisticamente significativa de expressão (**Tabela 28**). Sendo assim, como detectamos associação da expressão da YTHDF2 apenas com uma variável estudada, não podemos aferir que esta alteração possa estar influenciando a progressão tumoral.

Tabela 28 - Associação da expressão da YTHDF2 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de CRCC. Os dados foram exportados do Bando de dados de CRCC no REDcap da instituição e analisados aplicando os teste Qui-quadrado e exato de Fisher.

Variável	YTHDF2			p valor	
	Baixo ≤ 82.5	Alto > 82.5	Total		
	N (%)	N (%)			
Sexo	Feminino	140 (64)	80 (36)	220	0,101
	Masculino	213 (57)	163 (43)	376	
Estadiamento clínico	I	234 (59)	161 (41)	395	0,061
	II	33 (77)	10 (23)	43	
	III	53 (52)	48 (48)	101	
	IV	28 (60)	19 (40)	47	
Estadiamento clínico	I e II	267 (61)	171 (39)	438	0,208
	III e IV	81 (55)	67 (45)	148	
Metástase ao diagnóstico	Sim	27 (63)	16 (37)	43	0,633
	Não	321 (59)	226 (41)	547	
Risco de histórico familiar	Sim	154 (61)	99 (39)	253	0,263
	Não	66 (55)	55 (45)	121	
Outra neoplasia	Sim	90 (64)	50 (36)	140	0,101
	Não	180 (56)	142 (44)	322	
Presença de necrose	Sim	81 (51)	78 (49)	159	0,101
	Não	108 (60)	72 (40)	180	
PRBM1	Sim	242 (62)	146 (38)	388	0,827
	Não	74 (64)	42 (36)	116	

Cont/ Tabela 28

		YTHDF2			
<i>Isup</i>	1 e 2	102 (58)	73 (42)	175	0,016
	3 e 4	71 (45)	88 (55)	159	
<i>Isup</i>	1	4 (57)	3 (43)	7	0,099
	2	98 (58)	70 (42)	168	
	3	53 (45)	65 (55)	118	
	4	18 (44)	23 (56)	41	
<i>Estadiamento pT</i>	pT1	242 (59)	169 (41)	411	0,20
	pT2	36 (72)	14 (28)	50	
	pT3	70 (54)	59 (46)	129	
	pT4	4 (67)	2 (33)	6	
<i>Estadiamento pT</i>	pT1	242 (59)	169 (41)	411	0,107
	pT2	36 (72)	14 (28)	50	
	pT3 e pT4	74 (55)	61 (45)	135	
<i>Estadiamento pN</i>	pN0	94 (63)	56 (37)	150	0,531
	pN1	8 (53)	7 (47)	15	
	pNX	247 (58)	180 (42)	454	
<i>Estadiamento pM</i>	pM0	324 (58)	233 (42)	557	0,105
	pM1	24 (73)	9 (27)	33	

Buscando por mais evidências sobre a influência da expressão da YTHDF2, foram realizadas as curvas de SG incluindo todos os casos da casuística de CRCC, SG separadas por estadiamento clínico e SR excluindo os casos metastáticos, SR separadas por estadiamento clínico (**Tabela 30**). Comparando a expressão alta e baixa da YHTDF, identificamos diferença de expressão estatisticamente significativa, apenas na SR sem separar por estadiamento clínico (**Tabela 29**) e (**Figura 17**).

Tabela 29 - Curva de comparação da expressão da YTHDF2 nos casos de CRCC. Os dados foram exportados do bando de dados no REDcap da instituição, as curvas de SG e SR foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. Curvas de SG incluindo todos os casos da casuística e separadas por estadiamento clínico. Curvas de SR excluindo os casos metastáticos e separados por estadiamento clínico.

YTHDF2			
Variável	Categoria	N	P valor
SG	≤82.5	351	0,268
	>82.5	244	
SG Estadiamento I e II	≤82.5	266	0,958
	>82.5	171	
SG Estadiamento III e IV	≤82.5	80	0,362
	>82.5	67	
SR	≤82.5	305	0,010
	>82.5	213	
SR Estadiamento I e II	≤82.5	259	0,239
	>82.5	168	
SR Estadiamento III	≤82.5	47	0,110
	>82.5	44	

*SG – sobrevida global; SR – sobrevida livre de recidiva.

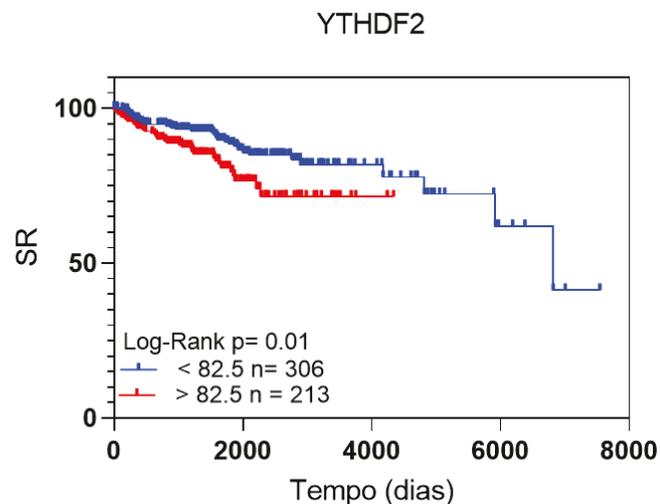


Figura 17 - Curva de comparação da expressão baixa e alta da YTHDF2 nos casos não metastáticos de CRCC. Os dados foram exportados do bando de dados no REDcap da instituição, as curvas de SR foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank.

Para avaliar se a expressão categorizada da YTHDF2 tem relação com o risco de óbito SG como principal evento, realizamos a regressão de cox, incluindo as variáveis presentes na análise de associação e foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada

YTHDF2, os casos que são faltante o dado da proteína foram excluídos desta análise. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 30**).

Tabela 30 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no CRCC: Regressão de cox em modelo Simples.

Variável	Categoria	RR	Simples	
			IC 95%	p valor
Sexo	Feminino	1	ref	
	Masculino	1,522	0,955 – 2,425	0,07
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III e IV	5,980	3,864 – 9,255	<0,00
Metástase ao diagnóstico	Não	1	ref	
	Sim	13,175	8,113 – 21,396	<0,00
Outra neoplasia	Não	1	ref	
	Sim	0,90	0,529 – 1,532	0,69
Expressão PRBM1	Não	2,730	1,750 – 4,259	<0,00
	Sim	1	ref	
Isup	1 e 2	1	ref	
	3 e 4	4,290	1,843 – 9,986	<0,00
Estadiamento pT	pT1	1	ref	
	pT2	3,079	1,538 – 6,166	<0,00
	pT3 e pT4	5,708	3,581 – 9,099	<0,00
Estadiamento pM	M0	1	ref	
	M1	11,016	6,579 – 18,446	<0,00
Expressão YTHDF2	Baixa ≤82,5	1	ref	
	Alta >82,5	1,308	0,852 2,007	0,22

Para a análise Múltiplas, foram incluídas as variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples e a proteína de interesse YTHDF2. Analisando o a risco de óbito SG com as variáveis com a expressão baixa e alta YTHDF2 de forma isolada (**Tabela 31**), não identificamos que ocorra associação da expressão da YTHDF2 com o aumento de risco de óbito. Entretanto, observando o risco de óbito com todas as variáveis pela regressão de cox em 5 passos na análise Múltipla (**Tabela 31**), detectamos que os casos com

alta YTHDF2, apresentam quase 3 vezes mais o risco de vir a óbito do que os casos com baixa YTHDF2.

Tabela 31 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa YTHDF2 no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III e IV	2,837	0,850 – 9,496	0,09
Expressão PRBM1	Não	2,870	0,969 – 8,496	0,057
	Sim	1	ref	
Isup	1 e 2	1	ref	
	3 e 4	4,657	1,165 – 18,614	0,030
Expressão YTHDF2	Baixa $\leq 82,5$	1	ref	
	Alta $>82,5$	2,739	0,989 – 7,584	0,053

A seguir, avaliamos o se a expressão da YTHDF2 pode aumentar o risco de o paciente apresentar recidiva. Na regressão de cox Simples, foram analisados os casos que contém dados da proteína YTHDF2 e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 32**).

Tabela 32 - Risco de recidiva na SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no CRCC: regressão de cox em modelo simples.

Variável	Categoria	RR	Simples	
			IC 95%	p valor
Sexo	Feminino	1	ref	
	Masculino	1,122	0,692 – 1,819	0,641
Histórico familiar	Não	1,567	0,910 – 2,698	0,105
	Sim	1	ref	
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III	4,748	2,965 – 7,605	<0,00
Outra neoplasia	Não	1,322	0,770 – 2,270	0,311
	Sim	1	ref	
Expressão PRBM1	Não	4,470	2,736 – 7,303	<0,00
	Sim	1	ref	
Estadiamento pT	pT1	1	ref	
	pT2	4,195	2,118 – 8,309	<0,00
	pT3 e pT4	6,065	3,638 – 10,110	<0,00
Expressão YTHDF2	Baixa ≤82,5	1	ref	
	Alta >82,5	1,880	1,172 – 3,016	0,009

Para a análise Múltiplas, foram incluídas as variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples. Como resultado, após 3 passos pela regressão de cox, identificamos que a expressão alta da YTHDF2 aumenta em RR= 2,383 mais o risco de o paciente ter recidiva, do que os pacientes que apresentam expressão baixa da YTHDF2 (**Tabela 33**).

Tabela 33 - Risco de recidiva, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no CRCC: regressão de cox em modelo múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III	7,710	0,831 – 71,540	0,072
Expressão PRBM1	Não	3,254	1,808 – 5,858	<0,00
	Sim	1	ref	
Estadiamento pT	pT1	1	ref	
	pT2	3,180	1,349 – 7,498	0,008
	pT3 e pT4	0,552	0,059 – 5,128	0,601
Expressão YTHDF2	Baixa ≤82,5	1	ref	

Alta >82,5	2,383	1,308 – 4,341	0,005
------------	-------	---------------	--------------

Contudo, apesar da expressão alta YTHDF2 ter se associado com a variável ISUP 3 e 4, apresentar aumento do risco de óbito global e aumento do risco de recidiva para os pacientes com CRCC, são poucos indícios para aferir que expressão alta da YTHDF2 esteja correlacionada a progressão tumoral, sendo necessário, estudos moleculares para compreender como a expressão da YTHDF2, possa estar alterando o processo de tumorigênese nos pacientes com CRCC.

4.2.5 Expressão *eraser* FTO

A *Fat mass and obesity-associated protein* FTO, foi a primeira *eraser* identificada, tendo sua atividade de desmetilar a m6A em RNA in vivo estudo publicado em 2011, sugerindo a reversibilidade desta modificação química¹⁷. Sua atividade tem sido relacionada ao câncer, e especificamente o grupo de⁸⁴, identificou que a superexpressão de FTO, desempenham um papel crítico na leucemia, sendo relatado também, que sua superexpressão pode estar relacionada a oncogênese em tumores sólido^{85,86}. Sendo assim, esses dados mostram a importância de compreender melhor sua interação com a biologia tumoral, sendo a FTO considerada um potente alvo terapêutico.

Para analisar a expressão da *eraser* FTO, nos pacientes com CRCC tratados do A.C.Camargo Cancer Center, foram realizados experimentos de padronização das reações de IHC. Como controle da especificidade da reação foi omitido o anticorpo primário. A localização subcelular esperada no tecido normal foi avaliada através do site Human Protein Atlas e foi comparada a localização observada nas reações de padronização. Na **(Figura 18)**, observamos a marcação nuclear da FTO no tecido normal adjacente, tumoral e tecido de metástase dos pacientes com CRCC.

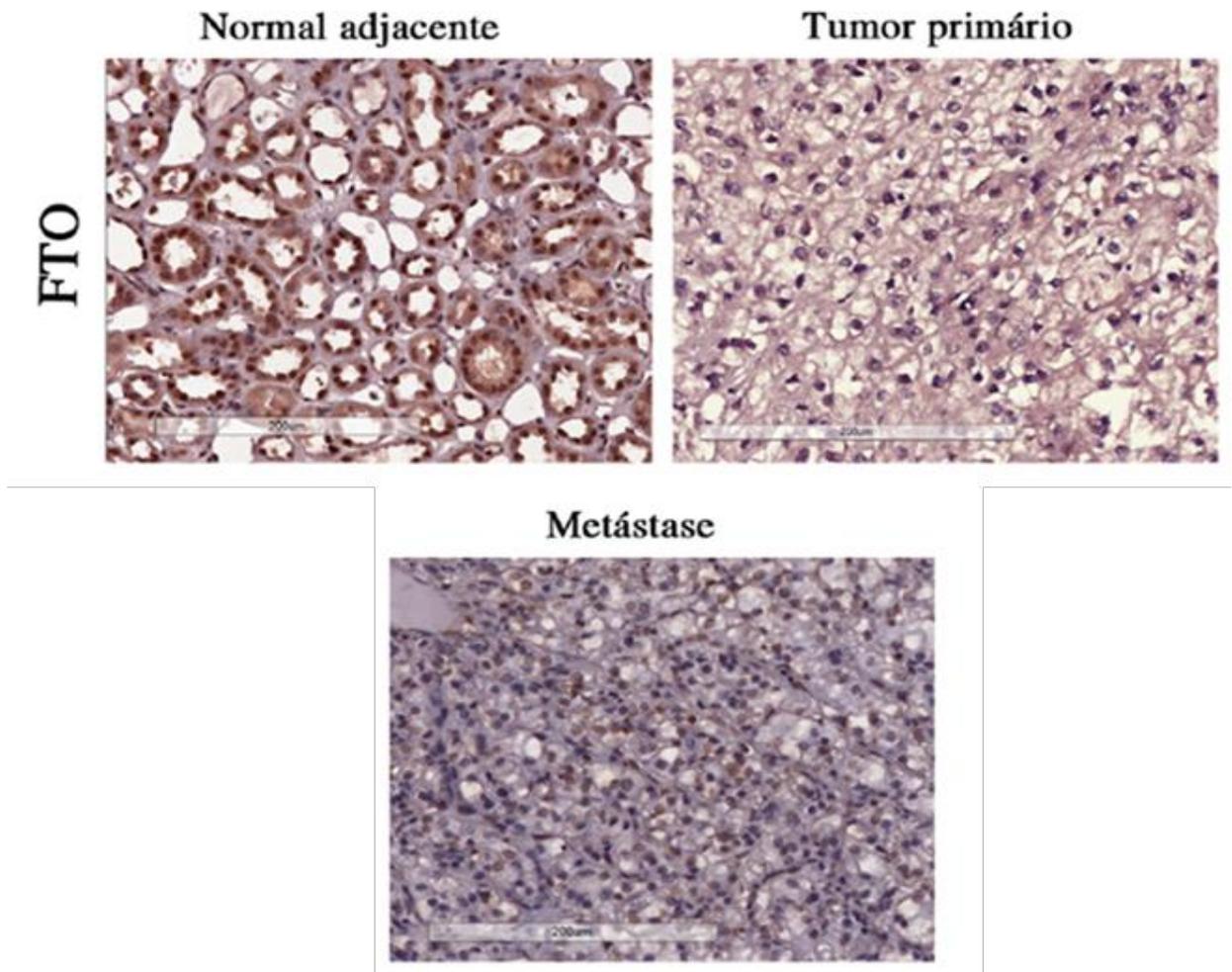


Figura 18 - Expressão da *eraser* FTO em CRCC. Expressão nuclear da FTO nos tecidos, normal adjacente, tumoral e metastático, apresentando diferença de expressão.

Analisando a expressão da desmetilase FTO nos casos pareados do tecido normal adjacente vs tecido do tumor primário e tecido do tumor primário vs tecido de metástase em análise paramétrica (**Tabela 34**), observamos que do tecido normal adjacente para o tecido tumoral do mesmo paciente, ocorre perda de expressão da FTO. Entretanto, do tecido tumoral para metástase, a diferença não foi estatisticamente significativa. Analisando a expressão da FTO quantitativamente em todos os casos, nos três tipos de tecidos, detectamos diferença estatisticamente significativa de expressão. Conseguimos observar uma redistribuição dos pacientes, que no tecido normal adjacente em sua totalidade, apresentam alta expressão da FTO. Nos tecidos tumorais, ocorre aumento dos pacientes com expressão mais baixa da FTO e no produto da metástase, observamos que são predominantes os casos com baixa expressão da FTO (**Figura 19**).

Tabela 34 - Expressão da FTO nos casos pareados de normal adjacente ao tumor, tecido tumoral e tecido de metástase dos pacientes com CRCC. Foi realizada uma análise paramétrica aplicando o teste T de student.

<i>Casos pareados</i>			
<i>Tecido</i>	N	Média	P
<i>Normal adjacente</i>	223	99,56	0,000
<i>Tumoral</i>	223	63,092	
<i>Casos pareados</i>			
<i>Tecido</i>	N	Média	P
<i>Tumoral</i>	9	20,00	0,401
<i>Metástase</i>	9	32,78	

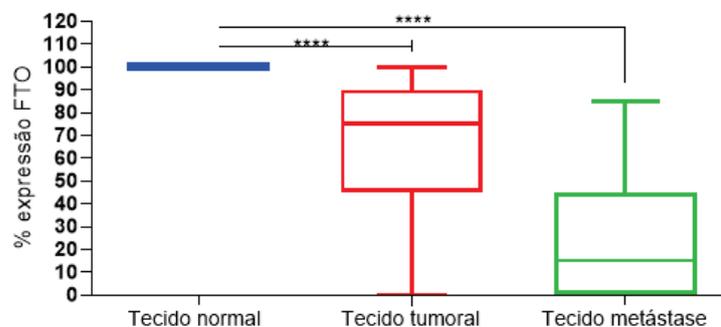


Figura 19 - Expressão global da FTO nos tecidos normal adjacente, tecido tumoral incluídos nos TMAs de CRCC e tecido de metástase incluídos no TMA de metastático. Análise não paramétrica, teste kruskal-wallis.

Para melhor explorarmos a expressão da FTO, foram definidos pontos de corte pela estatística de Log-Rank. Foram definidos dois pontos de corte expressão baixa $\leq 55\%$ e alta $> 55\%$ da FTO, que inclui todos os casos da nossa coorte na e outro apenas para a SR expressão baixa $\leq 40\%$ e alta $> 40\%$ FTO, onde foram excluídos os casos que apresentavam metástase (**Anexo 1**). Desta forma, para as próximas análises utilizamos o ponto de corte que inclui todos os casos da nossa casuística, classificado a expressão da FTO categorizada em baixa $\leq 55\%$ e alta $> 55\%$

A seguir, analisamos se existe associação da expressão categorizada baixa $\leq 55\%$ e alta $> 55\%$ da FTO, com as variáveis clínicas e anatomopatológicas selecionadas para este estudo. Do estadiamento clínico I para o IV, observamos que ocorre uma redução dos casos com alta FTO e aumento dos casos com baixa FTO, sendo uma diferença estatisticamente significativa. O mesmo cenário é observado quando agrupamos os estadiamentos clínicos em baixo (I e II) e alto (III e IV). Os casos que apresentaram metástase ao diagnóstico, tiveram uma distribuição

similar entre si, porém olhando em comparação com os que não tiveram, os casos negativos para metástase ao diagnóstico, apresentam concentração de casos maior em alta FTO. Observamos diferença estatisticamente significativa com a variável presença de necrose, onde os casos que apresentam necrose tecidual, tem redução de alta FTO e aumento de baixa FTO e o mesmo padrão de associação é observado nos pacientes que não apresentam expressão de PBRM1. No grau histológico ISUP, tanto separado quanto agrupado em, baixo (1 e 2) alto (3 e 4), detectamos associação estatisticamente significativa e observamos que dos grau ISUP 1e 2 para 3 e 4, que ocorre aumento de baixa FTO e redução de alta FTO. No estadiamento patológico pT mais avançado tanto separado quanto agrupados, identificamos que ocorre aumento dos casos com baixa FTO (**Tabela 35**).

Tabela 35 - Associação da expressão da FTO com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de CRCC. Os dados foram exportados do Bando de dados de CRCC no REDcap da instituição e analisados aplicando os teste Qui-quadrado e exato de Fisher.

