

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA BORBA ANTUNES

ASSINATURA DE GENES DE HIPÓXIA E RESPOSTA TUMORAL PAN-CÂNCER:
GENES ENVOLVIDOS EM MECANISMOS DE HIPÓXIA E SUA RELAÇÃO NA
MODULAÇÃO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM DIVERSOS TECIDOS
TUMORAIS

CURITIBA

2022

BRUNA BORBA ANTUNES

ASSINATURA DE GENES DE HIPÓXIA E RESPOSTA TUMORAL PAN-CÂNCER:
GENES ENVOLVIDOS EM MECANISMOS DE HIPÓXIA E SUA RELAÇÃO NA
MODULAÇÃO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM DIVERSOS TECIDOS
TUMORAIS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Antônio Alves Castro
Co-orientadora: Dra. Carolina Mathias

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Antunes, Bruna Borba

Assinatura de genes de hipóxia e resposta tumoral pan-
câncer: genes envolvidos em mecanismos de hipóxia e sua
relação na modulação de resposta imunológica em diversos
tecidos tumorais / Bruna Borba Antunes. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Genética.

Orientadora: Prof. Dr. Mauro Antônio Alves Castro.

Coorientadora: Dra. Carolina Mathias.

1. Câncer. 2. Hipóxia tumoral. 3. Resposta imune. I. Castro,
Mauro Antônio Alves. II. Mathias, Carolina, 1992-. III. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Genética. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BRUNA BORBA ANTUNES** intitulada: **Assinatura de genes de hipóxia e resposta tumoral pan-câncer - Genes envolvidos em mecanismos de hipóxia e sua relação na modulação de resposta imunológica em diversos tecidos tumorais.**, sob orientação do Prof. Dr. MAURO ANTONIO ALVES CASTRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

23/03/2022 12:42:49.0

MAURO ANTONIO ALVES CASTRO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/03/2022 11:43:27.0

ROBERTO ROSATI

Avaliador Externo (null)

Assinatura Eletrônica

23/03/2022 13:16:24.0

JAQUELINE CARVALHO DE OLIVEIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/03/2022 11:40:32.0

CAROLINA MATHIAS

Coorientador(a) (55001149)

RESUMO

Microambientes tumorais hipóxicos, caracterizados como regiões com níveis reduzidos de oxigênio, são comuns em tumores sólidos. A hipóxia desempenha um papel importante na malignidade e progressão do câncer. Reforço da atividade de células imunossupressoras, bloqueio de funções de células efectoras, diminuição da produção de citocinas e inibição de respostas do sistema imune são alguns dos efeitos causados pela mudança de expressão gênica ocasionada pela hipóxia. Nessa condição, enquanto as taxas gerais de síntese de RNA e proteína diminuem, a expressão de genes específicos é induzida a nível transcricional para mediar respostas adaptativas que tem por objetivo manter a homeostase. Esse comportamento remodela o microambiente tumoral, podendo desencadear fenótipos agressivos. As adaptações microambientais causadas pela hipóxia também afetam a eficácia de terapias tradicionais. Usando dados imunogenômicos de Pan-câncer de estudos anteriores, propõe-se uma abordagem bioinformática para busca de genes de hipóxia relacionados ao sistema imunológico na visão geral do Pan-câncer. Os dados de RNA-seq da coorte Pan-câncer do The Cancer Genome Atlas (TCGA) foram analisados e as métricas de *signal-to-noise ratio* foram aplicadas. A análise identificou padrões de expressão para genes de hipóxia entre subtipos imunológicos. Os genes foram reduzidos a uma lista dos mais regulados para cima e para baixo. Os genes específicos dos subtipos forneceram as informações mais relevantes, enquanto *PIK3CD*, o único comum a todos os subtipos, corrobora as propriedades previamente descritas para os grupos imunes. Este estudo destaca a necessidade de descrever profundamente o papel da hipóxia como reguladora da resposta imune em tumores, fornecendo novas perspectivas sobre diagnóstico, prognóstico e alvos terapêuticos na terapia do câncer.

Palavras-chave: Pan-câncer, microambiente hipóxico, resposta imune, subtipos imunes

ABSTRACT

Hypoxic tumor microenvironments, characterized by regions with reduced oxygen levels, are common in solid tumors. Hypoxia plays an important role in malignancy and cancer progression. Enhancement of immunosuppressive cell activity, blockage of effector cell functions, decrease in cytokine production and inhibition of immune system responses are some of the effects caused by the change in gene expression caused by hypoxia. Under this condition, while the general rates of RNA and protein synthesis decrease, the expression of specific genes is induced at the transcriptional level to mediate adaptive responses that aim to maintain homeostasis. This behavior reshapes the tumor microenvironment, which can trigger aggressive phenotypes. Microenvironmental adaptations caused by hypoxia also affect the efficacy of traditional therapies. Using Pan-cancer immunogenomics data from previous studies, we propose a bioinformatic approach to look for immune-related hypoxia genes in Pan-cancer overview. RNA-seq data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) Pan-cancer cohort was analyzed, and signal-to-noise ratio metrics were applied. The analysis identified expression patterns for hypoxia genes among immunological subtypes. Genes were narrowed into a list of the most up- and down-regulated. *Ace* genes (subtype-specific) provided the most relevant information, while *PIK3CD*, the only wildcard (common for all subtypes), corroborates properties previously described for the immune groups. This study highlights the need to deeply describe the role of hypoxia as a regulator of the immune response in tumors, providing new perspectives on diagnosis, prognosis, and therapeutic targets in cancer therapy.

Key-words: Pan-cancer, hypoxic microenvironment, immune response, immune subtypes

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - HALLMARKS DO CÂNCER.....	11
FIGURA 2 – FATORES INDUZÍVEIS POR HIPÓXIA EM NORMÓXIA E HIPÓXIA ..	13
FIGURA 3 – FLUXO DE TRABALHO.....	19
FIGURA 4 - INTERSEÇÕES DOS GENES DE HIPÓXIA SELECIONADOS ENTRE OS SUBTIPOS IMUNES.....	23
FIGURA 5 - SUBTIPOS IMUNES NAS COORTES DE PAN-CÂNCER VS. CONJUNTO DE GENES DE HIPÓXIA	26
FIGURA 6 - SUBTIPOS IMUNES VS. GENES DE HIPÓXIA.....	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - GENES ESPECÍFICOS E COMUNS AOS SUBTIPOS IMUNES	24
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

EMT	- do inglês, Epithelial-Mesenchymal Transition
HIFs	- do inglês, Hypoxia Inducible Factors
PHDs	- Proteínas contendo o domínio proil-hidroxilase
pVHL	- Supressor tumoral Von Hippel-Lindau
HREs	- do inglês, Hypoxia Response Elements
TME	- do inglês, Tumor Microenvironment
TAMs	- do inglês, Tumor-Associated Macrophages
ROS	- do inglês, Reactive Oxygen Species
VEGF	- Fator De Crescimento Endotelial
TCGA	- do inglês The Cancer Genome Atlas
SNR	- do inglês Signal-to-Noise Ratio
ICIs	- inibidores de checkpoints
ACC	- do inglês, Adrenocortical Carcinoma
BLCA	- do inglês, Bladder Urothelial Carcinoma
LGG	- do inglês, Brain Lower Grade Glioma
BRCA	- do inglês, Breast Invasive Carcinoma
CESC	- do inglês, Cervical Squamous Cell Carcinoma and Endocervical Adenocarcinoma
CHOL	- do inglês, Cholangiocarcinoma
COAD	- do inglês, Colon Adenocarcinoma
ESCA	- do inglês, Esophageal Carcinoma
GBM	- do inglês, Glioblastoma Multiforme
HNSC	- do inglês, Head And Neck Squamous Cell Carcinoma
KICH	- do inglês, Kidney Chromophobe
KIRC	- do inglês, Kidney Renal Clear Cell Carcinoma
KIRP	- do inglês, Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma
LIHC	- do inglês, Liver Hepatocellular Carcinoma
LUAD	- do inglês, Lung Adenocarcinoma
LUSC	- do inglês, Lung Squamous Cell Carcinoma
MESO	- do inglês, Mesothelioma
OV	- do inglês, Ovarian Serous Cystadenocarcinoma
PAAD	- do inglês, Pancreatic Adenocarcinoma
PCPG	- do inglês, Pheochromocytoma and Paraganglioma

PRAD - do inglês, Prostate Adenocarcinoma
READ - do inglês, Rectum Adenocarcinoma
SARC - do inglês, Sarcoma
SKCM - do inglês, Skin Cutaneous Melanoma
STAD - do inglês, Stomach Adenocarcinoma
TGCT - do inglês, Testicular Germ Cell Tumors
THCA - do inglês, Thyroid Carcinoma
UCS - do inglês, Uterine Carcinosarcoma
UCEC - do inglês, Uterine Corpus Endometrial Carcinoma
UVM - do inglês, Uveal Melanoma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 HIPÓXIA TUMORAL	11
2.1.1 Fatores induzíveis por hipóxia	12
2.2 SISTEMA IMUNE E HIPÓXIA TUMORAL	14
2.3 TRATAMENTOS	15
2.4 ASSINATURAS DE HIPÓXIA	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 FLUXO DE TRABALHO	19
4.2 AMOSTRA	20
4.3 CONJUNTO DE GENES DE HIPÓXIA	20
4.4 DADOS IMUNOLÓGICOS EM PAN-CÂNCER	20
4.5 SUBTIPOS IMUNES EM PAN-CÂNCER X GENES DE HIPÓXIA	21
4.6 SELEÇÃO DE GENES	21
4.7 INTERSEÇÃO ENTRE SUBTIPOS IMUNES	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 PADRÕES DE EXPRESSÃO MAIS EVIDENTES ENTRE SUBTIPOS IMUNES QUE ENTRE COORTES	25
5.2 SUBTIPOS IMUNES C3 E C6 SEGUEM UM PADRÃO SEMELHANTE DE EXPRESSÃO	27
5.3 GENES ESPECÍFICOS SÃO DESTAQUE ENTRE SUBTIPOS IMUNES	28
5.3.1 <i>PIK3CD</i> como gene comum	28
5.3.2 Genes específicos para o subtipo imune C1 estão relacionados à proliferação celular	29
5.3.3 Genes específicos para o subtipo imune C2 são tão diversos quanto as amostras que compõe o grupo	30
5.3.4 Genes específicos com regulação negativa para o subtipo C3 estão relacionados à degradação de HIF-1 α	31
5.3.5 Genes específicos de menor destaque	31
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

APÊNDICE – CONJUNTOS DE GENES	38
--	-----------

1 INTRODUÇÃO

Quando a demanda de oxigênio de um microambiente tecidual excede a oferta, caracteriza-se o estado de hipóxia (PIETROBON; MARINCOLA, 2021). Embora alguns processos fisiológicos funcionem nessas condições, a desregulação da sinalização de hipóxia está relacionada a uma variedade de doenças (BALAMURUGAN, 2016). É comum em tumores sólidos, pois o suprimento sanguíneo pode tornar-se insuficiente ao tecido em alta proliferação (LIU et al., 2020). Enquanto as taxas gerais de síntese de RNA e proteínas diminuem em resposta à hipóxia, a expressão de genes específicos é induzida a nível transcricional. Tais respostas são medidas adaptativas (VITO; EL-SAYES; MOSSMAN, 2020) que contribuem para propriedades malignas como progressão tumoral, invasão e metástase (LIU et al., 2020).

