



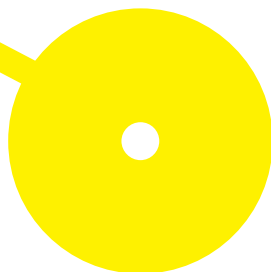
MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA – PATOLOGIA MOLECULAR

Caracterização de Neoplasias Pancreáticas Neuroendócrinas: correlação do tamanho dos telómeros com os dados moleculares e clinicopatológicos dos doentes

Ana Raquel Costa Borges

09/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



**INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO
E INOVAÇÃO EM SAÚDE**
UNIVERSIDADE DO PORTO

Caracterização de Neoplasias Pancreáticas Neuroendócrinas: correlação do tamanho dos telómeros com os dados moleculares e clinicopatológicos dos doentes

Autor

Ana Raquel Costa Borges

Orientador(es)

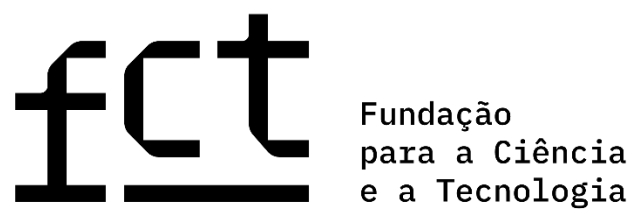
Doutor João Vinagre do Grupo de Investigação *Cancer Signalling & Metabolism* do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde

Prof. Doutora Sara Granja da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Patologia Molecular** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Menção de apoio financeiro

Dissertação realizada com o apoio de fundos nacionais pela FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto PTDC/MED-ONC/0531/2021 – *ATRX* no controlo de um programa alternativo na célula beta do pâncreas.



Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer à minha equipa de orientação, à Professora Paula Soares e ao Doutor João Vinagre, por me terem acolhido no seu grupo e me terem dado a oportunidade de trabalhar numa área que tanto aprecio. Agradeço-vos pela enorme confiança depositada, por todo o apoio e incentivo e, sobretudo, pelos conhecimentos profissionais oferecidos que levo comigo para o futuro.

Gostaria de endereçar um especial agradecimento ao Doutor Tiago Gaspar pelo acolhimento e pela incansável ajuda ao longo de todo este percurso, que já se iniciou no ano de 2022. Obrigada por toda a paciência e disponibilidade dispendidas.

Aos **Professores** que se cruzaram comigo nos anos letivos do Mestrado e a todos com quem tive a oportunidade de aprender algo ou trocar ideias e experiências. Em especial gostaria de agradecer a confiança depositada na minha proposta de dissertação à **Prof. Doutora Regina Silva** e **Prof. Doutora Sara Granja**, realçando a **Prof. Doutora Sara Granja** por ter aceite co-orientar esta dissertação. Por último, ao **Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S)**, **Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (Ipatimup)** e à **Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)** pelo precioso financiamento e por tornar este trabalho possível.

À grande família do **Ipatimup** um abraço gigante por todo o apoio dispendido durante estes dois anos. Em especial à **Raquel Lima**, **Sofia Quental**, **Diana Pinho**, **Marta Ferreira** e **Luís Cirnes** que sempre se mostraram disponíveis a ajudar e pelas dicas, apoio e *feedback* que foram dando em diversas etapas deste percurso. Às minhas amigas **Salomé Tavares**, **Luísa Fonseca**, **Lara Albergaria**, **Jéssica Lopes** e **Patrícia Domingues** que viveram comigo os melhores e piores momentos destes dois anos. Lidar com o meu feitio foi sempre desafiante, por isso um muito obrigado. Também, na mesma linha, agradeço às minhas referências de sabedoria e amizade, à **Anabela Ferro**, **Miriam Santos**, **Márcia Baixia** e **Raquel Silva**, que sempre ofereceram umas palavras de incentivo e um carinho especial. Aos restantes colegas de trabalho que se tornaram amigos, um obrigado por trazerem alegria em cada dia de trabalho.

A todos os meus amigos e amigas, em especial à **Morgana Mesquita** e **Raquel Gonçalves** por me acompanharem nesta grande aventura, desde apresentações, partilhas de apontamentos, estudo para exames até ao momento de entrega desta dissertação. Desejo-vos todo o sucesso que tanto merecem para a concretização dos vossos sonhos.

Ao meu namorado, **Tiago Simão**, por ter sido um dos maiores apoios nesta aventura. Agradeço por todos os dias me lembrar da minha força e capacidade e, por sempre, me colocar um sorriso na cara, até nos dias mais difíceis.

À minha família um agradecimento especial e com o maior carinho pelo apoio incondicional, pela paciência e pelo amor. Aos meus pais, **Sérgio Borges** e **Angelina Martins**, que sempre se sacrificaram pela minha educação, permitindo que hoje fosse possível a realização desta dissertação, e pelos seus abraços que sempre serão o meu ponto de abrigo. À minha irmã, **Sara Borges**, que aos meus olhos será sempre a minha pequenina, mas que também me ensina todos os dias a ser uma melhor versão de mim. Aos meus avós, **José Borges** e **Angelina Martins**, que partiram antes da conclusão deste trabalho, mas que foram pilares fundamentais durante este grande percurso. A vocês dedico este meu Trabalho.

Resumo

As neoplasias pancreáticas neuroendócrinas (PanNENs) são entidades raras enriquecidas em mutações nos genes envolvidos no mecanismo alternativo de alongamento de telómeros (ALT). Em 30-40% destas neoplasias está identificada a presença de mutações nos genes *ATRX* e *DAXX* que se relaciona com ALT.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a componente genética em casos ALT-positivos de PanNENs e correlacioná-la com os dados clinicopatológicos dos pacientes.

Para a caracterização anatomopatológica e molecular, realizou-se técnicas de imunohistoquímica, hibridização *in situ* específica para telómeros, *real time Polymerase Chain Reaction* (qPCR) e sequenciação por exoma. Os resultados foram estratificados de acordo com o perfil imunohistoquímico e as características clinicopatológicas.

Neste estudo, a perda de *ATRX/DAXX* associou-se positivamente ao sexo, ao tamanho do tumor e à metastização à distância; enquanto que, valores aumentados de rQT se associaram à perda de expressão destas proteínas, grau histológico e metastização. Quanto ao perfil genético, alterações com significado clínico foram reportadas e associadas às características clínicas e biológicas.

O qPCR apresenta-se como uma nova ferramenta biomarcadora no prognóstico. A caracterização do perfil genético apresenta desde já utilidade a desvendar novos alvos, mas ainda se encontra condicionado pelo número amostras da série de estudo que conseguimos caracterizar até à data.

Palavras-chave: Neoplasias pancreáticas neuroendócrinas; Alongamento alternativo dos telómeros; *real time Polymerase Chain Reaction*; Sequenciação de exoma.

Abstract

Pancreatic neuroendocrine neoplasms (PanNENs) are rare entities enriched in genetic mutations regarding genes involved in the alternative lengthening of telomeres (ALT). Mutations in the *ATRX* and *DAXX* genes have been identified in 30–40% and are a surrogate marker of ALT.

The present study aimed to evaluate the genetic component in ALT-positive cases of PanNENs and correlate it with the clinicalpathological data of the patients.

Immunohistochemistry, telomere-specific in situ hybridization, real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) and exome sequencing techniques were performed for the anatomopathological and molecular characterisation. The results were stratified according to the immunohistochemical profile and clinicalpathological characteristics.

In this study, *ATRX/DAXX* loss was positively associated with gender, tumor size, and the distant metastases; increased rQT values were associated with loss expression of these proteins, histological grade, and metastasis. Regarding the genetic profile, changes with clinical significance have been reported and associated with the clinical and biological characteristics.

The qPCR presents itself as a new biomarker tool for the prognosis. As for the genetic profile, it proved to be useful, but it should be implemented in more samples from the study series.

Keywords: Neuroendocrine pancreatic neoplasms; Alternative telomeres lengthening; real-time Polymerase Chain Reaction; Exome sequencing.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Patogênese molecular de PanNENs.....	2
1.1.1. Conseqüências epigenéticas em PanNENs.....	5
1.2. Mecanismo de manutenção de telômeros em PanNENs.....	7
1.3. Papel de ATRX e DAXX no mecanismo ALT.....	9
1.4. Implicações clínicas em PanNENs.....	10
2. Objetivos.....	13
3. Métodos.....	14
3.1. Amostra de estudo.....	14
3.2. Imunohistoquímica.....	14
3.3. Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência.....	15
3.4. Quantificação Relativa do Comprimento dos Telômeros.....	16
3.4.1. Extração de DNA.....	16
3.4.2. Real Time PCR.....	16
3.5. Sequenciação de DNA.....	18
3.6. Análise Bioinformática.....	19
3.7. Análise Estatística.....	19
4. Resultados.....	20
4.1. Características da população de estudo.....	20
4.2. Correlação do perfil imunohistoquímico com as características clinicopatológicas.....	22
4.3. Fenótipo ALT em pacientes com PanNENs.....	24
4.3.1. Heterogeneidade dos telômeros por <i>Tel-FISH</i>.....	24
4.3.2. Tamanho dos telômeros por <i>qPCR</i>.....	25
4.4. Componente molecular dos pacientes com PanNENs.....	28
4.5. Análise de Sobrevida.....	32
5. Discussão.....	35
6. Conclusão.....	44
Referências Bibliográficas.....	46
Anexos.....	I
Anexo I – Método de cálculo para a quantificação relativa dos telômeros.....	I
Anexo II – Classificação ENETS.....	II
Anexo III – Aprovação comissão de ética.....	III
Anexo IV – Licença reprodução de imagem.....	IV

Índice de Figuras

Figura 1 – Principais processos alterados na tumorigênese em PanNENs. As alterações de ativação (vermelho) dizem respeito a uma alteração no número de cópias de 6 ou mais bases; e as alterações de inativação (azul) incluem alterações no número de cópias de uma ou duas bases. Os asteriscos mostram genes que também contêm variantes classificadas como patogênicas na linhagem germinativa (21).....	3
Figura 2 – Esquema geral dos principais genes alterados em diferentes vias celulares e a sua interação com eventos epigenéticos, em PanNENs (6, 21, 30).....	7
Figura 3 – Mecanismo teórico proposto para a remodelação da cromatina pelo complexo ATRX/DAXX: ATRX liga-se à histona H3.3, na heterocromatina, através da interação do domínio ATRX-DNMT3-DNMT3L com a região N-terminal da histona H3, trimetilada em lisina 9 (H3K9me3). A proteína ATRX, em combinação com DAXX, facilita a deposição da variante de histona H3.3. A deposição da variante de histona H3.3 leva a alterações na cromatina, o que impede a formação de estruturas G4-DNA (31).....	10
Figura 4 – Condições utilizadas na técnica laboratorial qPCR: temperatura, tempos de incubação e número de ciclos utilizados.....	17
Figura 5 – Correlação da expressão de ATRX e/ou DAXX com as características clinicopatológicas. (A, B e C): correlação com o sexo do paciente; (D, E e F): correlação com o tamanho do tumor; (G, H e I): correlação com a presença ou ausência de metastização à distância. A significância estatística foi avaliada utilizando o teste Qui-quadrado (A-C, G-I) e <i>Mann-Whitney</i> (D-F). Os resultados são mostrados como mediana ± desvio interquartil, após exclusão de <i>outliers</i> (D-F). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$	23
Figura 6 – Imagens representativas do Tel-FISH: (A) do fenótipo ALT negativo e (B) ALT positivo. Em ambas as imagens, o DNA nuclear é corado com DAPI (azul), e a região teloméricas do DNA é corada com a sonda PNA específica de telômero, marcada com FITC (verde). Na imagem B, ALT positiva, denota-se uma marcação de pontos ultra-brilhantes e de tamanhos heterogêneos característicos da presença de ALT.....	24
Figura 7 – Gráficos da quantificação relativa de telômeros, estratificados pela imunohistoquímica ATRX e/ou DAXX (padrão positivo, mosaico e negativo). A: Quantificação relativa de telômeros em amostras de tecido normal; B: quantificação relativa de telômeros em tecido tumoral; C: rácio da quantificação relativa de telômeros em amostras de tecido tumoral e tecido normal adjacente. A significância estatística foi	

avaliada pelo teste de *Mann-Whitney*, após exclusão de *outliers*. Os resultados são mostrados como mediana ± desvio interquartil. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.....25

Figura 8 – Gráficos da quantificação relativa de telómeros, estratificados pela imunohistoquímica ATRX/DAXX (padrão positivo e negativo). A: Quantificação relativa de telómeros em tecido normal; B: quantificação relativa de telómeros em tecido tumoral; C: rácio da quantificação relativa de telómeros entre amostras de tecido tumoral e tecido normal adjacente. A significância estatística foi avaliada pelo teste de *Mann-Whitney*, após exclusão de *outliers*. Os resultados são mostrados como mediana ± desvio interquartil. ** p < 0.01; *** p < 0.001. 26

Figura 9 – Correlação do rácio da quantificação relativa dos telómeros tumor/tecido normal com os dados clinicopatológicos. A: Correlação com o grau histológico do tumor; B: correlação com a metastização ganglionar; C: correlação com a metastização à distância. A significância estatística foi avaliada pelo teste de *Mann-Whitney*, após exclusão de *outliers*. Os resultados são mostrados como mediana ± desvio interquartil. * p < 0,05; *** p < 0.001.....27

Figura 10 – Análise de sobrevivência de casos de PanNENs pelos dados anatomopatológicos: (A) perfil imunohistoquímico para ATRX; (B) perfil imunohistoquímico para DAXX; (C) grau histológico; e (D) comprimento dos telómeros no tecido tumoral..... 34

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Reagentes utilizados na <i>master mix</i> da técnica de qPCR e os volumes correspondentes para cada poço da microplaca, de acordo com o <i>kit Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay</i>	17
Tabela 2 – Painel personalizado de genes para a análise e classificação de variantes genéticas.....	19
Tabela 3 – Características clinicopatológicas dos pacientes diagnosticados com PanNENs. A categorização de T (ENETS) está descrita no Anexo II.....	21
Tabela 4 – Variantes genéticas com significado clínico (patogénica e provavelmente patogénica (PP)) detetadas em amostras de tecido tumoral de casos de PanNENs. A base de dados GnomAD foi utilizada como base de dados populacional de referência.	29
Tabela 5 – Correlação das características anatomopatológicas (grau histológico e presença de metastização) com os resultados obtidos nas técnicas de IHQ, Tel-FISH, qPCR (TL do tecido tumoral) e sequenciação do exoma dos PanNENs analisados.....	32
Tabela 6 – Critérios para a categorização de T, do estadiamento TNM, no sistema de classificação ENETS, em PanNETs (79).....	II

Lista de Abreviaturas

ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ALT	Alongamento alternativo dos telómeros (do inglês, <i>Alternative lengthening of telomeres</i>)
ATRX	ATRX remodelador da cromatina (do inglês, <i>ATRX Chromatin remodeler</i>)
bp	Pares de bases (do inglês, <i>base pairs</i>)
BRCA _s	<i>BRCA DNA repair associated</i>
CIN	Instabilidade cromossômica (do inglês <i>Chromosome instability</i>)
CHEK2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
CpG	<i>Cytosine phosphate-guanine</i>
CT	Comprimento de telómeros
DAXX	Proteína associada ao domínio da morte (do inglês, <i>Death domain associated protein</i>)
DEPDC5	<i>DEP Domain-containing protein 5</i>
DFS	Sobrevida livre de doença (do inglês <i>Disease-free survival</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EWSR1	<i>EWS RNA binding protein 1</i>
FFPE	<i>Formalin-fixed paraffin- embedded</i>
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (do inglês, <i>Fluorescence in situ hybridization</i>)
G	Grau histológico
HE	Hematoxilina-eosina
IC	Intervalo de confiança
IHQ	Imunohistoquímica
KMT2A	<i>Histone-lysine N-methyl transferase 2A</i>
KMT2C	<i>Lysine methyl transferase 2C</i>
MEN1	Neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (do inglês, <i>Multiple endocrine neoplasia type 1, or Menin 1</i>)
MiNEN	Neoplasia mista endócrina-não endócrina (do inglês <i>Mixed neuroendocrine-nonneuroendocrine neoplasms</i>)
MMT	Mecanismo de manutenção dos telómeros
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MUTYH	<i>MutY DNA glycosylase</i>
NECs	Carcinomas neuroendócrinos

NETs	Tumores neuroendócrinos
NF1	Neurofibromatose do tipo 1 (do inglês, <i>Neurofibromatosis type 1</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OST	Tempo de sobrevida global (do inglês <i>Overall survival time</i>)
PanNENs	Neoplasias pancreáticas neuroendócrinas (do inglês, <i>Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms</i>)
PARPi	Inibidores de poli(ADP-ribose) polimerase
PML	Leucemia promielocítica
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i>
QT	Quantificação de telômeros
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>)
rQT	Quantificação relativa de telômeros (do inglês <i>Relative telomere Quantification</i>)
SCR	Sequência de cópia única de referência (do inglês, <i>Single copy reference</i>)
SETD2	<i>SET domain containing 2</i>
SNV	Alteração de um único nucleótido (do inglês <i>Single Nucleotide Variation</i>)
SWI/SNF	<i>SWItch/sucrose non-fermentable</i>
Tel-FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência de telômeros (do inglês, <i>Telomere fluorescence in situ hybridization</i>)
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TETs	<i>Ten-eleven translocation</i>
TMN	Tumor, nódulo, metástase (do inglês, <i>Tumor, node and metastasis</i>)
TSC	Esclerose tuberosa (do inglês, <i>Tuberous sclerosis</i>)
TSC1	<i>TSC complex subunit 1</i>
TSC2	<i>TSC complex subunit 2</i>
VAF	Variação de frequência alélica
VHL	Doença de <i>von Hippel-Lindau</i>
VUS	Variante de significado incerto (do inglês, <i>Variant of unknown significance</i>)

1. Introdução

As neoplasias pancreáticas neuroendócrinas (PanNENs) são um grupo heterogêneo de neoplasias do pâncreas, que correspondem de 1 a 3% de todas as neoplasias deste órgão. Vários estudos reportam uma tendência para o aumento da sua incidência, afetando atualmente 1 em cada 100 000 indivíduos por ano; contudo, estudos *post mortem* sugerem que a incidência de PanNENs é variável e pode atingir até 10% da população (1-5).