Variável	FTO			p valor	
	Baixo ≤ 55	Alto > 55			
	N (%)	N (%)	Total		
Sexo	Feminino	74 (32)	155 (68)	229	0,659
	Masculino	132 (34)	252 (66)	384	
Estadiamento clínico	I	119 (29)	290 (71)	409	0,002
	II	21 (48)	23 (52)	44	
	III	44 (43)	59 (57)	103	
	IV	21 (46)	25 (54)	46	
Estadiamento clínico	I e II	140 (31)	313 (69)	471	0,005
	III e IV	65 (44)	84 (56)	149	
Metástase ao diagnóstico	Sim	20 (49)	21 (51)	41	0,039
	Não	181 (32)	381 (68)	562	
Risco de histórico familiar	Sim	80 (32)	173 (68)	253	0,348
	Não	44 (37)	76 (63)	120	
Outra neoplasia	Sim	57 (39)	90 (61)	147	0,113
	Não	100 (31)	223 (69)	323	
Presença de necrose	Sim	55 (34)	107 (66)	162	0,021
	Não	40 (22)	140 (78)	180	
PRBM1	Sim	119 (29)	293 (71)	382	< 0,001
	Não	70 (59)	49 (41)	119	
Isup	1 e 2	33 (19)	139 (81)	172	0,038
	3 e 4	46 (29)	110 (71)	156	
Isup	1	1 (14)	6 (86)	7	<0,001
	2	32 (19)	113 (81)	165	
	3	25 (21)	95 (79)	120	
	4	21 (58)	15 (42)	36	
Estadiamento pT	pT1	127 (30)	300 (70)	427	0,012
	pT2	23 (47)	26 (53)	49	
	pT3	52 (40)	78 (60)	130	
	pT4	4 (57)	3 (43)	7	
Estadiamento pT	pT1	127 (30)	300 (70)	427	0,007
	pT2	23 (47)	26 (53)	49	
	pT3 e pT4	56 (41)	81 (59)	137	
Estadiamento pN	pN0	74 (47)	84 (53)	158	<0,001
	pN1	5 (31)	11 (69)	16	
	pNX	126 (29)	310 (71)	436	
Estadiamento pM	pM0	188 (33)	389 (67)	577	0,122
	pM1	15 (47)	17 (53)	32	

A seguir, fizemos a curva de comparação da SG e SR dos pacientes portadores de CRCC com a expressão baixa e alta da FTO. Na curva de comparação de SG em dias, identificamos uma diferença estatisticamente significativa, onde os pacientes que têm baixa FTO apresentam pior SG do que os com alta FTO (**Figura 20.A**). O mesmo padrão de expressão é observado na SR (**Figura 20.B**) e quando separamos por estadiamento clínico, os pacientes com estadiamento clínico III com baixa FTO apresentam pior SR (**Figura 20.C**). As curvas SG e SR que não tiveram diferença estatisticamente significativa, encontram-se na (**Tabela 36**)

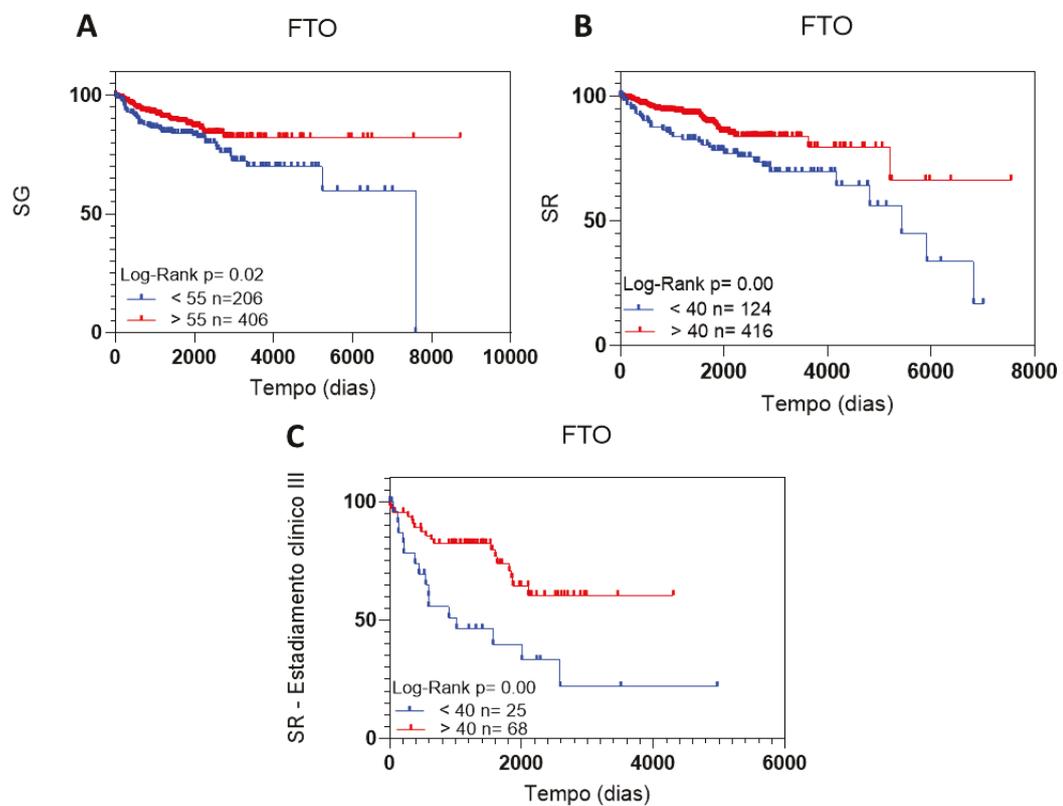


Figura 20 - Curva de comparação da expressão baixa e alta da FTO nos casos de CRCC. Os dados foram exportados do bando de dados no REDcap da instituição, as curvas de SR foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. (A) Curva de SG. (B) Curva de SR (C) Curva de SR separa por estadiamento clínico III.

Tabela 36 - Curva de comparação da expressão da FTO nos casos de CRCC. Os dados foram exportados do bando de dados no REDcap da instituição, as curvas de SG e SR foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. Curvas de SG incluindo todos os casos da casuística e separadas por estadiamento clínico. Curvas de SR excluindo os casos metastáticos e separados por estadiamento clínico.

FTO			
Variável	Categoria	N	P valor
SG	≤55	206	0,028
	>55	406	
SG -Estadiamento I e II	≤55	140	0,219
	>55	312	
SG Estadiamento III e IV	≤55	65	0,374
	>55	84	
SR	≤40	124	0,003
	>40	416	
SR Estadiamento I e II	≤40	99	0,081
	>40	343	
SR Estadiamento III	≤40	25	0,001
	>40	68	

*SG – sobrevida global; SR – sobrevida livre de recidiva.

Para identificar se a FTO pode ser utilizada como um possível alvo, realizamos a regressão de cox e na análise simples, adotamos o risco de óbito na SG como o principal evento e incluímos as variáveis presentes na análise de associação. Foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada FTO (**Tabela 37**), os casos que são ausentes os dados da proteína foram excluídos desta análise. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox.

Tabela 37 - Risco de óbito SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da FTO no CRCC: regressão de cox em modelo Simples.

Variável	Categoria	RR	Simples	
			IC 95%	p valor
Sexo	Feminino	1	ref	
	Masculino	1,618	1,072 – 2,442	0,02
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III e IV	5,980	3,864 – 9,255	<0,00
Metástase ao diagnóstico	Não	1	ref	
	Sim	13,416	8,720 – 20,641	<0,00
Outra neoplasia	Não	1	ref	
	Sim	1,028	0,633 – 1,670	0,91
Expressão PRBM1	Não	2,701	1,801 – 4,049	<0,00
	Sim	1	ref	
Isup	1 e 2	1	ref	
	3 e 4	3,283	1,638 – 6,581	<0,00
Estadiamento pT	pT1	1	ref	
	pT2	4,805	2,714 – 8,509	<0,00
	pT3 e pT4	7,091	4,585 – 10,968	<0,00
Estadiamento pM	M0	1	ref	
	M1	9,838	6,251 – 15,482	<0,00
Expressão FTO	Baixa ≤55	1	ref	
	Alta >55	0,779	0,630 – 0,963	0,02

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla, onde após a avaliação pela regressão de cox em 7 passos e a expressão da FTO não se manteve como um preditor associado ao aumento de risco de óbito na SG (**Tabela 38**).

Tabela 38 - Risco de óbito SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa FTO no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo

Variável	Categoria	RR	<i>Múltipla</i>	
			IC 95%	p valor
<i>Estadiamento clínico</i>	I e II	1	ref	
	III e IV	4,561	1,529 – 13,604	<0,00
<i>Expressão PRBM1</i>	Não	3,488	1,131 – 10,754	<0,00
	Sim	1	ref	
<i>Isup</i>	1 e 2	1	ref	
	3 e 4	8,822	1,858 – 41,878	<0,00

A seguir, realizamos a regressão de cox e na análise Simples, adotamos o risco de recidiva na SR como o principal evento. Foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada FTO e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 39**).

Tabela 39 - Risco de recidiva SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da FTO no CRCC: Regressão de cox em modelo Simples.

Variável	Categoria	RR	<i>Simples</i>	
			IC 95%	p valor
<i>Sexo</i>	Feminino	1	ref	
	Masculino	1,158	0,721 – 1,860	0,545
<i>Estadiamento clínico</i>	I e II	1	ref	
	III	5,293	3,310 – 8,465	<0,00
<i>Outra neoplasia</i>	Não	1,136	0,678 – 1,904	0,629
	Sim	1	ref	
<i>Expressão PRBM1</i>	Não	4,228	2,635 – 6,782	<0,00
	Sim	1	ref	
<i>Estadiamento pT</i>	pT1	1	ref	
	pT2	3,114	1,513 – 6,409	0,002
	pT3 e pT4	6,488	3,955 – 10,645	<0,00
<i>Expressão FTO</i>	Baixa ≤40,0	1	ref	
	Alta >40,0	0,501	0,315 - 0,797	0,004

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla, onde após a avaliação pela regressão de cox em 1 passo, identificamos que a expressão alta da FTO diminui em RR= 0,565 o risco de o paciente ter recidiva (**Tabela 40**).

Tabela 40 - Risco de óbito SR, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da FTO no CRCC: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I e II	1	ref	
	III	4,105	0,680 – 24,791	0,124
Estadiamento pT	pT1	1	ref	
	pT2	2,512	1,156 – 5,457	0,020
	pT3 e pT4	1,537	0,251 – 9,410	0,642
Expressão PRBM1	Não	3,095	1,860 – 5,151	<0,00
	Sim	1	ref	
Expressão FTO	Baixa $\leq 40,0$	1	ref	
	Alta $>40,0$	0,565	0,342 – 0,931	0,025

Portanto, identificamos que a expressão quantitativa alta FTO, concentra-se no tecido normal adjacente. Já no tecido tumoral e metastático, ocorre redução de expressão da FTO, com aumento dos pacientes com baixa FTO. Com nossos dados, podemos inferir que a redução de expressão da FTO se associa com os estágios mais avançados do e aumenta o risco de o paciente ter recidiva, dados observados na curva de comparação e regressão de cox na SR, indicando que a *eraser* FTO possa ser um possível marcador de progressão tumoral.

4.2.6 Correlação entre *writer*, *readers* e *erasers*

A seguir, para entender se a expressão quantitativa das proteínas METTL14, RBM15B, HNRNP C1/C2, YTHDF2 e FTO, tem alguma relação entre si, analisamos a expressão global das proteínas sem ser categorizada aplicando o teste ρ de Spearman (**Tabela 41**).

As duas *writers* METTL14 e RBM15B não apresentam correlação forte, porém, as duas apresentam correlação positiva com a *eraser* FTO, sugerindo uma compensação. Por outro lado, o aumento da YTHDF2 é acompanhado de forma positiva com o aumento concomitante

da METTL14 e RBM15B, indicando que pode haver um aumento de incorporação e leitura da metilação em diversos casos.

Tabela 41 - Correlação entre a expressão da METTL14, RBM15B, HNRNP C1/C2, YTHDF2 e FTO. Análise de correlação quantitativa por meio do coeficiente ρ de Spearman.

	rô de Spearman	METTL14	HNRNP C1/C2	FTO	YTHDF2	RBM15B
METTL14	Coeficiente de correlação	1	-,077	,314**	,409**	,180**
	p valor	668	0,05	<0,00	<0,00	<0,00
	n		625	609	590	577
HNRNP C1/C2	Coeficiente de correlação	-,007	1	-0,020	0,001	-0,012
	p	0,05		0,62	0,99	0,77
	n	625	627	585	565	554
FTO	Coeficiente de correlação	,314**	-0,020	1	,293**	,351**
	p valor	<0,00	0,62		<0,00	<0,00
	n	609	585	615	566	560
YTHDF2	Coeficiente de correlação	,409**	0,001	,293**	1	,369**
	p valor	<0,00	0,99	<0,00		<0,00
	N	590	565	566	600	573
RBM15B	Coeficiente de correlação	,180**	-0,012	,351**	,369**	1
	p valor	<0,00	0,77	<0,00	<0,00	
	n	577	554	560	573	585

Neste sentido, foi criado um Heatmap com as METTL14, RBM15B, FTO, YTHDF2 e HNRNP C1/C2 utilizando a distância euclidiana entre as amostras (**Figura 21**). Como observamos nas análises anteriores, o estadiamento clínico no primeiro diagnóstico e o estadiamento pT, são variáveis que indicam progressão tumoral e estadiamentos mais avançados tiveram associação com a expressão baixa da FTO, baixa RBM15B e expressão alta METTL14. Inserimos as variáveis citadas no heatmap, para observar se são formados clusters de acordo com a similaridade de expressão das proteínas que controlam o mecanismo de ação da m6A.

No heatmap, é possível identificar visualmente, que na FTO, RBM15B, YTHDF2 e METTL14, existem duas possíveis populações indicando que analisar a expressão destas proteínas de forma categórica foi uma boa estratégia. Observando as proteínas em colunas, identificamos que padrão de expressão da FTO é similar a expressão da RBM15B. Já a METTL14 apresenta um padrão distinto de expressão comparado com a FTO (**Figura 21.A**). A HNRNPC1/C2, apresenta expressão homogênea em nossa coorte de pacientes com CRCC. As

variáveis selecionadas não foram ordenadas de acordo com estadiamentos baixos e altos e sim por similaridade de expressão, sendo assim observamos uma distribuição não agrupada dos estadiamentos, estando os mesmos distribuídos no heatmap (**Figura 21.A**).

Para identificar possíveis subpopulações entre os tecidos, foi criado um heatmap com os três tipos de tecidos incluídos nos TMAs de CRCC, tecido normal adjacente, tecido tumoral e tecido de metástase incluindo todos os casos da nossa coorte de pacientes. Foi ordenado a clusterização de acordo com o tipo de tecido, e corroborando nossas análises quantitativa e qualitativas identificamos que no tecido normal, a expressão da FTO é alta e ocorre perda de expressão no tecido tumoral e metastático (**Figura 21.B**). Já na METTL14, na análise de associação e SG inferimos que a alta METTL14 se associou significativamente com os estágios mais agressivos de CRCC e no *heatmap* (**Figura 21.B**), observamos que em alguns casos de tecido tumoral e metastático ocorre redução da METTL14.

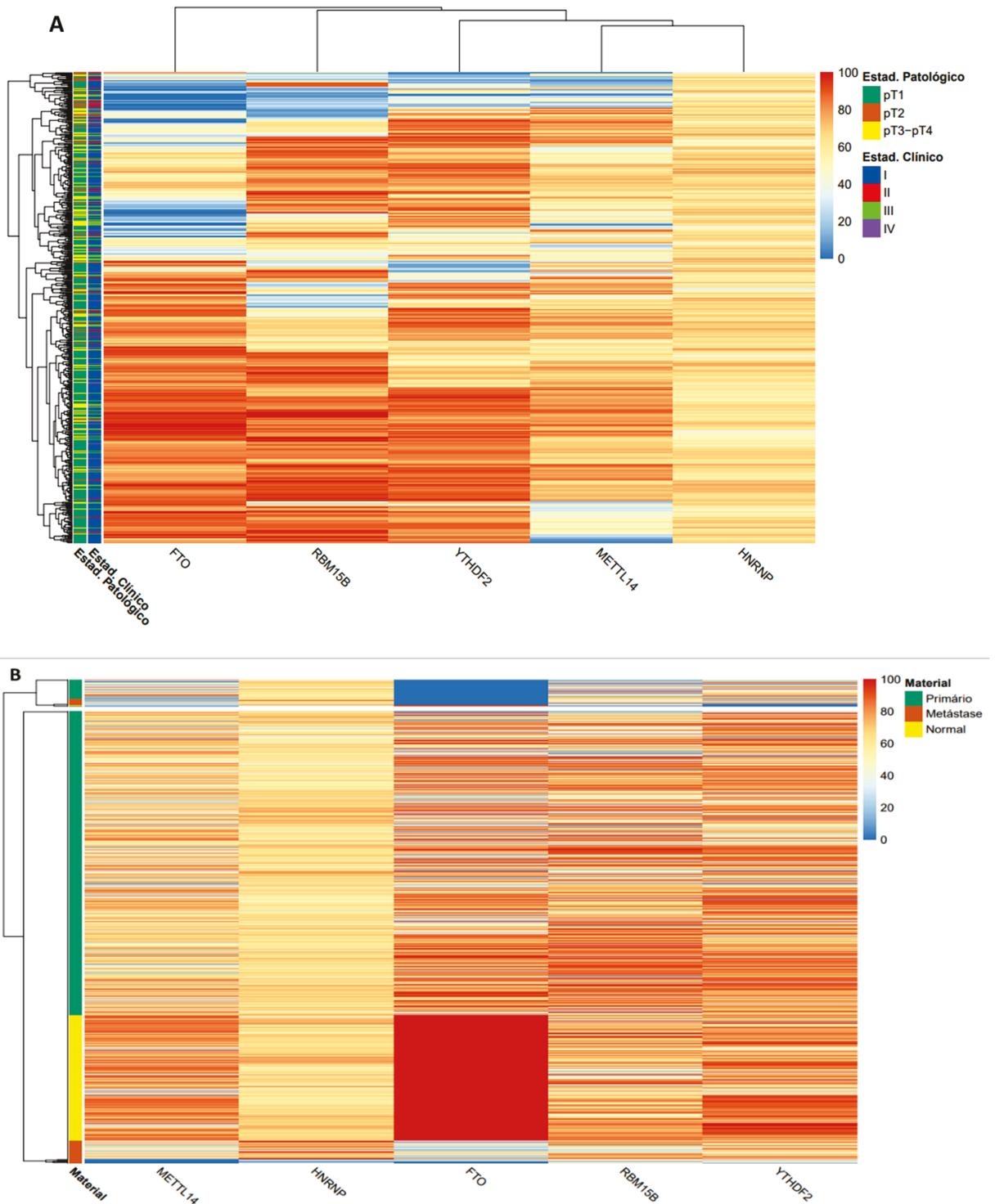


Figura 21 - Heatmap apresenta a expressão quantitativa das proteínas, METTL14, FTO, RBM15B, HNRNP C1/C2 e YTHDF2. (A) Heatmap apresenta a expressão das proteínas METTL14, FTO, RBM15B, HNRNP C1/C2 e YTHDF2 no tecido tumoral de CRCC. (B) Heatmap apresenta a expressão das proteínas METTL14, FTO, RBM15B, HNRNP C1/C2 e YTHDF2 nos três tipos de tecidos, normal adjacente, tecido tumoral e metastático.

4.3 CARCINOMA DE MAMA

4.3.1 Expressão *writer* METTL14

Para analisar a expressão da *writer* METTL14 nos casos de carcinoma de mama, foram realizados experimentos de IHC contendo os subtipos histológicos luminal A (LA), luminal B (LB), superexpressão HER 2 e triplo negativo (TN). Todos tecidos foram previamente organizados em TMA sendo excluídos os casos em que o tecido se apresentou insuficiente para análise. Como controle da especificidade da reação foi omitido o anticorpo primário e a localização subcelular esperada no tecido normal foi avaliada através do site Human Protein Atlas foi comparada a localização observada nas reações de padronização.

Na **Figura 22**, notamos a diferença de intensidade da marcação da METTL14, sendo assim para as próximas análises foi utilizado o HSCORE final, descrito no item 3.5.