A desregulação de expressão gênica resulta em remodelamento do microambiente tumoral (TME) e tem grande potencial para originar fenótipos agressivos de câncer (PIETROBON; MARINCOLA, 2021). A população de células imunes, como um elemento importante do TME, é direta e indiretamente afetada por ele (BALTA; WABNITZ; SAMSTAG, 2021). Ao reforçar atividade de células imunossupressoras, bloquear funções de células efectoras, e diminuir produção de citocinas, a hipóxia pode causar inibição de respostas do sistema imune (DING et al., 2021).

Devido à sua alta influência no desenvolvimento e prognóstico do câncer, o perfil imunológico do TME é um fator chave para prever o comportamento do tumor. Usando dados de imunogenômica, Thorsson e colaboradores (2018) foram capazes de analisar o TME classificando tumores sólidos em seis subtipos imunes distintos. C1 exibe alta expressão de genes angiogênicos, alta taxa de proliferação e infiltrado imune com resposta predominante de células Th2. As respostas predominantes de C2 envolvem expressão de IFN- γ , esse grupo tem forte sinal de células T CD8+, a maior diversidade de receptores de células T e alta taxa de proliferação. C3 é um subgrupo de características altamente inflamatórias, apresenta elevada expressão de genes relacionados a Th17 e Th1 e a proliferação de células tumorais é baixa a moderada. C4 apresenta supressão de resposta Th1, porém alta resposta associada a macrófagos do tipo M2. C5 é caracterizado como imunologicamente silencioso,

tem baixa atividade de linfócitos e, dentre os grupos, a maior resposta por macrófagos. C6 é caracterizado pela expressão de TGF- β , além de um alto infiltrado linfocitário com distribuição uniforme de células T do tipo I e II (THORSSON V, 2018).

Considerando seu importante papel em tumores agressivos e resistentes a tratamentos, desenvolver métodos de identificação e classificação de hipóxia tumoral pode auxiliar abordagens mais eficazes de prognóstico e decisões de tratamento. Com base nisso, este trabalho avalia o comportamento da expressão de genes e de fatores relacionados à hipóxia. A análise utilizou conjuntos de genes de hipóxia que apresentam expressão diferencial em cada um dos perfis imunológicos descritos por Thorsson, et al. (2018). A partir de dados de Pan-câncer, pretende-se descrever assinaturas de genes de hipóxia para os subtipos imunes.

A diversidade de populações celulares em tumores humanos sugere que tratamentos oncológicos cada vez mais personalizados são necessários para atingir resultados eficazes. A hipóxia é capaz de alterar a expressão gênica, entretanto, há muito a se investigar quanto ao perfil regulatório deste importante “Hallmark” expresso em diversos tumores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HIPÓXIA TUMORAL

Tumores apresentam características próprias que favorecem sua sobrevivência e crescimento. Diferentemente de tecidos não tumorais, seus microambientes são capazes de se adaptar a condições extremas como a baixa oxigenação (SUN et al., 2021). A condição de hipóxia cria um microambiente propício a um conjunto de características classificadas como *Hallmarks* do câncer (Figura 1), é muito comum em tumores sólidos, uma vez que a alta velocidade da proliferação de células causa um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio (PETROVA et al., 2018). Pode desencadear mudanças de expressão gênica e subseqüentes alterações proteômicas, afetando funções celulares (NAJAFI et al., 2020).

FIGURA 1 - HALLMARKS DO CÂNCER



FONTE: elaborada pela autora (2022) com base em (HANAHAHAN, 2022).

Tomando os vasos sanguíneos como ponto de referência, é possível identificar três diferentes regiões em um tumor. A primeira consiste em células bem oxigenadas

e próximas ao vaso. A segunda é uma área afastada e de necrose, onde há morte celular por asfixia. A terceira é intermediária entre as outras duas e consiste em células viáveis, mas hipóxicas. Tratamentos oncológicos são, muitas vezes, eficazes na eliminação das células da primeira região, bem oxigenadas e em proliferação, mas costumam encontrar resistência das células da terceira região (SCHITO; SEMENZA, 2016). Para aumentar a entrega de oxigênio e reestabelecer a homeostase, o tecido hipóxico estimula angiogênese, porém de modo caótico e desordenado, assim como a multiplicação característica das células tumorais. Os vasos sanguíneos se originam com defeitos estruturais, perpetuando a dificuldade de difusão de nutrientes e medicamentos (SAMANTA; SEMENZA, 2018).

Eventos de hipóxia compartilham vias importantes com a transição epitélio-mesenquimal (EMT) (TAM; WU; LAW, 2020). EMT é a transdiferenciação de células epiteliais, conferindo plasticidade. É um importante fator para todas as etapas de metástases (NOMAN et al., 2015). Além disso, em resposta à insuficiência de oxigênio, há reprogramação metabólica das células tumorais, afetando glicólise, síntese de glicogênio, fosforilação oxidativa e metabolismo lipídico (ZHANG et al., 2019).

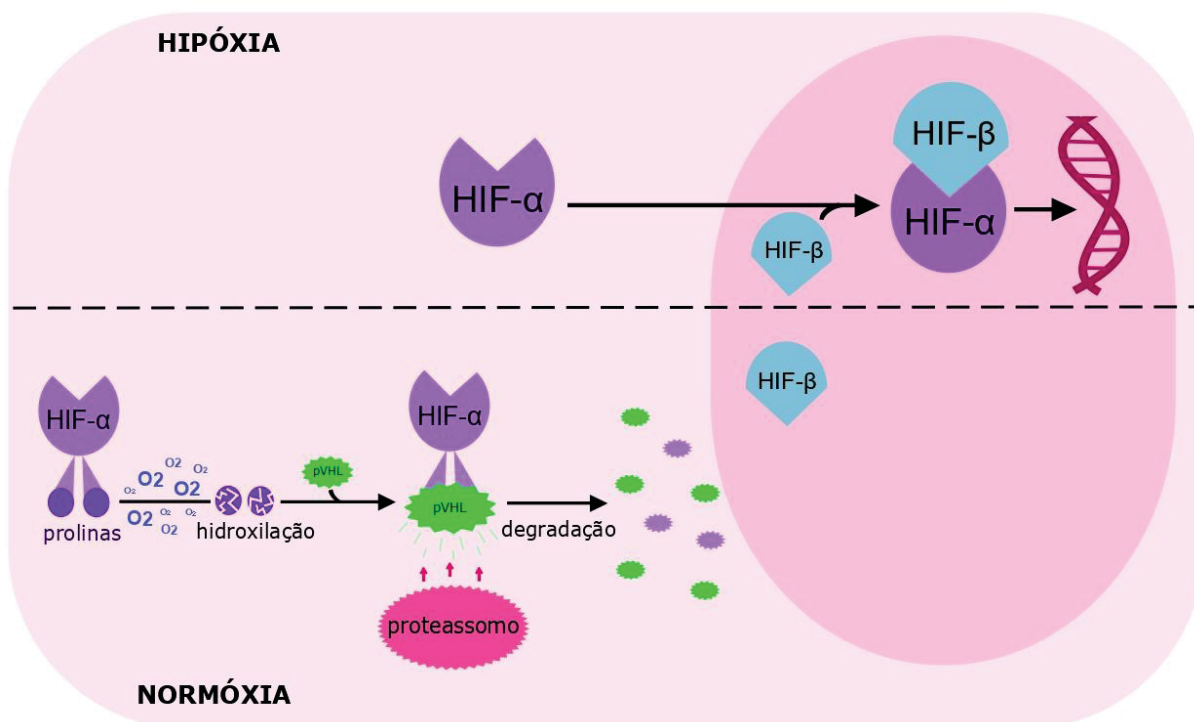
O microambiente hipóxico é complexo e, quando presente em tecidos tumorais, pode se organizar em um ciclo de retroalimentação (SAMANTA; SEMENZA, 2018). Os mecanismos de adaptação moldam as novas características tumorais, originando e perpetuando um fenótipo agressivo (ZHANG et al., 2020). Tumores hipóxicos muito comumente estão associados a um pior prognóstico, maior taxa de recorrência e menor tempo de sobrevida (MUZ et al., 2015).

2.1.1 Fatores induzíveis por hipóxia

O estresse hipóxico ao tecido tumoral induz respostas adaptativas importantes, dentre elas a mudança no perfil transcriptômico. Essa adaptação celular é amplamente mediada por uma família de fatores de transcrição denominados fatores induzíveis por hipóxia (HIFs). Sua atividade envolve induzir a expressão de conjuntos de genes que, em TME, estão envolvidos em proliferação celular, metabolismo, angiogênese e metástase (BALAMURUGAN, 2016).

HIFs são compostos pelas subunidades HIF- α e HIF- β , sendo a primeira sensível à taxa de oxigênio e a segunda, estável. A ativação transcricional pelos HIFs ocorre, majoritariamente, em condições hipóxicas, quando as subunidades são capazes de formar um complexo. (SAMANTA; SEMENZA, 2018).

FIGURA 2 – FATORES INDUZÍVEIS POR HIPÓXIA EM NORMÓXIA E HIPÓXIA



FONTE: elaborada pela autora (2021) com base em (PETROVA et al., 2018).

LEGENDA: Cada HIF- α contém dois resíduos de prolina que, na presença de oxigênio, são hidroxiadas por PHDs (proteínas contendo o domínio prolil-hidroxilase). A hidroxição promove a ligação à pVHL (supressor tumoral Von Hippel-Lindau). A ligação à pVHL leva a ubiquitinação (marcação de proteínas para degradação pelo proteassomo) de HIF- α e sua, então, degradação. Na falta de oxigênio, HIF- α não é degradado, possibilitando sua entrada no núcleo e ligação à HIF- β . O complexo formado por HIF- α e HIF- β é capaz de regular expressão gênica.