A patogênese destes tumores não é totalmente conhecida, mas a maioria dos PanNENs têm origem em células alfa e beta das ilhotas de *Langerhans*, podendo ainda ter origem em outras populações celulares da componente endócrina do pâncreas (6). Tendo como base a origem celular destas neoplasias, estas podem ser classificadas como funcionantes, em que refletem uma capacidade de produção de hormonas (tais como insulina, glucagon, gastrina, entre outros), causando uma sintomatologia clínica secundária relacionada com uma hiperprodução hormonal (3-7). No entanto, a maioria dos PanNENs (cerca de 60 a 80%) corresponde a formas assintomáticas, onde não existe produção hormonal, sendo, por isso, designados de não funcionantes (7, 8). A ausência de um efeito clinicamente perceptível resulta numa descoberta tardia e maioritariamente associada a um estadio de doença avançada, frequentemente com presença de metástases (8).

A maioria dos PanNENs ocorre de forma esporádica na população, mas cerca de 10 a 20% destas neoplasias podem estar associadas a síndromes de predisposição hereditária, das quais se destacam a neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (MEN1), doença de von Hippel-Lindau (VHL), a neurofibromatose do tipo 1 (NF1) a esclerose tuberosa (TSC) e a doença de Cowden (8, 9).

De acordo com o sistema de classificação universal para neoplasias endócrinas, proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a classificação destas neoplasias tem por base marcadores de proliferação, usando a avaliação da imunoexpressão do marcador Ki-67 ou a contagem de células em divisão celular (índice mitótico) – por outras palavras, a determinação do grau e do índice proliferativo. Deste modo, as neoplasias bem diferenciadas são classificadas como tumores neuroendócrinos (NETs) de baixo (G1), intermédio (G2) e de alto grau (G3) de acordo com o seu índice proliferativo ou mitótico. As neoplasias pouco diferenciadas são designadas de carcinomas neuroendócrinos (NECs). Assim, os PanNENs podem ser agrupados em PanNETs e PanNECs (10, 11).

A sobrevivência aos 5 anos de indivíduos com PanNENs, após ressecção tumoral, é de 95%. No entanto, atualmente, a sobrevivência em 5 anos para indivíduos com doença metastática é de cerca de 20% (12-16). O comportamento biológico deste tipo de neoplasias é um fator importante no diagnóstico e prognóstico desta doença. Os PanNENs apresentam um comportamento bastante heterogêneo, variando de indivíduo para indivíduo, sendo que o grau e o tamanho são fatores associados ao risco de metastização (8). Esta heterogeneidade da neoplasia está ainda associada a características genéticas e epigenéticas do tumor, como será discutido posteriormente (8, 17).

1.1. Patogênese molecular de PanNENs

A patogênese molecular desta neoplasia é complexa e pode envolver uma diversa variedade de variantes genéticas e alterações epigenéticas, que poderão ser considerados como fatores de risco para a progressão e agressividade da doença (8). Atualmente, sabe-se que a componente genética de PanNENs está fortemente correlacionada ao grau de diferenciação, estado funcional e agressividade da neoplasia (8, 18).

Com o avanço das novas tecnologias de sequenciação do genoma, as alterações genéticas em PanNENs foram gradualmente descobertas e reportadas. As potenciais mutações *driver* destes tumores afetam principalmente genes supressores tumorais, e mais raramente proto-oncogenes. De acordo com o estudo seminal de *Jiao* e colegas, os eventos genéticos mais frequentes estão presentes em vias de remodelação da cromatina, em genes como *MEN1* (do inglês, *Menin 1*), no *ATRX* (do inglês, *ATRX Chromatin remodeler*) e *DAXX* (do inglês, *Death domain associated protein*), e ainda em genes que compõem a via de sinalização do mTOR (do inglês, *Mammalian target of rapamycin*) (19, 20). O estudo de *Scarpa* e colegas veio reforçar os genes identificados anteriormente, mas apresentou ainda o importante papel do mecanismo de inativação do gene *MUTYH* (do inglês, *MutY DNA glycosylase*) e outros potenciais novos mecanismos de ativação da via mTOR, incluindo variantes genéticas no gene *DEPDC5* (do inglês, *DEP Domain-containing protein 5*), alterações de fusão no gene *EWSR1* (do inglês, *EWS RNA binding protein 1*) (21). Uma revisão do estado da arte mais recente identifica que a maior taxa de mutações *driver* em PanNENs encontra-se em genes envolvidos na remodelação da cromatina (*MEN1*, *SETD2* (do inglês, *SET Domain Containing 2*) e *KMT2C* (do inglês, *Lysine methyl transferase 2C*)), em genes que controlam o comprimento dos telômeros (*ATRX* e *DAXX*), em genes relacionados com a sinalização pela via do mTOR (*TSC1* e *TSC2* (do inglês, *TSC Complex*

subunit 1 and 2, respetivamente), *PTEN* (do inglês, *Phosphatase and tensin homolog*) e *DEPDC5*) e genes envolvidos na reparação de danos no DNA (*MUTYH*, *CHEK2* (do inglês, *Checkpoint kinase 2*) e *BRCAs*(do inglês, *BRCA DNA repair associated*)) (22); de referir que cerca de 90% dos PanNENs esporádicos são encontradas mutações nos genes *MEN1*, *ATRX* e *DAXX*.

A Figura 1, resume os principais processos alterados nestas neoplasias. O *MEN1* é o principal evento genético e com mutações em aproximadamente 40% dos casos. Identificam-se ainda quatro grupos constituídos por genes relacionados com o mecanismo de manutenção alternativo de telómeros, ALT (do inglês, *Alternative lengthening of telomeres*), reparação de DNA, modificação de cromatina e ativação da via de sinalização mTOR.

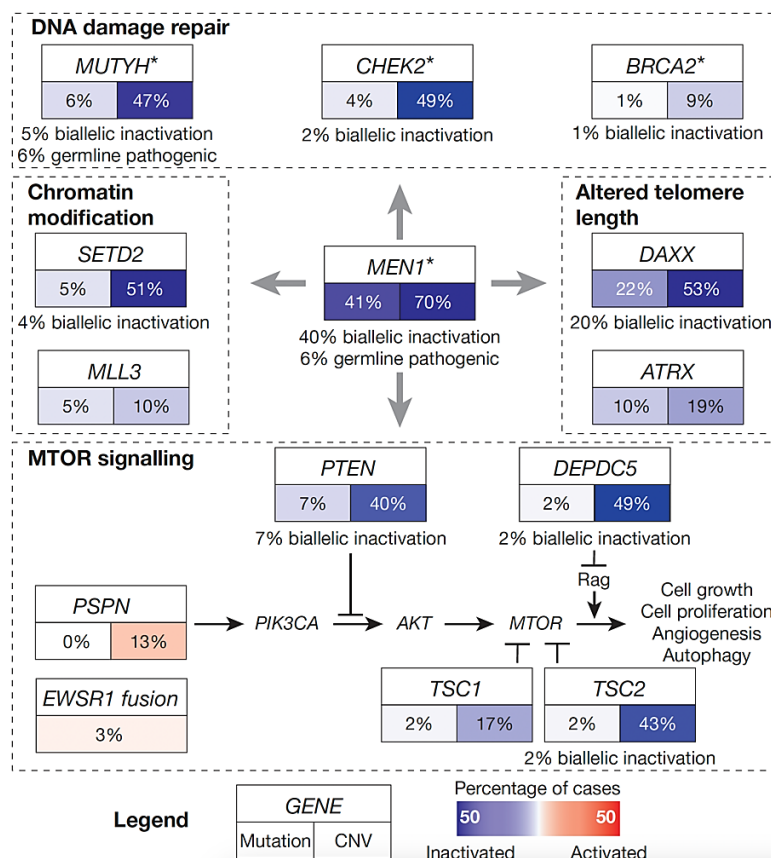


Figura 1 – Principais processos alterados na tumorigénese em PanNENs. As alterações de ativação (vermelho) dizem respeito a uma alteração no número de cópias de 6 ou mais bases; e as alterações de inativação (azul) incluem alterações no número de cópias de uma ou duas bases. Os asteriscos mostram genes que também contêm variantes classificadas como patogénicas na linhagem germinativa (21).

O gene *MEN1* localiza-se no cromossoma 11 (região 11q13) e codifica uma proteína nuclear, a menina, que desempenha inúmeras funções em diversos mecanismos. A menina atua ao

nível da remodelação da cromatina, reparação de DNA e regulação do ciclo celular – influencia a diferenciação e crescimento das células neuroendócrinas através da regulação da metilação de histonas em regiões promotoras de determinados genes (21, 22). As variantes somáticas neste gene são detetadas em 30 a 40% dos PanNENs esporádicos, resultando numa perda de função da proteína supressora tumoral e, conseqüentemente, numa proliferação descontrolada do tumor (11, 21).

O gene *ATRX* localiza-se no cromossoma X (região Xq21.1) (25). Este gene é classificado como um gene supressor tumoral e está associado a eventos de proteção contra o *stress* replicativo no DNA, desempenhando um papel importante na manutenção da estrutura e estabilidade dos cromossomas (26). Este gene codifica uma proteína de remodelação da cromatina, com um tamanho previsto de 280 kDa, da família SWI/SNF (do inglês, *SWItch/sucrose non-fermentable*). As proteínas desta família desempenham funções em inúmeros mecanismos nucleares, nomeadamente, na regulação da transcrição, reparação do DNA e recombinação mitótica. A proteína *ATRX*, em específico, é uma helicase, o que significa que atua no desenrolar da molécula de cadeia dupla de DNA durante os processos de replicação e transcrição. Além disso, *ATRX* está envolvido na regulação da expressão genética e na manutenção da heterocromatina (27). Esta proteína localiza-se em regiões repetitivas heterocromáticas, incluindo regiões teloméricas, regiões pericentroméricas, repetições de rDNA e no silenciamento de elementos retrovirais endógenos (27-30). As mutações no gene *ATRX* estão associadas a várias condições genéticas, sendo que, quando germinativas, estão comumente associadas à síndrome de deficiência intelectual da alfa-talassemia associada ao cromossoma X e a nível somático encontram-se numa diversidade de neoplasias, maioritariamente de linhagem mesenquimal, e caracterizadas pela ativação de *ALT* (27-31). Em geral, as mutações neste gene supressor tumoral podem levar a uma perda ou disfunção da proteína, resultando em alterações na estrutura da cromatina – mais especificamente, na heterocromatina – e, conseqüentemente, na regulação de outros genes fundamentais para o desenvolvimento normal das células (32).

A proteína *ATRX* interage com diversas proteínas como, por exemplo, a proteína *DAXX* no processo de remodelação da cromatina. Ambas as proteínas estão localizadas, principalmente, no núcleo celular (27-32). Apesar de o mecanismo molecular não estar totalmente elucidado, sabe-se ainda que a proteína *ATRX* está implícita na resolução de

estruturas secundárias de DNA, as estruturas G4-DNA, e na sua acumulação durante o processo de replicação aquando da perda de função desta proteína (33, 34).

O gene *DAXX* localiza-se no cromossoma 6 (região 6p21.32) e codifica uma proteína com diversas funções biológicas complexas e com importantes propriedades oncogénicas, que podem promover a iniciação, progressão e resistência à terapêutica. Esta proteína é expressa em vários tecidos humanos, sendo essencial no desenvolvimento embrionário. A proteína *DAXX* é encontrada predominantemente no núcleo e localiza-se, especificamente, em corpos intracelulares sem membrana, como os corpos nucleares da leucemia promielocítica (PML). Os corpos nucleares PML correspondem a esferas de diâmetro reduzido e estão presentes na maioria da linhagem celular linfóide e em muitos tecidos (35). Estes corpos nucleares pertencem à matriz nuclear das células humanas e desempenham diversas funções nucleares, incluindo reparação de DNA, transcrição de DNA e silenciamento epigenético (11, 35, 36). Assim, *DAXX* é uma proteína altamente conservada associada a eventos nucleares, incluindo a transcrição e regulação do ciclo celular (incluindo ainda o processo de apoptose celular). Alguns estudos evidenciaram que *DAXX* faz parte de um complexo com a histona H3.3, realçando um papel ativo no processo de remodelação da cromatina (34, 37-40). Na tumorigénese, a presença de mutações neste gene resulta na perda de função da proteína e, conseqüentemente, há alterações na deposição da histona H3.3 e na manutenção da heterocromatina, contribuindo para a instabilidade genómica e a progressão tumoral (34, 37-40).

A presença de mutações associadas aos genes *ATRX* e *DAXX* são eventos mutualmente exclusivos e ocorrem em aproximadamente 30 a 40% dos casos, estando associadas a instabilidade cromossómica (CIN) e com impacto na sobrevivência de doentes diagnosticados com PanNETs (20, 21, 23).

1.1.1. Consequências epigenéticas em PanNENs

A frequente inativação dos genes *ATRX*, *DAXX* e *MEN1* sugere um papel significativo dos eventos epigenéticos no desenvolvimento e progressão de PanNENs, nomeadamente nos processos de metilação do DNA e modificação de histonas (22).

A alteração do padrão de metilação do DNA pode levar ao silenciamento ou transcrição de genes e à instabilidade genómica, dependendo do local onde ocorrem estas alterações. No processo de tumorigénese, a hipermetilação da região promotora de genes supressores tumorais resulta na regulação negativa da expressão génica, isto é, os genes supressores

tumorais são silenciados, promovendo-se assim o crescimento tumoral. Em contrapartida, a hipometilação de todo o genoma está fortemente associada a instabilidade no DNA e a um maior risco de alterações estruturais (8, 22). Deste modo, a metilação do DNA é um processo epigenético dinâmico regulado pelas DNA metiltransferases (DNMT), que adicionam um grupo metil a citosinas de regiões promotoras ou em ilhas CpG (do inglês, *Cytosine phosphate-guanine*), e as desaminases que eliminam o grupo metilo, onde estão incluídas as dioxigenases – TETs (do inglês, *Ten-eleven translocation*) (11).

As proteínas DAXX e ATRX influenciam o processo de metilação do DNA (24). O estudo de Zhang e colegas demonstrou a capacidade da proteína DAXX se ligar especificamente a uma DNMT direcionando-a para a região promotora do gene *RASSF1A* (do inglês, *Ras association domain family member 1A*), resultando no silenciamento da expressão deste gene – este é um dos mecanismos pela qual a expressão de genes supressores tumorais pode ser silenciada em células tumorais (25). Os PanNETs com mutação germinativa do *MEN1* apresentam elevadas taxas de hipermetilação do seu promotor e de todo o genoma, mas são uma característica exclusiva de tumores associados a esta síndrome hereditária (25, 26).

Em relação à modificação e remodelação de nucleossomas, cada histona é dotada de um N-terminal flexível com locais de modificação onde podem ocorrer adições de grupos acetil, metil, fosforil ou ubiquitina, e conseqüentemente alterando a função da cromatina. Cada modificação pós-transducional das histonas pode ter diferentes funções, resultando na ativação ou inativação da expressão de inúmeros genes. Já foi demonstrado para o complexo ATRX/DAXX que este intervém na deposição da variante da histona H3.3 em regiões específicas do genoma – tais como regiões teloméricas e pericêntricas – que é fundamental na regulação epigenética de regiões repetitivas do genoma e na supressão de elementos transponíveis, contribuindo para a estabilidade genômica (27, 28). A menina interage com complexos de metiltransferases de histonas (como, por exemplo, a *KMT2A* (do inglês, *Histone-lysine N-methyltransferase 2A*) que metila a lisina 4 da histona H3, H3K4me3). Esta interação é importante na regulação da expressão de genes do ciclo celular e diferenciação celular (29). Desta forma, entende-se que a componente genética e epigenética estão fortemente correlacionadas através de diferentes vias, podendo ser útil a compreensão destas vias para estudos futuros de prognóstico e terapêutica. A Figura 2

esquematiza a correlação de diferentes vias celulares, assim como os principais genes intervenientes e algumas alterações epigenéticas em PanNENs.

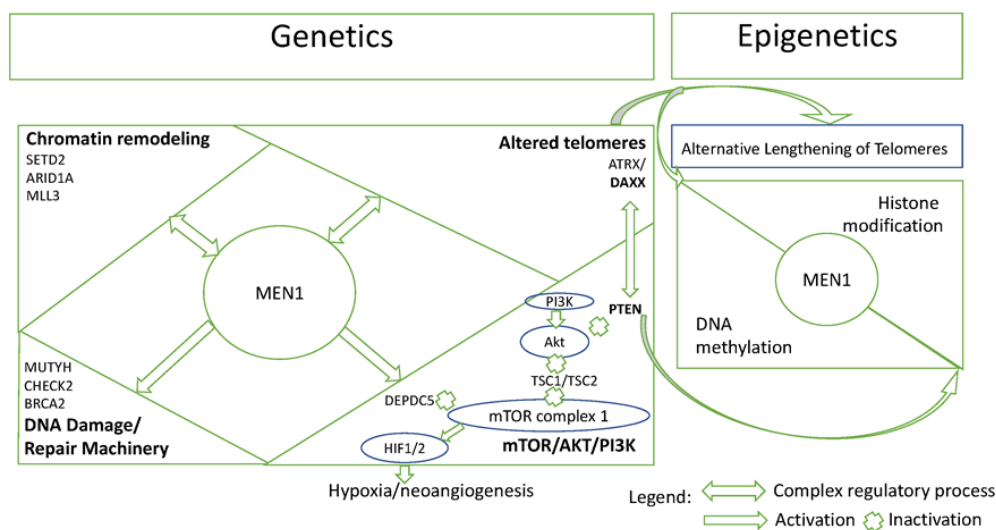


Figura 2 – Esquema geral dos principais genes alterados em diferentes vias celulares e a sua interação com eventos epigenéticos, em PanNENs (6, 21, 30).