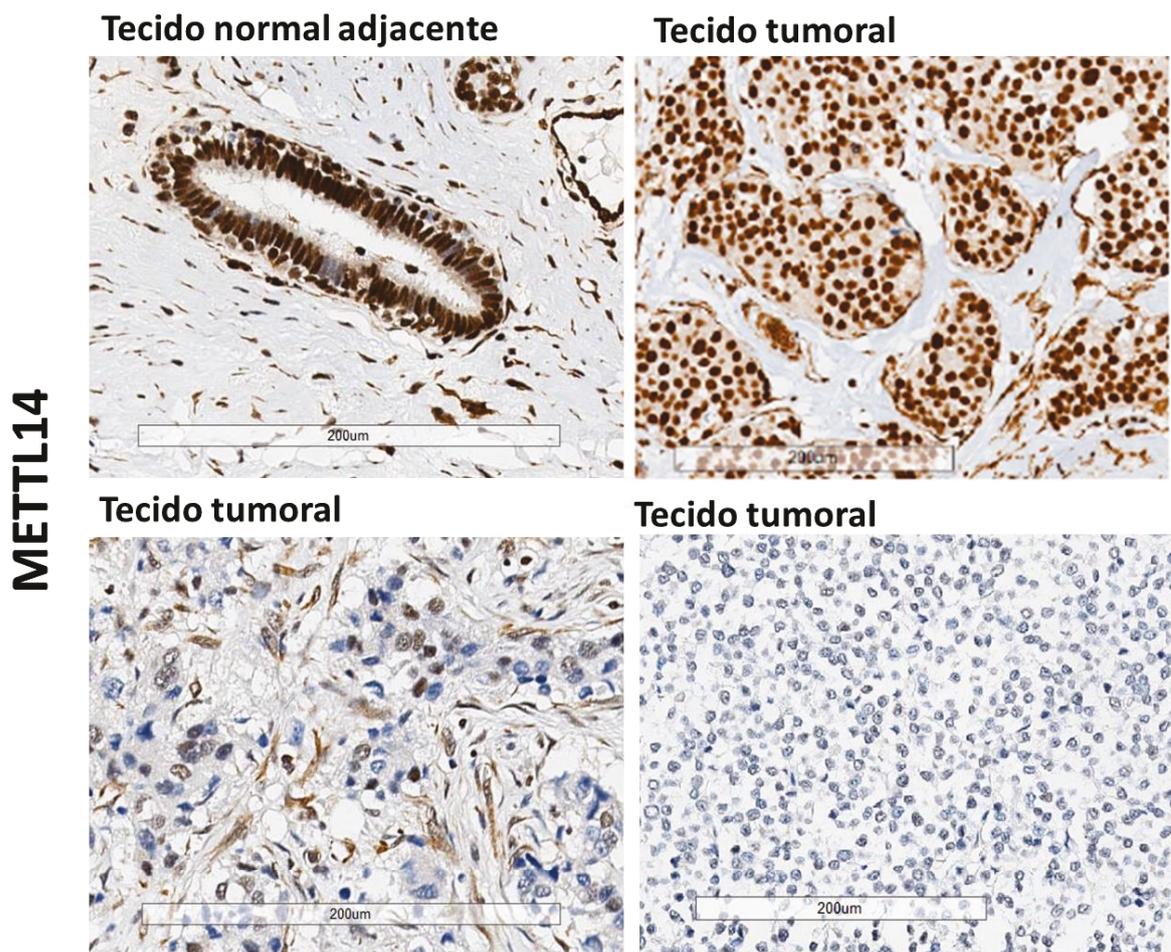


Figura 22 - Expressão da *writer* METTL14 no carcinoma de mama. Expressão nuclear da METTL14 no tecido tumoral, apresentando diferença de expressão.

Um importante fator de prognóstico para o câncer de mama é o marcador de proliferação KI67, sendo a proliferação uma importante característica de tumores malignos, influenciando a resposta terapêutica ⁸⁷. Correlacionamos a expressão quantitativa da METTL14 com o marcador KI67, índice mitótico da população estudada. Interessantemente, detectamos que a expressão da METTL14, se correlaciona de forma negativa com o índice mitótico da população e o marcador KI67, ou seja, quanto mais alta a expressão da METTL14 menor é o índice mitótico e expressão de KI67 da população analisada (**Tabela 42**).

Tabela 42 - Correlação da expressão quantitativa da METTL14 com o índice mitótico e KI67 aplicando o coeficiente ρ de Spearman.

	<i>rô de Spearman</i>	<i>Índice mitótico</i>	<i>KI67</i>
METTL14	Coeficiente de		
HSCORE	correlação	-.433**	-.326**
	N		
	P valor	131	126
		0.001	0.002

Para melhor entendermos a expressão da METTL14, foi definido um ponto de corte pela estatística de Log-Rank com os dados da SG, utilizando o HSCORE gerado com a expressão da METTL14. Foi definido um ponto de corte expressão baixa ≤ 140 e alta > 140 da METTL14, que inclui todos os casos da nossa coorte na (**Anexo 2**). Desta forma, para as próximas análises utilizamos a expressão qualitativa, em baixa ≤ 140 e alta > 140 METTL14.

Para análise de associação da expressão baixa ou alta da METTL14, foram incluídas as variáveis clínicas e anatomopatológicas, menopausa, risco de histórico familiar, presença de outra neoplasia e o estadiamento clínico, grau histológico, grau nuclear, tipo histológico, estadiamento T e N, subtipo molecular, expressão de p53.

Como resultado, identificamos que os pacientes da nossa coorte que apresentam necrose tecidual, se associam estatisticamente com a expressão baixa da METTL14. Para a graduação histológica no câncer de mama, atualmente se aplica o sistema de Nottingham, avaliando três características histológicas: formação tubular, atípica nuclear e índice mitótico. Utilizando este sistema os tumores são classificados como baixo grau I, grau intermediário II e alto grau III histológico (LAKHANI et al. 2012). Observando do grau histológico mais baixo I até o mais avançado III, identificamos que ocorre aumento significativo de casos com baixa

METTL14 e redução de alta METTL14. No grau nuclear 1 e 2, sua totalidade de casos apresentam alta METTL14 e no grau 3 notamos redução de alta METTL14 e aumento de baixa METTL14. O subtipo histológico, o carcinoma ductal invasivo (IDC) é o subtipo mais comum em câncer de mama, seguido pelo carcinoma lobular invasivo (ILC) que representa aproximadamente 10 % dos casos de câncer de mama. O subtipo ILC apresenta características associadas a bom prognóstico por apresentaram baixo grau histológico e baixa expressão de KI67 ⁸⁸. Em nossa análise, não detectamos associação estatisticamente significativa de expressão entre os tipos histológicos de expressão baixa e alta de METTL14, porém, notamos que os pacientes com tipo histológico ILC, tem apenas expressão alta da METTL14, e os pacientes tipo histológico IDC que apresenta um pior cenário para o carcinoma de mama, tem a ocorrência de baixa METTL14. Observando os subtipos moleculares separadamente, identificamos que do subtipo molecular LA para o TN ocorre aumento dos casos com baixa METTL14 (**Tabela 43**).

Tabela 43 - Associação da expressão da METTL14 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de Carcinoma de mama. Os dados foram exportados do Bando de dados de Carcinoma de mama no REDcap da instituição e analisados aplicando os teste Qui-quadrado e exato de Fisher.

Variável	METTL14 HSCORE			p valor	
	Baixa ≤140	Alta >140	Total		
	N (%)	N (%)			
Estadiamento clínico	I	6 (18)	28 (82)	34	0,507
	II	15 (20)	59 (80)	74	
	III e IV	7 (30)	16 (70)	23	
Menopausa	Pré	12 (21)	45 (79)	57	0,824
	Pós	13 (19)	56 (81)	69	
Risco de histórico familiar	Sim	14 (17)	69 (83)	83	0,149
	Não	11 (29)	27 (71)	38	
Outra neoplasia	Sim	3 (17)	15 (83)	18	>0,999
	Não	20 (20)	80 (80)	100	
Presença de necrose	Sim	17 (30)	40 (17)	57	0,052
	Não	11 (15)	64 (85)	75	
Grau Histológico	I	1 (8)	11 (92)	12	<0,001
	II	6 (10)	55 (90)	61	
	III e IV	22 (37)	39 (63)	60	
Grau nuclear	1 e 2	-	28 (100)	27	0,001
	3	29 (28)	76 (72)	105	
Tipo Histológico	IDC	29 (24)	93 (76)	122	0,205
	ILC	-	7 (100)	7	
Estadiamento T	T1	8 (17)	40 (83)	48	0,598
	T2	16 (24)	52 (76)	68	
	T3 e T4	4 (27)	11 (73)	15	
Estadiamento N	N0	12 (19)	50 (81)	62	0,917
	N1	13 (23)	43 (77)	56	
	N2	3 (23)	10 (77)	13	
Subtipo molecular	LA	3 (7)	38 (93)	41	<0,001
	LB	5 (14)	30 (86)	35	
	HER2+	2 (29)	5 (71)	7	
	TN	19 (39)	30 (61)	49	
Expressão p53	Positivo	12 (27)	32 (73)	33	0,130
	Negativo	8 (14)	50 (86)	58	

Na curva de sobrevida global, de comparação entre a expressão baixa e alta da METTL14 nos pacientes com carcinoma de mama, identificamos diferença estatisticamente significativa, onde os pacientes com baixa METTL14, apresentam pior SG em comparação com os pacientes com alta METTL14 (**Figura 23.A**). Segregando a curva de SG por subtipo molecular, detectamos diferença estatisticamente significativa de expressão onde os casos TN com baixa expressão de METTL14 apresentam pior SG (**Figura 23.D**). Nos subtipos LA e LB apresentam um N de casos menor e quase sua totalidade de casos apresentam alta METTL14 (**Figura 23.B.C**). O número de pacientes com o subtipo molecular HER+ da nossa casuística é baixo, por este motivo não foram feitas as curvas de comparação SG e SR com a expressão da METTL14

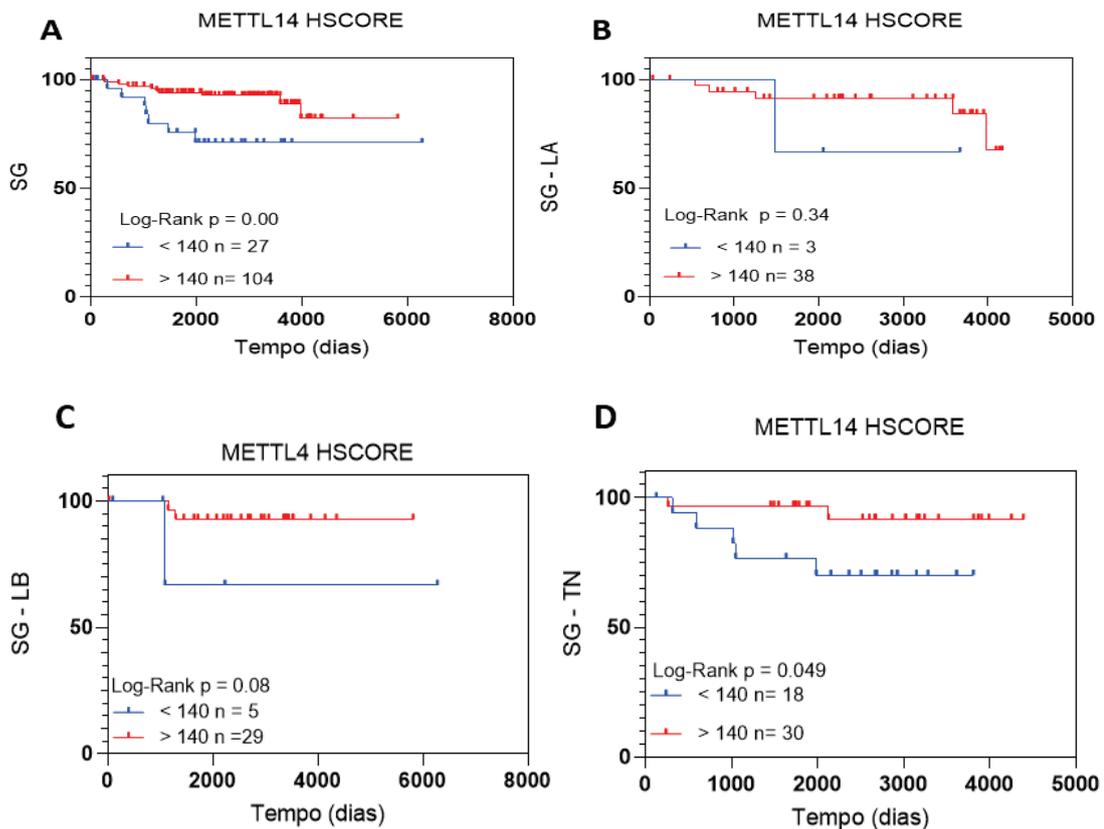


Figura 23 - Expressão da METTL14 nos casos de Carcinoma de mama. Os dados foram exportados do banco de dados no REDcap da instituição, as curvas de SG foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. (A) Curva de SG incluindo todos os casos da casuística. (B) SG dos pacientes com subtipo molecular LA. (C) SG dos pacientes com subtipo molecular LB. (D) SG dos pacientes com subtipo molecular TN.

Na curva de sobrevida livre de progressão (SLP), detectamos diferença estatisticamente significativa de expressão onde os pacientes com baixa METTL14 apresentam pior curva de SLP do que os que tem alta METTL14 (**Figura 24.A**). Separando a curva de SLP por subtipo molecular, identificamos que os pacientes TN com expressão baixa da METTL14, tem uma pior SLP quando comparados com os pacientes com alta METTL14 (**Figura 24.D**). Apesar de na curva de SLP para os pacientes com subtipo molecular LA ter dado um $p = 0.006$, o N de pacientes com baixa METTL14 é baixo, evidenciando que neste subtipo molecular predomina a expressão alta METTL14 (**Figura 24.B**) em nossa coorte de pacientes. Não identificamos diferença de expressão na curva SLP para os pacientes com subtipo molecular LB (**Figura 24.C**).

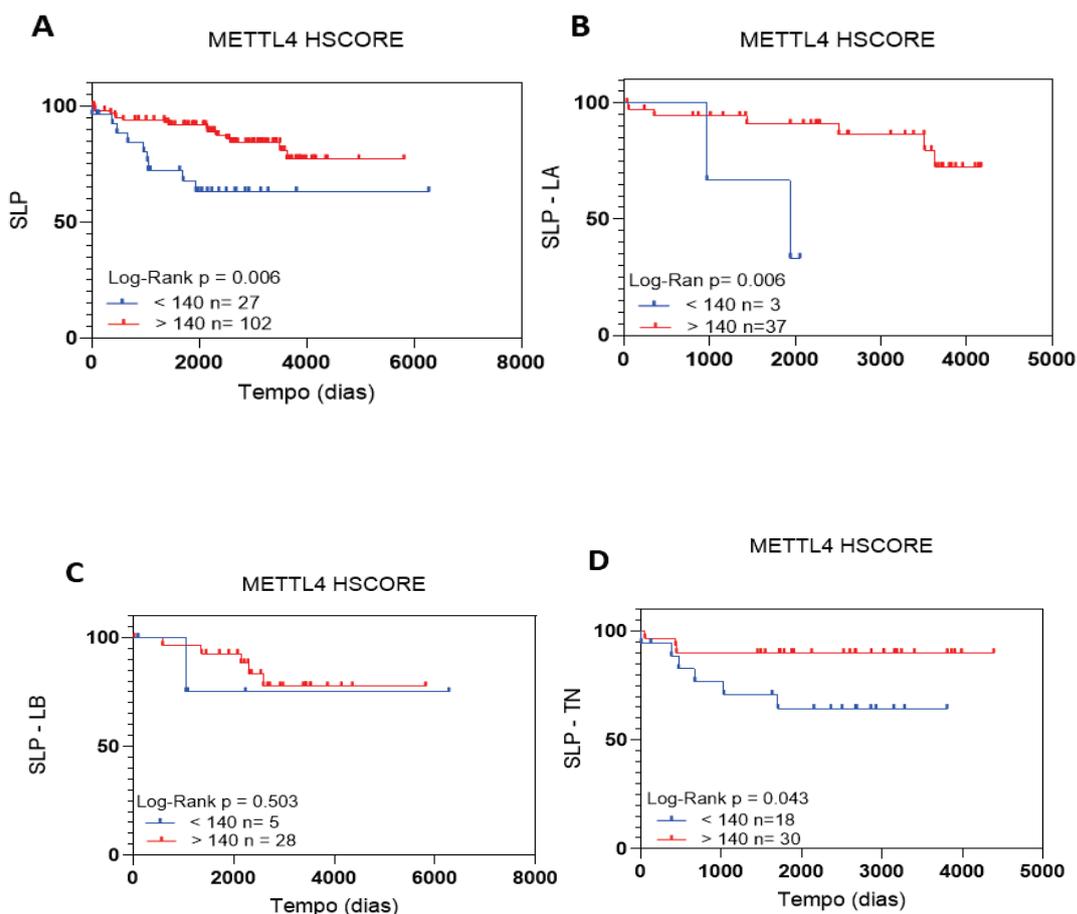


Figura 24 - Expressão da METTL14 nos casos de Carcinoma de mama. Os dados foram exportados do banco de dados no REDcap da instituição, as curvas de SLP foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. (A) Curva de SLP incluindo todos os casos da casuística. (B) SLP dos pacientes com subtipo molecular LA. (C) SLP dos pacientes com subtipo molecular LB. (D) SLP dos pacientes com subtipo molecular TN.

Para avaliar se a expressão baixa ou alta da METTL14 pode ser um preditor de aumento de risco de óbito na SG, realizamos análise simples pela regressão de cox. Foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada METTL14 nos casos de Carcinoma de Mama e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 44**).

Tabela 44 - Risco de óbito SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METTL14 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.

Variável	Categoria	RR	Simples	
			IC 95%	p valor
Menopausa	Pré	1	ref	
	Pós	1,71	0,574 – 5,122	0,335
Outra neoplasia	Não	1,200	0,268 – 5,369	0,811
	Sim	1	ref	
Histórico familiar	Não	1,720	0,544 – 5,434	0,356
	Sim	1	ref	
Estadiamento clínico	I	1	ref	
	II	1,113	0,220 - 5,845	0,881
	III e IV	6,941	1,472 – 32,71	0,014
Presença de necrose	Não	1	ref	
	Sim	0,924	0,328 – 2,600	0,880
Estadiamento T	T1	1	ref	
	T2	1,233	1,361 – 4,213	0,738
	T3 e T4	3,859	0,959 – 15,52	0,057
Estadiamento N	N0	1	ref	
	N1	1,275	0,367 - 4,415	0,702
	N2	6,917	1,948 – 24,55	0,003
Grau histológico	1	1	ref	
	2	1,370	0,164 – 11,446	0,777
	3 e 4	2,091	0,263 – 16,642	0,486
Grau nuclear	I e II	1	ref	
	III	0,89	0,286 – 2,780	0,842
Expressão p53	Não	1	ref	
	Sim	0,873	0,283 – 2,691	0,813
Subtipo molecular	LA	1	ref	
	LB	0,000	0,152 – 2,446	0,485
	HER2	0,953	0,000 – 0,	0,985
	TN	0,581	0,350 – 3,143	0,932
METTL14	Baixa ≤140	3,753	1,387 – 10,156	0,009
	Alta >140	1	ref	

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla, onde após a avaliação pela regressão de cox em 3 passos, podemos aferir que a expressão baixa da METTL14 aumenta em até quase 5 vezes mais o risco de óbito global comparado com a expressão alta da METTL14. **(Tabela 45).**

Tabela 45 - Risco de óbito global na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da MEETTL14 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I	1	ref	
	II	1,112	0,214 – 5,769	0,899
	III e IV	4,526	0,939 – 21,809	0,060
METTL14	Baixa ≤140	4,772	1,432 – 15,903	0,011
	Alta >140	1	ref	

Para avaliar se a expressão da METTL14 é um fator que aumenta o risco de progressão, realizamos a análise de regressão de cox Simples, sendo a SLP o principal evento. Foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada METTL14 nos casos de Carcinoma de Mama e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox **(Tabela 46).**

Tabela 46 - Risco de progressão da SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METTL14 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples

<i>Variável</i>	Categoria	RR	<i>Simples</i>	
			IC 95%	p valor
<i>Menopausa</i>	Pré	1	ref	
	Pós	1,541	0,629 – 3,775	0,344
<i>Histórico familiar de câncer</i>	Não	1,352	0,538 – 3,395	0,521
	Sim	1	ref	
<i>Outra neoplasia</i>	Não	1,254	0,371 – 4,243	0,715
	Sim	1	ref	
<i>Estadiamento clínico</i>	I	1	ref	
	II	2,430	0,532 – 11,093	0,252
	III	12,727	2,772 – 58,422	0,001
<i>Presença de necrose</i>	Não	1	ref	
	Sim	1,797	0,758 – 4,259	0,183
<i>Estadiamento T</i>	T1	1	ref	
	T2	1,233	0,361 – 4,213	0,73
	T3 e T4	3,859	0,959 – 15,52	0,05
<i>Estadiamento N</i>	N0	1	ref	
	N1	1,275	0,367 - 4,415	0,70
	N2	6,917	1,948 – 24,55	0,00
<i>Grau histológico</i>	1	1	ref	
	2	1,750	0,219 – 13,995	0,598
	3 e 4	3,178	0,414 – 24,370	0,266
<i>Grau nuclear</i>	I e II	1	ref	
	III	1,983	0,585 – 6,720	0,272
<i>Expressão p53</i>	Não	1	ref	
	Sim	0,769	0,287 – 2,058	0,601
<i>METTL14</i>	Baixa ≤140	3,472	1,472 – 8,191	0,004
	Alta >140	1	ref	

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla, onde após a avaliação pela regressão de cox em 3 passos, a expressão da METTL14 não se manteve como um preditor para o aumento de risco para progressão tumoral (**Tabela 47**).