Genes alvos de HIFs apresentam sequências curtas e específicas de DNA chamadas de elementos de resposta à hipóxia (HREs). Quando o complexo se liga a um HRE ocorre a ativação da transcrição daquele gene (SEMENTA, 2020).

HIF-1 α possui outras duas isoformas, HIF-2 α e HIF-3 α . Enquanto HIF-1 α é codificado por diversos organismos pluricelulares e expresso em todos os tecidos de mamíferos estudados, os outros dois membros da família HIF- α estão presentes apenas em vertebrados e sua expressão é restrita a alguns tecidos (SEMENTA, 2020). HIF-2 α apresenta papéis diferentes de HIF-1 α na progressão tumoral. Um

exemplo disso é a depleção de HIF-1 α em células endoteliais que suprime a migração de células tumorais, enquanto a depleção de HIF-2 α estimula a propagação metastásica. HIF-3 α , apesar de identificado, ainda não é bem estudado (PETROVA et al., 2018).

HIF-1 α é altamente expresso na maioria dos tumores humanos comuns e suas metástases e é capaz de ativar a transcrição de genes que codificam eritropoietina, transportadores de glicose, enzimas glicolíticas, fator de crescimento endotelial vascular e outros genes cujos produtos proteicos aumentam a distribuição de O₂ ou facilitam a adaptação metabólica à hipóxia (SEMENZA, 2000).

2.2 SISTEMA IMUNE E HIPÓXIA TUMORAL

Embora as células tumorais possam crescer e proliferar sob estresse hipóxico devido ao remodelamento TME, muitas vezes essa condição é hostil a elementos do sistema imunológico (VITO; EL-SAYES; MOSSMAN, 2020).

A ativação de fatores induzíveis por hipóxia, principal resposta do tecido à falta de oxigênio, afeta diversas populações de células imunes. HIFs estão ligados à sobrevivência e função de células B e T, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas.

A hipóxia pode estabelecer um microambiente imunossuprimido ao bloquear funções de células efectoras, diminuir apresentação de antígenos e aumentar expressão de citocinas imunossupressoras (DING et al., 2021). DePeaux e Delgoffe (2021) sugerem que uma dessas citocinas, a PD-1, torna os tumores hipóxicos resistentes, uma vez que o aumento da disponibilidade de PD-1 resulta em uma barreira para a função de células T, impedindo sua ativação e favorecendo que funcionem em “estado de exaustão” e menor eficácia (DEPEAUX; DELGOFFE, 2021).

Em nichos hipóxicos, o estímulo a síntese de IL-4, IL-10 e IL-13, induz macrófagos do tipo M2, conhecidos como macrófagos associados a tumores (TAMs), um fenótipo agressivo com características altamente pró-tumorais. Elevados níveis de TAMs levam a uma menor resposta terapêutica (VITO; EL-SAYES; MOSSMAN, 2020).

Compreender a configuração imunológica do TME é crucial para prever comportamento tumoral (BALTA; WABNITZ; SAMSTAG, 2021).

2.3 TRATAMENTOS

Idealmente, terapias direcionadas a alvos almejam atingir células específicas, não atingindo significativamente as não cancerosas. No entanto, as vias de regulação de hipóxia são altamente complexas e contêm cascatas de sinalização interconectadas e mecanismos de sobreposição, dificultando a seletividade (ALBADARI; DENG; LI, 2019).

A hipóxia é um obstáculo para um dos tratamentos de câncer mais convencionais e amplamente aplicados, a radioterapia. Quando absorvida por material biológico, a radiação ionizante produz radicais livres chamados espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas espécies altamente instáveis reagem com oxigênio danificam irreversivelmente o DNA da célula tumoral, resultando em apoptose. Pela falta de oxigênio, a hipóxia limita a ação de ROS, tornando o tecido até três vezes mais resistente em comparação com tecido normóxico. Aumentar a dose é inviável, pois afeta muito significativamente as células saudáveis. Dar continuidade à radioterapia pode induzir um fenótipo mais agressivo pela persistência e subsequente multiplicação das células hipóxicas (GRAHAM; UNGER, 2018).

Nenhum tratamento oncológico implementado atualmente tem como foco (ou apoio) uma abordagem anti-hipóxia. As estratégias propostas até então tiveram resultados modestos e/ou impraticabilidade clínica. Dentre as já testadas, o uso de drogas que formam espécies citotóxicas em hipóxia tem por objetivo poupar tecidos bem oxigenados. A tirapazamina faz parte de uma classe de compostos que se torna 300 vezes mais citotóxica em tecidos pouco oxigenados, mas não apresenta resultados satisfatórios. O obstáculo para esse tipo de abordagem é a característica perfusão restrita nos tecidos alvos. Problema similar ocorre com fármacos para tornar células hipóxicas radiosensíveis, mimetizando oxigênio (COATES; SKWARSKI; HIGGINS, 2019).

Baixos níveis de oxigênio estão diretamente relacionados à suprimimento sanguíneo, outra abordagem muito explorada de tratamento. Inibidores do fator de

crescimento endotelial (VEGF) tem por objetivo diminuir a angiogênese, bloqueando o crescimento tumoral. Ainda que em camundongos a abordagem VEGF se mostre eficaz e promissora, em tumores humanos não atinge os mesmos resultados (SITOHY; NAGY; DVORAK, 2012). Tratamentos baseados nesse alvo sozinho muito comumente resultam em resistência às drogas utilizadas. Seu efeito inicial aumenta a taxa de hipóxia, que sinaliza a via de HIFs e acaba por induzir maior transcrição de VEGF (FALLAH; RINI, 2019). Outra limitação desse alvo terapêutico é a heterogeneidade tumoral. Em humanos, vasos sanguíneos podem se tornar independentes de VEGF, tornando-os não responsivos á terapias com esse alvo (SITOHY; NAGY; DVORAK, 2012).

Porém, agentes inibidores de angiogênese são controversos, pois acredita-se que podem resultar em correção de anormalidades vasculares (SØRENSEN; HORSMAN, 2020). Jain, R. K. (2001) defende a hipótese de que a vasculatura defeituosa e caótica estimulada pelo estresse hipóxico poderia ser revertida pelo uso de agentes antiangiogênicos. Ao impedir o desenvolvimento de vasos por esse tipo de microambiente, haveria reestabelecimento de tecido tumoral normóxico (JAIN, 2001).

A hipótese de “normalização vascular” influencia o desenvolvimento de novos tratamentos para tumores hipóxicos. Liu (2021) introduz uma abordagem que combina imuno e radioterapia. Nessa estratégia, a imunoterapia tem como papel restaurar a viabilidade dos vasos pela indução de interferon γ e, com isso, aumentar a sensibilidade do tecido à radiação. Os resultados podem ser positivos, mas dependem do tipo de tumor tratado, uma vez que a etapa de imunoterapia se mostrou eficaz em somente 9 tipos de tumores sólidos. Prever a eficácia dessa abordagem requer que sejam determinados marcadores imunes específicos (LIU et al., 2021).

Uma das abordagens mais promissoras de imunoterapias é a de inibidores de *checkpoints* (ICIs). ICIs utilizam anticorpos monoclonais contra agentes que bloqueiam funções antitumorais do sistema imunológico, como a CTLA-4 e o PD-1. Porém, a composição do TME pode ser uma barreira para o uso dessa técnica, principalmente quando há nichos hipóxicos. A insuficiência de oxigênio nessas regiões pode acarretar em imunossupressão e resistência (WANG et al., 2021).

2.4 ASSINATURAS DE HIPÓXIA

A relação entre hipóxia e progressão do câncer torna crucial desenvolver formas de identificar esse tipo de tumor na clínica. Apesar de disponíveis, as abordagens para mensuração dos níveis de oxigênio tumorais são limitadas. Assinaturas de expressão gênica referem-se a conjuntos de genes capazes de indicar um fenótipo de interesse com base na análise dos seus padrões de expressão (YANG; WEST, 2019) e podem ser úteis para substituir ou complementar as abordagens existentes.

A busca por assinaturas de hipóxia tumoral é promissora para valor prognóstico ou como auxílio em decisões terapêuticas (ZHANG et al., 2020) e vem sendo alvo de interesse de grupos de pesquisa.

Yang e colaboradores (2021a) identificaram uma assinatura de genes de hipóxia relacionados à resposta imune em câncer de mama triplo-negativo. O modelo desenvolvido foi capaz de prever sobrevida e identificar alto risco para os pacientes com esse tipo tumoral. Os resultados do estudo podem se tornar uma ferramenta de seleção de pacientes para terapias com alvo em hipóxia (YANG et al., 2021a).

Visando o aprimoramento do prognóstico de câncer de estômago, Liu e colegas (2020) desenvolveram uma assinatura de genes baseada na interação de hipóxia e sistema imunológico no ambiente gástrico. Além de descobrirem que tanto a hipóxia quanto o estado imune do microambiente tumoral associam-se à sobrevida do paciente, também puderam desenvolver uma assinatura de 3 genes capaz de ser aplicada para classificação de prognóstico (LIU et al., 2020).

A relação de status de hipóxia e sistema imune no contexto do melanoma também gerou resultados relevantes por Shou e colaboradores (2021). O grupo não só definiu uma assinatura de 11 genes relacionados a hipóxia, como identificou o escore de hipóxia como um fator de prognóstico independente e capaz de prever o microambiente imunológico para esse tipo tumoral (SHOU et al., 2021).

O desenvolvimento de assinaturas de hipóxia tumoral é um interesse relativamente recente e de caráter exploratório, necessitando de validação clínica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Explorar assinaturas genéticas relacionadas a padrões de regulação da expressão gênica para hipóxia no contexto Pan-Câncer.