1.2. Mecanismo de manutenção de telómeros em PanNENs

Os telómeros humanos são estruturas de DNA que protegem as extremidades dos cromossomas e compreendem uma sequência de repetição de nucleótidos TTAGGG (31, 32). Biologicamente, os telómeros estão indiretamente correlacionados com os mecanismos de apoptose e senescência celular, devido à incapacidade da enzima DNA polimerase replicar completamente estas sequências nas extremidades cromossómicas no sentido 3' – 5', durante sucessivos ciclos de replicação. Estas estruturas evitam a perda de DNA codificante, mas devido a esta incapacidade na replicação, há um encurtamento físico dos telómeros a cada divisão celular, funcionando como um relógio biológico. Assim, os telómeros estão associados ao processo biológico de envelhecimento celular (32, 33).

Um dos processos tumorigénico bem estabelecidos é a necessidade de se ultrapassar uma proliferação limitada, adquirida através de mecanismos que impeçam o encurtamento biológico dos telómeros a cada divisão celular. A regulação positiva ou reativação da enzima telomerase é um dos mecanismos mais comumente utilizados pelas células neoplásicas. Fisiologicamente, a enzima telomerase, codificada pelo gene *TERT* (do inglês, *Telomerase reverse transcriptase*) é responsável pelo alongamento dos telómeros, através da adição de sequências repetitivas a estas estruturas, e permanece inativa, normalmente, nas células somáticas adultas de modo a evitar a proliferação celular descontrolada. No entanto, esta enzima pode ser encontrada na sua forma ativa durante o desenvolvimento

embrionário e em células proliferativas como, por exemplo, células germinativas e células estaminais em tecidos (33).

A (re)ativação da telomerase é o mecanismo mais frequente para a imortalização e progressão do tumor, e pode ter como base uma série de alterações, tais como mutações e metilação do promotor da *TERT*, ampliações e rearranjos (34). Nos casos dos PanNENs, apenas mutações do promotor da *TERT* foram descritas, e em casos associados a síndromes familiares (35). Cerca de 10 a 15% das neoplasias utilizam um outro mecanismo molecular – um mecanismo independente da telomerase, designado por ALT (33, 36, 37). Este mecanismo ALT é comumente encontrado em tumores de origem mesenquimal, e em particular nos PanNENs, estando associado à CIN e à presença de mutações em genes específicos. Este mecanismo baseia-se no processo de recombinação homóloga para manter o comprimento dos telómeros, podendo coexistir com a (re)ativação da telomerase em células tumorais humanas apesar de a co-ocorrência ser rara (31). As características observadas em células humanas com ALT incluem a grande heterogeneidade no comprimento dos telómeros (que varia de indetetável a anormalmente longo nos mesmos núcleos) e a elevada taxa de trocas de material cromossômico entre cromátides irmãs nos telómeros, o que demonstra a atividade recombinacional que ocorre neste mecanismo. Adicionalmente, diversos estudos descrevem a existência de DNA telomérico extra-cromossomal, proteínas de ligação específica a complexos teloméricos e proteínas envolvidas na recombinação e replicação de DNA nos corpos nucleares de PML associados a ALT (38, 39). A ativação do mecanismo ALT compreende a existência de mutações inativantes, resultando na perda de uma ou mais moléculas repressoras, que estão presentes em células somáticas normais e células telomerase-positivas (31, 39, 40). Além disto, sabe-se que a regulação depende de interações complexas de inúmeras proteínas, fatores de transcrição, vias de sinalização e eventos epigenéticos, como foi discutido no capítulo anterior (31, 41).

Uma das questões levantadas acerca deste tema assenta nos papéis destes dois mecanismos na neoplasia. Estudos recentes evidenciaram que existem tumores que podem apresentar heterogeneidade intratumoral quanto ao comprimento dos telómeros, sugerindo que ambos os mecanismos de manutenção dos telómeros (MMT) estão ativos em diferentes células neoplásicas. Em contrapartida, outros estudos postulam que o mecanismo ALT e a (re)ativação da telomerase podem coexistir na mesma célula. Embora

os resultados sejam diferentes, não se pode considerar que os estudos são contraditórios, uma vez que permitem estipular a hipótese de ambos os acontecimentos, anteriormente discutidos, estarem presentes num tumor (41).

1.3. Papel de ATRX e DAXX no mecanismo ALT

Atualmente, sabe-se que as mutações somáticas nos genes *ATRX* e *DAXX*, assim como outras mutações associadas aos genes codificantes da histona H3.3, estão fortemente associados a neoplasias ALT positivas. Estas descobertas demonstram que estas proteínas têm um importante papel biológico na remodelação da cromatina e que a perda de expressão nuclear para *ATRX* e/ou *DAXX* funciona como um indicador da presença de mutações e da presença de ALT. Deste modo, ambas as proteínas podem ser consideradas como moléculas supressoras de ALT (42, 43).

Como mencionado anteriormente, os genes *ATRX* e *DAXX* codificam proteínas que formam um complexo para a deposição da histona H3.3 nas regiões teloméricas e pericentroméricas. Esta deposição é essencial para a manutenção da estrutura da heterocromatina e para o silenciamento da expressão de determinados genes. Assim a proteína *DAXX* atua como parceira de uma histona altamente específica que é capaz de discriminar a histona H3.3 de outras variantes de histonas, ao passo que a proteína *ATRX* está envolvida no recrutamento de *DAXX* para regiões repetitivas do DNA. A Figura 3 ilustra o mecanismo teórico proposto para a remodelação da cromatina pelo complexo *ATRX/DAXX*; a localização de *ATRX* na heterocromatina resulta da interação com diferentes proteínas.

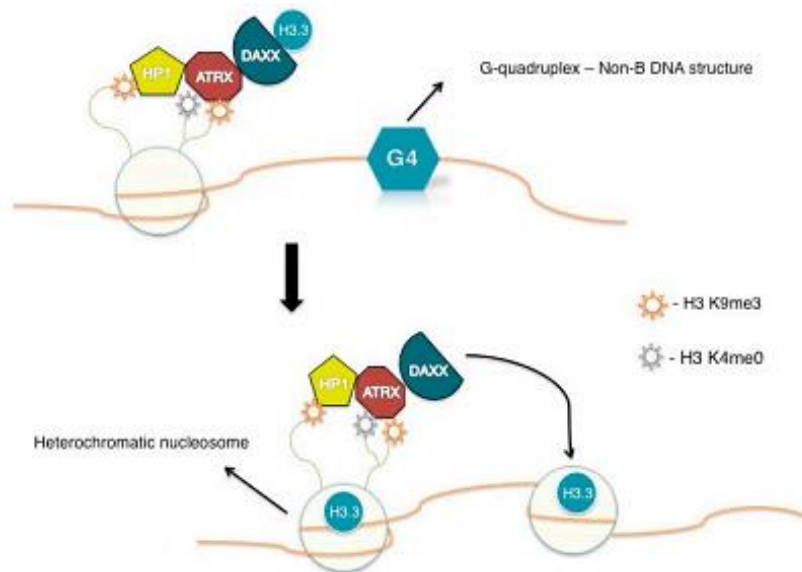


Figura 3 – Mecanismo teórico proposto para a remodelação da cromatina pelo complexo ATRX/DAXX: ATRX liga-se à histona H3.3, na heterocromatina, através da interação do domínio ATRX-DNMT3-DNMT3L com a região N-terminal da histona H3, trimetilada em lisina 9 (H3K9me3). A proteína ATRX, em combinação com DAXX, facilita a deposição da variante de histona H3.3. A deposição da variante de histona H3.3 leva a alterações na cromatina, o que impede a formação de estruturas G4-DNA (31).

Na Figura 3 é possível observar que a deposição da histona H3.3 leva ao impedimento da formação de estruturas G4-DNA e, conseqüentemente, permite a manutenção da conformação do DNA. As estruturas G4-DNA são estruturas secundárias de DNA resultantes da presença de zonas repetitivas com uma composição de resíduos de guanina e citosina, nas regiões teloméricas. Estas estruturas estão associadas à formação de obstáculos em diversos eventos nucleares, nomeadamente na replicação do DNA. Estudos recentes sugerem que ATRX não tem um papel direto na eliminação destas estruturas, no entanto esta proteína intervém diretamente no processo de deposição da variante H3.3. Em contrapartida, a perda de função de ATRX está associada a um aumento da quantidade de estruturas G4-DNA e, conseqüentemente, a *stress* replicativo na célula humana e que dão início aos processos de reparação recombinogénicos do DNA levando à iniciação do ALT. Deste modo, pode-se inferir que a presença destas estruturas nas regiões teloméricas favorecem a iniciação do mecanismo ALT e, conseqüentemente, a CIN nas células humanas tumorais (42, 43).

1.4. Implicações clínicas em PanNENs

No presente, não existe conhecimento suficiente para orientar a escolha e seleção de terapias dirigidas no tratamento de PanNENs com base nas alterações genómicas definidas. Apesar de já existirem alvos putativos como a ativação da via do mTOR e

inibidores aprovados para esta via, tais como o *Everolimus* (44). A heterogeneidade inerente a este tipo de neoplasia é um desafio significativo no momento da seleção e delineamento de uma terapia (18), no entanto, já estão descritas associações ao prognóstico em função do perfil de mutações das neoplasias.

Nos estudos de *Jiao* e colegas, as mutações nos genes *ATRX* e *DAXX* foram identificadas nos doentes com PanNETs que tinham sobrevidas prolongadas; de se referir, que o subgrupo de doentes selecionados neste estudo incluía exclusivamente casos de doença avançada (20). Em contrapartida, no estudo de *Marioni* e colegas, foi demonstrado que a mutação de *ATRX* ou *DAXX* estava correlacionada com um pior prognóstico e com menor tempo de sobrevida (45). Os achados, contraditórios, destes estudos podem ser justificados pelo estágio clínico do tumor da população usada no último estudo. Isto significa que o valor de prognóstico da perda das proteínas *ATRX* ou *DAXX* depende do estágio da doença, pelo que em neoplasias com doença localizada (não metastáticas) está associada a uma menor sobrevida, enquanto que a perda em tumores metastáticos associa-se sobrevidas maiores (20, 45). Estes acontecimentos sugerem que a perda de expressão destas proteínas é um evento tardio na tumorigénese, mas a perda de expressão proteica ocorre antes do desenvolvimento da metastização (11).

Na última década, muitos estudos foram publicados abordando a prevalência do fenótipo ALT em diversos subtipos de neoplasias humanas. De facto, estudos recentes alertam para a importância do conhecimento da patogénese e classificação de diferentes subtipos de PanNENs (22). Este alerta vai de encontro ao grande objetivo da medicina personalizada, ao facto de identificar uma alteração alvo num dado paciente que permita combinar um tratamento com uma alta taxa de eficácia e segurança para cada paciente. O ALT é um alvo extremamente apetecível como marcador dado que não se encontra em células normais (42, 43). Neste momento ainda não existe uma terapêutica visando o ALT como alvo, mas começamos a possuir várias ferramentas para identificar este.

Para determinar a ativação do mecanismo ALT em células humanas, muitas técnicas laboratoriais são utilizadas, de forma isolada ou combinadas. A implementação da avaliação da presença do fenótipo ALT e da expressão das proteínas *ATRX* e *DAXX* como ferramentas de rotina de prognóstico e decisão terapêutica tornou-se uma realidade através da técnica imunohistoquímica (IHQ) e pela hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) específica para telómeros (39, 46, 47). A presença de mutações nos genes *ATRX* e

DAXX pode ser verificada através da técnica de IHQ, na qual ausência de marcação nuclear é um indicador indireto da presença destas. De acordo com a extensão da marcação nuclear em células tumorais, apenas os casos com expressão de marcação nuclear para *DAXX* e *ATRX* são consideradas amostras positivas (31). A presença do fenótipo ALT é classicamente detetada pela técnica de FISH específica para telómeros, a qual usa uma sonda complementar (oligómero PNA – do inglês, *Peptide nucleic acid*) à sequência telomérica, acoplada a um fluoróforo, o que permite visualizar a heterogeneidade das dimensões dos telómeros nos núcleos das células tumorais com recurso a microscopia de fluorescência: a presença de pontos ultra-brilhantes correspondentes aos telómeros com tamanhos diferentes e desequilibrados é uma imagem característica (48).

Apesar de não ser utilizado como biomarcador de prognóstico em pacientes diagnosticados com PanNENs, a técnica qPCR (do inglês, *real time Polymerase Chain*) apresenta algumas vantagens, nomeadamente ao nível económico e de duração. De facto, no estudo preliminar para esta dissertação, inferiu-se a possibilidade de implementação desta técnica de qPCR tendo tido resultados preliminares satisfatórios. Com o avanço de novas tecnologias de sequenciação, será possível ir mais longe no estudo de PanNENs através da análise de todo o genoma e de alterações epigenéticas, que já demonstraram ser eventos importantes na patogénese de PanNENs, e que esperamos no futuro serem a base para o desenvolvimento de novas ferramentas para um ataque personalizado a estes alvos.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização e avaliação da componente genética em casos ALT positivos de PanNENs, e a sua correlação com os dados anatomopatológicos e as características clínicas dos pacientes. Deste modo, pretendeu-se realizar a caracterização do perfil de expressão das proteínas ATRX e DAXX, presença de ALT e a sequenciação do exoma para os referidos casos. Ainda teve como objetivo identificar e classificar variantes genéticas em diversos genes, que intervêm no processo de patogenicidade deste tipo de tumores e a identificação de mutações acionáveis para uma terapêutica específica.

3. Métodos

3.1. Amostra de estudo

Este estudo retrospectivo engloba uma série de 156 amostras de PanNENs diagnosticadas entre 1985 e 2019. As respetivas amostras foram disponibilizadas pelo Hospital *Acibadem Internacional*, Istambul, Turquia; e três centros hospitalares nacionais: Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, Centro Hospitalar Universitário do Porto e Centro Hospitalar Universitário São João. Os dados clinicopatológicos dos utentes foram obtidos através dos relatórios de anatomia patológica, sendo considerada o máximo de informação disponível como sexo do indivíduo, idade no momento de diagnóstico, localização e tamanho do tumor, estadiamento clínico, grau histológico, características genéticas e moleculares, *follow-up*, funcionalidade tumoral, estadiamento TMN e outros quando relevantes.

Os casos classificados como G3 antes de 2019 foram revistos por um patologista experiente no diagnóstico de PanNENs com o intuito de conferir o diagnóstico e a classificação de acordo com a classificação da OMS de 2019. Os PanNETs (G1 a G3) foram incluídos no estudo. No entanto, tumores mistos com adenocarcinoma ductal pancreático, componente pavimentoso ou acinar – neoplasia mista endócrina–não neuroendócrina (MiNEN) sob a classificação mais recente da OMS – foram excluídos. Em pacientes com múltiplos tumores, o tumor de maior tamanho foi selecionado e avaliado.

Todas as amostras de tumor haviam sido previamente fixadas em formol e incluídas em parafina (FFPE – do inglês, *Formalin-fixed paraffin embedded*). Os blocos de tecido pancreático foram utilizados para a realização de cortes histológicos para coloração hematoxilina–eosina (HE), extração de DNA, IHQ e FISH. A lâmina de HE foi observada e utilizada para a realização da macrodisseção da amostra, excluindo algumas áreas, como, por exemplo, áreas necróticas e hemorrágicas.

3.2. Imunohistoquímica

Os ensaios imunohistoquímicos foram realizados com os anticorpos específicos para ATRX e DAXX e em amostras de FFPE com 4 µm de espessura. As amostras foram desparafinadas e reidratadas, de acordo com o protocolo padrão. Posteriormente, foi realizada a recuperação antigénica por calor, seguida de um arrefecimento à temperatura ambiente, usando o tampão citrato 1x (pH 6,0) (*Citrate Buffer 10x*, AP-9003-500, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Através da utilização do *Ultravision Hydrogen Peroxide*

Block (TA-125-H202Q, Thermo Fisher Scientific) e do *Ultravision Protein Block* (TA-125-PBQ, Thermo Fisher Scientific) procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena e de outras proteínas inespecíficas. Os anticorpos primários anti-ATRX (1:350, HPA001906 *rabbit polyclonal*, Sigma-Aldrich, Alemanha) e anti-DAXX (1:150, HPA008736 *rabbit polyclonal*, Sigma-Aldrich, Alemanha) foram previamente diluídos antes de utilizados. O processo de marcação dos anticorpos foi feito recorrendo ao kit de polímero *Primary Antibody* Quanto (TL-125-QPB, Thermo Fisher Scientific) durante 10 minutos, seguido pelo polímero *HRP* Quanto (TL-125-QPH, Thermo Fisher Scientific) e a marcação final com o DAB Quanto (TA-125-QHDX, Thermo Fisher Scientific). As lâminas foram no final contrastadas com hematoxilina de Gill. Após desidratação, foram montadas em meio de montagem.

No final, os resultados foram interpretados por um patologista experiente. De acordo com a extensão da marcação nuclear em células tumorais, os casos foram considerados para ambas as proteínas como: negativos (<10%) na ausência de marcação nuclear para as respetivas proteínas; positivos (>80%) ou positivos exibindo um padrão de mosaico nuclear (10–80%), na presença de marcação nuclear nas células tumorais. As áreas necróticas tumorais foram excluídas da avaliação imunohistoquímica.

3.3. Hibridização *in situ* por Fluorescência

O ensaio hibridização *in situ* por fluorescência para telómeros (Tel-FISH) foi realizado nas amostras negativas para ATRX e/ou DAXX, em cortes histológicos com 10 µm de espessura. Para esta metodologia, foram utilizados quatro cortes de amostras FFPE, que foram desparafinados e reidratados de acordo com o protocolo padrão.

Os ensaios Tel-FISH consistiram numa lavagem prévia para a permeabilização nuclear – com 1% Tween – e na recuperação antigénica com um tampão citrato a 1x (pH 6,0) (Tampão Citrato 10x, AP-9003-500, Thermo Fisher Scientific). As lâminas foram desidratadas e preparadas para a adição de uma sonda específica, onde foram incubadas numa câmara escura humidificada. Nesta situação, utilizou-se uma sonda complementar a uma sequência telomérica, acoplada a um fluoróforo, permitindo visualizar a heterogeneidade das dimensões dos telómeros nos núcleos de células tumorais. Após uma série de lavagens com PBST (0,1% Tween 20) (pH 7,2–7,4), as lâminas foram incubadas com DAPI (1:1000, em PBS) e, por fim, sofreram uma desidratação gradual e a montagem com o meio *VECTASHIELD Hardset Antifade Mounting Medium* (sem DAPI) (Vector Laboratories,

Estados Unidos). Posteriormente, foi realizada a captura de imagens ao microscópio de fluorescência e a respetiva avaliação das imagens obtidas.