Tabela 47 - Risco de progressão da SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da METTL14. Regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável Estadiamento clínico	Categoria	RR	<i>Múltipla</i>	
			IC 95%	p valor
	I	1	ref	
	II	2,193	0,474 – 10,151	0,315
	III e IV	12,971	2,825 – 59,552	0,001

Portanto, em nossas análises identificamos estatisticamente que a baixa expressão da METTL14, está associada aos estágios mais agressivos do Carcinoma de mama, especificamente no subtipo molecular TN, apresentando pior SG e SLP e risco aumentado em quase RR= 4,772 vezes para óbito global, quando comparado com os pacientes com expressão alta da METTL14.

4.3.2 Expressão da *writer* VIRMA (KIAA1429)

A proteína KIAA1429, desempenha seu papel dentro do complexo de metiltransferases sendo um cofator junto com as proteínas WTAP e RBM15 auxiliando as metiltransferases METTL3 e METTL14 na catalisação da modificação química m6A ao mRNA. Por ser um componente deste complexo, sua função e mecanismo de ação se alterado pode levar ao desbalanço da adição da m6A que está envolvida em vários processos biológicos. Entretanto, seu mecanismo de ação na tumorigênese ainda não está completamente esclarecido necessitando de muitos estudos. Nesse sentido, um grupo avaliou com dados do TCGA a expressão da KIAA1429 em 371 tecidos de Carcinoma Hepatocelular e 50 tecidos normais adjacentes e identificaram que esta proteína tem aumento de expressão no tecido tumoral, observando também em curva de sobrevida global que, pacientes com baixa expressão da KIAA1429 apresentam melhor sobrevida dos que os pacientes com alta expressão ⁸⁹.

Sendo assim, iniciamos a padronização da reação de IHC para esta proteína. Todos tecidos foram previamente organizados em TMA sendo excluídos os casos em que o tecido se apresentou insuficiente para análise. Como controle da especificidade da reação foi omitido o anticorpo primário e a localização subcelular esperada no tecido normal foi avaliada através do site Human Protein Atlas foi comparada a localização observada nas reações de padronização. A reação de IHC, foi realizada nos casos de carcinoma de mama para a *writer*

KIAA1429 (**Figura 25**) e para analisar a expressão desta proteína foi utilizado o HSCORE final descrito no item 3.5.

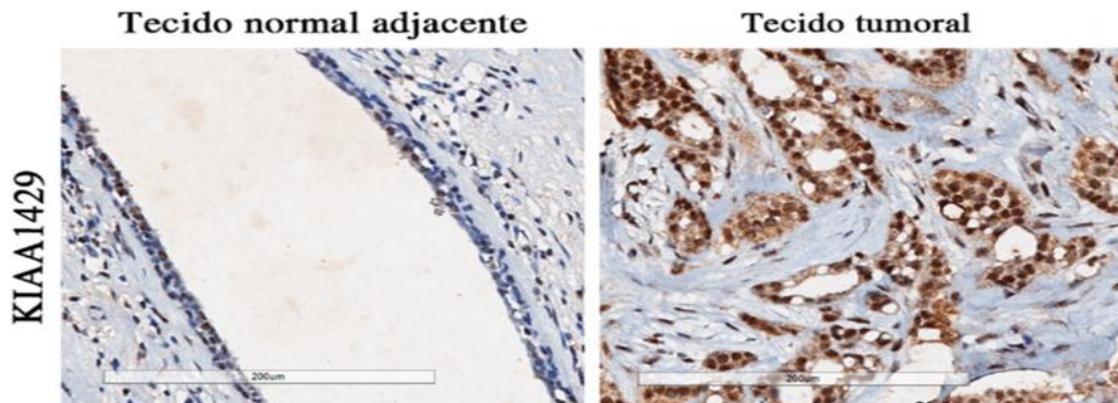


Figura 25 - Expressão da proteína KIAA1429 no TMA de carcinoma de mama. A proteína tem sua localização nuclear.

Para continuar nossa análise, correlacionamos a expressão quantitativa da KIAA1429 com o KI67, índice mitótico. Não foi detectada correlação estatisticamente significativa da expressão da KIAA1429 com os marcadores de proliferação (**Tabela 48**).

Tabela 48 - Correlação da expressão quantitativa da KIAA1429 com o índice mitótico e KI67 aplicando o coeficiente r de Spearman.

	<i>r</i> de Spearman	Índice mitótico	KI67
HSCORE KIAA1429	Coeficiente de correlação		
	n	-,153	-,081
	p valor	125	125
		0.08	0.37

A seguir, foi definido um ponto de corte da expressão KIAA1429, pela estatística de Log-Rank com os dados da SG, utilizando o HSCORE gerado com a expressão da KIAA1429. O ponto de corte definido foi expressão categórica baixa ≤ 110 e alta > 110 da KIAA1429 (**Anexo 2**). Sendo assim, para próximas análises utilizamos a expressão da KIAA1429 categorizada.

Para análise de associação, utilizamos a expressão categórica baixa e alta da KIAA1429, e não identificamos associação estatisticamente significativa de expressão baixa ou alta da KIAA1429 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas analisadas (**Tabela 49**).

Tabela 49 - Associação da expressão da KIAA1429 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de Carcinoma de mama. Os dados foram exportados do Bando de dados de Carcinoma de mama no REDcap da instituição e analisados aplicando os teste Qui-quadrado e exato de Fisher.

<i>Variável</i>	KIAA1429 HSCORE			p valor	
	Baixa ≤110	Alta >110	Total		
	N (%)	N (%)			
<i>Estadiamento clínico</i>	I	20 (56)	16 (44)	36	0,378
	II	45 (69)	20 (31)	65	
	III e IV	15 (67)	8 (33)	24	
<i>Menopausa</i>	Pré	28 (60)	19 (40)	47	0,441
	Pós	51 (67)	25 (33)	76	
<i>Risco de histórico familiar</i>	Sim	54 (64)	31 (36)	85	0,667
	Não	22 (69)	10 (31)	32	
<i>Outra neoplasia</i>	Sim	14 (64)	8 (36)	22	>0,999
	Não	65 (64)	36 (36)	101	
<i>Presença de necrose</i>	Sim	29 (66)	15 (34)	44	>0,999
	Não	52 (64)	29 (36)	81	
<i>Grau Histológico</i>	I	9 (60)	6 (40)	15	0,785
	II	39 (62)	24 (38)	63	
	III e IV	31 (70)	13 (30)	44	
<i>Grau nucelar</i>	1 e 2	22 (65)	12 (35)	34	>0,999
	3	58 (64)	32 (36)	90	
<i>Tipo Histológico</i>	IDC	70 (65)	37 (35)	107	0,779
	ILC	11 (61)	7 (39)	17	
<i>Estadiamento T</i>	T1	43 (73)	16 (27)	59	0,921
	T2	55 (85)	10 (15)	65	
	T3 e T4	15 (79)	4 (21)	19	
<i>Estadiamento N</i>	N0	35 (58)	25 (42)	65	0,096
	N1	38 (76)	12 (24)	50	
	N2	8 (53)	7 (47)	15	
<i>Subtipo molecular</i>	LA	32 (63)	19 (37)	51	0,510
	LB	20 (59)	14 (41)	34	
	HER2+	5 (83)	1 (17)	6	
	TN	24 (73)	9 (27)	33	
<i>Expressão p53</i>	Positivo	30 (75)	10 (25)	40	0,291
	Negativo	44 (65)	24 (35)	68	

Na curva de comparação SG e SLP com a expressão baixa e alta da KIAA1429, não identificamos diferença estatisticamente significativa (**Tabela 50**). Segregando os casos por subtipo molecular, não detectamos alteração de expressão da KIAA1429 (**Tabela 50**).

Tabela 50 - Curva de comparação da expressão da KIAA1429 nos casos de Carcinoma de mama. Os dados foram exportados do bando de dados no REDcap da instituição, as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de recidiva foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. Curvas de SG separadas por subtipo molecular. Curvas de SLP separadas por subtipos moleculares.

KIAA1429 HSCORE			
VARIÁVEL	Categoria	N	p valor
SG	≤110	81	0,086
	>110	44	
SG LA	≤110	32	0,312
	>110	9	
SG LB	≤110	20	0,719
	>110	14	
SG TN	≤110	24	0,127
	>110	9	
SLP	≤110	80	0,103
	>110	43	
SLP LA	≤110	32	0,652
	>110	18	
SLP LB	≤110	29	0,208
	>110	14	
SLP TN	≤110	24	0,116
	>110	9	

*SG- sobrevida global; SLP – sobrevida livre de progressão.

Mesmo sem alterações detectadas nas análises anteriores com a expressão da KIAA1429, realizamos a regressão de cox para identifica se a expressão da KIAA1429 pode ser um preditor de aumento de risco de óbito na SG. Foi realizada análise simples, pela regressão de cox e foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada KIAA1429 nos casos de Carcinoma de Mama e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 51**).

Tabela 51 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da KIAA1429 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.

<i>Variável</i>	Categoria	<i>Simples</i>		
		RR	IC 95%	p valor
<i>Menopausa</i>	Pré	1	ref	
	Pós	0,874	0,234 – 3,261	0,841
<i>Histórico familiar</i>	Não	1,465	0,267 – 8,045	0,660
	Sim	1	ref	
<i>Estadiamento clínico</i>	I	1	ref	
	II	1,142	0,104 – 12,599	0,913
	III e IV	14,018	1,718 – 114,357	0,014
<i>Presença de necrose</i>	Não	1	ref	
	Sim	0,809	0,208 – 3,137	0,759
<i>Estadiamento T</i>	T1	1	ref	
	T2	1,385	0,310 – 6,197	0,670
	T3 e T4	4,201	0,836 – 21,122	0,082
<i>Estadiamento N</i>	N0	1	ref	
	N1	2,007	0,335 – 12,021	0,446
	N2	14,111	2,722 – 73,159	0,002
<i>Grau histológico</i>	1	1	ref	
	2	1,079	0,120 – 9,655	0,946
	3 e 4	1,936	0,225 – 16,676	0,548
<i>Grau nuclear</i>	I e II	1	ref	
	III	0,989	0,255 – 3,835	0,988
<i>Expressão p53</i>	Não	1	ref	
	Sim	1,045	0,248 – 4,399	0,952
<i>Subtipo molecular</i>	LA	1	ref	
	LB	0,614	0,119 – 3,197	0,565
	Her2+	0,000	0,000	0,989
	TN	0,963	0,229 – 4,048	0,959
<i>KIAA149</i>	Baixa ≤110	0,347	0,098 – 1,231	0,102
	Alta >110	1	ref	

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla. Mesmo com a expressão da KIAA1429 não apresentando dado estatisticamente significativo quando avaliada como uma variável independente única, inserimos sua expressão a análise múltipla por ser nossa variável de

interesse. Após a avaliação pela regressão de cox em 4 passo, detectamos que a expressão baixa da KIAA1429 diminui em RR= 0,261 o risco de o paciente vir a óbito (**Tabela 52**).

Tabela 52 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da KIAA1429 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I	1	ref	
	II	1,292	0,117 – 14,291	0,834
	III e IV	18,013	2,146 – 151,175	0,008
KIAA1429	Baixa ≤110	0,261	0,071 – 0,960	0,043
	Alta >110	1	ref	

Para avaliar de a expressão da KIAA1429 pode ser um preditor de aumento de risco de progressão, com os dados da SLP, realizamos análise simples pela regressão de cox. Foram analisados, os casos que contém dados da proteína analisada KIAA1429 e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 53**).

Tabela 53 - Risco de progressão pela SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da KIAA1429 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.

<i>Variável</i>	Categoria	<i>Simples</i>		
		RR	IC 95%	p valor
<i>Menopausa</i>	Pré	1	ref	
	Pós	1,248	0,453 – 3,440	0,668
<i>Histórico familiar</i>	Não	1,724	0,577 – 5,152	0,329
	Sim	1	ref	
<i>Outra neoplasia</i>	Não	3,774	0,500 – 28,463	0,198
	Sim	1	ref	
<i>Estadiamento clínico</i>	I	1	ref	
	II	2,015	0,419 – 9,702	0,382
	III	9,750	2,064 – 46,048	0,004
<i>Presença de necrose</i>	Não	1	ref	
	Sim	1,521	0,576 – 4,018	0,398
<i>Estadiamento T</i>	T1	1	ref	
	T2	2,268	0,682 – 7,541	0,181
	T3 e T4	6,671	1,743 – 25,537	0,006
<i>Grau histológico</i>	1	1	ref	
	2	1,797	0,216 – 14,953	0,588
	3 e 4	3,947	0,498 – 31,312	0,194
<i>Grau nuclear</i>	I e II	1	ref	
	III	3,465	0,791 – 15,179	0,099
<i>Expressão p53</i>	Não	1	ref	
	Sim	0,896	0,310 – 2,592	0,839
<i>KIAA1429</i>	Baixa ≤110	0,360	0,137 – 0,946	0,038
	Alta >110	1	ref	

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla, onde após a avaliação pela regressão de cox em 4 passo, detectamos que a expressão baixa da KIAA1429 diminui em RR = 0,234 o risco de o paciente ter progressão (**Tabela 54**).

Tabela 54 - Risco de progressão na SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da KIAA1429 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I	1	ref	
	II	1,935	0,401 – 9,349	0,411
	III e IV	13,687	2,657 – 70,512	0,002
Outra neoplasia	Não	4,129	0,536 – 31,790	0,173
	Sim	1	ref	
KIAA149	Baixa ≤110	0,234	0,080 – 0,686	0,008
	Alta >110	1	ref	

Sendo assim, em nossas análises não identificamos alteração de expressão da KIAA1429 na análise de associação ou curva de sobrevivência de comparação. Entretanto, detectamos que a expressão baixa da KIAA1429, reduz o risco de o paciente vir a óbito e ter progressão tumoral, mas são poucos indícios para sugerir que a expressão da *writer* KIAA1429, possa estar correlacionada a progressão tumoral nos pacientes da nossa coorte de Carcinoma de mama.

4.3.3 Expressão da *eraser* FTO

Para analisar a expressão da *eraser* FTO nos casos de carcinoma de mama, foram realizados experimentos de IHC contendo os subtipos histológicos luminal A (LA), luminal B (LB), superexpressão HER 2 e triplo negativo (TN). Todos tecidos foram previamente organizados em TMA sendo excluídos os casos em que o tecido se apresentou insuficiente para análise. Como controle da especificidade da reação, foi omitido o anticorpo primário e a localização subcelular esperada no tecido normal foi avaliada através do site Human Protein Atlas foi comparada a localização observada nas reações de padronização. A reação de IHC, foi realizada nos casos de carcinoma de mama para a *eraser* FTO (**Figura 26**) e para analisar a expressão desta proteína foi utilizado o HSCORE final descrito no item 3.5.

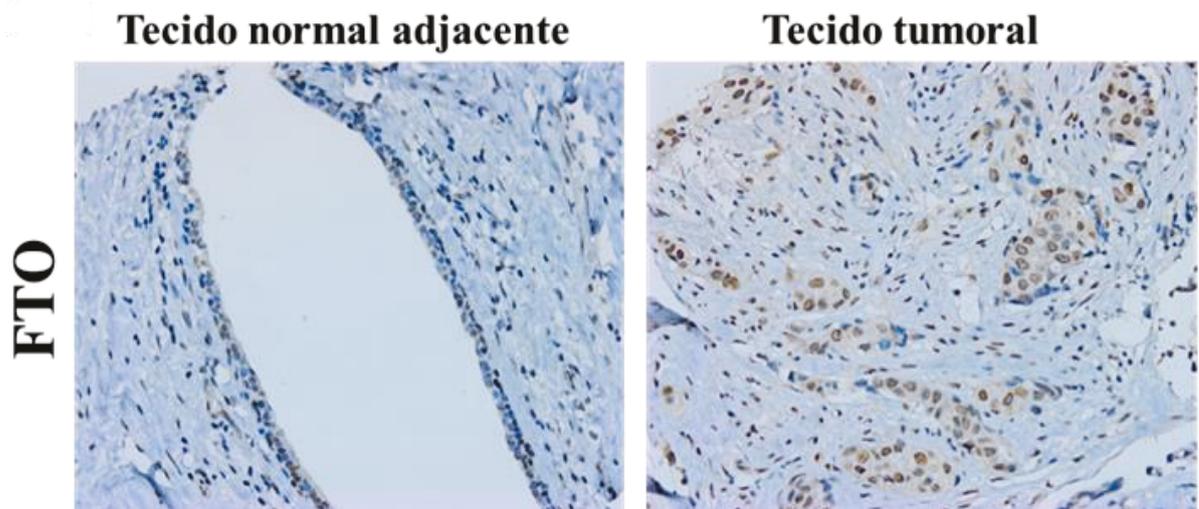


Figura 26 - Expressão da *eraser* FTO apresentando marcação nuclear com diferença de intensidade de marcação.

Foi realizada a correlação da expressão quantitativa da FTO com o marcador de proliferação KI67, índice mitótico da população estudada. Identificamos uma correlação estatisticamente significativa da expressão da FTO com o índice mitótico da coorte analisada, onde ocorre uma concentração de casos com baixa expressão de FTO com baixos índices mitóticos (**Tabela 55**). Apesar de ter correlação estatística significativa da expressão da FTO com o marcador KI67, o valor de r nos mostra uma correlação fraca (**Tabela 55**).

Tabela 55 - Correlação da expressão quantitativa da FTO com o índice mitótico e KI67 aplicando o coeficiente r de Spearman.

	<i>r</i> de Spearman	Índice mitótico	KI67
FTO HSCORE	Coeficiente de correlação	-,358**	-,267**
n		144	144
p valor		<0,00	<0,00

Para melhor analisarmos a expressão da FTO, foi definido um ponto de corte pela estatística de Log-Rank com os dados da SG, utilizando o HSCORE gerado com a expressão da FTO. O ponto de corte definido para expressão qualitativa da FTO foi de expressão baixa ≤ 140 e alta > 140 FTO (**Anexo 2**). Sendo assim, para próximas análises utilizamos a expressão categórica da FTO.

Na análise de associação da expressão baixa e alta da FTO com as variáveis clínicas e anatomopatológicas selecionadas para este estudo, identificamos que a expressão baixa da FTO se associa com os graus histológicos mais avançados. Do grau histológico I para o grau III e IV, detectamos uma diferença estatisticamente significativa, onde ocorre perda de casos com alta FTO e aumento de casos com baixa FTO. Interessantemente, o N de casos dos subtipos moleculares LA e TN são similares, e o LA que apresenta melhor prognóstico tem menos casos com baixa FTO do que o TN, que é subtipo com pior cenário do carcinoma de mama (**Tabela 56**).

Tabela 56 - Associação da expressão da FTO com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de Carcinoma de mama. Os dados foram exportados do Bando de dados de Carcinoma de mama no REDcap da instituição e analisados aplicando os teste Qui-quadrado e exato de Fisher.