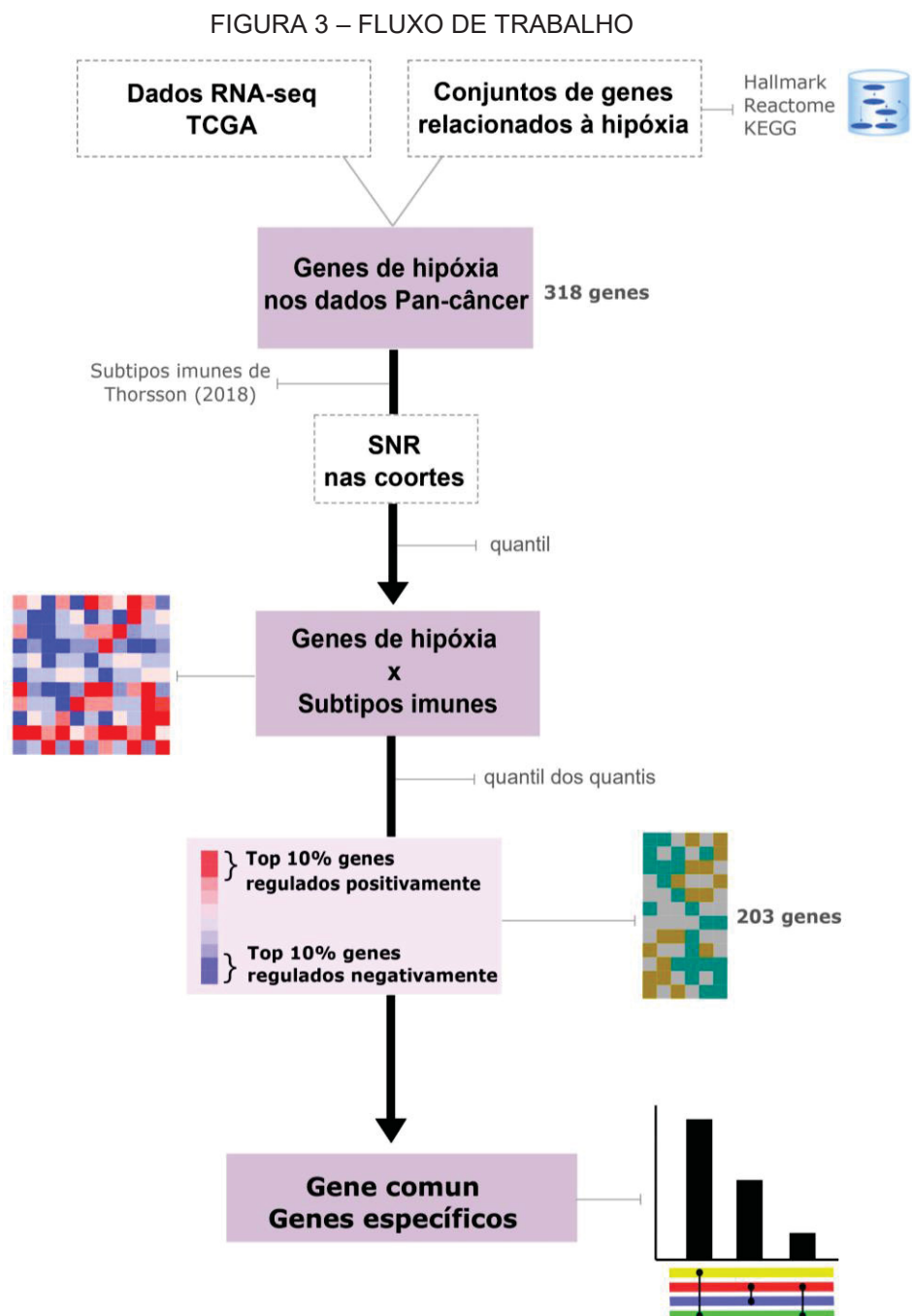
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Destacar a relevância de pesquisas acerca da hipóxia tumoral.
- Explorar hipóxia em tipos tumorais com diferentes perfis imunológicos.
- Investigar a relação entre hipóxia e características de grupos imunológicos.
- Introduzir o conceito de classificação alternativa de tumores.
- Colaborar para o surgimento de futuras abordagens que tenham a hipóxia como alvo diagnóstico e/ou terapêutico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FLUXO DE TRABALHO

O processo de preparo dos dados e desenvolvimento das análises apresenta-se na Figura 3.



FONTE: elaborada pela autora (2022).

4.2 AMOSTRA

As amostras utilizadas são parte do projeto Pan-Câncer, iniciativa que tem como proposta analisar, a partir dos conjuntos de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), o genoma de 33 diferentes tipos de tumor, entre mais de 11.000 pacientes (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017). Para a análise foram obtidos os dados de RNA-Seq de 30 tipos tumorais, referente aos tumores sólidos. Os dados, normalizados por log2, foram baixados do *XenaBrowser* (<https://xenabrowser.net/datapages/>). Foram selecionadas as amostras de tumor primário.

4.3 CONJUNTO DE GENES DE HIPÓXIA

O conjunto de genes de hipóxia foram obtidos pelo MsigDB v7.4 (LIBERZON et al., 2011; SUBRAMANIAN et al., 2005). A coleção *Hallmark* de assinaturas de hipóxia (LIBERZON et al., 2015), um conjunto de 200 genes, representa uma anotação resumida que transmite as informações relevantes de vários conjuntos originais relacionados à hipóxia. Os conjuntos de genes *Hallmark* dessa base de dados são construídos por meio de metodologia computacional, portanto, para trabalhar com uma lista mais rica e detalhada, também foram selecionadas três coleções curadas. *Cellular Response to Hypoxia* (75 genes), *Regulation of Gene Expression by Hypoxia Inducible Factor* (11 genes), derivados da plataforma Reactome, e *HIF-1 Signaling Pathway* (109 genes), derivada da plataforma KEGG, completaram a lista de genes de hipóxia (Conjuntos de genes listados em apêndice).

A lista de genes de hipóxia foi usada para filtrar os dados de expressão gênica das amostras, resultando em uma matriz de expressão com os dados de RNA-Seq apenas para os genes de interesse.

4.4 DADOS IMUNOLÓGICOS EM PAN-CÂNCER

Os dados dos subtipos imunes em Pan-câncer foram obtidos do material suplementar de Thorsson et al. (2018). Para conduzir a análise, os dados foram

integrados à matriz de expressão de acordo com o subtipo imune e *barcode* das amostras.

4.5 SUBTIPOS IMUNES EM PAN-CÂNCER X GENES DE HIPÓXIA

Para a visualização gráfica dos dados desenvolveu-se um *heatmap* com o pacote *ComplexHeatmap* (GU; EILS; SCHLESNER, 2016). Na Figura 4, as amostras foram exibidas em colunas e os genes em linhas. A relação *Signal-to-Noise* (SNR) foi calculada para os subtipos imunes dentro das coortes, como segue:

$$SNR = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sigma_1 + \sigma_2}$$

sendo μ_1 a média de expressão gênica na coorte analisada e μ_2 a média de expressão gênica em pacientes fora da coorte analisada. σ refere-se ao desvio padrão dos respectivos grupos mencionados. A normalização quantílica foi realizada e os valores de SNR máximo e mínimo foram limitados a +0,5 e -0,5, respectivamente.

4.6 SELEÇÃO DE GENES

Para visualizar a expressão gênica entre os subtipos imunes, a Figura 5A reproduz um *heatmap* derivado do anterior. As amostras foram agrupadas por subtipo imune em colunas, enquanto os genes de hipóxia permanecem nas linhas. Para evidenciar os extremos do intervalo de expressão gênica, valores absolutos de SNR foram calculados para cada subtipo e comparados ao mesmo cálculo para os demais subtipos, desconsiderando as coortes. Os quantis de SNR absoluto para o mesmo subtipo imune foram somados em todas as coortes e um novo quantil foi calculado para dispor os genes em ranking. Essa abordagem foi escolhida para ajustar a influência de coortes com tamanhos de amostra muito distintos. Os novos valores absolutos de SNR variam de 0 a 1. A Figura 5A mostra os 318 genes em linhas, enquanto as amostras são agrupadas por subtipos imunes em colunas.

Para evidenciar os genes mais relevantes em cada subtipo imune, o *heatmap* representado na Figura 5B foi gerado a partir dos genes que figuram entre os 10% mais expressos e 10% menos expressos.

4.7 INTERSEÇÃO ENTRE SUBTIPOS IMUNES

Para exibir as interseções dos genes selecionados entre os seis subtipos imunes, foi gerado um gráfico de interseções, Figura 6, através do pacote *UpSetR* (v1.4.0) (CONWAY; LEX; GEHLENBORG, 2017). Para comparações entre mais de cinco grupos o tradicional diagrama de Venn deixa de ser recomendado, então, para melhor visualização, optou-se pelo modelo do pacote citado. O gráfico representa cada grupo imunológico de duas formas, “baixo” e “alto”. O termo “baixo” refere-se ao conjunto de genes que apresentaram desregulação negativa, ou seja, expressão diminuída se comparada aos pacientes controle. Enquanto o termo “alto” refere-se ao conjunto de genes que apresentaram desregulação positiva, ou seja, expressão aumentada se comparada aos pacientes controle

TABELA 1 - GENES ESPECÍFICOS E COMUNS AOS SUBTIPOS IMUNES

Interseções	Total	Genes
C1.Baixo/C2.Alto/C3.Alto/ C4.Baixo/C5.Baixo/C6.Alto	1	<i>PIK3CD</i>
C1.Alto	15	<i>P4HA1, PPFIA4, IER3, ERFFI1, HK2, TFRC, TES, EFNA3, ENO2, INHA, B3GALT6, GPC1, SLC2A1, STC2, ANGPT2</i>
C2.Alto	8	<i>PSMB1, RBX1</i>
C3.Alto	3	<i>FOS, SELENBP1, DUSP1</i>
C4.Alto	9	<i>SLC37A4, PRDX5, PSMD9, ELOB, GALK1, BCAN, GBE1, PSMD5, GAA</i>
C5.Alto	12	<i>IDS, CDKN1B, CAMK2A, PIK3CB, PFKM, LDHB, LDHAL6A, CCNG2, MAPK1, RRAGD, HIF1AN, PIK3CA</i>
C6.Alto	6	<i>PAM, LXN, SDC2, TPST2, CHST3, SDC3</i>
C1.Baixo	5	<i>PNRC1, STAT3, MKNK1, NFKB1</i>
C2.Baixo	10	<i>PPARGC1A, GPC4, FLT1, NDST1, ENO4, GPC3, PIK3R1, DTNA, PCK1, HIF3A</i>
C3.Baixo	5	<i>PSMA7, PSMB5, PSMC1, PSMD7, PSMD2</i>
C4.Baixo	5	<i>SLC2A3, AKAP12, PKP1, CHST2, TKTL1</i>
C5.Baixo	6	<i>PPP1R15A, JUN, EIF4EBP1, S100A4, CP, IFNGR2</i>
C6.Baixo	8	<i>ENO3, PSMC5, SIAH2, PDK1, RPS6KB2, JMJD6, SEM1, ANKZF1</i>

FONTE: A autora (2021).