A visualização das lâminas Tel-FISH foi realizada num microscópio *Zeiss Axio Imager Z1* (Carl Zeiss, Alemanha), equipado com *Axiocam MR ver3.0* (Carl Zeiss), uma objetiva *Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC*, uma lâmpada *X-cite 120Q* com a íris posicionado na quarta posição e ainda o *software Axiovision 4.9* (Carl Zeiss). As imagens obtidas das lâminas foram também fotografadas e guardadas.

As amostras de PanENs foram classificadas como ALT positivas quando os critérios, previamente estabelecidos, eram cumpridos: (1) presença de sinais FISH de telómeros em focos intranucleares (foi estabelecido que a intensidade total do sinal por foco deve ser 10 vezes superior que a intensidade média do sinal para células não neoplásicas individuais na mesma amostra); e (2) $\geq 1\%$ de células neoplásicas exibem focos de DNA telomérico associados a ALT. Deste modo, todas as amostras que não apresentassem focos teloméricos associados a ALT foram consideradas negativas, sendo que pelo menos 500 células foram avaliadas.

3.4. Quantificação Relativa do Comprimento dos Telómeros

3.4.1. Extração de DNA

Previamente, foi realizada a extração de DNA de todos os casos de PanENs, em cortes histológicos com 10 μm de espessura, com tecido tumoral e tecido normal adjacente disponível, com o kit *GRS Genomic DNA BoradRange (GRiSP, Portugal)*, e de acordo com o fabricante. Todas as amostras haviam sido previamente delimitadas nos cortes histológicos de HE, por um patologista experiente. O tecido normal consistiu em tecido normal pancreático, evitando alterações major do componente exócrino do pâncreas. Foram excluídas áreas de necrose e/ou hemorragia, tecidos linfóides, tecidos gastrointestinais e áreas delimitadas com tinta-da-china. Quando não houvesse presença de tecido normal, o tecido tumoral era extraído isoladamente. O DNA foi quantificado no espectrofotómetro *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific).

3.4.2. Real Time PCR

A técnica qPCR foi realizada no sistema *QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR System* (ThermoFisher Scientific). Para a técnica qPCR, foram utilizadas duas amostras distintas de

cada caso (Normal e Tumor). Da série de estudo, apenas foram avaliadas 142 amostras parafinadas de 156 PanNENs.

A medição direta do comprimento absoluto dos telómeros (CT) foi realizada com o *kit Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay* (ScienCell Research Laboratories, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante. Este *kit* contempla dois conjuntos de *primers*: um conjunto de *primers* de telómeros que reconhece e amplifica sequências teloméricas e um conjunto de *primers* de cópia única de referência (SCR) que reconhece e amplifica uma região não telomérica, com um tamanho de 100 bp, no cromossoma 17 humano, e que serve de referência para a normalização dos dados; é ainda incluída, uma amostra de DNA genómico de referência com um comprimento de telómero conhecido (708 ± 52 kb por célula diploide), que serve como referência para o cálculo do comprimento dos telómeros das amostras em estudo.

A Tabela 1 sintetiza os reagentes utilizados e o volume utilizado na preparação das duas *master mixes*, uma para cada um dos conjuntos de *primers* do kit. Por microplaca, foram incluídos o controlo negativo (branco) e a amostra de DNA genómico de referência e as amostras em estudo, que foram realizadas em duplicado para cada conjunto de *primers*. As condições utilizadas na técnica laboratorial estão representadas na Tabela 1 e na Figura 4.

Tabela 1 – Reagentes utilizados na *master mix* da técnica de qPCR e os volumes correspondentes para cada poço da microplaca, de acordo com o *kit Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay*.

Componentes da <i>master mix</i>	Volume (μ L)
DNA genómico de referência ou DNA genómico da amostra em estudo	1 μ L
Primer de telómeros ou SCR	2 μ L
<i>qPCR master mix (FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Cat #06402712001))</i>	10 μ L
Água	7 μ L
Volume total	20 μL

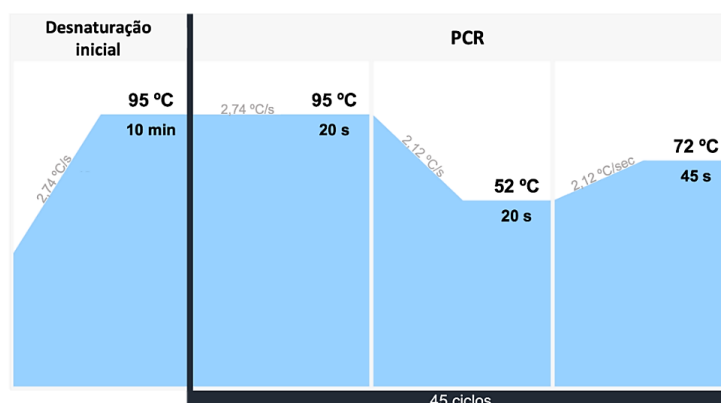


Figura 4 – Condições utilizadas na técnica laboratorial qPCR: temperatura, tempos de incubação e número de ciclos utilizados.

O sistema QuantStudio 5 mede os sinais de fluorescência no final de cada ciclo de amplificação e interpreta automaticamente os respetivos dados, em comparação com a amostra de referência, de modo a fornecer o comprimento médio dos telómeros de cada amostra em estudo. Os cálculos efetuados para a apresentação e análise da quantificação relativa dos telómeros (rQT) são fornecidos pelos fabricantes do respetivo *kit* de qPCR e estão disponíveis para consulta no Anexo I. A rQT diz respeito ao comprimento relativo de telómeros na amostra alvo e a quantificação absoluta de telómeros corresponde ao comprimento total de telómeros da amostra alvo por célula diploide.

3.5. Sequenciação de DNA

Para a sequenciação de DNA foram selecionadas amostras caracterizadas pela presença do fenótipo ALT – validado pelas técnicas de IHQ e Tel-FISH – e, posteriormente, foram preparadas diluições com uma concentração final de 800 ng. As diluições foram realizadas tendo em conta as quantificações realizadas após a extração de DNA.

A sequenciação por exoma foi realizada por um laboratório externo de sequenciação (Novogene Genomics, Reino Unido). De uma forma geral, o DNA genómico foi fragmentado aleatoriamente em fragmentos curtos com um tamanho de 180 a 280bp; e as extremidades destes fragmentos foram alteradas para a adição de uma cauda poli-A e, posteriormente, a ligação de adaptadores *Illumina*. O conjunto dos fragmentos com os adaptadores foram amplificados por PCR e posteriormente purificados. A hibridização das bibliotecas ocorreu num tampão com sondas marcadas com biotina. Posteriormente, foram utilizadas esferas magnéticas com estreptavidina, que permitiram a captura dos exões dos genes, e subsequentemente os fragmentos não hibridados foram lavados e as sondas não utilizadas digeridas, para evitar ligações inespecíficas nas bibliotecas. Por fim, as bibliotecas capturadas foram enriquecidas através da amplificação por PCR.

Para garantir a confiabilidade dos dados, um controlo de qualidade foi realizado em cada etapa do procedimento. Como última etapa do procedimento, as bibliotecas foram quantificadas por dois métodos distintos – *Qubit* e qPCR. As bibliotecas quantificadas foram finalmente sequenciadas na plataforma *Illumina*, de acordo com a concentração efetiva da biblioteca e a quantidade de dados necessária.

3.6. Análise Bioinformática

O processamento bioinformático dos ficheiros obtidos da sequenciação de DNA foi realizado por um profissional experiente no serviço de Bioinformática do i3S. Da análise bioinformática resultaram os ficheiros, para cada amostra sequenciada, com as variantes filtradas e selecionadas. Para a análise e classificação de variantes foi selecionado um painel personalizado de genes, tal como está ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Painel personalizado de genes para a análise e classificação de variantes genéticas.

PRINCIPAIS GENES		OUTROS GENES
<i>ATRX</i>	<i>SETD2 (EHMT1; EHMT2)</i>	<i>AKT1; AKT2; AKT3</i>
<i>DAXX</i>	<i>MEN1</i>	<i>MTOR</i>
<i>TP53</i>	<i>KMT2C (ou MLL3)</i>	<i>RRAG</i>
<i>MUTYH (MLH1)</i>	<i>PTEN (TNS1; TNS3)</i>	<i>EWSR1</i>
<i>CHEK2</i>	<i>DEPDC5</i>	<i>TSC1 e TSC2</i>
<i>BRCA1</i>	<i>PSPN (ARTN; NRTN; GDNF)</i>	<i>SMARCAL1 (CDH5; CDH4)</i>
<i>BRCA2</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PPM1D (PPM1E; PPM1F)</i>

A análise e classificação das variantes genéticas baseou-se na frequência populacional da variante (na base de dados *gnomAD*), tipo de mutação, mecanismo funcional e em outras bases de dados como a *ClinVar*, *Franklin* e *OncKB*.

3.7. Análise Estatística

Para a gestão e análise dos resultados recolhidos e obtidos, foi utilizado o programa *Microsoft Excel* (Microsoft, Estados Unidos), *Prism 9* (Graphpad, Estados Unidos) para *macOS Version 9.1.1* e *SPSS Statistics Versão 29.0* (IBM, Estados Unidos).

Foram utilizados o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, o teste de Qui-quadrado e a correlação de *Pearson* para o estudo estatístico de amostras independentes. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para um valor de $p = 0,05$, com um intervalo de confiança (IC) de 95%. Além disto, os resultados transferidos do sistema automatizado *QuantStudio 5* foram analisados no programa *Microsoft Excel*, tendo especial atenção aos valores de desvio padrão obtidos. Para valores de desvio padrão muito elevados (superiores a 2,0), as amostras foram repetidas novamente, em duplicado ou triplicado.

4. Resultados

4.1. Características da população de estudo

As características clínicas e patológicas dos 156 casos de PanNENs diagnosticados da população em estudo estão registadas na Tabela 3. Nem todos os casos do estudo tinham disponível toda a informação necessária, pelo que estes casos estão omissos dos resultados apresentados.

No presente estudo houve um predomínio de indivíduos do sexo feminino, com 86 mulheres (55,1%) e 70 homens (44,9%). A idade ao diagnóstico variou entre os 13 e 81 anos, sendo que a mediana de idades foi de 56 anos (a média foi igual a 53 anos); e 123 PanNENs (78,8%) foram classificados clinicamente como não funcionantes. Relativamente à localização do tumor, 20,5% estavam localizados no corpo do pâncreas, 34,8% na cauda e 39,4% na cabeça. Quanto ao tamanho do tumor verificou-se que 36%, de 132 casos com informação disponível, apresentavam um tamanho inferior a 2 cm, 36,7% um tamanho entre os 2 a 4 cm e 27,3% um tamanho superior a 4 cm (o valor mediano corresponde a 2,45 cm e os tamanhos estavam entre o intervalo [0,2-18,0] cm).

De acordo com a classificação da OMS de 2022, 3,9% dos casos corresponderam a PanNECs e 71,8% dos casos de PanNETs pertenciam ao grau histológico 1, 22,4% ao grau 2 e 3,9% grau 3. Com base no estadiamento ENETS, os casos de PanNENs apresentavam os seguintes estadios de T: 53 (35,6%) T1, 50 (33,6%) T2, 42 (28,2%) T3 e 4 (2,7%) T4.

Em relação à presença de metastização ganglionar e metastização à distância, em 35 casos (22,4%) havia evidência de metastização ganglionar regional e 16 casos (10,3%) tinham metastização à distância. Para a metastização ganglionar (Tabela 3), foi avaliada a ausência de metástases (N0) e a presença de metástases em gânglios linfáticos regionais (N1). Em relação à metastização à distância (Tabela 3), M0 corresponde à ausência de metástases e M1 à presença de metástases noutros órgãos. Para os casos que não foi possível avaliar a metastização ganglionar ou à distância foi designado de Nx e Mx, respetivamente.

As informações de *follow-up* estavam disponíveis apenas para 111 pacientes, o que corresponde a uma percentagem de 71%. As informações disponibilizadas correspondem a dados recolhidos entre um valor médio de 82 meses, sendo o intervalo de meses de 0 a 271 (Tabela 3).

Tabela 3 – Características clinicopatológicas dos pacientes diagnosticados com PanNENs. A categorização de T (ENETS) está descrita no Anexo II.

CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS	Nº DE CASOS (%)
Sexo (n = 156)	
Masculino	70 (44.9)
Feminino	86 (55.1)
Idade (anos) (n = 156)	
≤ 50	65 (41.7)
> 50	91 (58.3)
Tumores clinicamente funcionantes (n = 156)	
Sim	33 (21.2)
Não	123 (78.8)
Localização do tumor (n = 132) (Omissos = 24)	
Cabeça	52 (39.4)
Corpo	27 (20.5)
Cauda	46 (34.8)
Múltiplas localizações	7 (5.3)
Tamanho do tumor (n = 150) (Omissos = 6)	
< 2.0 cm	54 (36.0)
2.0 a 4.0 cm	55 (36.7)
> 4.0 cm	41 (27.3)
Grau (WHO 2022) (n = 156)	
PanNET G1	112 (71.8)
PanNET G2	35 (22.4)
PanNET G3	6 (3.9)
PanNEC	3 (1.9)
Categoria T (ENETS) (n = 151) (Omissos = 5)	
T1	53 (35.6)
T2	50 (33.6)
T3	42 (28.2)
T4	4 (2.7)
Metastização Ganglionar Regional (n = 156)	
N0/Nx	121 (77.6)
N1	35 (22.4)
Metastização à Distância (n = 156)	
M0/Mx	140 (89.7)
M1	16 (10.3)
Follow-up (n = 156)	
Vivo sem doença	64 (41.0)
Vivo com doença	16 (10.3)
Vivo com <i>follow-up</i> desconhecido	5 (3.2)
Morto por doença	8 (5.1)
Morto por outras causas	8 (5.1)
Morto por causa desconhecida ou perdida	10 (6.4)
Sem qualquer informação	45 (28.8)

Duração do <i>follow-up</i> (n = 156)	Nº de meses (intervalo)
Tempo total de <i>follow-up</i> , média e mediana	82 e 72 (0 – 271)
Tempo de sobrevida global (OST), média e mediana	85 e 72 (0 – 271)

4.2. Correlação do perfil imunohistoquímico com as características clinicopatológicas

A avaliação imunohistoquímica para as proteínas ATRX e DAXX foi realizada em 152 e 151 lâminas de PanNENs, respetivamente. Como mencionado no capítulo 3, a interpretação dos resultados, para as proteínas ATRX e DAXX, foi a seguinte: perfil IHQ negativo (<10%) na ausência de marcação nuclear para as respetivas proteínas; perfil IHQ positivo (>80%) ou perfil IHQ mosaico (10–80%), na presença de marcação nuclear nas células tumorais.

A percentagem de casos com perfil IHQ negativo – ou seja, casos com perda de expressão proteica, com provável mutação inativante no gene – foi maior em DAXX do que ATRX (14% vs. 6%). Em relação à expressão proteica de ATRX, 143 (91%) casos foram positivos, sendo que 56 dessas lâminas apresentaram um padrão de mosaico nuclear. Quanto à expressão de DAXX, 129 (83%) casos foram avaliados como perfil IHQ positivo, dos quais 59 exibiram um padrão de mosaicismo. Assim, as percentagens de mosaicismo foram muito semelhantes entre as duas proteínas (36% para ATRX e 38% para DAXX).

Para se avaliar o valor preditivo da perda de expressão destas proteínas procedeu-se a uma análise comparativa entre a perda de ATRX e/ou DAXX (em separado para cada proteína e em conjunto para a perda de uma e/ou outra) com as características clinicopatológicas. Os parâmetros considerados para análise estatística foram o sexo do paciente, a idade ao diagnóstico, o grau histológico, a localização do tumor, a multiplicidade do tumor, o tamanho do tumor e o estadiamento TNM.

Aquando da análise de comparação com as características clinicopatológicas, o perfil IHQ de ATRX e/ou DAXX mostrou significância estatística com o sexo do paciente, tamanho do tumor e o estadio M (Figura 5). A distinção de lâminas com perfil IHQ positivo e perfil IHQ mosaico não revelou qualquer informação adicional, pelo que os resultados do perfil IHQ foram subsequentemente estratificados em dois grupos distintos: ATRX/DAXX positivo (incluindo o padrão de mosaico) e ATRX/DAXX negativo.

Em relação à perda de expressão de ATRX, não se verificou qualquer associação com o sexo do paciente (p = 1,000; IC de 95%) (Fig. 5A). No entanto, a perda de DAXX foi significativamente mais associada ao sexo masculino, na qual 24,2% do sexo masculino e

7,1% do sexo feminino têm perda de DAXX ($p = 0,006$; IC de 95%). Esta correlação também foi observada na perda de ATRX/DAXX ($p = 0,050$; IC de 95%).