<i>Variável</i>	FTO HSCORE			p valor	
	Baixa ≤140	Alta >140	Total		
	N (%)	N (%)			
<i>Estadiamento clínico</i>	I	29 (72)	11 (28)	39	0,401
	II	60 (80)	15 (20)	75	
	III e IV	24 (86)	4 (14)	28	
<i>Menopausa</i>	Pré	43 (78)	12 (22)	55	0,829
	Pós	67 (81)	16 (19)	83	
<i>Risco de histórico familiar</i>	Sim	77 (80)	19 (20)	96	0,243
	Não	25 (69)	11 (31)	36	
<i>Outra neoplasia</i>	Sim	21 (84)	4 (16)	25	0,437
	Não	80 (75)	26 (25)	106	
<i>Presença de necrose</i>	Sim	46 (82)	10 (18)	56	0,411
	Não	66 (75)	22 (25)	88	
<i>Grau Histológico</i>	I	8 (67)	4 (33)	12	0,007
	II	45 (67)	22 (33)	67	
	III e IV	57 (90)	6 (10)	63	
<i>Grau nuclear</i>	1 e 2	21 (66)	11 (34)	32	0,089
	3	91 (81)	21 (19)	112	
<i>Tipo Histológico</i>	IDC	100 (79)	26 (21)	126	0,529
	ILC	12 (71)	5 (29)	17	
<i>Estadiamento T</i>	T1	43 (73)	16 (27)	59	0,278
	T2	55 (85)	10 (15)	65	
	T3 e T4	15 (79)	4 (21)	19	
<i>Estadiamento N</i>	N0	57 (80)	14 (20)	71	0,183
	N1	41 (73)	15 (27)	56	
	N2	15 (94)	1 (6)	21	
<i>Subtipo molecular</i>	LA	31 (62)	19 (38)	50	0,004
	LB	33 (94)	2 (6)	35	
	HER2+	6 (100)	-	6	
	TN	42 (79)	11 (21)	53	
<i>Expressão p53</i>	Positivo	37 (82)	8 (18)	45	0,639
	Negativo	53 (77)	16 (23)	69	

Na busca por mais indícios sobre a existência de alteração da expressão da FTO no carcinoma de mama, fizemos curva de SG e SLP de comparação com a expressão baixa e alta da FTO com todos os casos da nossa coorte, e não identificamos uma diferença estatisticamente de expressão entre as curvas (**Tabela 57**). Segregando as curvas de SG e SLP por subtipos moleculares, também não identificamos diferença de expressão das curvas com a FTO baixa ou alta (**Tabela 57**).

Tabela 57 - Curva de comparação da expressão da FTO nos casos de Carcinoma de mama. Os dados foram exportados do bando de dados no REDcap da instituição, as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de recidiva foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. Curvas de SG separadas por subtipo molecular. Curvas de SLP separadas por subtipos moleculares.

VARIÁVEL	FTO HSCORE		p valor
	Categoria	N	
SG	≤140	113	0,221
	>140	31	
SG LA	≤140	31	0,129
	>140	19	
SG LB	≤140	33	0,649
	>140	2	
SG TN	≤140	42	0,618
	>140	10	
SLP	≤140	112	0,414
	>140	30	
SLP LA	≤140	31	0,426
	>140	18	
SLP LB	≤140	32	0,710
	>140	2	
SLP TN	≤140	42	0,635
	> 140	10	

*SG – sobrevida global; SLP – sobrevida livre de progressão.

Para avaliar se a expressão da FTO é um preditor para o aumento de risco global, realizamos a análise de regressão de cox Simples, sendo a SG o principal evento. Foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada FTO nos casos de Carcinoma de Mama e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 58**).

Tabela 58 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da FTO no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.

<i>Variável</i>	Categoria	<i>Simples</i>		
		RR	IC 95%	p valor
<i>Menopausa</i>	Pré	1	ref	
	Pós	1,197	0,391 – 3,665	0,752
<i>Histórico familiar</i>	Não	1,656	0,483 – 5,672	0,422
	Sim	1	ref	
<i>Outra neoplasia</i>	Não	3,062	0,398 – 23,558	0,282
	Sim	1	ref	
<i>Estadiamento clínico</i>	I	1	ref	
	II	1,113	0,204 – 6,078	0,902
	III e IV	6,990	1,483 – 32,949	0,014
<i>Presença de necrose</i>	Não	1	ref	
	Sim	1,198	0,415 – 3,458	0,738
<i>Estadiamento T</i>	T1	1	ref	
	T2	1,405	0,396 – 4,984	0,598
	T3 e T4	4,082	1,012 – 16,467	0,048
<i>Estadiamento N</i>	N0	1	ref	
	N1	1,732	0,465 – 6,452	0,413
	N2	7,249	1,941 – 27,067	0,003
<i>Grau histológico</i>	1	1	ref	
	2	0,979	0,114 – 8,383	0,985
	3 e 4	1,880	0,238 – 14,863	0,549
<i>Grau nuclear</i>	I e II	1	ref	
	III	1,271	0,358 – 4,511	0,711
<i>Expressão p53</i>	Não	1	ref	
	Sim	1,059	0,336 – 3,342	0,922
<i>Subtipo molecular</i>	LA	1	ref	
	LB	0,839	0,200 – 3,520	0,810
	Her2+	0,000	0,000 –	0,981
	TN	1,315	0,416 – 4,152	0,641
<i>FTO</i>	Baixa ≤140	0,517	0,176 – 1,513	0,228
	Alta >140	1	Ref	

As variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples, foram incluídas na análise Múltipla, onde após a avaliação pela regressão de cox em 4 passo, detectamos que a expressão da FTO não se manteve como um preditor para o risco de óbito (**Tabela 59**).

Tabela 59 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da FTO no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I	1	ref	
	II	1,113	0,204 – 6,078	0,902
	III e IV	6,990	1,483 – 32,949	0,014

A seguir, avaliamos se a expressão da FTO é um preditor para o aumento de risco de progressão, realizamos a análise de regressão de cox Simples, sendo a SLP o principal evento. Foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada FTO nos casos de Carcinoma de Mama e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 60**).

Tabela 60 - Risco de progressão na SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da FTO no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.

Variável	Categoria	RR	Simples	
			IC 95%	p valor
Menopausa	Pré	1	ref	
	Pós	1,270	0,526 – 3,069	0,595
Histórico familiar	Não	1,241	0,477 – 3,231	0,658
	Sim	1	ref	
Outra neoplasia	Não	1,730	0,514 – 5,822	0,376
	Sim	1	ref	
Estadiamento clínico	I	1	ref	
	II	1,672	0,453 – 6,176	0,441
	III	8,153	2,268 – 29,305	0,001
Presença de necrose	Não	1	ref	
	Sim	1,820	0,786 – 4,212	0,162
Estadiamento T	T1	1	ref	
	T2	1,877	0,693 – 5,080	0,215
	T3 e T4	4,823	1,528 – 15,221	0,007
Estadiamento N	N0	1	ref	
	N1	2,308	0,894 – 5,958	0,084
	N2	4,731	1,499 – 14,932	0,008
Grau histológico	1	1	ref	
	2	1,718	0,215 – 13,744	0,610
	3 e 4	3,178	0,414 – 24,377	0,266

Cont/ Tabela 60

		<i>Simples</i>		
<i>Grau nuclear</i>	I e II	1	ref	
	III	3,677	0,860 – 15,721	0,079
<i>Expressão p53</i>	Não	1	ref	
	Sim	0,989	0,388 – 2,518	0,981
<i>FTO</i>	Baixa ≤140	1,337	0,454 – 3,940	0,598
	Alta >140	1	ref	

Para a análise múltipla, foram incluídas as variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples. Após a avaliação pela regressão de cox em 6 passo, a expressão da FTO não foi detectada como um preditor para o aumento de risco de progressão tumoral (**Tabela 61**).

Tabela 61 - Risco de progressão SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da KIAA1429 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo.

		<i>Múltipla</i>		
<i>Variável</i>	Categoria	RR	IC 95%	p valor
<i>Estadiamento clínico</i>	I	1	ref	
	II	1,428	0,379 – 5,382	0,599
	III e IV	7,914	2,202 – 28,438	0,002

Portanto, identificamos que a baixa expressão da FTO está associada com o subtipo molecular TN e os graus histológicos mais avançados. Entretanto, são poucos indícios para aferir que tal alteração, possa estar interferindo no mecanismo de ação da m6A provocando um desbalanço nos mRNAs traduzidos, que tenham relação com a progressão tumoral.

4.3.4 Expressão da *reader* YTHDF2

Para analisar a expressão da *reader* YTHDF2 nos casos de carcinoma de mama, foram realizados experimentos de IHC contendo os subtipos histológicos luminal A (LA), luminal B (LB), superexpressão HER 2 e triplo negativo (TN). Todos tecidos foram previamente organizados em TMA sendo excluídos os casos em que o tecido se apresentou insuficiente para análise. Como controle da especificidade da reação, foi omitido o anticorpo primário e a

localização subcelular esperada no tecido normal foi avaliada através do site Human Protein Atlas foi comparada a localização observada nas reações de padronização. A reação de IHC, foi realizada nos casos de carcinoma de mama para a *reader* YTHDF2 (**Figura 27**) e para analisar a expressão desta proteína foi utilizado o HSCORE final descrito no item **3.5**.

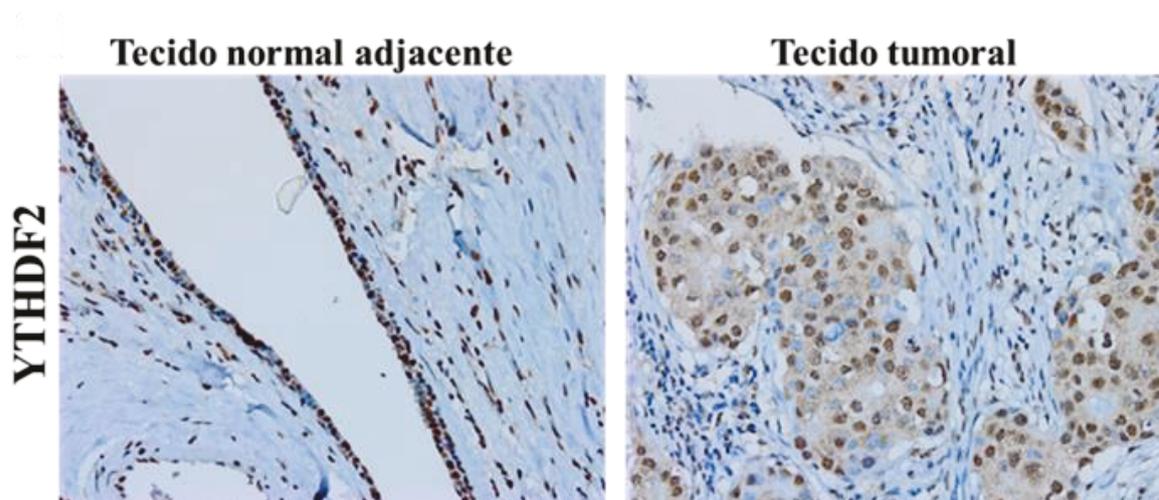


Figura 27 - Expressão da *reader* YTHDF2. Expressão nuclear da YTHDF2 no carcinoma de mama.

A seguir, foi feita a correlação da expressão quantitativa da YTHDF2 com o marcador de proliferação, o índice mitótico da população estudada. Conseguimos detectar uma correlação estatisticamente significativa de expressão da YTHDF2 com o marcador KI67. Entretanto, olhando para o coeficiente de correlação, podemos ver que se trata de uma correlação baixa (**Tabela 62**).

Tabela 62 - Correlação da expressão quantitativa da YTHDF2 com o índice mitótico e KI67 aplicando o coeficiente ρ de Spearman.

	<i>ρ de Spearman</i>	<i>Índice mitótico</i>	<i>KI67</i>
YTHDF2	Coeficiente de correlação	-,109	-,190
HSCORE			
	N	140	141
	p valor	0,19	0,02

Para melhor compreender a expressão da proteína YTHDF2 nos pacientes com Carcinoma de Mama, foi definido um ponto de corte com estatística de Log-Rank com os dados da SG, utilizando o HSCORE gerado com a expressão da YTHDF2. Foi definido o melhor ponto de corte para expressão categórica em baixa ≤ 210 e alta > 210 YTHDF2 (**Anexo 2**). Para as próximas análises foi utilizada a expressão categórica da YTHDF2.

Na análise de associação, da expressão baixa e alta da YTHDF2 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas, identificamos diferença estatística significativa apenas nas variáveis menopausa, onde os pacientes que detectaram o câncer após menopausa, tem aumento dos casos com expressão alta YTHDF2 (**Tabela 63**).

Tabela 63 - Associação da expressão da YTHDF2 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de Carcinoma de mama. Os dados foram exportados do Bando de dados de Carcinoma de mama no REDcap da instituição e analisados aplicando os teste Qui-quadrado e exato de Fisher.

Variável	YTHDF2 HSCORE			p valor	
	Baixa ≤ 210	Alta >210	Total		
	N (%)	N (%)			
Estadiamento clínico	I	22 (54)	19 (46)	41	0,451
	II	37 (51)	36 (49)	73	
	III e IV	10 (38)	16 (62)	26	
Menopausa	Pré	35 (62)	21 (38)	56	0,023
	Pós	33 (42)	46 (58)	79	
Risco de histórico familiar	Sim	17 (44)	44 (48)	61	0,447
	Não	47 (52)	22 (56)	70	
Outra neoplasia	Sim	11 (48)	12 (52)	23	>0,999
	Não	53 (50)	52 (50)	105	
Presença de necrose	Sim	26 (47)	29 (53)	55	0,863
	Não	43 (50)	43 (50)	86	
Grau Histológico	I	8 (62)	5 (38)	13	0,601
	II	30 (47)	34 (53)	64	
	III e IV	29 (47)	32 (53)	61	
Grau nuclear	1 e 2	15 (45)	18 (55)	33	0,694
	3	54 (50)	54 (50)	108	
Tipo Histológico	IDC	64 (51)	61 (49)	115	0,586
	ILC	6 (40)	9 (60)	15	
Estadiamento T	T1	29 (48)	31 (52)	60	0,385
	T2	34 (54)	29 (46)	63	
	T3 e T4	6 (35)	11 (65)	17	
Estadiamento N	N0	38 (54)	32 (46)	70	0,277
	N1	27 (47)	30 (53)	57	
	N2	4 (31)	9 (69)	13	
Subtipo molecular	LA	21 (44)	27 (53)	48	0,414
	LB	17 (50)	17 (50)	34	
	HER2+	1 (20)	4 (80)	5	
	TN	29 (55)	24 (45)	53	
Expressão p53	Positivo	23 (55)	19 (45)	42	0,843
	Negativo	34 (52)	32 (48)	66	

A seguir, foram realizadas as curvas de comparação da expressão baixa e alta da YTHDF2 para SG e SLP. E como resultado desta análise, não identificamos diferença estatisticamente significativa do tempo de SG e SLP quando comparados os pacientes que apresentam expressão alta e baixa da YTHDF e o mesmo resultado é observado quando separamos os pacientes por subtipo molecular (**Tabela 64**).

Tabela 64 - Curva de comparação da expressão da YTHDF2 nos casos de Carcinoma de mama. Os dados foram exportados do bando de dados no REDcap da instituição, as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de recidiva foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. Curvas de SG, separadas por subtipo molecular. Curvas de SLP, separadas por subtipos moleculares.

YTHDF2 HSCORE			
VARIÁVEL	Categoria	N	p valor
SG	≤210	69	0,234
	>210	72	
SG LA	≤210	21	0,300
	>210	27	
SG LB	≤210	17	0,558
	>210	17	
SG TN	≤210	28	0,614
	>210	24	
SLP	≤210	69	0,425
	> 210	70	
SLP LA	≤210	21	0,447
	> 210	26	
SP LB	≤210	17	0,887
	>210	16	
SLP TN	≤210	28	0,607
	>210	24	

*SG - sobrevida global; SLP – sobrevida livre de progressão.

Para avaliar se a expressão da YTHDF2 é um preditor para o aumento de risco global, realizamos a análise de regressão de cox Simples, sendo a SG o principal evento. Foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada YTHDF2 nos casos de Carcinoma de Mama e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 65**).

Tabela 65 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.

<i>Variável</i>	Categoria	RR	<i>Simples</i>	
			IC 95%	p valor
<i>Menopausa</i>	Pré	1	ref	
	Pós	1,287	0,421 – 3,939	0,658
<i>Histórico familiar</i>	Não	1,419	0,415 – 4,853	0,577
	Sim	1	ref	
<i>Outra neoplasia</i>	Não	2,826	0,367 – 21,742	0,318
	Sim	1	ref	
<i>Estadiamento clínico</i>	I	1	ref	
	II	1,171	0,214 – 6,395	0,855
	III e IV	7,504	1,592 – 35,373	0,011
<i>Presença de necrose</i>	Não	1	ref	
	Sim	1,229	0,426 – 3,549	0,703
<i>Estadiamento T</i>	T1	1	ref	
	T2	1,442	0,407 – 5,110	0,571
	T3 e T4	4,377	1,087 – 17,629	0,038
<i>Estadiamento N</i>	N0	1	ref	
	N1	1,667	0,448 – 6,212	0,446
	N2	8,447	2,262 – 31,538	0,002
<i>Grau histológico</i>	1	1	ref	
	2	1,129	0,132 – 9,665	0,912
	3 e 4	2,117	0,267 – 16,756	0,477
<i>Grau nuclear</i>	I e II	1	ref	
	III	1,383	0,389 – 4,917	0,616
<i>Expressão p53</i>	Não	1	ref	
	Sim	1,123	0,355 – 3,550	0,843
<i>Subtipo molecular</i>	LA	1	ref	
	LB	0,864	0,205 – 3,629	0,841
	Her2+	0,000	0,000	0,982
	TN	1,323	0,418 – 4,184	0,634
<i>YTHDF2</i>	Baixa ≤ 210	1	ref	
	Alta > 210	1,902	0,649 – 5,576	0,242

Para a análise múltipla, foram incluídas as variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples. Após a avaliação pela regressão de cox em 4

passos, a expressão da YTHDF2, não se manteve como um preditor para o aumento de risco de óbito global (**Tabela 66**).

Tabela 66 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I	1	ref	
	II	1,171	0,214 – 6,395	0,855
	III e IV	7,504	1,592 – 35,373	0,011

A seguir, avaliamos se a expressão da YTHDF2 é um preditor para o aumento de risco progressão, realizamos a análise de regressão de cox Simples, sendo a SLP o principal evento. Foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada YTHDF2 e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 67**).

Tabela 67 - Risco de progressão na SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.

Variável	Categoria	RR	Simples	
			IC 95%	p valor
Menopausa	Pré	1	ref	
	Pós	1,353	0,560 – 3,267	0,502
Histórico familiar	Não	1,049	0,403 – 2,730	0,922
	Sim	1	ref	
Outra neoplasia	Não	2,638	0,618 – 11,256	0,190
	Sim	1	ref	
Estadiamento clínico	I	1	ref	
	II	3,040	0,666 – 13,878	0,151
	III	13,386	2,958 – 60,589	0,001
Presença de necrose	Não	1	ref	
	Sim	2,324	0,999 – 5,408	0,050
Estadiamento T	T1	1	ref	
	T2	1,893	0,700 – 5,121	0,209
	T3 e T4	5,057	1,605 – 15,927	0,006
Estadiamento N	N0	1	ref	
	N1	2,905	1,089 – 7,748	0,033
	N2	6,627	2,018 – 21,760	0,002
Grau histológico	1	1	ref	
	2	1,955	0,244 – 15,643	0,528
	3 e 4	3,598	0,468 – 27,643	0,218
Grau nuclear	I e II	1	ref	
	III	4,043	0,945 – 17,301	0,060
Expressão p53	Não	1	ref	
	Sim	0,895	0,335 – 2,392	0,826
YTHDF2	Baixa ≤210	1	ref	
	Alta >210	1,838	0,778 – 4,338	0,165

Para a análise múltipla, foram incluídas as variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples. Após a avaliação pela regressão de cox em 5 passos, concluímos que a expressão da YTHDF2 não aumenta o risco de o paciente ter progressão tumoral (**Tabela 68**).

Tabela 68 - Risco de progressão na SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da YTHDF2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	Múltipla	
			IC 95%	p valor
Estadiamento clínico	I	1	ref	
	II	2,173	0,466 – 10,131	0,323
	III e IV	9,796	2,128 – 45,105	0,003
Outra neoplasia	Não	4,634	0,621 – 34,566	0,135
	Sim	1	ref	
Presença de necrose	Não	1	ref	
	Sim	2,144	0,914 – 5,029	0,080

Com estas análises, detectamos associação da expressão alta *reader* YTHDF2, apenas com a variável menopausa. Entretanto, com apenas um indício de alteração, não podemos aferir que a expressão da YTHDF2 possa ter alguma influência na tumorigênese dos pacientes com Carcinoma de mama.

4.3.5 Expressão da *reader* HNRNP C1/C2

Para analisar a expressão da HNRNPC1/C2 nos tecidos de carcinoma de mama dos pacientes tratados do A.C.Camargo Cancer Center, foram realizados experimentos de padronização das reações de IHC. Como controle da especificidade da reação foi omitido o anticorpo primário. A localização subcelular esperada no tecido normal foi avaliada através do site Human Protein Atlas e foi comparada a localização observada nas reações de padronização acima nos casos de carcinoma de mama, contendo os subtipos histológicos luminal A, luminal B, superexpressão HER 2 e tipo basal, todos tecidos foram organizados previamente em TMA sendo excluídos os casos em que o tecido se apresentou insuficiente para análise. A reação de IHC, foi realizada nos casos de carcinoma de mama para a *reader* HNRNP C1/C2 (**Figura 28**) e para analisar a expressão desta proteína foi utilizado o HSCORE final descrito no item 3.5.