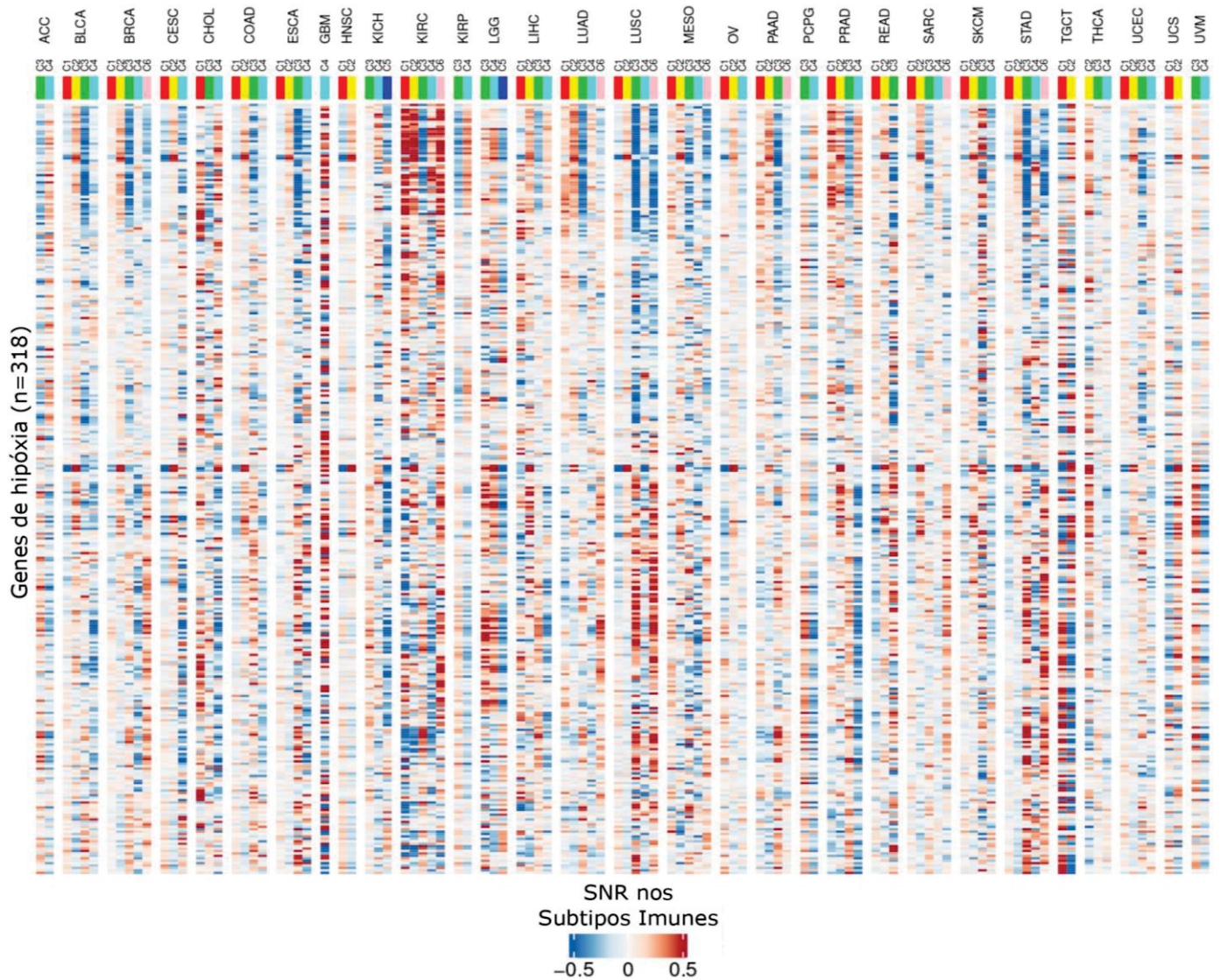
LEGENDA: Lista parcial dos genes contidos nas interseções entre os subtipos imunes. Interseções nomeadas pelo subtipo imune seguido da palavra “baixo” para os genes com expressão reduzida, ou “alto” para os de expressão aumentada.

5.1 PADRÕES DE EXPRESSÃO MAIS EVIDENTES ENTRE SUBTIPOS IMUNES QUE ENTRE COORTES

A combinação dos conjuntos do MsigDB resultou em uma lista de genes de hipóxia. A matriz de expressão gênica em Pan-câncer obtida pelo XenaBrowser foi filtrada pela lista e acrescentaram-se os *barcodes* do TCGA. Com base no perfil de expressão gênica relacionado à resposta imune, Throsson et al. (2018) analisou mais de 10.000 amostras do TCGA, de 30 tipos distintos de câncer, e os classificou em seis subtipos imunes. Usando o material suplementar de Thorsson et al. (2018), a classificação imune foi, também, incorporada à matriz.

A matriz foi exibida como um *heatmap*, Figura 4, onde as linhas correspondem aos 318 genes de hipóxia, enquanto as colunas são organizadas por subtipos imunes dentro das coortes. Para esta análise, apenas coortes com mais de 20 amostras foram consideradas. Como esperado, a maioria das coortes não apresenta todos os seis subtipos imunes, isso se deve às propriedades dos tecidos, mas também às diferenças nos tamanhos das amostras que compõem dos subgrupos imunes.

FIGURA 5 - SUBTIPOS IMUNES NAS COORTES DE PAN-CÂNCER VS. CONJUNTO DE GENES DE HIPÓXIA



FONTE: A autora (2021).

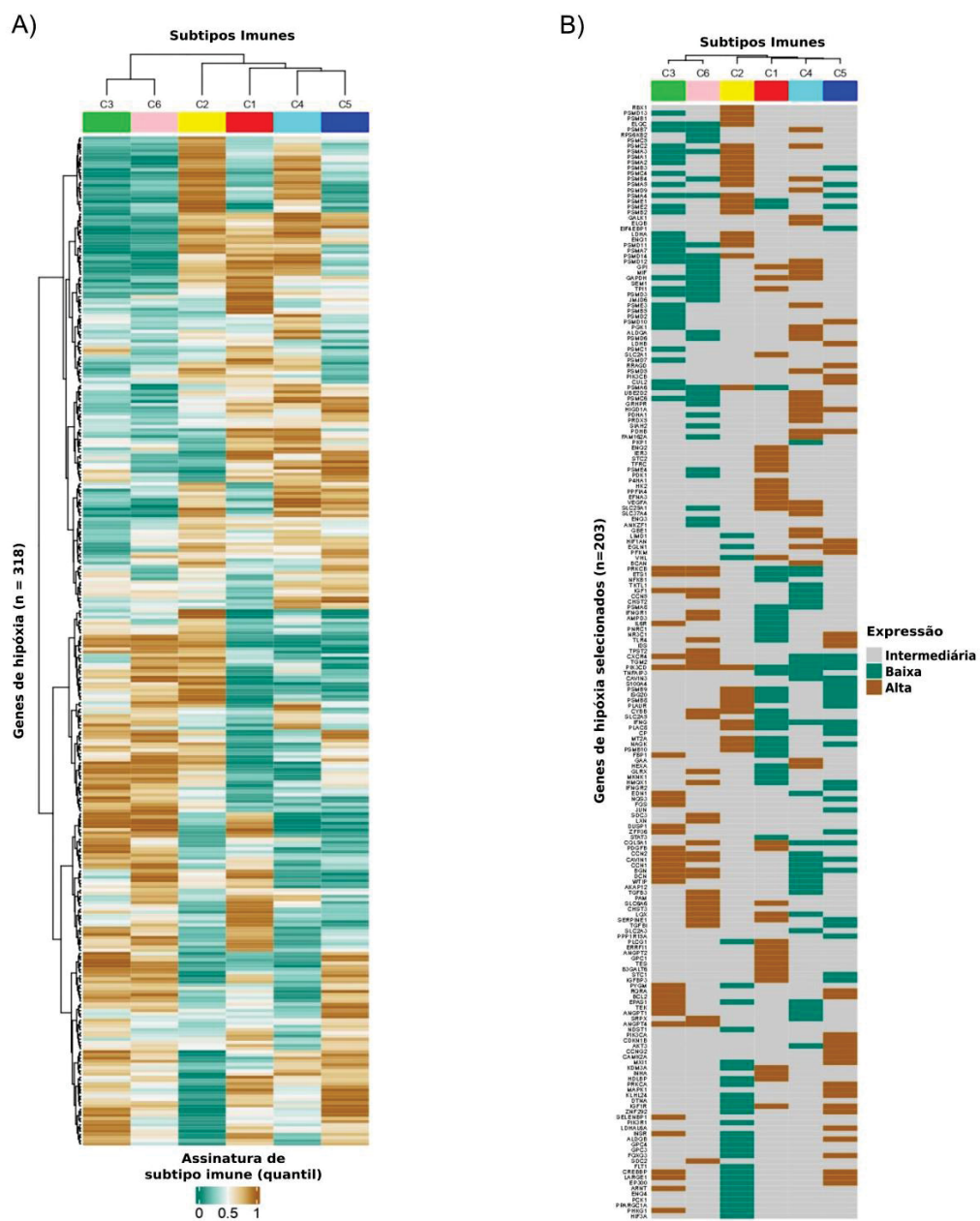
LEGENDA: Heatmap das coortes de Pan-câncer do TCGA subdivididos em grupos imunológicos vs. conjunto de genes de hipóxia (n = 318).

A Figura 4 apresenta informações gerais sobre a expressão de genes de hipóxia nas coortes. A visualização dos dados dispostos teve por objetivo encontrar focos de interesse para subsequente avaliação. Nessa etapa observou-se que a expressão dos genes de hipóxia apresenta padrões se analisada entre subtipos imunes dentro de um mesmo tipo tumoral.

5.2 SUBTIPOS IMUNES C3 E C6 SEGUEM UM PADRÃO SEMELHANTE DE EXPRESSÃO

A *clusterização* de colunas da Figura 5A revela que os grupos C3 e C6 possuem um padrão de expressão semelhante, enquanto os outros subtipos parecem mais distantes entre si.