Relativamente ao tamanho do tumor, a perda de DAXX e de ATRX/DAXX mostrou associação estatisticamente significativa com os tumores de maiores dimensões ($p = 0,003$ e $p = 0,012$, respetivamente; IC de 95%) (Fig. 5E e 5F). Por outras palavras, PanNENs com perda de expressão de DAXX foram significativamente os a tumores com maiores dimensões – em valores medianos, lâminas com expressão negativa apresentavam um tamanho de 5 cm, enquanto que as com expressão positiva um de 2,25 cm. Em contrapartida, a expressão de ATRX perdeu significância para o tamanho do tumor:

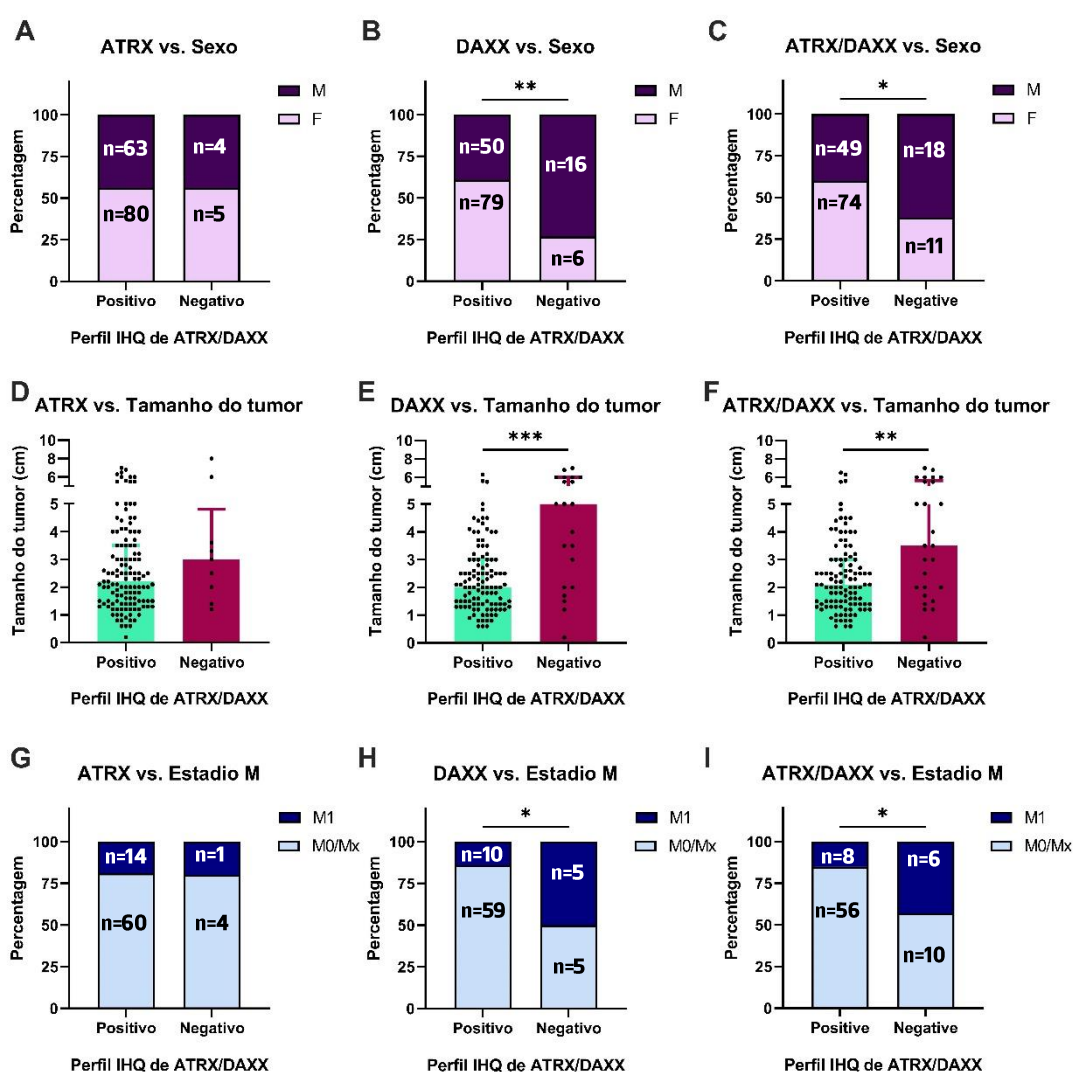


Figura 5 – Correlação da expressão de ATRX e/ou DAXX com as características clinicopatológicas. (A, B e C): correlação com o sexo do paciente; (D, E e F): correlação com o tamanho do tumor; (G, H e I): correlação com a presença ou ausência de metastização à distância. A significância estatística foi avaliada utilizando o teste Qui-quadrado (A-C, G-I) e *Mann-Whitney* (D-F). Os resultados são mostrados como mediana \pm desvio interquartil, após exclusão de *outliers* (D-F). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

os positivos apresentaram uma média de 3,18 cm e os negativos de 3,44 cm (valores medianos iguais a 2,4 cm e 3,0 cm, respectivamente) ($p = 0,502$; IC de 95%) (Fig. 5D).

A perda de ATRX e/ou DAXX está mais associada a casos sem evidência de metastização à distância (estádio M0/Mx) ($p = 0,029$; IC de 95%). No entanto, 6 (42,9%) casos com metastização têm perda de ATRX/DAXX (Fig. 5I). Ao analisar individualmente a expressão de cada uma das proteínas, verificou-se que a expressão de ATRX não apresenta significância estatística, mas a perda de DAXX demonstrou diferenças significativas ($p = 0,952$ e $p = 0,017$, respectivamente; IC de 95%). Especificamente, 5/10 (50%) casos com metastização tinham perda de DAXX, enquanto 10 (14,1%) casos de DAXX positivo tinham metastização à distância (Fig. 5H).

Em relação aos restantes fatores de prognóstico, não foram encontradas associações com a perda de expressão de ATRX, de DAXX ou ATRX/DAXX. A Figura 5 diz respeito aos gráficos ilustrativos onde se verificou uma significância estatística entre o valor de prognóstico de ATRX/DAXX e alguns fatores de prognóstico.

4.3. Fenótipo ALT em pacientes com PanNENs

4.3.1. Heterogeneidade dos telómeros por *Tel-FISH*

A técnica de Tel-FISH foi realizada e avaliada em 22 casos de PanNENs com um perfil IHQ negativo para ATRX e/ou DAXX. Cerca de 17 (77,3%) de 22 lâminas foram classificadas como amostras positivas para ALT. Por outras palavras, 17 amostras cumpriram um ou os dois critérios definidos para amostras ALT positivas, como foi mencionado no Capítulo 3.3: (a) presença de sinais FISH de telómeros em focos intranucleares e (b) $\geq 1\%$ de células neoplásicas exibem focos de DNA telomérico associados a ALT.

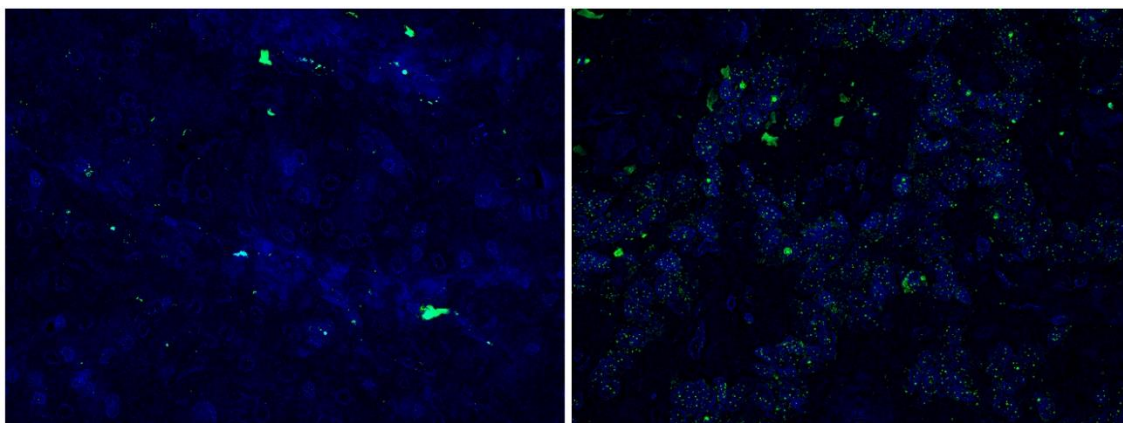


Figura 6 – Imagens representativas do Tel-FISH: (A) do fenótipo ALT negativo e (B) ALT positivo. Em ambas as imagens, o DNA nuclear é corado com DAPI (azul), e a região telomérica do DNA é corada com a sonda PNA específica de telómero,

marcada com FITC (verde). Na imagem B, ALT positiva, denota-se uma marcação de pontos ultra-brilhantes e de tamanhos heterogêneos característicos da presença de ALT.

4.3.2. Tamanho dos telómeros por qPCR

A determinação da rQT foi determinada em 142 amostras com tecido tumoral. No entanto, o rácio da quantificação de tumor/tecido normal apenas foi realizada em 133 amostras (94%), uma vez que apenas estas amostras tinham disponível tecido normal adjacente.

De forma a correlacionar os resultados da rQT com outras técnicas realizadas, os mesmos foram estratificados de acordo com os resultados imunohistoquímicos para ATRX e/ou DAXX e estão representados nas Figuras 7 e 8.

De acordo com a quantificação de telómeros (QT) nos tecidos normais, os casos com perfil IHQ positivo apresentaram uma média de 11,6 u.a., mosaico 25,54 u.a. e negativo 7,22 u.a..

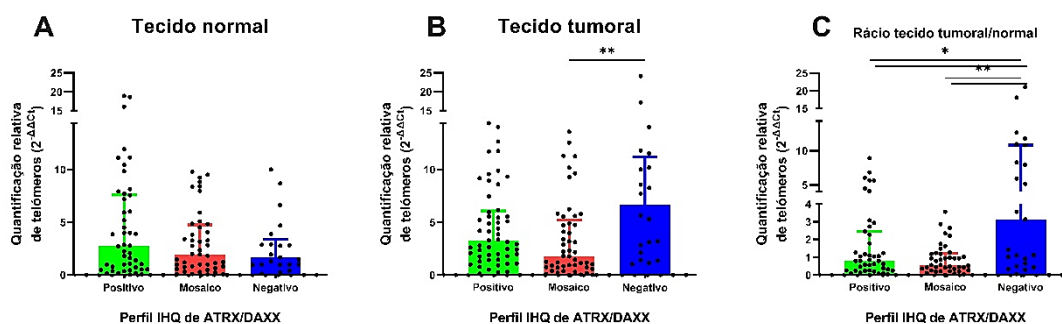


Figura 7 – Gráficos da quantificação relativa de telómeros, estratificados pela imunohistoquímica ATRX e/ou DAXX (padrão positivo, mosaico e negativo). A: Quantificação relativa de telómeros em amostras de tecido normal; B: quantificação relativa de telómeros em tecido tumoral; C: rácio da quantificação relativa de telómeros em amostras de tecido tumoral e tecido normal adjacente. A significância estatística foi avaliada pelo teste de *Mann-Whitney*, após exclusão de *outliers*. Os resultados são mostrados como mediana ± desvio interquartil. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Para os tumores, o valor médio da rQT nos casos positivos foi de 7,53 u.a., os mosaicos 8,89 u.a. e os negativos 14,92 u.a.. As diferenças entre eles, quer em tecido normal quer no tumor, não foram significativas ($p = 0,05$). Uma vez que os casos positivos com um padrão mosaico para ATRX/DAXX (10 – 80%) não apresentaram uma rQT aumentada, em comparação com os casos positivos (> 80%), estes casos com padrão de mosaico foram inseridos no grupo dos casos ATRX/DAXX positivos – ficando, assim, a análise sucinta a dois grupos distintos: ATRX/DAXX positivo e ATRX/DAXX negativo, como está ilustrado na Figura 8.

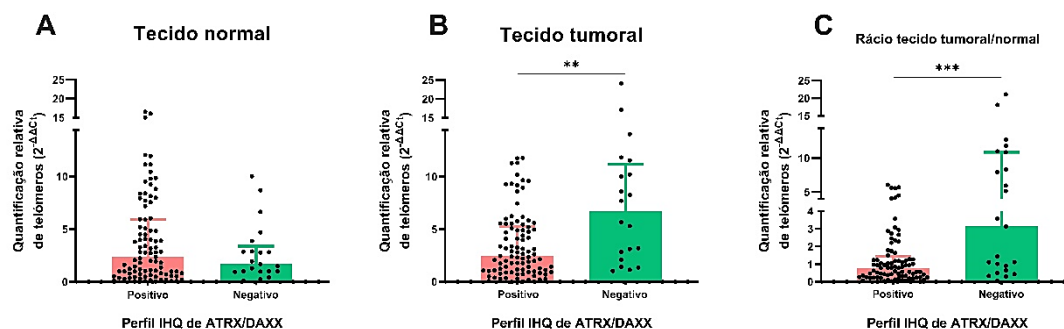


Figura 8 – Gráficos da quantificação relativa de telômeros, estratificados pela imunohistoquímica ATRX/DAXX (padrão positivo e negativo). A: Quantificação relativa de telômeros em tecido normal; B: quantificação relativa de telômeros em tecido tumoral; C: rácio da quantificação relativa de telômeros entre amostras de tecido tumoral e tecido normal adjacente. A significância estatística foi avaliada pelo teste de *Mann-Whitney*, após exclusão de *outliers*. Os resultados são mostrados como mediana \pm desvio interquartil. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Através da análise da Figura 8A, verifica-se que os casos IHQ positivos apresentaram valores superiores de rQT em comparação com os casos IHQ negativos (3,34 u.a. vs. 2,36 u.a., valores medianos). Contrariamente, nas amostras de tecido tumoral (Figura 8B), os casos IHQ negativos apresentaram um valor superior em relação aos casos positivos (8,41 u.a. vs. 3,28 u.a., respetivamente) (valores medianos). Esta relação também foi observada no gráfico representativo do rácio da rQT (Figura 8C), sendo que os valores medianos dos casos negativos e positivos são 3,89 u.a. e 0,03 u.a. ($p = 0,0017$), respetivamente.

O comprimento relativo do telómero foi determinado tendo em conta as recomendações do fabricante, onde os cálculos estão disponíveis no Anexo I. Assim, os casos com perda de expressão de ATRX/DAXX têm um comprimento significativamente maior ($55 \pm 0,5$ kb) do que os casos positivos ($19 \pm 0,5$ kb) (valores medianos).

Ainda foi realizada uma correlação da quantificação relativa de telômeros com os dados clinicopatológicos dos pacientes, correlacionando-se os resultados com diferentes fatores de prognóstico: sexo do paciente, idade ao diagnóstico, grau histológico, localização do tumor, multiplicidade do tumor, tamanho do tumor, estadiamento TNM e expressão de ATRX e DAXX (em separado para cada proteína e em conjunto para a perda de uma e/ou outra). Do qual se inferiu que os valores mais altos de quantificação relativa dos telômeros correlacionaram-se estatisticamente com o perfil imunohistoquímico ATRX, o grau histológico e metastização ganglionar e à distância – Figura 9.

Quanto à expressão das proteínas, houve uma tendência para uma maior expressão do rácio tumor/normal em casos com perda de ATRX ($p = 0,058$; IC de 95%). Em contrapartida, não foi demonstrada qualquer significância estatística nos casos com perda de DAXX ($p =$

0,118, IC de 95%). Assim, também se verificou esta associação na comparação com a expressão de ATRX e/ou DAXX ($p = 0,016$, IC de 95%).

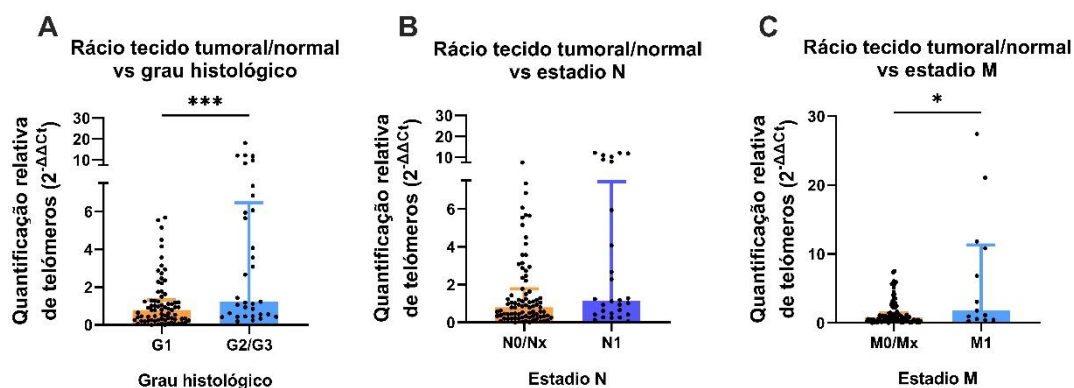


Figura 9 – Correlação do rácio da quantificação relativa dos telómeros tumor/tecido normal com os dados clinicopatológicos. A: Correlação com o grau histológico do tumor; B: correlação com a metastização ganglionar; C: correlação com a metastização à distância. A significância estatística foi avaliada pelo teste de *Mann-Whitney*, após exclusão de *outliers*. Os resultados são mostrados como mediana \pm desvio interquartil. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

O rácio tumor/normal está significativamente correlacionado com o grau histológico, havendo uma associação de valores de quantificação relativa dos telómeros superior em graus histológicos mais avançados do tumor (G2 e G3) ($p = 0,041$; IC de 95%) (Figura 9A). De acordo com o rácio da quantificação relativa de telómeros, os tumores G1 apresentaram uma média de 8,66 u.a. e os tumores G2 e G3 de 15,93 u.a. (1,01 u.a. e 2,04 u.a., respetivamente, valores medianos). Os casos com G2 e G3 tinham uma maior rQT ao nível de significância de $p < 0,001$ (***)

Quanto à presença ou ausência de metastização ganglionar (estadio N), 35 (22,4%) casos apresentaram metastização ganglionar (Tabela 3). Tal como é observado na Figura 9, a rQT varia entre um intervalo de 0 a 20 u.a. e verificou-se também uma maior tendência para uma maior expressão de rQT em casos com presença de metastização, ou seja, em estadio N1 (Figura 9B). O valor médio de rácio da quantificação relativa de telómeros foi de 6,44 u.a. para casos sem metastização ganglionar e de 17,51 u.a. para casos com metástases em gânglios linfáticos (0,94 u.a. e 1,24 u.a., respetivamente) (valores medianos).

Da amostra de estudo, apenas 16 (10,3%) dos casos apresentavam metastização à distância, de acordo com a Tabela 3. Com observação do gráfico da Figura 9C, verificou-se que os valores de rQT estavam significativamente aumentados, variando entre [0,30[u.a. Os casos com metastização à distância (estadio M1) tinham uma quantificação relativa de telómeros, em valor mediano de 1,78 u.a., ao nível de significância de $p < 0,05$ (*). Em relação

aos casos sem metastização, estes estão mais associados predominantemente a valores baixos de quantificação relativa dos telómeros (valor mediano de 1,22 u.a.).