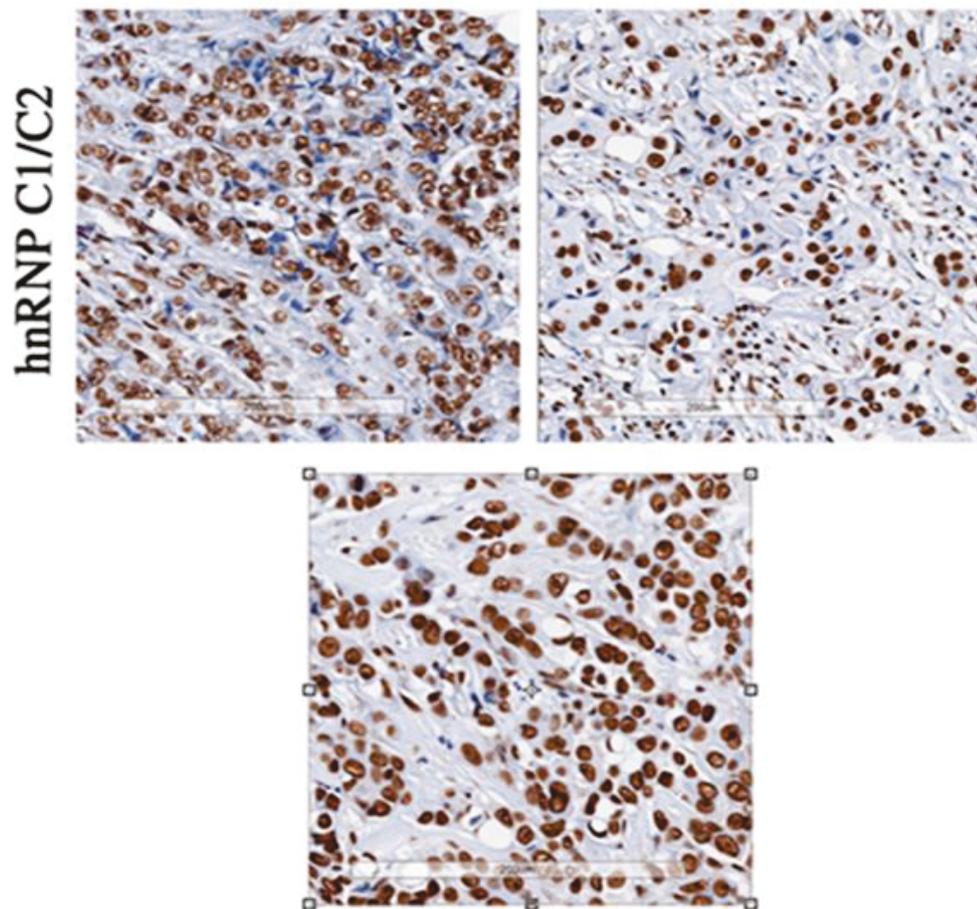


Figura 28 - Expressão da *reader* HNRNP C1/C2 no tecido de carcinoma de mama. A proteína tem sua localização nuclear apresentando homogeneidade de expressão entre os diferentes casos.

Posteriormente, correlacionamos a expressão da HNRNP C1/C2 com marcadores que indicam a proliferação tumoral o KI67 e o índice mitótico e foi identificada uma correlação estatisticamente significativa apenas na expressão do KI67 (**Tabela 69**). Entretanto, por ser um r muito baixo não sugerimos que essa correlação possa fazer alguma diferença biologicamente para os pacientes com câncer de mama.

Tabela 69 - Correlação da expressão quantitativa da HNRNP C1/C2, com o índice mitótico e KI67 aplicando o coeficiente ρ de Spearman.

	<i>rho</i> de Spearman	Índice mitótico	KI67
HNRNP C1/C2 HSCORE	Coeficiente de correlação	,233	,075
	N	143	143
	P valor	0,007	0,372

Para avaliarmos a expressão categórica da HNRNP C1/C2, foi definido um ponto de corte pela estatística de Log-Rank com os dados da SG, utilizando o HSCORE gerado da expressão da HNRNP C1/C2. Foi definido o ponto de corte para a expressão categórica em baixa $\leq 160\%$ e alta $> 160\%$ da METTL14, que inclui todos os casos da nossa coorte na **(Anexo 2)**. Sendo assim, para as próximas análises, foi utilizada a expressão categórica da HNRNP C1/C2.

Como resultado da análise de associação, não identificamos qualquer associação da expressão baixa ou alta da HNRNP C1/C2 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas, incluídas neste estudo **(Tabela 70)**.

Tabela 70 - Associação da expressão da HNRNP C1/C2 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos casos de Carcinoma de mama. Os dados foram exportados do Bando de dados de Carcinoma de mama no REDcap da instituição e analisados aplicando os teste Qui-quadrado e exato de Fisher.

<i>Variável</i>	HNRNP C1/C2 HSCORE			p valor	
	Baixa ≤160	Alta >160	Total		
	N (%)	N (%)			
<i>Estadiamento clínico</i>	I	17 (41)	24 (59)	41	0,54
	II	27 (37)	46 (63)	75	
	III e IV	8 (29)	20 (71)	28	
<i>Menopausa</i>	Pré	22 (40)	33 (60)	55	0,720
	Pós	30 (36)	53 (64)	83	
<i>Risco de histórico familiar</i>	Sim	34 (26)	60 (64)	94	>0,999
	Não	14 (37)	24 (63)	38	
<i>Outra neoplasia</i>	Sim	12 (52)	11 (48)	23	0,159
	Não	38 (36)	69 (64)	107	
<i>Presença de necrose</i>	Sim	15 (26)	42 (74)	57	0,074
	Não	36 (42)	50 (58)	106	
<i>Grau Histológico</i>	I	6 (46)	7 (54)	13	0,36
	II	25 (38)	41 (62)	66	
	III e IV	20 (32)	43 (68)	63	
<i>Grau nucelar</i>	1 e 2	12 (36)	21 (64)	33	>0,999
	3	39 (35)	71 (64)	110	
<i>Tipo Histológico</i>	IDC	47 (37)	79 (63)	126	0,600
	ILC	5 (29)	12 (71)	17	
<i>Estadiamento T</i>	T1	26 (44)	33 (56)	59	0,29
	T2	20 (31)	45 (69)	65	
	T3 e T4	6 (33)	12 (67)	18	
<i>Estadiamento N</i>	N0	26 (37)	45 (63)	71	0,95
	N1	20 (36)	36 (64)	56	
	N2	6 (40)	9 (60)	15	
<i>Subtipo molecular</i>	LA	20 (42)	25 (58)	45	0,60
	LB	14 (38)	23 (62)	37	
	HER2+	1 (17)	5 (83)	6	
	TN	17 (33)	35 (67)	52	
<i>Expressão p53</i>	Positivo	16 (36)	28 (64)	44	0,695
	Negativo	27 (40)	40 (60)	67	

Na curva de sobrevida global e livre de recidiva de comparação da expressão baixa e alta da HNRNP C1/C2 nos casos de Carcinoma de mama, não foi identificada diferença estatística significativa de expressão entre as categorias da proteína (**Tabela 71**). Segregando as curvas SG e SLP por subtipo histológico, também não foi detectada qualquer alteração de expressão.

Tabela 71 - Curva de comparação da expressão da HNRNP C1/C2 nos casos de Carcinoma de mama. Os dados foram exportados do bando de dados no REDcap da instituição, as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de recidiva foram realizadas utilizando o estimador Kaplan-Meier aplicando o teste Log-Rank. Curvas de SG separadas por subtipo molecular. Curvas de SLP separadas por subtipos moleculares.

HNRNP C1/C2 HSCORE			
VARIÁVEL	Categoria	N	p valor
SG	≤160	52	0,482
	>160	91	
SG LA	≤160	20	0,816
	>160	28	
SG LB	≤160	14	0,803
	>160	23	
SG TN	≤160	17	0,122
	>160	34	
SLP	≤160	52	0,246
	> 160	89	
SLP LA	≤160	20	0,839
	> 160	27	
SLP LB	≤160	14	0,829
	> 160	22	
SLP TN	≤160	17	0,123
	> 160	34	

Para avaliar se a proteína HNRNP C1/C2 é um preditor para o aumento de risco global, realizamos a análise de regressão de cox Simples, sendo a SG o principal evento. Foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada HNRNP C1/C2 e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 72**).

Tabela 72 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da HNRNP C1/C2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.

<i>Variável</i>	Categoria	RR	<i>Simples</i>	
			IC 95%	p valor
<i>Menopausa</i>	Pré	1	ref	
	Pós	1,200	0,392 – 3,672	0,749
<i>Histórico familiar</i>	Não	1,482	0,433 – 5,075	0,531
	Sim	1	ref	
<i>Outra neoplasia</i>	Não	2,845	0,370 – 21,883	0,315
	Sim	1	ref	
<i>Estadiamento clínico</i>	I	1	ref	
	II	1,142	0,209 – 6,236	0,878
	III e IV	7,164	1,520 – 33,771	0,013
<i>Presença de necrose</i>	Não	1	ref	
	Sim	1,169	0,405 – 3,373	0,773
<i>Estadiamento T</i>	T1	1	ref	
	T2	1,378	0,389 – 4,883	0,620
	T3 e T4	4,098	1,017 – 16,512	0,047
<i>Estadiamento N</i>	N0	1	ref	
	N1	1,667	0,448 – 6,209	0,446
	N2	7,885	2,111 – 29,447	0,002
<i>Grau histológico</i>	1	1	ref	
	2	1,123	0,131 – 9,621	0,916
	3 e 4	2,116	0,267 – 16,781	0,478
<i>Grau nuclear</i>	I e II	1	ref	
	III	1,336	0,376 – 4,742	0,654
<i>Expressão p53</i>	Não	1	ref	
	Sim	1,092	0,345 – 3,452	0,881
<i>Subtipo molecular</i>	LA	1	ref	
	LB	0,774	0,185 – 3,247	0,727
	Her2+	0,000	0,000	0,981
	TN	1,354	0,428 – 4,284	0,606
<i>HNRNPC1/C2</i>	Baixa ≤160	1,438	0,520 – 3,976	0,484
	Alta >160	1	ref	

Para a análise múltipla, foram incluídas as variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples. Após a avaliação pela regressão de cox em 4 passo, a expressão da HNRNP C1/C2 não foi identificada como um preditor para o aumento do risco de óbito global dos pacientes com Carcinoma de mama (**Tabela 73**).

Tabela 73 - Risco de óbito na SG, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da HNRNP C1/C2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo.

Variável	Categoria	RR	<i>Múltipla</i>	
			IC 95%	p valor
<i>Estadiamento clínico</i>	I	1	ref	
	II	1,142	0,209 – 6,236	0,878
	III e IV	7,164	1,520 – 33,771	0,013

A seguir, realizamos a análise de regressão de cox Simples, sendo a SLP o principal evento. Foram analisados os casos que contém dados da proteína analisada HNRNP C1/C2 e incluídas as variáveis que foram avaliadas na análise de associação. As variáveis que não apresentaram proporcionalidade foram excluídas da regressão de cox (**Tabela 74**).

Tabela 74 - Risco de progressão na SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da HNRNP C1/C2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Simples.

Variável	Categoria	RR	<i>Simples</i>	
			IC 95%	p valor
<i>Menopausa</i>	Pré	1	ref	
	Pós	1,170	0,478 – 2,865	0,732
<i>Histórico familiar</i>	Não	1,210	0,459 – 3,185	0,700
	Sim	1	ref	
<i>Outra neoplasia</i>	Não	2,484	0,580 – 10,628	0,220
	Sim	1	ref	
<i>Estadiamento clínico</i>	I	1	ref	
	II	2,615	0,565 – 12,106	0,219
	III	12,794	2,828 – 57,892	0,001
<i>Presença de necrose</i>	Não	1	ref	
	Sim	1,983	0,839 – 4,687	0,119
<i>Estadiamento T</i>	T1	1	ref	
	T2	2,216	0,769 – 6,383	0,140
	T3 e T4	5,872	1,761 – 19,575	0,004
<i>Estadiamento N</i>	N0	1	ref	
	N1	2,581	0,954 – 6,982	0,062
	N2	6,170	1,879 – 20,265	0,003
<i>Grau histológico</i>	1	1	ref	
	2	1,743	0,214 – 14,218	0,604
	3 e 4	3,646	0,473 – 28,093	0,214

Cont/ Tabela 74

<i>Simples</i>				
<i>Grau nuclear</i>	I e II	1	ref	
	III	3,658	0,853 – 15,685	0,081
<i>Expressão p53</i>	Não	1	ref	
	Sim	0,871	0,326 – 2,328	0,783
<i>HNRNP</i>	Baixa ≤160	1	ref	
	Alta >160	1,339	0,542 – 3,303	0,527

Para a análise múltipla, foram incluídas as variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise Simples. Após a avaliação pela regressão de cox em 6 passo, a expressão da HNRNP C1/C2 não se manteve como um preditor para o risco de progressão tumoral (**Tabela 75**).

Tabela 75 - Risco de progressão na SLP, presente nas variáveis analisadas no estudo incluindo a expressão qualitativa da HNRNP C1/C2 no Carcinoma de mama: regressão de cox em modelo Múltiplo.

<i>Múltipla</i>				
<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>RR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p valor</i>
<i>Estadiamento clínico</i>	I	1	ref	
	II	2,237	0,475 – 10,535	0,309
	III e IV	12,466	2,756 – 56,393	0,001

Sendo assim, para a expressão da HNRNP nos casos de Carcinoma de Mama, não detectamos alterações relevantes que nos sugerissem que está possa estar interferindo no mecanismo de ação da m6A.

4.3.6 Correlação entre writer, readers e erasers

A seguir, para entender se a expressão quantitativa das proteínas METTL14, KIAA1429, HNRNP C1/C2, YTHDF2 e FTO, tem alguma relação entre si, analisamos a expressão global das proteínas sem ser categorizada aplicando o teste *rô* de Spearman. Identificamos que a expressão da METTL14 se correlaciona positivamente com a expressão da FTO e a FTO apresenta correlação positiva com a KIAA1429, porém, é uma correlação fraca. Já a YTHDF2 se correlaciona fortemente com a HNRNP C1/C2. Entretanto, a YTHDF2 e HNRNP C1/C2, são

proteínas que não identificando alteração de expressão no carcinoma de mama. Sendo assim, não sugerimos que esta correlação tenha alguma relação com alteração do mecanismo de ação da m6A no caos de carcinoma de mama (**Tabela 76**).

Tabela 76 - Correlação entre a expressão da METTL14, KIAA1429, HNRNP C1/C2, YTHDF2 e FTO no Carcinoma de mama. Análise de correlação quantitativa por meio do coeficiente r de Spearman.

	rô de Spearman	METTL14	HNRNP C1/C2	FTO	YTHDF2	KIAA1429
METTL14	Coeficiente de correlação	1	-,144	,248**	,095	,120
	p valor		0,11	<0,00	0,30	0,23
HNRNP C1/C2	n	132	121	121	118	99
	Coeficiente de correlação	-,144	1	0,04	,461**	,045
FTO	p valor	0,11	0,59	0,00	0,59	0,59
	n	121	627	137	135	137
YTHDF2	Coeficiente de correlação	,248**	0,04	1	,275**	,307**
	p valor	<0,00	0,59	<0,00	<0,00	<0,00
KIAA1429	n	121	137	145	135	118
	Coeficiente de correlação	,095	,461**	,275**	1	,231**
METTL14	p valor	0,30	<0,00	<0,00		0,01
	N	118	135	135	142	116
HNRNP C1/C2	Coeficiente de correlação	,120	,045	,307**	,231**	1
	p valor	0,23	0,59	<0,00	0,01	
FTO	n	99	137	118	116	125

Neste sentido, foi criado um Heatmap com a expressão das proteínas METTL14, KIAA1429, FTO, YTHDF2 e HNRNP C1/C2 utilizando a distância euclidean entre as amostras (**Figura 29**).

Olhando a expressão global da FTO no heatmap, identificamos que de fato sua expressão nos casos de Carcinoma de mama é mais baixa e que existam duas possíveis subpopulações, nos sugerindo que a forma mais adequada, foi avaliar sua expressão de forma categórica (**Figura 29**). Como detectado na (**Tabela 77**), a expressão FTO apresenta correlação positiva com a expressão da KIAA1429 e no heatmap podemos visualmente observar essa correlação de expressão. Já na METTL14, observamos que existem também duas possíveis

subpopulações, e que os casos que apresentam baixa expressão são do subtipo molecular TN (Figura 30).

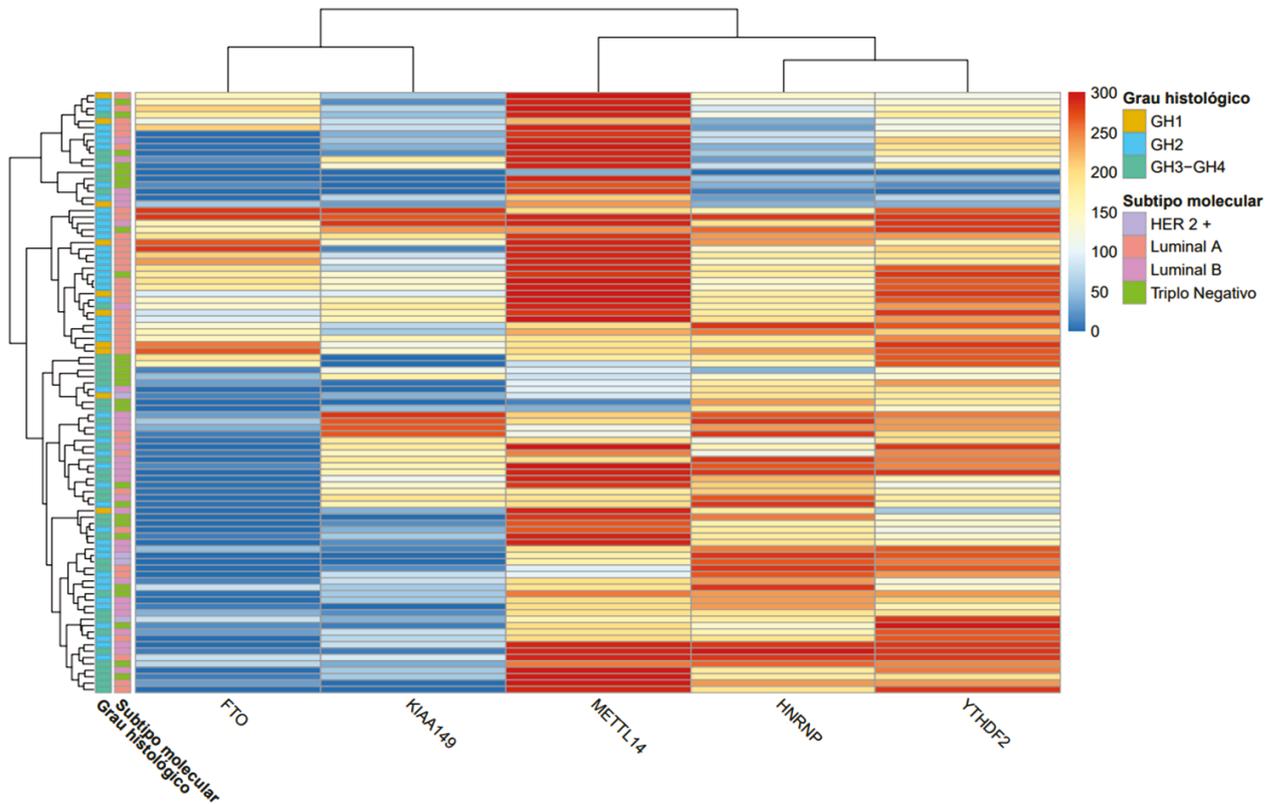


Figura 29 - Heatmap apresenta a expressão quantitativa das proteínas, METTL14, FTO, KIAA1429, HNRNP C1/C2 e YTHDF2.

Observando a coluna vertical do heatmap na (Figura 29), identificamos que por similaridade as amostras formaram três clusters. Após a identificação dos clusteres, foram realizadas curvas de comparação da SG e SLP, para ver se identificávamos diferença de expressão entre os clusteres. Como resultado desta análise, não identificamos diferença do tempo de SG e SLP, para os pacientes nos três clusteres identificados (Figura 30,B,C).