FIGURA 6 - SUBTIPOS IMUNES VS. GENES DE HIPÓXIA



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Figura 5A - *Heatmap* de subtipos imunológicos proposto pelo artigo de referência Thorsson et al. (2018) vs. conjunto de genes de hipóxia (n = 318). Figura 5B - *Heatmap* identificando genes de hipóxia nas extremidades do intervalo de SNR absoluto. Para cada subtipo imune, 32 genes foram escolhidos como os 10% mais regulados positivamente e 31 como os 10% mais regulados negativamente.

Para cada subtipo imune, 32 genes foram escolhidos como os 10% mais regulados positivamente e 31 como os 10% mais regulados negativamente. O destaque desses genes resultou no *heatmap* da Figura 5B. É possível observar os genes de hipóxia mais relevantes dentro dos subtipos imunes, reforçando os comportamentos semelhantes do *cluster* composto pelos grupos C3 e C6. O *cluster* composto pelos grupos C2, C1, C4 e C5 embora apresentem menos semelhanças, se tomados um a um, se comportam em um padrão de expressão oposto ao do primeiro *cluster*.

5.3 GENES ESPECÍFICOS SÃO DESTAQUE ENTRE SUBTIPOS IMUNES

Selecionados anteriormente, os genes de hipóxia mais diferencialmente expressos entre os subtipos imunes são exibidos na Figura 6. O gráfico representa o número de genes específicos para cada grupo e quantos são compartilhados entre eles. A Figura 6 mostra apenas um gene comum a todos os subtipos imunes, enquanto o número de genes específicos é mais expressivo.

5.3.1 *PIK3CD* como gene comum

De acordo com a análise dos genes mais regulados positiva e negativamente para cada subtipo imune, exibidos pela Figura 6, apenas um é comum a todos os grupos. Os grupos C2, C3 e C6 apresentam regulação positiva de *PIK3CD*. Enquanto os grupos C1, C4 e C5 apresentam regulação negativa de *PIK3CD*.

PIK3CD codifica p110 δ , uma subunidade catalítica de PI3K, descrita como sendo predominantemente expressa em leucócitos. A ausência ou diminuição da expressão de p110 δ causa imunodeficiência (THOUENON et al., 2021), é natural que subtipos com menor atividade imunológica, como C4 e C5, apresentem expressão diminuída de *PIK3CD*. Além disso, p110 δ pode estar relacionado à proliferação, migração e sobrevivência celular (CHEN et al., 2019).

A identificação do *PIK3CD* como um gene comum é esperada, por se tratar de um gene relacionado ao sistema imunológico, além de estar potencialmente ligado a diversos mecanismos celulares.

5.3.2 Genes específicos para o subtipo imune C1 estão relacionados à proliferação celular

O grupo C1 se destaca pelas propriedades cicatrizantes, caracteriza-se pela elevada expressão de agentes angiogênicos, alta taxa de proliferação e infiltrado imune com predominância de linfócitos do tipo Th2 (THORSSON V, 2018). A Figura 4 mostra que a maioria das coortes de Pan-câncer tem genes de hipóxia ligados a esse subtipo imune, mais precisamente, 22 das 30 coortes.

De acordo com a Figura 6, a expressão de 20 genes de hipóxia está exclusivamente relacionada a este grupo, sendo 15 regulados positivamente e 5, negativamente. Dentre os genes regulados negativamente, *PNRC1* é um importante supressor tumoral, pois inibe a proliferação de células tumorais ao interagir com proteínas envolvidas em fatores de crescimento e vias mediadas por Ras (SALETTA et al., 2010). Outro gene com expressão reduzida nos grupos C1 é o *STAT3*, responsável por mediar a expressão de diversos genes envolvidos em processos celulares, como crescimento celular e apoptose. É considerado um dos reguladores do *VEGF* induzido por hipóxia, um importante fator envolvido na angiogênese (HWANG et al., 2020).

As amostras classificadas como parte do grupo C1 mostraram regulação positiva de alguns genes de hipóxia relevantes. *P4HA1* está ligado à produção de colágeno e nos tecidos tumorais é associado à promoção de invasão e metástase. Zhao e colaboradores (2021) identificaram um grupo de genes, incluindo *P4HA1*, capazes de prever mau prognóstico para pacientes com carcinoma epidermóide oral quando superexpressos. No câncer de mama, a expressão de *P4HA1* induz deposição de colágeno, causando fenótipos mais agressivos (ZHAO et al., 2021). Uma assinatura de 5 genes de hipóxia definida por Yang et al. (2021b) para prever prognóstico em pacientes com câncer cervical considera *P4HA1* um dos oncogenes, capaz de afetar proliferação, migração e invasão tumoral (YANG et al., 2021b). Em condições de hipóxia, *ERRF1* induz dormência de células tumorais. Essa

característica torna as células resistentes à quimioterapia e radioterapia e, como condição reversível, esse reservatório de células tumorais pode voltar a proliferar após o tratamento (ENDO et al., 2017). *TFRC* também figurou como um dos genes específicos de C1 e pode estar associado à promoção da proliferação celular. Ele codifica uma proteína de membrana responsável pela captação de ferro (XU et al., 2019). Células em multiplicação tendem a apresentar maior expressão dessa proteína do que células quiescentes, uma vez que o ferro é um nutriente essencial para o crescimento e metabolismo celular (UDENSI et al., 2014).

O grupo C1 apresenta propriedades angiogênicas significativas. Tumores hipóxicos tendem a induzir altas taxas de neovascularização e, para isso, dependem fortemente da atividade de dois genes, *VEGF-A* e *ANGPT2*. *ANGPT2* é apresentado como um dos genes específicos de C1. Sua expressão aumenta a permeabilidade vascular, induz plasticidade dos vasos e desestabiliza a organização vascular (TIRPE et al., 2019).

5.3.3 Genes específicos para o subtipo imune C2 são tão diversos quanto as amostras que compõe o grupo

Caracterizado como IFN- γ dominante, o grupo C2 apresenta a maior polarização de macrófagos dentre os subtipos imunes, além de forte sinal de células T CD8 (THORSSON V, 2018). Embora o grupo C2 também apareça na maioria das coortes de Pan-câncer, como pode ser visto na Figura 4, é um subtipo heterogêneo, abrangendo tecidos tumorais com propriedades diversas. Por esta razão, os 12 genes específicos de C2 também são diversos em suas funções.

Dentre os genes altamente expressos, destaca-se *RBX1*, que codifica a proteína-1 da *Ring box*. Essa proteína é uma importante subunidade do complexo responsável pela etapa de degradação do HIF-1 α , evitando sua ação transcricional subsequente (STANTIC et al., 2018). O grupo regulado negativamente apresentou *DTNA*, identificado como supressor tumoral (FU; PEI; SONG, 2021), *PCK1*, importante regulador da gliconeogênese (YAMAGUCHI et al., 2019), e *HIF3A*. Entre os genes que codificam fatores induzíveis por hipóxia, o *HIF3A* tem os mecanismos menos claros, mas é conhecido por atuar como um regulador negativo de HIF-1 α e HIF-2 α (ROMERO et al., 2020).

5.3.4 Genes específicos com regulação negativa para o subtipo C3 estão relacionados à degradação de HIF-1 α

C3 está associado ao melhor prognóstico e sobrevida entre todos os subtipos imunes, sendo caracterizado por Thorsson et al. (2018) como um grupo altamente inflamatório, apresentando proliferação celular baixa a moderada (THORSSON V, 2018).

Todos os 5 genes regulados negativamente em C3 estão relacionados a unidades constituintes do proteassomo. O gene *PSMA7*, por exemplo, codifica a subunidade alfa do tipo 7, que participa da atividade de transativação do HIF-1 α através da via do proteassomo. A diminuição da expressão desta proteína pode inibir a degradação do HIF-1 α (LI et al., 2011). Nem todos os genes dessa categoria possuem literatura que os vincule diretamente aos mecanismos de hipóxia, mas, como todos codificam partes do mesmo complexo, espera-se que se comportem de forma semelhante ao descrito para *PSMA7*.

5.3.5 Genes específicos de menor destaque

O subtipo imune C4 apresenta maior resposta de macrófagos do tipo M2 e caracteriza-se pela supressão de linfócitos Th1, por isso é identificado como o grupo com depleção linfocitária (THORSSON V, 2018). Entre os genes específicos de C4, *SLC2A3* é um dos mais desregulados. Em hipóxia, sua expressão relaciona-se a reprogramação metabólica mediada por *HIFs* para produção de energia anaeróbia, mas, dentro do grupo C4, *SLC2A3* apresenta expressão reduzida (LAUER et al., 2020). No entanto, *GBE1* é regulado positivamente no grupo C4. *GBE1* apoia reprogramação fosforilação oxidativa para glicólise. Este cenário ocorre em células de adenocarcinoma de pulmão, por exemplo, onde pacientes com alta expressão de *GBE1* exibem piores perfis de sobrevivência (LI et al., 2020).

Tecidos classificados como C5 são imunologicamente silenciosos, com baixa resposta leucocitária e baixa proliferação celular (THORSSON V, 2018). Entre os genes específicos neste grupo, a regulação negativa de *S100A4* corrobora essas

propriedades. *S100A4* está envolvido no estímulo a proliferação tumoral, metástases, motilidade celular e apoptose (TANEJA; VETTER; LECLERC, 2021). O gene *LDHB*, regulado positivamente para este grupo, foi anotado por Zhang et al. (2021) como parte de uma assinatura gênica para prognóstico de glioma, o que é uma observação esperada, visto que o subtipo imune C5 é composto principalmente por amostras desse tipo de tumor (ZHANG et al., 2021).

O grupo C6 é composto por um pequeno conjunto de tumores mistos com alto infiltrado linfocitário, sua propriedade mais marcante é ser TGF- β dominante (THORSSON V, 2018). *SIAH2* codifica uma enzima E3 ligase, que pode estabilizar indiretamente os níveis de HIF-1 α , promovendo degradação de fatores que degradam HIF. Esta é uma das funções mais bem estabelecidas de *SIAH2*, um gene com expressão reduzida em C6 (XU; LI, 2021).

6 CONCLUSÃO

A diversidade de tumores que podem se desenvolver no corpo humano, variam não só de acordo com o tecido, mas também de acordo com características intratumorais. Prognóstico, diagnóstico e tratamentos focados nas individualidades tumorais podem levar a maior precisão e eficácia. Nesse contexto, é notável o potencial de se explorar a caracterização de hipóxia tumoral.