4.4. Componente molecular dos pacientes com PanNENs

A sequenciação por exoma do DNA foi realizada em 11 (50%) de 22 casos de PanNENs com um perfil IHQ negativo para ATRX e/ou DAXX e ainda em mais dois casos com perfil IHQ positivo para estas proteínas. A sequenciação foi realizada a partir de amostras de tecido tumoral e teve como finalidade a análise e classificação de variantes somáticas de um único nucleótido (SNV – do inglês, *Single nucleotide variant*), inserções, duplicações e deleções. Assim como referido no Capítulo 3.6, foram analisadas as variantes somáticas para um número limitado de genes que estão indicados na Tabela 2.

Um total de 576 variantes em amostras de tumor (mediana 50; intervalo [10–81]) foram detetadas nos 13 casos de PanNENs no painel de genes selecionado. O gene mais frequentemente mutado foi o *KMT2C* (12,3%), apresentando variantes genéticas em 12 (92%) dos casos sequenciados. Os outros genes mais mutados são *SETD2* e *MTOR* (7,5%), *BRCA2* (7,1%) e *BRCA1* (6,1%), respetivamente. A frequência de variantes genéticas detetadas nos genes *ATRX*, *MEN1* e *DAXX* foi de 4,7%, 4,0% e 1,6%, respetivamente.

Nas 13 amostras de PanNENs foram ainda detetadas 526 SNVs não sinónimos e 16 indels e cerca de 370 (64,2%) das 576 variantes são de significado incerto (VUS). Todas as variantes foram classificadas de acordo com as diretrizes da ACMG e cerca de 11,63% têm significado clínico. As variantes genéticas de significado clínico estão descritas na Tabela 4.

As variantes genéticas com significado clínico no gene *ATRX* foram detetadas em 3 pacientes (23%), enquanto que no gene *DAXX* 4 pacientes (30,8%) dos 13 casos analisados apresentavam alterações genéticas. Em ambos os genes, as mutações detetadas são do tipo *frameshift* ou *nonsense* que resultam na perda de função da respetiva proteína, o que está de acordo com os resultados da IHQ – todos os casos têm um perfil IHQ negativo para ATRX e/ou DAXX. Além disto, 5 em 7 pacientes com presença em um ou ambos os genes referidos tinham o fenótipo ALT positivo, pela técnica de Tel-FISH.

As variantes genéticas no gene *MEN1* estão presentes em 5 pacientes (38,5%). No entanto, não houve qualquer suspeita da presença de síndrome hereditária nestes respetivos casos. No entanto, estas variantes genéticas surgem na presença de outras alterações em outros genes de vias de remodelação da cromatina, reparação de DNA e mecanismo de ALT. Quanto ao processo de remodelação da cromatina, os genes *SETD2* e

KMT2C apresentavam alterações genéticas em 4 (30,8%) e 6 (46,2%). Os genes de reparação do DNA, nomeadamente *BRCAs* e *MUTYH*, apresentaram mutações em 5 pacientes (38,5%). Em relação à via de sinalização celular mTOR, em 7 dos 13 pacientes (53,8%) foram detetadas alterações genéticas num dos genes intervenientes nesta via – por exemplo, *PTEN*, *PIK3CA*, *DEPDC5*, entre outros.

Dos 13 casos sequenciados e analisados existiu apenas um para a qual não foi detetada qualquer variante genética com significado clínico. Deste caso em particular, foram detetadas 8 variantes com significado clínico benigno e três variantes VUS. Além disso, este caso apresentou um perfil IHQ positivo para *ATRX* e/ou *DAXX* e, quanto às características clinicopatológicas, correspondeu a um PanNET de G1 e com ausência de metastização ganglionar e à distância. Também não apresentou valores de qPCR significativos, subentendendo-se que apresenta valores de comprimento de telómeros normais.

Conforme a classificação do *MSK's Precision Oncology Knowledge Base*, as variantes genéticas *PTEN A126V* e *PIK3CA R38H* foram assinaladas como mutações acionáveis com um nível FDA 3. Apesar de não se encontrarem descritas nesta base de dados, as mutações deletérias e truncadas nos restantes genes referidos na Tabela 4 podem ser consideradas como mutações com potencial oncogénico.

Tabela 4 – Variantes genéticas com significado clínico (patogénica e provavelmente patogénica) detetadas em amostras de tecido tumoral de casos de PanNENs. A base de dados GnomAD foi utilizada como base de dados populacional de referência.

Gene/Chr	Localização da variante	Nº do caso	Região genómica	Tipo de variante	Sig. clínico	VAF	GnomAD	dbSNP
<i>ATRX</i> Xq21.1	NM_000489.6:c.4830_4831del	TR27	Exão 18	frameshift	PP	0.758	-	-
	NM_000489.6:c.5668C>T (p.Gln1890*)	PT50	Exão 23	nonsense	PP	0.107	-	rs2148156530
	NM_000489.6:c.4425delA	PT83	Exão 15	frameshift	PP	0.333	9.112e-7	-
	NM_000489.6:c.477delA	PT83	Exão 5	frameshift	Patogénica	0.96	-	-
<i>DAXX</i> 6p21.32	NM_001141969:c.1947_1954del	TR4	Exão 7	frameshift	PP	0.545	-	-
	NM_001141969:c.1866G>A (p.Trp622*)	TR16	Exão 6	nonsense	PP	0.143	-	-
	NM_001141969:c.712C>T (p.Arg238*)	PT6	Exão 3	nonsense	Patogénica	0.909	0.000001369	-
	NM_001141969:c.2000_2001del	PT6	Exão 7	frameshift	PP	0.296	-	-
	NM_001141969:c.1087G>T (p.Glu363*)	PT67	Exão 4	nonsense	PP	0.086	-	-
	NM_001141969:c.1542delC	PT67	Exão 6	frameshift	PP	0.5	-	-
<i>MUTYH</i> 1p34.1	NM_001048174.2:c.563G>A (Gly188Glu)	PT50	Exão 8	missense	PP	0.144	0.000003717	rs768553551
	NM_001048174.2:c.1102G>T (p.Gly368Cys)	PT67	Exão 12	missense	PP	0.0573	-	-
<i>BRCA1</i> 17q21.31	NM_007294.4:c.2635G>T (p.Glu879*)	PT50	Exão 10	nonsense	Patogénica	0.0731	-	rs80357251
	NM_007294.4:c.4384G>T (p.Glu1462*)	PT67	Exão 13	nonsense	Patogénica	0.0879	-	-
	NM_007294.4:c.718C>T (p.Gln240*)	PT67	Exão 10	nonsense	PP	0.0884	-	-

Gene/Chr	Localização da variante	Nº do caso	Região genômica	Tipo de variante	Sig. clínico	VAF	GnomAD	dbSNP
BRCA2 13q13.1	NM_000059.4:c.9139C>T (p.Gln3047*)	TR3	Exão 24	nonsense	Patogénica	1	-	
	NM_000059.4:c.2264_2265del	PT6	Exão 11	frameshift	PP	0.5	-	
	NM_000059.4:c.1850C>G (p.Ser617*)	PT18	Exão 10	nonsense	Patogénica	0.096	-	rs397507278
	NM_000059.4:c.6706G>T (p.Glu2236*)	PT18	Exão 11	nonsense	Patogénica	0.35	0.0000513	rs41293503
	NM_000059.4:c.7738C>T (p.Gln2580*)	PT50	Exão 16	nonsense	Patogénica	0.0808	-	rs80358999
	NM_000059.4:c.7886G>A (p.Trp2629*)	PT50	Exão 17	nonsense	Patogénica	0.171	6.195e-7	rs80359015
SETD2 3p21.31	NM_014159.7:c.2502dupT	TR4	Exão 3	frameshift	PP	0.151	-	-
	NM_014159.7:c.5071C>T (p.Gly1691*)	TR27	Exão 9	nonsense	PP	0.0676	-	-
	NM_014159.7:c.6070C>T (p.Arg2024*)	PT50	Exão 13	nonsense	PP	0.0724	-	rs2107600380
	NM_014159.7:c.4586G>A (p.Cys1529Tyr)	PT50	Exão 4	missense	PP	1	-	rs2107727777
	NM_014159.7:c.1318delT	PT50	Exão 3	frameshift	PP	0.0599	-	-
	NM_014159.7:c.5691delC	PT67	Exão 12	frameshift	PP	0.0675	-	-
EHMT1 9q34.3	NM_024757.5:c.2311C>T (p.Gln771*)	TR16	Exão 15	nonsense	PP	0.303	-	-
	NM_024757.5:c.2281G>T (p.Gly761*)	PT6	Exão 15	nonsense	PP	0.19	-	-
MEN1 11q13.1	NM_001370259.2:c.850dupG	TR4	Exão 6	frameshift	PP	0.703	-	-
	NM_001370259.2:c.249_252del	PT6	Exão 2	frameshift	Patogénica	1	0.000001200	-
	NM_001370259.2:c.851C>A (p.Ala284Glu)	PT18	Exão 6	missense	Patogénica	0.0864	-	-
	NM_001370259.2:c.1050C>A (p.Asp350Glu)	PT67	Exão 8	missense	PP	0.606	-	-
	NM_001370259.2:c.493T>C (p.Cys165Arg)	PT67	Exão 3	missense	PP	0.125	-	-
	NM_001370259.2:c.69delT	PT116	Exão 2	frameshift	PP	0.782	-	-
KMT2C 7q36.1	NM_170606.3:c.2447dupA	TR4; PT83; PT116; PT118	Exão 14	frameshift	PP	0.201	0.00003481	-
	NM_170606.3:c.11461C>T (p.Gln3821*)	PT50	Exão 44	nonsense	PP	0.184	-	rs2129101671
	NM_170606.3:c.11538delC	PT67	Exão 44	frameshift	PP	0.066	-	-
	NM_170606.3:c.6082_6083del	PT67	Exão 36	frameshift	PP	0.096	-	-
	NM_170606.3:c.839G>A (p.Gly280Glu)	PT83	Exão 38	missense	PP	0.581	-	-
	NM_170606.3:c.1541G>A (p.Cys514Tyr)	PT83	Exão 42	missense	PP	0.444	-	-
PTEN 10q23.31	NM_000314.8:c.421C>T (p.His141Tyr)	TR4	Exão 5	missense	PP	0.0852	-	-
	NM_000314.8:c.377C>T (p.Ala126Val)	PT50	Exão 5	missense	PP	0.156	-	rs1114167656
	NM_000314.8:c.425G>A (p.Arg425Ala)	PT67	Exão 5	missense	PP	0.132	0.000004338	-
DEPDC5 22q12.3	NM_001242896.3:c.2251_2254del	TR3	Exão 26	frameshift	PP	0.764	-	-
	NM_001242896.3:c.3055_3056del	PT6	Exão 31	frameshift	PP	0.705	-	-
	NM_001242896.3:c.778C>T (p.Gln260*)	PT50	Exão 13	nonsense	PP	0.459	-	rs2148574434
PIK3CA 3q26.32	NM_006218.4:c.1534G>T (p.Gly512*)	TR4	Exão 9	missense	PP	0.0926	-	-
	NM_006218.4:c.2941C>T (p.Gln981*)	TR27	Exão 21	nonsense	PP	0.667	-	-
	NM_006218.4:c.1656G>A (p.Trp552*)	PT6	Exão 10	nonsense	PP	0.828	-	-
	NM_006218.4:c.2611C>T (p.Gln871*)	PT83	Exão 18	nonsense	PP	1	-	-
	NM_006218.4:c.113G>A (p.Arg38His)	PT83	Exão 2	missense	Patogénica	1	0.000002056	-

Gene/Chr	Localização da variante	Nº do caso	Região genômica	Tipo de variante	Sig. clínico	VAF	GnomAD	dbSNP
<i>MTOR</i> 1p36.22	NM_004958.4:c.5905C>T (p.Pro1969Ser)	PT6	Exão 42	<i>missense</i>	PP	1	6.196e-7	-
<i>FUS</i> 16p11.2	NM_004960.4:c.418C>T (p.Gln140*)	TR27	Exão 5	<i>nonsense</i>	PP	0.115	-	-
	NM_004960.4:c.1474G>T (p.Gly492*)	PT83	Exão 14	<i>missense</i>	PP	1	-	-
<i>TSC2</i> 16p13.3	NM_000548.5:c.3532C>T (p.Gln1178*)	TR3	Exão 30	<i>nonsense</i>	Patogénica	1	-	rs45517297
	NM_000548.5:c.3610G>A (p.Gly1204Arg)	TR27	Exão 30	<i>missense</i>	PP	0.2	-	rs1555511663
	NM_000548.5:c.2095C>T (p.Gln699*)	PT18	Exão 19	<i>nonsense</i>	Patogénica	0.833	-	rs45517210
	NM_000548.5:c.2098G>T (p.Glu700*)	PT83	Exão 20	<i>nonsense</i>	Patogénica	0.456	-	-
	NM_000548.5:c.5228G>A (p.Arg1743Gln)	PT83	Exão 41	<i>missense</i>	Patogénica	0.124	-	rs45507199
<i>SMARCAL1</i> 2q35	NM_014140.4:c.1075C>T (p.Gln359*)	TR27	Exão 5	<i>nonsense</i>	PP	0.667	6.197e-7	rs759179617
<i>PPM1D</i> 17q23.3	NM_003620.4:c.1714C>T (p.Arg572*)	PT5	Exão 6	<i>nonsense</i>	PP	0.14	0.000008675	rs765769406
	NM_003620.4:c.1057C>T (p.Arg353*)	PT50	Exão 53	<i>nonsense</i>	PP	0.108	0.000004337	rs1371874151

* PP – Provavelmente patogénica

Nos 13 pacientes onde foram detetadas variantes genéticas significativas, também foi possível evidenciar a presença de metastização, mais especificamente, a presença de metastização em um ou dois gânglios linfáticos. No entanto, em apenas 50% de 10 pacientes foi registado a presença de metastização à distância. De acordo com a classificação WHO 2019, a maioria dos tumores corresponderam a PanNET G1 (8 casos) e G2 (4 casos) e apenas um caso foi classificado como G3. Quanto à rQT, 50% dos pacientes com PanNETs (n = 12) que apresentaram um comprimento de telómeros superior a 90 a.u. também tinham presente variantes genéticas em diversos genes, intervenientes nas quatro vias de processos celulares: remodelação da cromatina, reparação de DNA, mecanismo ALT e via de sinalização mTOR.

Na Tabela 5 foi evidenciado os resultados obtidos para todas as técnicas realizadas neste estudo, para os casos analisados. Na estratificação dos valores de TL do tecido tumoral, medidos por Qpcr, foi definido o ponto de corte como 90 a.u. tendo em conta a distribuição percentual da variável na série de estudo – valor correspondente ao primeiro valor do 3º quartil.

Tabela 5 – Correlação das características anatomopatológicas (grau histológico e presença de metastização) com os resultados obtidos nas técnicas de IHQ, Tel-FISH, qPCR (TL do tecido tumoral) e sequenciação do exoma dos PanNENs analisados

Caso	Grau Histológico	Estádio (N/M)	Perfil IHQ		Tel FISH	qPCR TL Tumor	Mutações com significado clínico
			ATRX	DAXX			
TR3	PanNET G1	N2 M1	Positivo	Negativo	---	< 90 a.u.	<i>BRCA2, DEPDC5 e TSC2</i>
TR4	PanNET G2	N2 M1	Positivo	Negativo	ALT positivo	> 90 a.u.	<i>DAXX, SETD2, MEN1, KMT2C, PTEN e PIK3CA</i>
TR16	PanNET G2	N2 M1	Positivo	Negativo	ALT positivo	< 90 a.u.	<i>DAXX e EHMT1</i>
TR21	PanNET G1	N0 M0	Positivo	Positivo	----	< 90 a.u.	----
TR27	PanNET G2	N2 M0	Positivo	Negativo	---	---	<i>ATRX, SETD2, PIK3CA, FUS, TSC2 e SMARCAL1</i>
PT5	PanNET G1	N2 M1	Positivo	Negativo	ALT positivo	> 90 a.u.	<i>PPM1D</i>
PT6	PanNET G1	N2 M0	Negativo	Negativo	ALT positivo	> 90 a.u.	<i>DAXX(2), BRCA2, EHMT1, DEPDC5, MEN1, PIK3CA e MTOR</i>
PT18	PanNET G1	N1 Mx	Negativo	Positivo	---	< 90 a.u.	<i>BRCA2(2), MEN1 e TSC2</i>
PT50	PanNET G1	N2 Mx	Positivo	Positivo	---	> 90 a.u.	<i>ATRX, MUTYH, BRCA1, BRCA2(2), SETD2(3), KMT2C, PTEN, DEPDC5 e PPM1D</i>
PT67	PanNET G2	N1 M0	Negativo	Positivo	ALT positivo	> 90 a.u.	<i>DAXX(2), MUTYH, BRCA1(2), SETD2, MEN1(2), KMT2C(2) e PTEN</i>
PT83	PanNET G1	N2 M0	Positivo	Negativo	ALT positivo	> 90 a.u.	<i>ATRX(2), KMT2C(4), PIK3CA(2), FUS e TSC2(2)</i>
PT116	PanNET G3	N2 M0	Negativo	Positivo	ALT negativo	< 90 a.u.	<i>MEN1 e KMT2C</i>
PT118	PanNET G1	N2 M1	Positivo	Negativo	ALT positivo	< 90 a.u.	<i>KMT2C</i>

4.5. Análise de Sobrevida

Tal como observado na Tabela 3, o tempo médio de seguimento é de 82 meses, sendo que o intervalo varia de 0 a 271 meses. Durante este intervalo de tempo, cerca de 45 pacientes (28,8%) foram perdidos e não existem informações acerca do seu seguimento. Dos restantes, 8 pacientes (5,1%) morreram devido à doença, outros 8 (5,1%) morreram devido a outras causas médicas – como, por exemplo, insuficiência cardíaca, embolia pulmonar e complicações cirúrgicas – e outros 10 (6,4%) estavam mortos sem causa conhecida. Cerca de 54,5% correspondeu à percentagem de pacientes que permaneceu vivo, no entanto em condições de saúde distintas – 16 pacientes permaneceriam doentes, 64 pacientes estavam em remissão e para 5 pacientes desconhecia-se o seu estado de saúde.