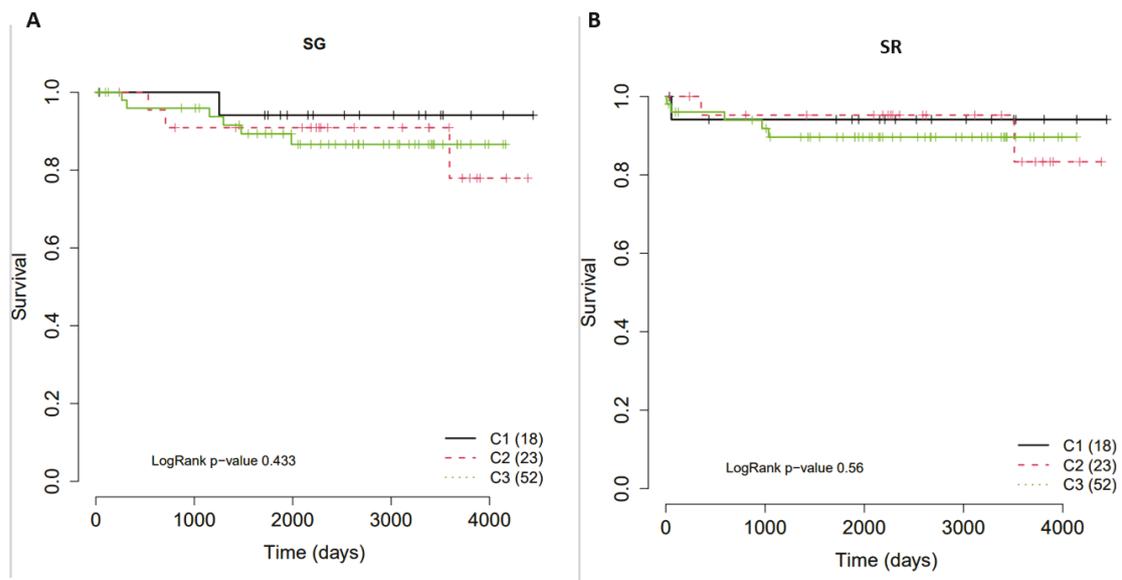


Figura 30 - Curva de sobrevivida com os pacientes agrupados por cluteres no heatmap. (A) Curva de sobrevivida global. (B) Curva de sobrevivida livre de recidiva.

4 DISCUSSÃO

Como citado anteriormente, a METTL14 é uma proteína com domínio homólogo da METTL3 e juntas formam o complexo de metiltransferases que juntamente com suas proteínas adicionam a m6A no mRNA. Pesquisadores ⁹⁰, analisaram a expressão da METTL14 no Carcinoma Hepacelular e sugerem que essa proteína possa ser um importante supressor tumoral. Em suas análises, observaram que pacientes com baixa expressão desta proteína apresentaram recorrência da doença e pior sobrevida, associando a com um evento importante no surgimento de metástase neste tipo tumoral. No câncer de colorretal, pacientes com baixa expressão da METTL14 apresentaram prognóstico desfavorável ⁹¹. Outro grupo de pesquisadores, avaliaram linhagens celulares de câncer de mama e identificaram que a superexpressão METTL14 promove o aumento de migração e proliferação celular ⁹². Nos últimos anos, estudos sugerem que alteração da expressão da METTL14, está relacionada com os piores estágios de diferentes tipos de cânceres. Diante dos nossos dados apresentados, no carcinoma de mama, podemos inferir que a expressão baixa da METTL14 se associa com o grau histológico avançado e o subtipo molecular TN. Os subtipos moleculares LA e LB tem maior ocorrência de pacientes com alta METTL14 e os pacientes com o subtipo molecular TN apresentam mais casos com baixa METTL14. Em 2019, outro grupo de pesquisa identificou que os níveis de expressão da METTL14 em mRNA, teve redução no subtipo molecular TN ⁹³. A maioria dos tumores do TN se manifestam no tipo histológico IDC ⁹². Em nossas análises, não detectamos uma diferença estatisticamente significativa de expressão baixa e alta da METTL14 com os subtipos histológicos. Entretanto, todos os pacientes com o subtipo histológico ILC, apresentam expressão alta da METTL14, enquanto os com o subtipo IDC, apresentam pacientes com expressão baixa da METTL14. Na curva de SG e SLP de comparação, detectamos que os pacientes com subtipo molecular TN com baixa expressão da METTL14, tem pior sobrevida do que os pacientes com alta METTL14. Na regressão de cox, pacientes da nossa coorte de carcinoma de mama, com expressão baixa da METTL14, apresentam o risco de óbito global aumentado em (RR = 4,772, p= 0,01). No CRCC, observamos redução estatisticamente significativa de expressão da METTL14 no tecido tumoral e metastático quando comparado com o tecido normal adjacente o tumor. A redução de expressão da METTL14 em pacientes com CRCC, também foi observada em outro estudo por qRT-PCR ⁹⁴.

Porém, em nossa análise de associação, identificamos associação positiva de alta METTL14 com os piores estágios da doença, como na classificação ISUP alta (3 e 4) e estadiamento patológico pT3 e pT4. Sendo assim, em nossa coorte de pacientes com CRCC do A.C. Camargo Cancer Center, sugerimos que a alteração da expressão da METTL14 possa estar ocorrendo em dois momentos distintos, um quando ocorre a redução de sua expressão, e outro que ocorre a regulação positiva da expressão alta METTL14, associada a estágios mais avançados da doença. Na literatura, estudos recentes, identificaram que pacientes com CRCC e alta METTL14, apresentam melhor sobrevida global, e em células in vitro a regulação positiva da METTL14 diminuiu a ativação da via de sinalização PI3K(AKT) ⁹⁵. No carcinoma de mama, a expressão alta da *writer* KIAA1429 foi associada a pior SG e aumento de proliferação celular. Já em nossas análises, não detectamos associação da expressão baixa ou alta da KIAA1429 com as variáveis correlacionadas a progressão tumoral, porém na regressão de cox, a expressão baixa da KIAA1429 diminuiu o risco de óbito global e progressão tumoral para os casos de carcinoma de mama em (RR= 0,261, p= 0,043) e (RR= 0,234, p= 0,008), respectivamente. Outra desregulação do mecanismo de ação da m6A no CRCC é expressão da FTO, onde detectamos que FTO é *down* regulada nos tecidos de CRCC quando comparados ao tecido normal adjacente. Strick A., et al ⁹⁶, avaliou a expressão das *eraser* FTO por IHC, em uma coorte contendo 147 casos de CRCC e 30 tecidos normais adjacente e concordantemente com nossas análises, identificaram redução de expressão da FTO nos casos de CRCC comparados com os tecidos normais adjacentes. Entretanto, nenhuma associação significativa de expressão foi identificada com as variáveis clínicas de anatomopatológica do estudo em questão, diferentemente de nossas análises, que detectamos associação da expressão baixa FTO com os estadiamento clínicos III e IV, graduação ISUP 3 e 4 e estadiamento pT3 e pT4. Por qRT-PCR, o mesmo grupo analisou níveis da FTO em mRNA e identificaram que os casos com baixos níveis de FTO se correlacionaram com pior sobrevida global e câncer específico ⁹⁶. Em nossas análises, de níveis proteico da FTO, na curva de comparação identificamos que os paciente com baixa FTO apresentam pior SR no estadiamento clínico III. A baixa expressão da FTO também foi correlacionada com pior sobrevida global e livre de doença e estadiamento clínico III e IV, concordantemente com nossos resultados ³⁴. Com a baixa regulação da FTO nos casos de CRCC, podemos sugerir que o processo de desmetilação da m6A possa estar alterado, tendo a ocorrência do aumento mRNA metilados, porém, não sabemos se existe algum mecanismo compensatório pela segunda *eraser* identificada em 2013, a ALKBH5 ¹⁸. A

ALKBH5, catalisa a desmetilação da m6A principalmente no mRNA e sua atividade pode afetar a exportação e metabolismo do mRNA¹⁸. Já no carcinoma de mama, a alta expressão da FTO foi significativamente associada com pior sobrevida, aumento de proliferação celular e presença de metástase, em um estudo funcional utilizando modelo *in vitro* e *in vivo*³⁹. Porém, em nossas análises detectamos a associação de baixa FTO com o grau histológico III e IV e maior ocorrência de baixa FTO nos subtipos moleculares Her2+ e TN. Como descrito na literatura, a função da m6A está diretamente ligada ao grupo de proteínas que regulam seu mecanismo de ação, as proteínas *writers*, *readers* e *erasers*. Uma outra proteína que interage com a função do complexo de metiltransferases que adiciona a m6A ao mRNA é a RBM15B, que atua na regulação do *splicing* alternativo^{16,80}. Recentemente, um estudo identificou através de análises de bioinformáticas, utilizando dados do TCGA, que a RBM15B é um fator de prognóstico para o melanoma da úvea, e que baixa expressão desta *writer* se correlacionou com pior sobrevida global dos pacientes analisados⁹⁶. No carcinoma hepatocelular, os níveis da RBM15B de mRNA estão upregulados promovendo proliferação celular e sua alta expressão foi correlacionada com o tamanho tumoral e pior sobrevida global⁹⁷. Como resultado, em nossas análises identificamos redução estatisticamente significativa de expressão da RBM15B nos tecidos de CRCC e sua baixa expressão foi associada com variáveis de pior prognóstico, como estadiamento clínico III e IV e presença de metástase ao diagnóstico. No estadiamento pT, observamos que a distribuição de casos no pT2 e pT4 é igual. Na curva de comparação de SG e SR identificamos diferença estatística de expressão onde os pacientes com baixa RBM15B e com estadiamento clínico avançado apresentam pior sobrevida, quando comparados com os pacientes com alta RBM15B. Na regressão de cox, identificamos que pacientes com expressão alta da RBM15B tem o risco diminuído de apresentar recidiva em (RR= 0,518, p=0,037). Em nossa coorte de CRCC, identificamos também, alteração na expressão da *reader* YTHDF2. Quando avaliamos a expressão quantitativa da YTHDF2 nos casos pareados, identificamos que ocorre redução significativa de expressão da YTHDF2 do tecido normal adjacente para o tecido tumoral. Essa redução de expressão da YTHDF2 nos casos de CRCC, também foi identificada em outro estudo⁹⁸. Porém, quando avaliamos a expressão categórica em alta e baixa da YTHDF2, na curva de comparação, identificamos que pacientes com alta YTHDF2 apresenta pior SR e pela regressão de cox na análise múltipla, detectamos que a expressão alta da YTHDF2 aumenta o risco de óbito global e de o paciente apresentar recidiva. Já na literatura, a expressão baixa da YTHDF2 foi associada

a pior prognóstico para os pacientes com CRCC ⁹⁸. Sendo assim, em nossas análises detectamos importantes alterações de expressão de proteínas que regulam o processo de ação da m6A (**Tabela 77**), que pode estar participando do processo de tumorigenese e progressão tumoral para as doenças estudadas, sendo de total relevância para comunidade científica e para novos possíveis alvos terapêuticos.

Tabela 77 – Alteração da expressão das proteínas *writer*, *reader* e *eraser* no CRCC e Carcinoma de mama.

CRCC					
Proteína	Categoria	Tecido normal X Tumor X Metastase	Expressao x Estadiamento Clínico	SG	SR
METTL14	<i>Writer</i> metiltransferase	Redução expressão no tumor e metástase	Aumento de expressao nos altos graus	Alta expressão associada a pior sobrevida nos baixos graus	Não tem relação
RBM15B	<i>Writer</i> acessória	Redução expressão na metástase	Redução de expressão nos altos graus	Baixa expressão associada a pior sobrevida no alto grau	Baixa expressao associada a recidiva e risco aumentado
HNRNP C1/C2	<i>Reader</i>	Redução no tumor	Sem alteracao	Sem associação	Sem associação
YTHDF2	<i>Reader</i>	Redução expressão no tumor e metástase	Sem alteracao	Alta expressao associada a risco aumentado	Alta expressao associada a recidiva a risco aumentado
FTO	<i>Eraser</i>	Redução expressão no tumor e metástase	Redução de expressão nos altos graus	Baixa expressão associada a pior sobrevida	Baixa expressão associada a recidiva e risco aumentado
Carcinoma de mama					
Proteína	Categoria	Expressão x Subtipo molecular	Expressao x Estadiamento Clínico	SG	SLP
METTL14	<i>Writer</i> metiltransferase	baixa expressão associada ao TN	Sem alteracao	Baixa expressao associada a pior sobrevida e aumento de risco óbito	Baixa expressão associada a progressão
HNRNP C1/C2	<i>Reader</i>	Não tem relação	Sem alteracao	Sem associação	Sem associação
YTHDF2	<i>Reader</i>	Não tem relação	Sem alteracao	Sem associação	Sem associação
FTO	<i>Eraser</i>	Não tem relação	Diferente entre subtipos moleculares	Sem associação	Sem associação
KIAA1429	<i>Writer</i> acessória	Não tem relação	Sem alteracao	Baixa expressão diminui o risco de óbito	Baixa expressão diminui o risco de progressão

*SG- sobrevida global; SR - sobrevida livre de recidiva; SLP - sobrevida livre de progressão.

5 CONCLUSÃO

Neste projeto, avaliamos os níveis de expressão proteica das *writers, readers e erasers*, que regulam o mecanismo de ação da modificação química *N6 – methyladenosine (m6A)*. Identificamos que expressão alta da METTL14 e baixa FTO se associam com os estágios mais agressivos de CRCC e a baixa expressão da RBM15B se correlaciona com pacientes com que apresentam pior sobrevida livre de recidiva, podendo ser um possível marcador de progressão tumoral. No carcinoma de mama a expressão baixa da METTL14, se associa com o subtipo moleculat TN e aumenta o risco de óbito global dos pacientes, evidenciando que a METTL14 pode ser um importante marcador de prognóstico para pacientes com carcinoma de mama.

6 REFERÊNCIAS

1. Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C. Gene expression regulation mediated through reversible m⁶A RNA methylation. *Nat Rev Genet.* 2014 May;15(5):293–306.
2. Machnicka MA, Milanowska K, Osman Oglou O, Purta E, Kurkowska M, Olchowik A, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D262-7.
3. Boriack-Sjodin PA, Ribich S, Copeland RA. RNA-modifying proteins as anticancer drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(6):435–53.
4. Carlile TM, Rojas-Duran MF, Zinshteyn B, Shin H, Bartoli KM, Gilbert W V. Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature.* 2014 Sep;515(7525):143–6.
5. Li X, Zhu P, Ma S, Song J, Bai J, Sun F, et al. Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. *Nat Chem Biol.* 2015 Aug;11(8):592–7.
6. Schwartz S, Bernstein DA, Mumbach MR, Jovanovic M, Herbst RH, León-Ricardo BX, et al. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell.* 2014 Sep;159(1):148–62.
7. Squires JE, Patel HR, Nousch M, Sibbritt T, Humphreys DT, Parker BJ, et al. Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jun;40(11):5023–33.
8. Dominissini D, Nachtergaele S, Moshitch-Moshkovitz S, Peer E, Kol N, Ben-Haim MS, et al. The dynamic N(1)-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature.* 2016 Feb;530(7591):441–6.
9. Lewis CJT, Pan T, Kalsotra A. RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Mar;18(3):202–10.
10. Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974 Oct;71(10):3971–5.
11. Wei CM, Gershowitz A, Moss B. Methylated nucleotides block 5' terminus of HeLa cell messenger RNA. *Cell.* 1975 Apr;4(4):379–86.

12. Yue Y, Liu J, He C. RNA N6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes Dev.* 2015 Jul 1;29(13):1343–55.
13. Liu J, Yue Y, Han D, Wang X, Fu Y, Zhang L, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nat Chem Biol.* 2014 Feb;10(2):93–5.
14. Ping X-L, Sun B-F, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang W-J, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res.* 2014 Feb;24(2):177–89.
15. Schwartz S, Mumbach MR, Jovanovic M, Wang T, Maciag K, Bushkin GG, et al. Perturbation of m6A Writers Reveals Two Distinct Classes of mRNA Methylation at Internal and 5' Sites. *Cell Rep.* 2014;8(1):284–96.
16. Patil DP, Chen C-K, Pickering BF, Chow A, Jackson C, Guttman M, et al. m(6)A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature.* 2016;537(7620):369–73.
17. Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol.* 2011 Oct;7(12):885–7.
18. Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedorcsak P, Huang C-M, Li CJ, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell.* 2013 Jan;49(1):18–29.
19. Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, et al. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature.* 2012 Apr;485(7397):201–6.
20. Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, Lu Z, Han D, Ma H, et al. N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell.* 2015 Jun;161(6):1388–99.
21. Lin S, Choe J, Du P, Triboulet R, Gregory RI. The m(6)A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells. *Mol Cell.* 2016 May;62(3):335–45.
22. Zhao BS, Roundtree IA, He C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(1):31–42.
23. Meyer KD, Patil DP, Zhou J, Zinoviev A, Skabkin MA, Elemento O, et al. 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell.* 2015 Nov;163(4):999–1010.
24. Zhou J, Wan J, Gao X, Zhang X, Jaffrey SR, Qian S-B. Dynamic m(6)A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature.* 2015 Oct;526(7574):591–

- 4.
25. Dai D, Wang H, Zhu L, Jin H, Wang X. N6-methyladenosine links RNA metabolism to cancer progression. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):124.
26. Yeh H, Yong J. Alternative Polyadenylation of mRNAs: 3'-Untranslated Region Matters in Gene Expression. *Mol Cells.* 2016;39(4):281–5.
27. Yang Y, Hsu PJ, Chen YS, Yang YG. Dynamic transcriptomic m6A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism. *Cell Res.* 2018;28(6):616–24.
28. Ru W, Zhang X, Yue B, Qi A, Shen X, Huang Y, et al. Insight into m6A methylation from occurrence to functions. *Open Biol.* 2020;10(9):200091.
29. Cui Q, Shi H, Ye P, Li L, Qu Q, Sun G, et al. m 6 A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells Article m 6 A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Rep.* 2017;18(11):2622–34.
30. Wei W, Huo B, Shi X. miR-600 inhibits lung cancer via downregulating the expression of METTL3. *Cancer Manag Res.* 2019;11:1177–87.
31. Zhang S, Zhao BS, Zhou A, Lin K, Zheng S, Lu Z, Chen Y, Sulman EP, Xie K, Bögler O, Majumder S, He C HS. m 6 A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 Expression and Cell Proliferation Program Article m 6 A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 E. *Cancer Cell.* 2017;31(4):591–606.
32. Xi Z, Xue Y, Zheng J, Liu X, Ma J, Liu Y. WTAP Expression Predicts Poor Prognosis in Malignant Glioma Patients. *J Mol Neurosci.* 2016;60(2):131–136.
33. Li Z, Weng H, Su R. Article FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N 6 -Methyladenosine RNA Article FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N 6 -Methyladenosine RNA Demethylase. *Cancer Cell.* 2017;31(1):127–41.
34. Zhuang C, Zhuang C, Luo X, Huang X, Yao L, Li J, et al. N6-methyladenosine demethylase FTO suppresses clear cell renal cell carcinoma through a novel FTO - PGC - 1 α signalling axis. *J Cell Mol Med.* 2019;23(3):2163–73.
35. Kwok C-T, Marshall AD, Rasko JEJ, Wong JJJ. Genetic alterations of m6A regulators predict poorer survival in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2017 Dec;10(1):39.
36. Mercher T, Coniat MB, Monni R, Mauchauffe M, Nguyen Khac F, Gressin L, Mugneret F,

- Leblanc T, Dastugue N, Berger R BO. Involvement of a human gene related to the *Drosophila* *spen* gene in the recurrent t (1 ; 22) translocation of acute megakaryocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(1):5776–9.
37. Bansal H, Yihua Q, Iyer SP, Ganapathy S, Proia D, Penalva LO, et al. WTAP is a novel oncogenic protein in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014 May;28(5):1171–4.
 38. Zhang C, Samanta D, Lu H, Bullen JW, Zhang H, Chen I, et al. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Apr;113(14):E2047-56.
 39. Niu Y, Lin Z, Wan A, Chen H, Liang H, Sun L, et al. RNA N6-methyladenosine demethylase FTO promotes breast tumor progression through inhibiting BNIP3. *Mol Cancer*. 2019;18(1):46.
 40. Tanabe A, Tanikawa K, Tsunetomi M, Takai K, Ikeda H, Konno J, et al. RNA helicase YTHDC2 promotes cancer metastasis via the enhancement of the efficiency by which HIF-1 α mRNA is translated. *Cancer Lett*. 2016;376(1):34–42.
 41. Zhao X, Chen Y, Mao Q, Jiang X, Jiang W, Chen J, et al. Overexpression of YTHDF1 is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark*. 2018;21(4):859–68.
 42. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
 43. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7–30.
 44. Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *World J Oncol*. 2020 Jun;11(3):79–87.
 45. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):93–105.
 46. Rosner I, Bratslavsky G, Pinto PA LW. The clinical implications of the genetics of renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2009;27(2):131–6.
 47. Wettersten HI, Aboud OA, Jr PNL, Weiss RH. Metabolic reprogramming in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Publ Gr*. 2017;13(7):410–9.
 48. Lendahl U, Lee KL, Yang H, Poellinger L. Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia. *Nat Rev Genet*. 2009;10(12):821–32.