Em comparação com os últimos anos, houve um crescimento no interesse por esse tópico de pesquisa, mas ainda de caráter predominantemente exploratório. Já foram descritas, para alguns tipos tumorais, assinaturas genéticas com base em genes relacionados a hipóxia.

O presente trabalho explorou a possibilidade da criação de assinaturas de acordo com uma classificação tumoral alternativa, os subtipos imunes descritos. Os resultados apresentam informações gerais que devem ser mais profundamente exploradas.

Novas abordagens de imunoterapia vêm acompanhando o interesse pelo tratamento cada vez mais individualizado, o que torna relevante o uso das classificações imunes de Thorsson, et al (2018) no desenvolvimento de assinaturas genéticas.

REFERÊNCIAS

- ALBADARI, N.; DENG, S.; LI, W. The Transcriptional Factors HIF-1 and HIF-2 and Their Novel Inhibitors in Cancer Therapy. **Expert Opin Drug Discov.**, v. 14, n. 7, p. 667–682, 2019.
- BALAMURUGAN, K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. **Int J Cancer**, v. 138, n. 5, p. 1058–1066, 2016.
- BALTA, E.; WABNITZ, G. H.; SAMSTAG, Y. Hijacked immune cells in the tumor microenvironment: Molecular mechanisms of immunosuppression and cues to improve t cell-based immunotherapy of solid tumors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 1–27, 2021.
- CHEN, J. S. et al. PIK3CD induces cell growth and invasion by activating AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling in colorectal cancer. **Cancer Science**, v. 110, n. 3, p. 997–1011, 2019.
- COATES, J. T.; SKWARSKI, M.; HIGGINS, G. S. Targeting tumour hypoxia: Shifting focus from oxygen supply to demand. **British Journal of Radiology**, v. 92, n. 1093, p. 1–3, 2019.
- CONWAY, J. R.; LEX, A.; GEHLENBORG, N. UpSetR: An R package for the visualization of intersecting sets and their properties. **Bioinformatics**, v. 33, n. 18, p. 2938–2940, 2017.
- DEPEAUX, K.; DELGOFFE, G. M. Metabolic barriers to cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 12, p. 785–797, 2021.
- DING, J. et al. A 4-gene-based hypoxia signature is associated with tumor immune microenvironment and predicts the prognosis of pancreatic cancer patients. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2021.
- ENDO, H. et al. The induction of MIG6 under hypoxic conditions is critical for dormancy in primary cultured lung cancer cells with activating EGFR mutations. **Oncogene**, v. 36, n. 20, p. 2824–2834, 2017.
- FALLAH, J.; RINI, B. I. HIF Inhibitors: Status of Current Clinical Development. **Current Oncology Reports**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 2019.
- FU, G.; PEI, Z.; SONG, N. Oncogenic microRNA-301b regulates tumor repressor dystrobrevin alpha to facilitate cell growth, invasion and migration in esophageal cancer. **Esophagus**, v. 18, n. 2, p. 315–325, 2021.
- GRAHAM, K.; UNGER, E. Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 6049–6058, 2018.
- GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 2016.
- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HWANG, S. et al. Phosphorylation of STAT3 and ERBB2 mediates hypoxia-induced VEGF release in ARPE-19 cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 22, n. 4, p. 2733–2740, 2020.
- JAIN, R. K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. **Nature Medicine**, v. 7, n. 9, p. 987–989, 2001.
- LAUER, V. et al. Hypoxia drives glucose transporter 3 expression through hypoxia-inducible

transcription factor (HIF)-mediated induction of the long noncoding RNA NIC1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 13, p. 4065–4078, 2020.

LI, L. et al. Hypoxia-induced GBE1 expression promotes tumor progression through metabolic reprogramming in lung adenocarcinoma. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2020.

LI, N. et al. Calcineurin B subunit interacts with proteasome subunit alpha type 7 and represses hypoxia-inducible factor-1 α activity via the proteasome pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 405, n. 3, p. 468–472, 2011.

LIBERZON, A. et al. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. **Bioinformatics**, v. 27, n. 12, p. 1739–1740, 2011.

LIBERZON, A. et al. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. **Cell Systems**, v. 1, n. 6, p. 417–425, 2015.

LIU, Y. et al. Development and validation of a hypoxia-immune-based microenvironment gene signature for risk stratification in gastric cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–17, 2020.

LIU, Z. et al. Vascular normalization in immunotherapy: A promising mechanisms combined with radiotherapy. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 139, n. January, p. 111607, 2021.

MUZ, B. et al. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. **Hypoxia**, p. 83, 2015.

NAJAFI, M. et al. Hypoxia in solid tumors: a key promoter of cancer stem cell (CSC) resistance. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 146, n. 1, p. 19–31, 2020.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **PanCanAtlas is TCGA's final analysis across the data**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/blog/2017/tcga-pancan-atlas>>.

NOMAN, M. Z. et al. Hypoxia: A key player in antitumor immune response. A review in the theme: Cellular responses to hypoxia. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 309, n. 9, p. C569–C579, 2015.

PETROVA, V. et al. The hypoxic tumour microenvironment. **Oncogenesis**, v. 7, n. 1, 2018.

PIETROBON, V.; MARINCOLA, F. M. Hypoxia and the phenomenon of immune exclusion. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1–26, 2021.

ROMERO, Y. et al. Antitumor Therapy under Hypoxic Microenvironment by the Combination of 2-Methoxyestradiol and Sodium Dichloroacetate on Human Non-Small-Cell Lung Cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

SALETTA, F. et al. Iron chelator-mediated alterations in gene expression: Identification of novel iron-regulated molecules that are molecular targets of hypoxia-inducible factor-1 α and p53. **Molecular Pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 443–458, 2010.

SAMANTA, D.; SEMENZA, G. L. Metabolic adaptation of cancer and immune cells mediated by hypoxia-inducible factors. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1870, n. 1, p. 15–22, 2018.

SCHITO, L.; SEMENZA, G. L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. **Trends in Cancer**, v. 2, n. 12, p. 758–770, 2016.

SEМЕНZA, G. L. Expression of hypoxia-inducible factor 1: Mechanisms and consequences. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 47–53, 2000.

SEMENZA, G. L. The genomics and genetics of oxygen homeostasis. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 21, p. 183–204, 2020.

SHOU, Y. et al. Determination of hypoxia signature to predict prognosis and the tumor immune microenvironment in melanoma. **Molecular Omics**, v. 17, n. 2, p. 307–316, 2021.

SITOHY, B.; NAGY, J. A.; DVORAK, H. F. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: Reassessing the target. **Cancer Res.**, v. 72, n. 8, p. 1909–1914, 2012.

SØRENSEN, B. S.; HORSMAN, M. R. Tumor Hypoxia: Impact on Radiation Therapy and Molecular Pathways. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. April, p. 1–11, 2020.

STANTIC, M. et al. $\Delta Np73$ enhances HIF-1 α protein stability through repression of the ECV complex. **Oncogene**, v. 37, n. 27, p. 3729–3739, 2018.

SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 2005.

SUN, Y. et al. Exploiting a new approach to destroy the barrier of tumor microenvironment: Nano-architecture delivery systems. **Molecules**, v. 26, n. 9, 2021.

TAM, S. Y.; WU, V. W. C.; LAW, H. K. W. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers : HIF-1 α and Beyond. v. 10, n. April, p. 1–11, 2020.

TANEJA, S.; VETTER, S. W.; LECLERC, E. Hypoxia and the receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, 2021.

THORSSON V, ET AL. The Immune Landscape of Cancer HHS Public Access. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 812–830, 2018.

THOUENON, R. et al. Activated PI3Kinase Delta Syndrome—A Multifaceted Disease. **Frontiers in Pediatrics**, v. 9, n. June, p. 1–10, 2021.

TIRPE, A. A. et al. Hypoxia: Overview on hypoxia-mediated mechanisms with a focus on the role of hif genes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 1–20, 2019.

UDENSI, U. K. et al. **Proteomics-based identification of differentially abundant proteins from human keratinocytes exposed to arsenic trioxide.** [s.l: s.n.]. v. 7

VITO, A.; EL-SAYES, N.; MOSSMAN, K. Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 1–20, 2020.

WANG, B. et al. Targeting hypoxia in the tumor microenvironment: a potential strategy to improve cancer immunotherapy. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 40, n. 1, p. 1–16, 2021.

XU, D.; LI, C. Regulation of the SIAH2-HIF-1 Axis by Protein Kinases and Its Implication in Cancer Therapy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. March, p. 1–15, 2021.

XU, X. et al. Transferrin receptor-involved HIF-1 signaling pathway in cervical cancer. **Cancer Gene Therapy**, v. 26, n. 11–12, p. 356–365, 2019.

YAMAGUCHI, N. et al. PCK1 and DHODH drive colorectal cancer liver metastatic colonization and hypoxic growth by promoting nucleotide synthesis. **eLife**, v. 8, p. 1–26, 2019.

YANG, L. J.; WEST, C. M. L. Hypoxia gene expression signatures as predictive biomarkers for personalising radiotherapy. **British Journal of Radiology**, v. 92, n. 1093, 2019.

YANG, X. et al. A combined hypoxia and immune gene signature for predicting survival and risk stratification in triple-negative breast cancer. **Aging**, v. 13, n. 15, p. 19486–19509, 2021a.

YANG, Y. et al. Constructe a novel 5 hypoxia genes signature for cervical cancer. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 1–15, 2021b.

ZHANG, C. et al. A Novel Glucose Metabolism-Related Gene Signature for Overall Survival Prediction in Patients with Glioblastoma. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.

ZHANG, Q. et al. Integrative Analysis of Hypoxia-Associated Signature in Pan-Cancer. **iScience**, v. 23, n. 9, p. 101460, 2020.

ZHANG, T. et al. Hypoxia and metabolism in metastasis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1136, p. 87–95, 2019.

ZHAO, C. et al. A four-hypoxia-genes-based prognostic signature for oral squamous cell carcinoma. **BMC Oral Health**, v. 21, n. 1, p. 1–13, 2021.