A recorrência do tumor ocorreu em 26 casos (16,7%); a causa de recidiva é desconhecida para a maioria dos casos (n = 15; 57,7%), no entanto, 10 pacientes (38,4%) apresentaram metástases hepáticas e um paciente (3,8%) metástases ganglionares.

Os parâmetros de sobrevida global (OST) foram determinados para diversas características clinicopatológicas dos pacientes, destacando-se as variáveis do perfil IHQ para ATRX e DAXX, estadio N, estadio M, grau histológico e comprimento de telômeros (49). Assim observou-se que os casos com perfil IHQ negativo para ATRX (perda de expressão) tiveram uma sobrevida significativamente menor do que os casos com perfil IHQ positivo ($p = 0,019$) (Fig. 9A); o mesmo não foi observado para DAXX ($p = 0,38$) (Fig. 9B). Em relação à presença de metastização ganglionar e à distância não existiu diferenças significativas entre os dois grupos (ausência e presença de metastização) quanto à análise de sobrevivência ($p = 0,820$ e $p = 0,49$, respectivamente). Em relação ao grau histológico, foram observadas diferenças estatisticamente significativas no tempo de sobrevivência dos diferentes grupos de grau histológico ($p = 0,004$) (Fig. 9C). Na estratificação dos valores de TL do tecido tumoral, medidos por qPCR e através da definição de ponto de corte como 90 a.u., também se observou que o grupo com maior TL apresentou significativamente menor sobrevida ($p = 0,044$) (Fig.9D). A significância estatística foi avaliada através do teste de *Log Rank*, para um IC de 95%, realizado no *SPSS Statistics Versão 29.0* (IBM, Estados Unidos da América).

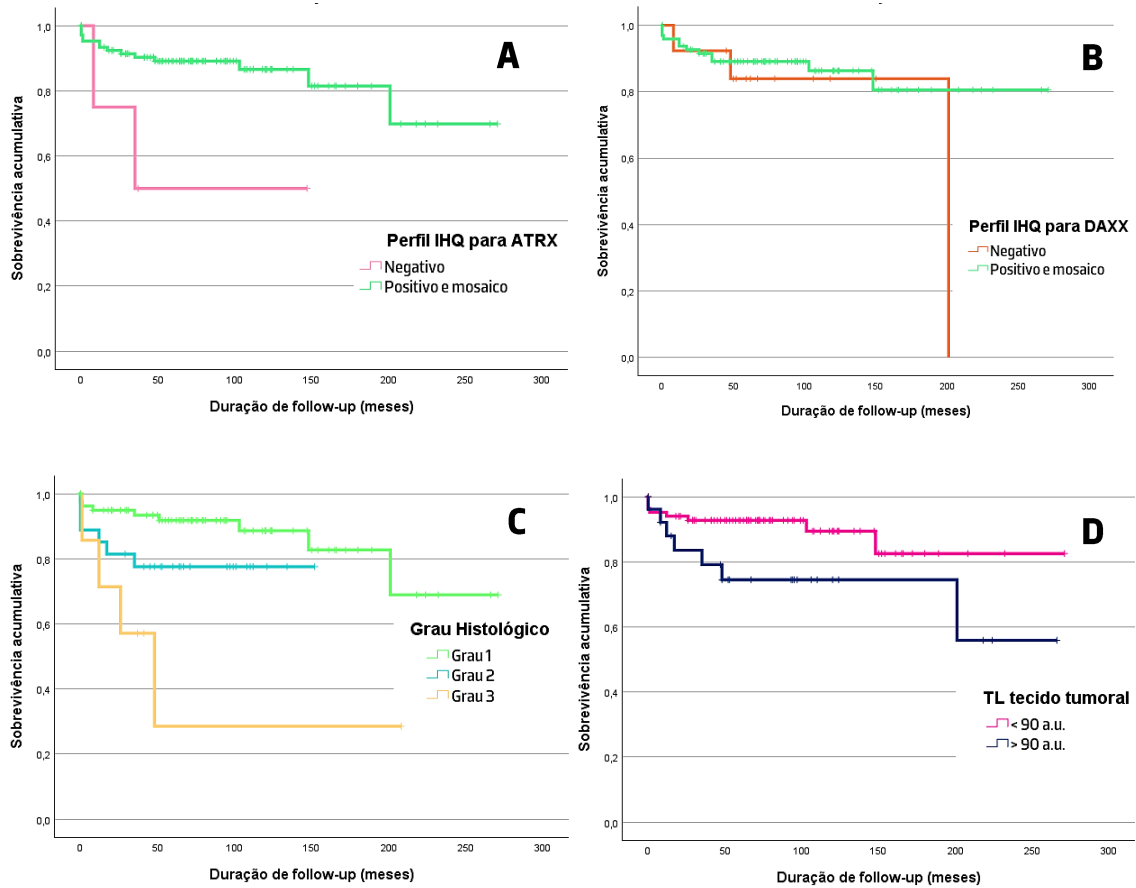


Figura 10 – Análise de sobrevivência de casos de PanNENs pelos dados anatomopatológicos: (A) perfil imunohistoquímico para ATRX; (B) perfil imunohistoquímico para DAXX; (C) grau histológico; e (D) comprimento dos telômeros no tecido tumoral. $p < 0.05$

5. Discussão

No presente estudo foram avaliados um total de 156 casos de PanNENs, e com dados clínicopatológicos disponíveis. A IHQ com anticorpos para ATRX e DAXX foi realizada em 152 casos. A perda de expressão de ATRX e DAXX foi detetada em 9 e 22 PanNENs, respetivamente: 20% dos casos eram ATRX e/ou DAXX negativos. A técnica de Tel-FISH foi realizada e avaliada em 22 casos com um perfil IHQ negativo para ATRX e/ou DAXX e cerca de 17 (77,3%) foram classificadas como amostras ALT positivas.

Até ao momento, a expressão por IHQ das proteínas ATRX e DAXX e a técnica de Tel-FISH têm um papel fundamental como biomarcadores de prognóstico em pacientes diagnosticados com PanNENs (24, 39, 46). Tem sido objeto de interesse no nosso grupo de investigação a avaliação do potencial da técnica de qPCR como uma ferramenta biomarcadora na avaliação do comprimento dos telómeros em PanNENs, através da determinação da rQT de amostras de tumor e tecido adjacente na série de estudo dado o comprimento aumentado dos telómeros, quando o mecanismo ALT está presente.

Outras técnicas estão disponíveis para a avaliação do comprimento dos telómeros, sendo que o Tel-FISH é a metodologia padrão para a avaliação em amostras humanas (50). A sensibilidade e especificidade foram definidas em 91% e 89%, respetivamente, para linhas celulares humanas; no entanto, não existem dados destes parâmetros em amostras de tecido FFPE (51). Tal como referido anteriormente, as técnicas moleculares de Tel-FISH e qPCR foram utilizadas para medir o tamanho e heterogeneidade dos telómeros, uma vez que a sensibilidade e especificidade do qPCR são de 100% e 89%, respetivamente.

Em relação à técnica de IHQ, esta está bem estabelecida como um marcador indireto para a presença de mutações inativantes do ATRX e DAXX, e apresenta uma especificidade relativamente alta. A sensibilidade e especificidade desta técnica com anticorpos anti-ATRX e anti-DAXX são elevadas – anticorpos anti-ATRX foi de 41-77% e 88-98% e anticorpos anti-DAXX foi de 85% e 95%, aproximadamente (46, 52, 53). No entanto, estudos recentes questionam estes valores. *Gisdere* e colegas reportaram que apenas metade dos casos com perda de expressão destas proteínas pela IHQ apresentavam variantes inativadoras nos seus genes (54). Neste estudo, consideramos que os casos ATRX/DAXX negativos para a sua expressão apresentavam, provavelmente, variantes inativadoras nos genes correspondentes.

No decurso deste estudo, avaliou-se se o perfil IHQ mosaico corresponderia a um comportamento intermediário entre o perfil IHQ negativo e o perfil IHQ positivo, para ambas as proteínas em estudo. Este trabalho permitiu concluir que o mosaico não corresponde a uma forma intermediária, pelo que esta hipótese foi excluída e os resultados de estudo da IHQ e do qPCR foram estratificados de forma binária – negativo ou perda de expressão e positivo para uma expressão intacta.

Na análise comparativa para resultados IHQ com as características clínicopatológicas, o perfil IHQ de ATRX e/ou DAXX mostrou uma associação com o sexo do paciente, tamanho do tumor e o estadio M. A série deste estudo apresentava maioritariamente indivíduos do sexo feminino (razão de 1,2 : 1,0), o que foi concordante com algumas coortes de outros estudos científicos (55, 56). Ainda assim foi possível observar uma correlação da perda de DAXX com o sexo do paciente, estando significativamente associado ao sexo masculino (75%). Este resultado é compatível com a literatura, que evidencia uma associação entre PanNETs ALT positivos e doentes do sexo masculino (57). Outros estudos recentes focaram-se nas características histológicas de PanNETs com perda de expressão proteica de ATRX e DAXX e comprovaram a existência de uma correlação com um maior tamanho do tumor, disseminação extra-pancreática do tumor, metastização à distância (estadio M), presença de ALT e instabilidade cromossómica (CIN) (42, 43, 45, 54, 55, 57-59). Estas afirmações são consistentes com os resultados obtidos neste estudo, no qual foi demonstrado que os casos com perda de ATRX e/ou DAXX estão associados a um maior tamanho do tumor (> 4 cm), à presença de metastização (DAXX: 50%), à presença de ALT (77,3% dos casos com perda de expressão são ALT positivos) e CIN nas células tumorais. Por estas razões enumeradas, a avaliação IHQ da expressão destas proteínas está se a tornar cada vez mais aceite e importante na área de prognóstico deste tipo de neoplasia. *Hackeng* e colegas estabeleceram a perda de ATRX/DAXX e a ativação de ALT como fatores prognósticos independentes para o cálculo de sobrevida de uma grande série de PanNETs não funcionais (60).

Em relação ao tempo menor de sobrevida, os resultados do estudo demonstraram que os casos com perda de expressão para ambas as proteínas apresentavam um OST significativamente mais reduzido do que os casos com expressão intacta. Estes resultados foram concordantes com a hipótese mais comumente defendida na literatura, em que a perda de ATRX/DAXX está envolvida no desenvolvimento e progressão da neoplasia,

levando a subtipos de neoplasias mais agressivos. No entanto, a heterogeneidade destes tumores, e por vezes a avaliação de casos em diferentes estádios, repercute na análise de sobrevida, e é um dos fatores apontados para a publicação de resultados contraditórios (42, 43, 45, 54, 55, 57-59).

A perda de ATRX não foi significativamente associada a estas características, mas terá de se ter em conta os poucos casos negativos para esta proteína (n = 9; 5,8%). A percentagem de casos com perda de DAXX é 2,5 vezes superior à de ATRX. Contudo, a percentagem de casos com perda de expressão de ATRX cumpriu os critérios de aceitação reportados pela literatura, uma vez que se trata de uma neoplasia rara em que a presença de variantes inativadoras em *ATRX* é menos comum (20, 23). Deste modo, os resultados combinados de ATRX e DAXX foram semelhantes aos resultados individuais de DAXX, e em linha com o relatado na literatura científica (57).

Outros estudos relataram uma associação significativa de casos com perda de expressão proteica ATRX/DAXX com o grau histológico do tumor – mutações em *ATRX* ou *DAXX* parecem ser uma assinatura de PanNETs de G2 (10). Neste trabalho não se observou nenhuma diferença estatística do perfil IHQ entre os diferentes graus (G1, G2 e G3) (13, 42, 45, 54, 55, 57, 59, 60). Uma possível justificação para a incapacidade de detetar esta associação prende-se com o facto de a série de estudo ser constituída maioritariamente por PanNENs bem diferenciados e de grau G1 – apenas 22% dos 156 PanNENs corresponderem a tumores de G2. No entanto, através da técnica de qPCR, foi possível estabelecer uma correlação do rácio da QT com o grau histológico e a perda de expressão proteica de ATRX. Estes resultados demonstraram que a técnica de qPCR poderá possuir um nível de sensibilidade superior à IHQ e realçam ainda o potencial que esta metodologia teria como ferramenta biomarcadora para o prognóstico de PanNENs. Pela análise da OST, observou-se que existe uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos histológicos, estando o grau 3 associado a um tempo mais reduzido de sobrevida do paciente conforme seria expectável e validando a série.

Pela análise dos gráficos de rQT, observou-se que os casos ATRX/DAXX positivos se associaram a valores mais altos de rQT no tecido normal. Em comparação com os valores do tecido tumoral, os valores para os casos ATRX/DAXX positivos diminuíram face aos valores do tecido normal. O mesmo se verificou para os valores de rácio da quantificação relativa de telómeros, com exceção dos casos com perda de expressão de uma ou ambas

as proteínas. Estes dados podem ser justificados pelo fenómeno natural de divisão celular das células humanas e pelo facto de células tumorais ALT negativo não apresentarem tamanhos diferentes e desequilibrados – que pode ser observado pela ausência de pontos ultra-brilhantes correspondentes aos telómeros, na técnica de FISH (48). Assim, sabe-se ainda que num processo de transformação neoplásica, duas das características principais adquiridas pelas células humanas são a autossuficiência em sinais de crescimento e a ativação do ponto de paragem do ciclo celular que, conseqüentemente, resultam num potencial replicativo ilimitado (32). Deste modo, as células tumorais ALT negativo serão caracterizadas por um aumento do número de divisões celulares e, conseqüentemente, um maior encurtamento dos telómeros – facto que conduzirá a que estas células apresentem telómeros de menor comprimento do que as respetivas células humanas normais, uma vez que estas últimas têm menos ciclos de divisão celular. Em contrapartida, as células tumorais ALT positivo apresentam telómeros com maiores dimensões devido ao mecanismo de manutenção dos telómeros (61). Outra hipótese possível prende-se com o facto de a ativação do mecanismo ALT poder estar associado à perda de outras proteínas, além de ATRX e DAXX. Deste modo, variantes inativadoras noutros genes que tenham a capacidade de ativar o mecanismo ALT, através da mesma via ou por outros mecanismos moleculares, podem estar a ser desvalorizadas neste estudo. Por exemplo, estudos recentes relataram a presença simultânea de variantes no gene *TERT* e a ativação de ALT e, ainda, que a presença destas variantes genéticas se associam a piores características prognósticas e a uma menor sobrevivência do paciente (62, 63).

Analisando especificamente os casos ATRX/DAXX negativo, o gráfico do rácio de rQT de tecido tumoral/tecido normal demonstrou que os valores mais altos de quantificação relativa de telómeros se associam à perda de expressão de ATRX e/ou DAXX – isto significa que os casos com perfil IHQ negativo têm um comprimento significativamente maior ($55 \pm 0,5$ kb) (valores medianos) do que os casos positivos. Estes resultados são a favor da literatura, na medida em que a perda destas proteínas pode estar associada à ativação do mecanismo ALT em células tumorais, marcado por uma grande heterogeneidade no comprimento dos telómeros (24, 32). Pela técnica de rtPCR, foi possível ainda correlacionar significativamente os valores de rácio de rQT, em casos de pacientes com PanNENs, com o grau histológico – como já tinha sido anteriormente mencionado –, a metastização ganglionar (N1) e a metastização à distância (M1).

Assim como foi demonstrado e discutido ao longo deste trabalho, a perda de ATRX e/ou DAXX depende da presença de metastização. De facto, o valor de prognóstico da perda de ATRX e DAXX depende do estadio da doença, pelo que a perda destas proteínas em tumores não metastáticos está associada a uma pior sobrevida dos doentes, enquanto a perda de ATRX e DAXX em tumores metastáticos associa-se a uma melhor sobrevida (12, 20, 45). Uma explicação plausível para este fenómeno prende-se com o facto de neoplasias com perda de ATRX e DAXX progredirem e metastizarem mais facilmente. De facto, os resultados estão de acordo com a hipótese de que a perda de expressão proteica destas proteínas e a ativação de ALT serem eventos que favorecem a metastização do tumor primário (64–66). No entanto, é importante realçar que as células neoplásicas ALT positivas apresentam CIN e, por isso, estas neoplasias podem ter um crescimento mais lento, uma vez que podem ter uma adaptação mais difícil, quando comparadas com células ALT negativo (11, 12).

A análise de sobrevida permitiu a discriminação de diferentes faixas de TL, quando o limite foi definido em 90 a.u. (ou $90 \pm 0,5$ kb) – os casos de tumor com TL maior (isto é, superior ao valor limite definido) apresentaram OST significativamente diminuído. O aumento de valores TL em casos ATRX/DAXX negativo sugere a ativação do mecanismo ALT. Estes resultados nunca tinham sido referenciados na literatura, pelo que esta descoberta apoia a hipótese de que a técnica de qPCR é uma ferramenta útil e valiosa na rotina de diagnóstico e prognóstico de pacientes com PanNENs. As principais vantagens do rtPCR, em comparação com a técnica *gold standard* são: (1) economia de tempo e diminuição de custos financeiros; (2) maior precisão e objetividade dos resultados quantitativos; (3) facilmente reproduzível e menos suscetível à opinião dos observadores. Uma desvantagem desta técnica cinge-se com a qualidade dos resultados em amostras de FFPE armazenadas por longos períodos de tempo, devido à qualidade do DNA extraído (67).

Os PanNENs são entidades raras e clinicamente desafiadoras, nas quais o perfil genético foi progressivamente revelado na última década com novas técnicas de sequenciação de genoma e exoma. O melhor entendimento e compreensão da contribuição das variantes genéticas, dos genes intervenientes e do fenótipo ALT para a tumorigénese do PanNET pode revelar novas possibilidades para o tratamento de pacientes que sofrem deste tipo de neoplasia, que se torna cada vez mais frequente (6, 68).