49. Sanchez DJ, Simon MC. Genetic and metabolic hallmarks of clear cell renal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2018;1870(1):23–31.
50. Rini BI, McKiernan JM, Chang SS, Choueiri TK, Kenney PA, Landman J, et al. Kidney. In: Amin MB, editor. *AJCC cancer staging manual*. 8th ed. New York: Springer; 2018. p. 739–47.
51. Dagher J, Delahunt B, Rioux-leclercq N, Egevad L, Srigley JR, Coughlin G, et al. Clear cell renal cell carcinoma : validation of World Health Organization / International Society of Urological Pathology grading. *Histopathology*. 2017;71(6):918–25.
52. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *J Urol*. 2002 Dec;168(6):2395–400.
53. American Cancer Society. *Cancer facts and figures 2019* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jun 12]. Available from: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html>
54. Lukamowicz-Rajska M, Mittmann C, Prummer M, Zhong Q, Bedke J, Hennenlotter J, et al. MiR-99b-5p expression and response to tyrosine kinase inhibitor treatment in clear cell renal cell carcinoma patients. *Oncotarget*. 2016 Nov 29;7(48):78433–47.
55. Oto J, Plana E, Sánchez-González JV, García-Olaverri J, Fernández-Pardo Á, España F, et al. Urinary microRNAs: Looking for a New Tool in Diagnosis, Prognosis, and Monitoring of Renal Cancer. *Curr Urol Rep*. 2020 Mar 13;21(2):11.
56. De Maeseneer DJ, Delafontaine B, Rottey S. Checkpoint inhibition: new treatment options in urologic cancer. *Acta Clin Belg*. 2017 Feb;72(1):24–8.
57. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol*. 2015 Mar;67(3):519–30.
58. Atkins MB, Tannir NM. Current and emerging therapies for first-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev*. 2018 Nov;70:127–37.
59. de Velasco G, Bex A, Albiges L, Powles T, Rini BI, Motzer RJ, et al. Sequencing and Combination of Systemic Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol Oncol*. 2019 Sep;2(5):505–14.
60. Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. *Lancet*. 2016;387(10021):894–906.

61. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2021.
62. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1194–220.
63. Bhushan A, Gonsalves A, Menon JU. Current State of Breast Cancer Diagnosis, Treatment, and Theranostics. *Pharmaceutics*. 2021 May 14;13(5):723.
64. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: a review. *JAMA*. 2019 Jan 22;321(3):288–300.
65. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Dec;6:718.
66. Yin L, Duan J-J, Bian X-W, Yu S-C. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*. 2020;22(1):61.
67. Engebraaten O, Kristian H, Vollan M. Triple-Negative Breast Cancer and the Need for New Therapeutic Targets. *Am J Pathol*. 2013;183(4):1064–74.
68. Rivenbark AG, Coleman WB. Field cancerization in mammary carcinogenesis — Implications for prevention and treatment of breast cancer. *Exp Mol Pathol*. 2012;93(3):391–8.
69. Nascimento R, Otoni K. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology*. 2020;30:e20200024.
70. Anderson KN, Schwab RB, Martinez ME. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Feb;144(1):1–10.
71. Rakha EA, Green AR. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathology*. 2017 Feb;49(2):111–9.
72. Eiger D, Agostinetto E, Saúde-Conde R, de Azambuja E. The Exciting New Field of HER2-Low Breast Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 1;13(5):1015.
73. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. 2009 Apr;42(2):377–81.
74. Harris PA, Taylor R, Minor BL, Elliott V, Fernandez M, O’Neal L, et al. The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *J*

- Biomed Inform. 2019 Jul;95:103208.
75. Gulmann C, Butler D, Kay E, Grace A, Leader M. Biopsy of a biopsy: validation of immunoprofiling in gastric cancer biopsy tissue microarrays. *Histopathology*. 2003 Jan;42(1):70–6.
 76. Milanes-Yearsley M, Hammond MEH, Pajak TF, Ph D, Cooper JS, Chang C, et al. Tissue Micro-Array : A Cost and Time-Effective Method for Correlative Studies by Regional and National Cancer Study Groups. *Mod Pathol*. 2002;15(12):1366–73.
 77. Roffé M, Hajj GNM, Azevedo HF, Alves VS, Castilho BA. IMPACT is a developmentally regulated protein in neurons that opposes the eukaryotic initiation factor 2 β kinase GCN2 in the modulation of neurite outgrowth. *J Biol Chem*. 2013;288(15):10860–9.
 78. Śledź P JM. Structural insights into the molecular mechanism of the m⁶A writer complex. *Elife*. 2016;5:e18434.
 79. Zhou KI, Pan T. Structures of the m⁶A Methyltransferase Complex : Two Subunits with Distinct but Coordinated Roles. *Mol Cell*. 2016;63(2):183–5.
 80. Knuckles P, Lence T, Haussmann IU, Jacob D, Kreim N, Carl SH, et al. Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m⁶A machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes Dev*. 2018;32(5–6):415–29.
 81. Geuens T, Bouhy D, Timmerman V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet*. 2016 Aug;135(8):851–67.
 82. Ma C, Liao S, Zhu Z. Crystal structure of human YTHDC2 YTH domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Oct;518(4):678–84.
 83. Patil DP, Pickering BF, Jaffrey SR. Reading m⁽⁶⁾A in the Transcriptome: m⁽⁶⁾A-Binding Proteins. *Trends Cell Biol*. 2018 Feb;28(2):113–27.
 84. Li Z, Weng H, Su R, Weng X, Zuo Z, Li C, et al. FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N⁶-Methyladenosine RNA Demethylase. *Cancer Cell*. 2017;31(1):127–41.
 85. Tang X, Liu S, Chen D, Zhao Z, Zhou J. The role of the fat mass and obesity-associated protein in the proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncol Lett*. 2019 Feb;17(2):2473–8.
 86. Yang S, Wei J, Cui Y-H, Park G, Shah P, Deng Y, et al. m⁽⁶⁾A mRNA demethylase FTO regulates melanoma tumorigenicity and response to anti-PD-1 blockade. *Nat Commun*.

- 2019 Jun;10(1):2782.
87. Esposito A, Criscitiello C CG. Highlights from the 14th St Gallen International Breast Cancer Conference 2015 in Vienna: Dealing with classification, prognostication, and prediction refinement to personalize the treatment of patients with early breast cancer. *Ecancermedicalscience*. 2015;9:518.
 88. Barroso-Sousa R, Metzger-Filho O. Differences between invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: results and therapeutic implications. *Ther Adv Med Oncol*. 2016;8(4):261–6.
 89. Lan T, Li H, Zhang D, Xu L, Liu H, Hao X, et al. KIAA1429 contributes to liver cancer progression through N6-methyladenosine-dependent post-transcriptional modification of GATA3. *Mol Cancer*. 2019 Dec;18(1):186.
 90. Ma J-Z, Yang F, Zhou C-C, Liu F, Yuan J-H, Wang F, et al. METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N6 -methyladenosine-dependent primary MicroRNA processing. *Hepatology*. 2017 Feb;65(2):529–43.
 91. Yang X, Zhang S, He C, Xue P, Zhang L, He Z, et al. METTL14 suppresses proliferation and metastasis of colorectal cancer by down-regulating oncogenic long non-coding RNA XIST. *Mol Cancer*. 2020;19(1):46.
 92. Yi D, Wang R, Shi X, Xu L, Yilihamu Y, Sang J. METTL14 promotes the migration and invasion of breast cancer cells by modulating N6-methyladenosine and hsa-miR-146a-5p expression. *Oncol Rep*. 2020;43(5):1375–86.
 93. Wu L, Wu D, Ning J, Liu W ZD. Changes of N6-methyladenosine modulators promote breast cancer progression. *BMC Cancer*. 2019;19(1):326.
 94. Wang Y, Cong R, Liu S, Zhu B, Wang X, Xing Q. Decreased expression of METTL14 predicts poor prognosis and construction of a prognostic signature for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Cell Int*. 2021 Jan 11;21(1):46.
 95. Qian J-Y, Gao J, Sun X, Cao M-D, Shi L, Xia T-S, et al. KIAA1429 acts as an oncogenic factor in breast cancer by regulating CDK1 in an N6-methyladenosine-independent manner. *Oncogene*. 2019;38(33):6123–41.
 96. Strick A, von Hagen F, Gundert L, Klümper N, Tolkach Y, Schmidt D, et al. The N(6) -methyladenosine (m(6) A) erasers alkylation repair homologue 5 (ALKBH5) and fat mass and obesity-associated protein (FTO) are prognostic biomarkers in patients with clear cell renal carcinoma. *BJU Int*. 2020 Apr;125(4):617–24.

97. Tan C, Xia P, Zhang H, Xu K, Liu P, Guo D, et al. YY1-Targeted RBM15B Promotes Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation and Sorafenib Resistance by Promoting TRAM2 Expression in an m6A-Dependent Manner. *Front Oncol.* 2022;12:873020.
98. Mu Z, Dong D, Sun M, Li L, Wei N, Hu B. Prognostic Value of YTHDF2 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2020;10:1566.

Anexo 1 – Pontos de corte definidos para a categorização de expressão baixa e expressão alta para os casos de CRCC

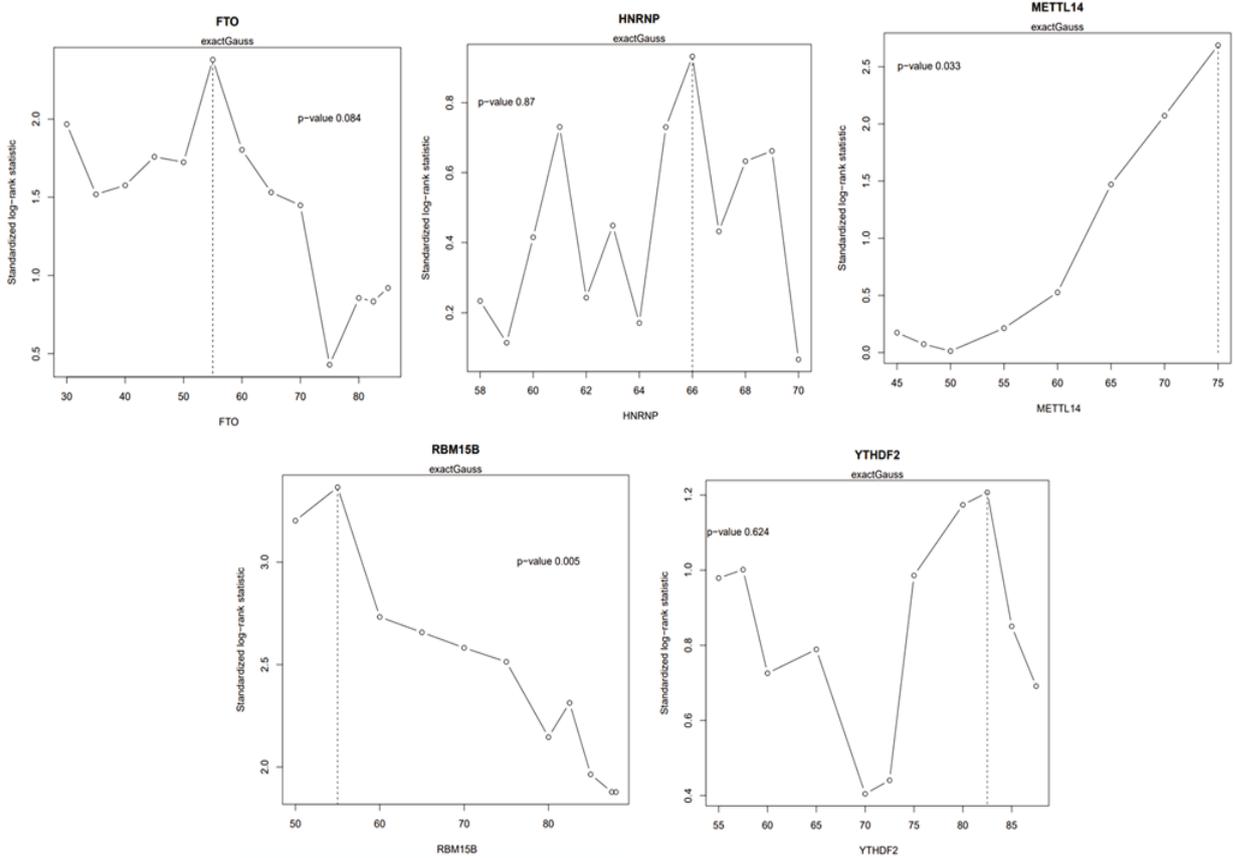


Figura 1. Pontos de corte definidos para cada proteína utilizando o pacote maxtat. Foi definido categoricamente a expressão baixa e expressão alta para cada proteína, $FTO \leq 55 > 55$, $HNRNP \leq 66 > 66$, $METTL14 \leq 75 > 75$, $RBM15B \leq 55 > 55$ e $YTHDF2 \leq 82,5 > 82,5$.

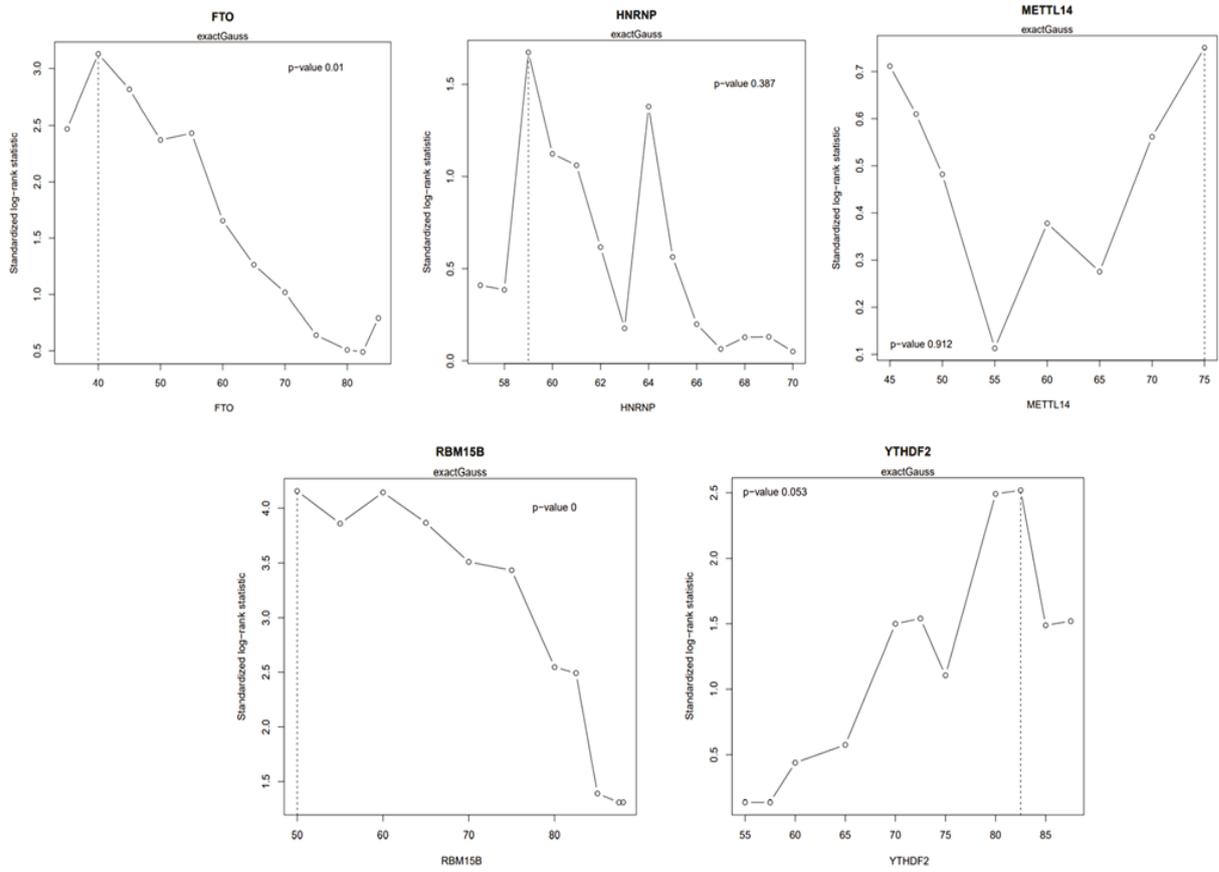


Figura 2. Pontos de corte definidos para cada proteína utilizando o pacote maxstat. Foi definido categoricamente a expressão baixa e expressão alta para cada proteína para a curva de sobrevida SR, excluindo na análise os casos com estadiamento clínico IV, $FTO \leq 40 > 40$, $HNRNP \leq 59 > 59$, $METTL14 \leq 75 > 75$, $RBM15B \leq 50 > 50$ e $YTHDF2 \leq 82,5 > 82,5$,

Anexo 2 – Pontos de corte definidos para a categorização de expressão baixa e expressão alta para os casos de Carcinoma de mama.

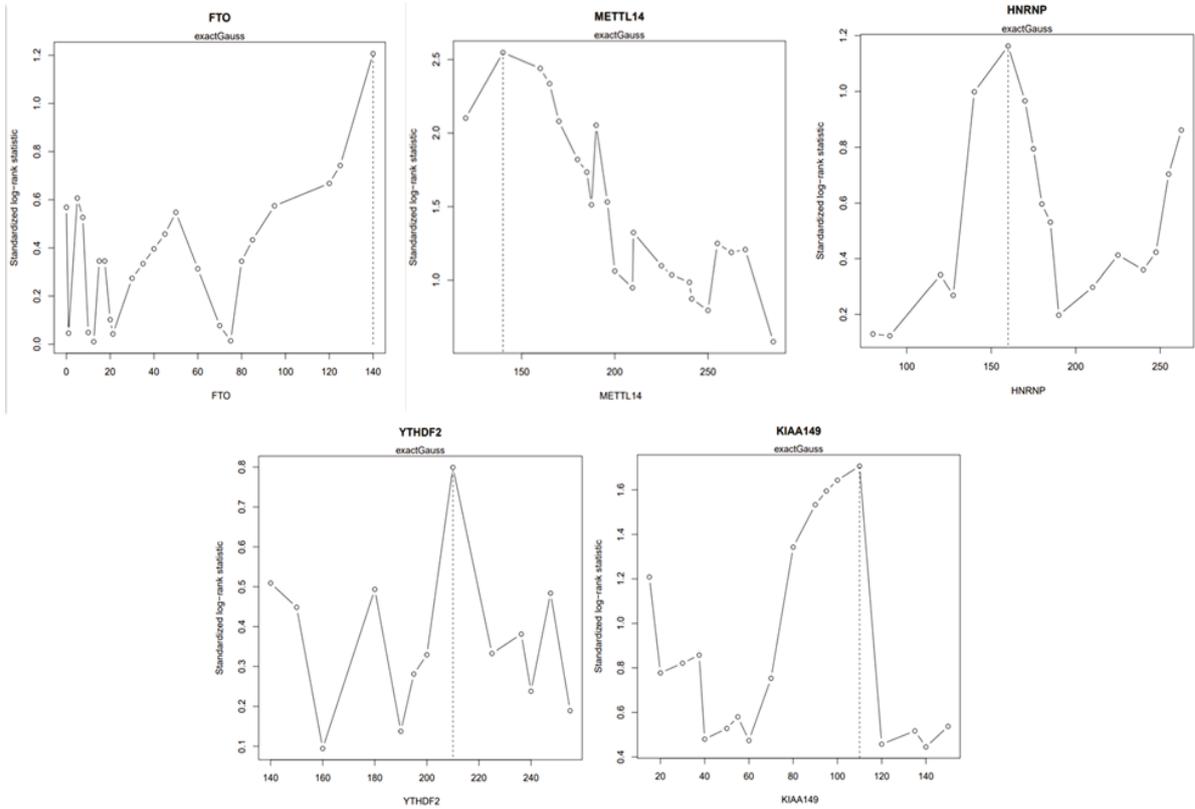


Figura 3. Pontos de corte definidos para cada proteína utilizando o pacote maxstat. Foi definido categoricamente a expressão baixa e expressão alta para cada proteína para a curva de sobrevida SG e SLP, excluindo na análise os casos com estadiamento clínico IV, $FTO \leq 140 > 140$, $METTL14 \leq 140 > 140$, $HNRNP \leq 160 > 160$, $KIAA1429 \leq 110 > 110$ e $YTHDF2 \leq 210 > 210$.