APÊNDICE – CONJUNTOS DE GENES

REACTOME		KEGG	
Regulation of Gene Expression by Hypoxia Inducible Factor	Cellular Response to Hypoxia	HIF-1 Signaling Pathway	Hallmark Hypoxia
<i>ARNT</i>	<i>AJUBA</i>	<i>AKT1</i>	<i>ACKR3</i>
<i>CA9</i>	<i>ARNT</i>	<i>AKT2</i>	<i>ADM</i>
<i>CITED2</i>	<i>CA9</i>	<i>AKT3</i>	<i>ADORA2B</i>
<i>CREBBP</i>	<i>CITED2</i>	<i>ALDOA</i>	<i>AK4</i>
<i>EP300</i>	<i>CREBBP</i>	<i>ALDOB</i>	<i>AKAP12</i>
<i>EPAS1</i>	<i>CUL2</i>	<i>ALDOC</i>	<i>ALDOA</i>
<i>EPO</i>	<i>EGLN1</i>	<i>ANGPT1</i>	<i>ALDOB</i>
<i>HIF1A</i>	<i>EGLN2</i>	<i>ANGPT2</i>	<i>ALDOC</i>
<i>HIF3A</i>	<i>EGLN3</i>	<i>ANGPT4</i>	<i>AMPD3</i>
<i>HIGD1A</i>	<i>ELOB</i>	<i>ARNT</i>	<i>ANGPTL4</i>
<i>VEGFA</i>	<i>ELOC</i>	<i>BCL2</i>	<i>ANKZF1</i>
	<i>EP300</i>	<i>CAMK2A</i>	<i>ANXA2</i>
	<i>EPAS1</i>	<i>CAMK2B</i>	<i>ATF3</i>
	<i>EPO</i>	<i>CAMK2D</i>	<i>ATP7A</i>
	<i>HIF1A</i>	<i>CAMK2G</i>	<i>B3GALT6</i>
	<i>HIF1AN</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>B4GALNT2</i>
	<i>HIF3A</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>BCAN</i>
	<i>HIGD1A</i>	<i>CREBBP</i>	<i>BCL2</i>
	<i>LIMD1</i>	<i>CUL2</i>	<i>BGN</i>
	<i>PSMA1</i>	<i>CYBB</i>	<i>BHLHE40</i>
	<i>PSMA2</i>	<i>EDN1</i>	<i>BNIP3L</i>
	<i>PSMA3</i>	<i>EGF</i>	<i>BRS3</i>
	<i>PSMA4</i>	<i>EGFR</i>	<i>BTG1</i>
	<i>PSMA5</i>	<i>EGLN1</i>	<i>CA12</i>
	<i>PSMA6</i>	<i>EGLN2</i>	<i>CASP6</i>
	<i>PSMA7</i>	<i>EGLN3</i>	<i>CAV1</i>
	<i>PSMA8</i>	<i>EIF4E</i>	<i>CAVIN1</i>
	<i>PSMB</i>	<i>EIF4E1B</i>	<i>CAVIN3</i>
	<i>PSMB1</i>	<i>EIF4E2</i>	<i>CCN1</i>
	<i>PSMB10</i>	<i>EIF4EBP1</i>	<i>CCN2</i>
	<i>PSMB11</i>	<i>ELOB</i>	<i>CCN5</i>
	<i>PSMB2</i>	<i>ELOC</i>	<i>CCNG2</i>
	<i>PSMB3</i>	<i>ENO1</i>	<i>CDKN1A</i>
	<i>PSMB4</i>	<i>ENO2</i>	<i>CDKN1B</i>

<i>PSMB5</i>	<i>ENO3</i>	<i>CDKN1C</i>
<i>PSMB6</i>	<i>ENO4</i>	<i>CHST2</i>
<i>PSMB7</i>	<i>EP300</i>	<i>CHST3</i>
<i>PSMB8</i>	<i>EPO</i>	<i>CITED2</i>
<i>PSMB9</i>	<i>ERBB2</i>	<i>COL5A1</i>
<i>PSMC1</i>	<i>FLT1</i>	<i>CP</i>
<i>PSMC2</i>	<i>GAPDH</i>	<i>CSRP2</i>
<i>PSMC3</i>	<i>HIF1A</i>	<i>CXCR4</i>
<i>PSMC4</i>	<i>HK1</i>	<i>DCN</i>
<i>PSMC5</i>	<i>HK2</i>	<i>DDIT3</i>
<i>PSMC6</i>	<i>HK3</i>	<i>DDIT4</i>
<i>PSMD1</i>	<i>HKDC1</i>	<i>DPYSL4</i>
<i>PSMD10</i>	<i>HMOX1</i>	<i>DTNA</i>
<i>PSMD11</i>	<i>IFNG</i>	<i>DUSP1</i>
<i>PSMD12</i>	<i>IFNGR1</i>	<i>EDN2</i>
<i>PSMD13</i>	<i>IFNGR2</i>	<i>EFNA1</i>
<i>PSMD14</i>	<i>IGF1</i>	<i>EFNA3</i>
<i>PSMD2</i>	<i>IGF1R</i>	<i>EGFR</i>
<i>PSMD3</i>	<i>IL6</i>	<i>ENO1</i>
<i>PSMD4</i>	<i>IL6R</i>	<i>ENO2</i>
<i>PSMD5</i>	<i>INS</i>	<i>ENO3</i>
<i>PSMD6</i>	<i>INSR</i>	<i>ERO1A</i>
<i>PSMD7</i>	<i>LDHA</i>	<i>ERRFI1</i>
<i>PSMD8</i>	<i>LDHAL6A</i>	<i>ETS1</i>
<i>PSMD9</i>	<i>LDHAL6B</i>	<i>EXT1</i>
<i>PSME1</i>	<i>LDHB</i>	<i>F3</i>
<i>PSME2</i>	<i>LDHC</i>	<i>FAM162A</i>
<i>PSME3</i>	<i>LTBR</i>	<i>FBP1</i>
<i>PSME4</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>FOS</i>
<i>PSMF1</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>FOSL2</i>
<i>RBX1</i>	<i>MAPK1</i>	<i>FOXO3</i>
<i>RPS27A</i>	<i>MAPK3</i>	<i>GAA</i>
<i>SEM1</i>	<i>MKNK1</i>	<i>GALK1</i>
<i>UBA52</i>	<i>MKNK2</i>	<i>GAPDH</i>
<i>UBB</i>	<i>MTOR</i>	<i>GAPDHS</i>
<i>UBC</i>	<i>NFKB1</i>	<i>GBE1</i>
<i>UBE2D1</i>	<i>NOS2</i>	<i>GCK</i>
<i>UBE2D2</i>	<i>NOS3</i>	<i>GCNT2</i>
<i>UBE2D3</i>	<i>NPPA</i>	<i>GLRX</i>
<i>VEGFA</i>	<i>PDHA1</i>	<i>GPC1</i>
<i>VHL</i>	<i>PDHA2</i>	<i>GPC3</i>
<i>WTIP</i>	<i>PDHB</i>	<i>GPC4</i>
	<i>PDK1</i>	<i>GPI</i>
	<i>PFKFB3</i>	<i>GRHPR</i>

<i>PFKL</i>	<i>GYS1</i>
<i>PFKM</i>	<i>HAS1</i>
<i>PFKP</i>	<i>HDLBP</i>
<i>PGK1</i>	<i>HEXA</i>
<i>PGK2</i>	<i>HK1</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>HK2</i>
<i>PIK3CB</i>	<i>HMOX1</i>
<i>PIK3CD</i>	<i>HOXB9</i>
<i>PIK3R1</i>	<i>HS3ST1</i>
<i>PIK3R2</i>	<i>HSPA5</i>
<i>PIK3R3</i>	<i>IDS</i>
<i>PLCG1</i>	<i>IER3</i>
<i>PLCG2</i>	<i>IGFBP1</i>
<i>PRKCA</i>	<i>IGFBP3</i>
<i>PRKCB</i>	<i>IL6</i>
<i>PRKCG</i>	<i>ILVBL</i>
<i>RBX1</i>	<i>INHA</i>
<i>RELA</i>	<i>IRS2</i>
<i>RPS6</i>	<i>ISG20</i>
<i>RPS6KB1</i>	<i>JMJD6</i>
<i>RPS6KB2</i>	<i>JUN</i>
<i>SERPINE1</i>	<i>KDELR3</i>
<i>SLC2A1</i>	<i>KDM3A</i>
<i>STAT3</i>	<i>KIF5A</i>
<i>TEK</i>	<i>KLF6</i>
<i>TF</i>	<i>KLF7</i>
<i>TFRC</i>	<i>KLHL24</i>
<i>TIMP1</i>	<i>LALBA</i>
<i>TLR4</i>	<i>LARGE1</i>
<i>VEGFA</i>	<i>LDHA</i>
<i>VHL</i>	<i>LDHC</i>
	<i>LOX</i>
	<i>LXN</i>
	<i>MAFF</i>
	<i>MAP3K1</i>
	<i>MIF</i>
	<i>MT1E</i>
	<i>MT2A</i>
	<i>MXI1</i>
	<i>MYH9</i>
	<i>NAGK</i>
	<i>NCAN</i>
	<i>NDRG1</i>
	<i>NDST1</i>

		NDST2
		NEDD4L
		NFIL3
		NOCT
		NR3C1
		P4HA1
		P4HA2
		PAM
		PCK1
		PDGFB
		PDK1
		PDK3
		PFKFB3
		PFKL
		PFKP
		PGAM2
		PGF
		PGK1
		PGM1
		PGM2
		PHKG1
		PIM1
		PKLR
		PKP1
		PLAC8
		PLAUR
		PLIN2
		PNRC1
		PPARGC1A
		PPFIA4
		PPP1R15A
		PPP1R3C
		PRDX5
		PRKCA
		PYGM
		RBPJ
		RORA
		RRAGD
		S100A4
		SAP30
		SCARB1
		SDC2
		SDC3
		SDC4
		SELENBP1

			<i>SERPINE1</i>
			<i>SIAH2</i>
			<i>SLC25A1</i>
			<i>SLC2A1</i>
			<i>SLC2A3</i>
			<i>SLC2A5</i>
			<i>SLC37A4</i>
			<i>SLC6A6</i>
			<i>SRPX</i>
			<i>STBD1</i>
			<i>STC1</i>
			<i>STC2</i>
			<i>SULT2B1</i>
			<i>TES</i>
			<i>TGFB3</i>
			<i>TGFB1</i>
			<i>TGM2</i>
			<i>TIPARP</i>
			<i>TKTL1</i>
			<i>TMEM45A</i>
			<i>TNFAIP3</i>
			<i>TPBG</i>
			<i>TPD52</i>
			<i>TPI1</i>
			<i>TPST2</i>
			<i>UGP2</i>
			<i>VEGFA</i>
			<i>VHL</i>
			<i>VLDLR</i>
			<i>WSB1</i>
			<i>XPNPEP1</i>
			<i>ZFP36</i>
			<i>ZNF292</i>