Até ao momento sabe-se que cerca de 90% dos PanNENs surge, na população, devido a mutações esporádicas em genes como *MEN1*, *ATRX*, *DAXX*, entre outros (11, 21). Os resultados obtidos são concordantes com a literatura, uma vez que estes genes, na série de estudo, apresentaram variantes com significado clínico em 9 (81,8%) das 11 amostras com perfil IHQ negativo para *ATRX/DAXX*. Além disso, 5 (55,5%) dos 9 casos mencionados têm células tumorais ALT positivo e apenas um dos casos é um tumor ALT negativo. O caso ALT negativo corresponde a uma amostra PanNET G3 com um perfil IHQ negativo para *ATRX* e um perfil IHQ positivo para *DAXX*. De facto, este caso não apresenta qualquer mutação com significado clínico nos genes *ATRX* e *DAXX*, pelo que a ausência de variantes inativadoras nos genes intervenientes no mecanismo de ALT poderá justificar o resultado obtido pelo Tel-FISH. Para os restantes casos não foi possível obter um resultado da técnica de Tel-FISH, uma vez que se tratam de um material armazenado por longos anos, podendo não ter uma qualidade satisfatória para a execução da técnica, e nem sempre existe material disponível para a realização da mesma.

A Tabela 5 resume algumas características clinicopatológicas (grau histológico e presença de metastização – estádios N e M) e os resultados das técnicas de IHQ, Tel-FISH, qPCR e da sequenciação do exoma dos PanNENs analisados. Curiosamente, 50% dos casos mutados para os genes em questão eram PanNETs G2. Esta correlação com o grau histológico já foi observada na técnica de qPCR e ainda vai de encontro ao que é defendido pela literatura, isto é, que a perda de expressão destas proteínas é um evento tardio na tumorigénese (11). Além disso, todos os casos referidos apresentaram metastização ganglionar e/ou à distância, sugerindo que a perda de expressão proteica poderá estar correlacionada com o desenvolvimento de metastização, no entanto não é possível afirmar que seja um evento marcante neste desenvolvimento visto que existem outros casos com metastização e sem variantes genéticas nos genes *ATRX*, *DAXX* e *MEN1* (11, 57).

Neste capítulo, já mencionado anteriormente, salientou-se que *Gisdere* e seus colegas reportaram que apenas metade dos casos com perda de expressão destas proteínas pela IHQ apresentavam variantes inativadoras nos seus genes (54). De facto, com a sequenciação de exoma foi possível constatar este facto, uma vez que houve pelo menos duas amostras para as quais não foram detetadas variantes inativadoras nestes genes.

Ainda estudos recentes relataram que *ATRX* e *DAXX* não são os únicos genes responsáveis pela ativação de ALT. Recentemente, *Diplas* e os seus colegas identificaram

um novo gene associado a ALT, o gene *SMARCAL1*, que traduz uma proteína reguladora dependente de actina, da família SWI/SNF; que tal como ATRX, é uma proteína que intervém na remodelação da cromatina e, como pertencem à mesma família, compartilham diversas semelhanças – neste estudo, as mutações em *SMARCAL1* foram equivalentes a mutações em *ATRX* (69). Curiosamente, existiu um único caso com uma variante inativadora no gene *SMARCAL1*, descrita na Tabela 4, e que corresponde um PanNET de G2, com um tamanho de 5,5cm e com metastização ganglionar. Neste caso a técnica de Tel-FISH não foi realizada, no entanto seria uma mais valia a realização desta técnica para avaliar a presença do fenótipo ALT, neste paciente em questão.

No entanto, foi possível estabelecer correlações dos resultados do Tel-FISH e das características clinicopatológicas com a descoberta de variantes genéticas com significado clínico em outros genes, que intervêm no mesmo processo ou em diferentes processos celulares – como, por exemplo, reparação de DNA, remodelação da cromatina e via de sinalização mTOR (18). Esta descoberta realça a importância do estudo genético de outros genes, como por exemplo, os genes *KMT2C*, *SETD2*, *MTOR* e *BRCA*s, em pacientes com PanNETs. É importante salientar que todos estes genes mutados conferem CIN ao tumor, um *hallmark* do cancro e que potencia o crescimento e progressão do tumor (70–72). Do ponto de vista terapêutico, por exemplo, alguns tumores podem estar associados a alterações nos genes de reparação (*BRCA 1/2*), que resultam no dano da cadeia de DNA. Neste contexto, os inibidores de poli(ADP-ribose) polimerase (PARPi) foram aprovados para pacientes com tumores mutados em *BRCA 1/2*. Contudo, a resistência adquirida aos medicamentos revelou-se uma grande desvantagem do PARPi (70).

Neste trabalho ainda foi possível correlacionar a ausência de variantes genéticas com significado clínico com um perfil IHQ positivo e que apresentava tamanhos normais de telómeros pela técnica de qPCR. Este caso tratou-se de um PanNET G1, com um tamanho entre 2 a 4 cm, sem presença de metastização e em que o paciente continua vivo e em remissão. Através deste caso, é possível estipular a hipótese de que algumas variantes genéticas encontradas no tumor podem derivar de mutações adquiridas posteriormente pelo tumor e que conferem características de pior prognóstico.

No entanto, é importante referir que algumas mutações detetadas neste trabalho se podem tratar de variantes da linhagem germinativa, nomeadamente, algumas mutações descritas na Tabela 4 nos genes *BRCA1*, *BRAC2*, *TSC1* e *TSC2*. Para se comprovar esta

hipótese poderia ser feito a sequenciação por exoma do tecido normal adjacente dos PanNENs em questão. Ainda é fundamental mencionar que muitas variantes genéticas foram classificadas como VUS (n = 370; 64,2%) devido à insuficiência de dados – por exemplo, dados pessoais, dados familiares, dados populacionais, entre outros – para uma classificação destas variantes como função neutra/benigna ou inativadora.

Em relação às mutações acionáveis detetadas neste trabalho, a mutação *PTEN A126V* está localizada no domínio fosfatase da proteína, diminuindo ou inativando a função e, conseqüentemente, a sua atividade proteica (73). No entanto, dados laboratoriais promissores revelaram que células tumorais com esta mutação podem ser sensíveis a inibidores seletivos de beta-isoforma direcionados a PI3K, como os agentes experimentais GSK2636771 e AZD8186. A outra mutação acionável mencionada neste trabalho, a *PIK3CA R38H*, está localizada no domínio de ligação do adaptador da proteína e resulta numa perda de interação entre a molécula ABD e vários resíduos no N-terminal do domínio da cinase PIK3CA (49, 74). Alguns dados laboratoriais sugerem que células tumorais com a mutação *PIK3CA R38H* podem ser sensíveis ao inibidor seletivo de isoforma PIK3CA RLY-2608. De facto, este é o tipo de trabalho fundamental num estudo genético e, posteriormente, na escolha e seleção de uma terapia dirigida a um dado paciente.

Sem dúvida que este trabalho permitiu a descoberta de novas metodologias como ferramentas biomarcadoras no prognóstico e decisão terapêutica de pacientes com PanNENs. Além disso, o estudo do perfil genético em alguns casos desta série já permitiu correlacionar algumas variantes genéticas com significado clínico encontradas a diversas características clínicas e anatomopatológicas em amostras de FFPE. Contudo, esta série contém amostras antigas, para as quais nem foi possível a realização de todas as técnicas mencionadas neste trabalho devido à ausência de material ou à insatisfatória qualidade do DNA extraído para a sequenciação por exoma. Além disto, o perfil genético centrou-se no estudo de um painel de 36 genes selecionados, podendo haver uma possível hipótese da exclusão de genes com uma grande relevância clínica. Por exemplo, mutações no promotor do gene *TERT* são alterações somáticas mais frequentes no cancro humano e já foi comprovada a sua coexistência com a ativação de ALT, em tumores de origem mesenquimal (35, 75).

Apesar de estes dados serem importantes para a contextualização e aprofundamento dos conhecimentos acerca da patogénese de PanNENs, não é possível a sua generalização para

outras populações, uma vez que esta série de estudos corresponde maioritariamente a pacientes do ocidental da Europa, não podendo ser generalizado a outras populações geográficas.

6. Conclusão

Nas últimas décadas, a pesquisa científica na área da oncologia, nomeadamente, no diagnóstico, prognóstico e tratamento de neoplasias aumentou drasticamente. Em concreto, a medicina evoluiu para um tratamento único e personalizado para cada paciente, com a evolução de novas tecnologias de sequenciação do genoma e exoma humano. Nesta dissertação, o foco centrou-se no estudo de PanNENs que, cada vez mais, têm vindo a ser alvo de vários estudos devido à sua raridade e à heterogeneidade e complexidade das características biológicas e clínicas deste tipo de neoplasia. Especificamente, foi explorado o mecanismo ALT e a sua ativação em células neoplásicas, correlacionando-la com diferentes genes e respetivas proteínas que intervêm neste mecanismo independente da telomerase (40, 46, 59).

Nos dias de hoje, o mecanismo ALT surgiu como um marcador confiável de pior prognóstico em PanNENs e útil na identificação de pacientes de maior risco (76). Tal como foi referido ao longo da dissertação, as técnicas de IHQ para avaliação da expressão proteica de ATRX e DAXX e FISH específico para telómeros são as técnicas laboratoriais implementadas e validadas na prática clínica como biomarcadores de prognóstico em pacientes diagnosticados com PanNENs (31). No entanto, a técnica de qPCR revelou-se promissora e útil como uma ferramenta complementar de prognóstico às duas técnicas anteriormente mencionadas. De facto, neste estudo, a perda de ATRX/DAXX associou-se positivamente ao sexo do doente, ao tamanho do tumor e à presença de metástases à distância; enquanto que, valores aumentados de rQT, quantificados por qPCR, se associaram significativamente à perda de expressão de ATRX e/ou DAXX, perfil IHQ negativo para ATRX, grau histológico e metastização à distância.

Contudo, o estudo do perfil genético tem-se revelado extremamente importante no prognóstico e decisão terapêutica em pacientes com diagnóstico de PanNENs, sendo essencial a sua realização para orientação dos cuidados médicos a realizar (18, 60). Além disso, são necessários mais estudos prospetivos sobre a contribuição de outros genes (como, por exemplo, *TERT*, *SMARCA1*, entre outros) na ativação e manutenção do mecanismo ALT em células tumorais; e o conhecimento das suas consequências biológicas e clínicas para o paciente. Outros genes que codificam a proteína H3.3 e HP1, proteínas que intervêm ativamente na remodelação da cromatina, também podem valer a pena avaliar devido à sua contribuição para o mecanismo ALT (77, 78).

Tendo ainda em consideração a avaliação realizada nesta série de estudo e as limitações encontradas no decorrer deste trabalho, acreditamos que seria essencial alargar o estudo de perfil genético a mais casos desta série de estudo, com o objetivo de melhor compreender a relação da presença de variantes genéticas com as características biológicas, clínicas e anatomopatológicas em cada paciente. Por exemplo, o estudo de variantes genéticas em modelos animais pode revelar novas funcionalidades para genes conhecidos e identificar genes subjacentes a doenças humanas, para as quais os mecanismos de doença não estão bem elucidados. Além disto, era importante estender esta avaliação a uma população de estudo maior e com maior diversidade étnica e geográfica, por exemplo.

Finalmente, considerando a existência de alterações epigenéticas ou alterações genéticas de *splicing* e em regiões intrónicas, seria necessário, como perspectivas futuras, complementar o nosso estudo com dados obtidos pela sequenciação de ácido ribonucleico (RNA), estudo de microRNAs ou outros estudos epigenéticos para metilação de DNA ou modificação de histonas (6, 8, 21, 26, 55).

Referências Bibliográficas

1. Leoncini E, Carioli G, La Vecchia C, Boccia S, Rindi G. Risk factors for neuroendocrine neoplasms: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.* 2016;27(1):68–81.
2. Halfdanarson TR, Rabe KG, Rubin J, Petersen GM. Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. *Ann Oncol.* 2008;19(10):1727–33.
3. Fang JM, Shi J. A Clinicopathologic and Molecular Update of Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms With a Focus on the New World Health Organization Classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2019;143(11):1317–26.
4. Galgano SJ, Morani AC, Gopireddy DR, Sharbidre K, Bates DDB, Goenka AH, et al. Pancreatic neuroendocrine neoplasms: a 2022 update for radiologists. *Abdom Radiol (NY).* 2022;47(12):3962–70.
5. Ghabi EM, Habib JR, Shoucair S, Javed AA, Sham J, Burns WR, et al. Detecting Somatic Mutations for Well-Differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumors in Endoscopic Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration with Next-Generation Sequencing. *Ann Surg Oncol.* 2023;30(12):7720–30.
6. Di Domenico A, Pipinikas CP, Maire RS, Brautigam K, Simillion C, Dettmer MS, et al. Epigenetic landscape of pancreatic neuroendocrine tumours reveals distinct cells of origin and means of tumour progression. *Commun Biol.* 2020;3(1):740.
7. Kimura W, Kuroda A, Morioka Y. Clinical pathology of endocrine tumors of the pancreas. Analysis of autopsy cases. *Dig Dis Sci.* 1991;36(7):933–42.
8. Tirosh A, Kebebew E. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic neuroendocrine tumors. *J Gastrointest Oncol.* 2020;11(3):567–77.
9. Carrera S, Sancho A, Azkona E, Azkuna J, Lopez-Vivanco G. Hereditary pancreatic cancer: related syndromes and clinical perspective. *Hered Cancer Clin Pract.* 2017;15:9.
10. Rindi G, Mete O, Uccella S, Basturk O, La Rosa S, Brosens LAA, et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr Pathol.* 2022;33(1):115–54.
11. Boons G, Vandamme T, Peeters M, Van Camp G, Op de Beeck K. Clinical applications of (epi)genetics in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: Moving towards liquid biopsies. *Rev Endocr Metab Disord.* 2019;20(3):333–51.
12. Kim JY, Brosnan-Cashman JA, An S, Kim SJ, Song KB, Kim MS, et al. Alternative Lengthening of Telomeres in Primary Pancreatic Neuroendocrine Tumors Is Associated with Aggressive Clinical Behavior and Poor Survival. *Clin Cancer Res.* 2017;23(6):1598–606.
13. Chou A, Itchins M, de Reuver PR, Arena J, Clarkson A, Sheen A, et al. ATRX loss is an independent predictor of poor survival in pancreatic neuroendocrine tumors. *Hum Pathol.* 2018;82:249–57.

14. Lee L, Igarashi H, Fujimori N, Hijioka M, Kawabe K, Oda Y, et al. Long-term outcomes and prognostic factors in 78 Japanese patients with advanced pancreatic neuroendocrine neoplasms: a single-center retrospective study. *Jpn J Clin Oncol*. 2015;45(12):1131–8.
15. Moller S, Langer SW, Slott C, Krogh J, Hansen CP, Kjaer A, et al. Recurrence-Free Survival and Disease-Specific Survival in Patients with Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms: A Single-Center Retrospective Study of 413 Patients. *Cancers (Basel)*. 2023;16(1).
16. Krogh S, Gronbaek H, Knudsen AR, Kissmeyer-Nielsen P, Hummelshoj NE, Dam G. Predicting Progression, Recurrence, and Survival in Pancreatic Neuroendocrine Tumors: A Single Center Analysis of 174 Patients. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:925632.
17. Williamson LM, Steel M, Grewal JK, Thibodeau ML, Zhao EY, Loree JM, et al. Genomic characterization of a well-differentiated grade 3 pancreatic neuroendocrine tumor. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2019;5(3).
18. Raj N, Shah R, Stadler Z, Mukherjee S, Chou J, Untch B, et al. Real-Time Genomic Characterization of Metastatic Pancreatic Neuroendocrine Tumors Has Prognostic Implications and Identifies Potential Germline Actionability. *JCO Precis Oncol*. 2018;2018.
19. Zhou W, Han X, Ji Y, Wang D, Xie D, Qiu Z, et al. Targeted deep sequencing reveals the genetic heterogeneity in well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors with liver metastasis. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2023;12(3):302–13.
20. Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, et al. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science*. 2011;331(6021):1199–203.
21. Scarpa A, Chang DK, Nones K, Corbo V, Patch AM, Bailey P, et al. Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature*. 2017;543(7643):65–71.
22. Ciobanu OA, Martin SC, Herlea V, Fica S. Insights into Epigenetic Changes Related to Genetic Variants and Cells-of-Origin of Pancreatic Neuroendocrine Tumors: An Algorithm for Practical Workup. *Cancers (Basel)*. 2022;14(18).
23. Uemura J, Okano K, Oshima M, Suto H, Ando Y, Kumamoto K, et al. Immunohistochemically Detected Expression of ATRX, TSC2, and PTEN Predicts Clinical Outcomes in Patients With Grade 1 and 2 Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Ann Surg*. 2021;274(6):e949–e56.
24. Mahmud I, Liao D. DAXX in cancer: phenomena, processes, mechanisms and regulation. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(15):7734–52.
25. Zhang H, He J, Li J, Tian D, Gu L, Zhou M. Methylation of RASSF1A gene promoter is regulated by p53 and DAXX. *FASEB J*. 2013;27(1):232–42.
26. Conemans EB, Lodewijk L, Moelans CB, Offerhaus GJA, Pieterman CRC, Morsink FH, et al. DNA methylation profiling in MEN1-related pancreatic neuroendocrine tumors reveals a potential epigenetic target for treatment. *Eur J Endocrinol*. 2018;179(3):153–60.

27. Rapkin LM, Ahmed K, Dulev S, Li R, Kimura H, Ishov AM, et al. The histone chaperone DAXX maintains the structural organization of heterochromatin domains. *Epigenetics Chromatin*. 2015;8:44.
28. Pang Y, Chen X, Ji T, Cheng M, Wang R, Zhang C, et al. The Chromatin Remodeler ATRX: Role and Mechanism in Biology and Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15(8).
29. Salomoni P. The PML-Interacting Protein DAXX: Histone Loading Gets into the Picture. *Front Oncol*. 2013;3:152.
30. Mafficini A, Scarpa A. Genetics and Epigenetics of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr Rev*. 2019;40(2):506–36.
31. Amorim JP, Santos G, Vinagre J, Soares P. The Role of ATRX in the Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) Phenotype. *Genes (Basel)*. 2016;7(9).
32. O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(3):171–81.
33. Ali JH, Walter M. Combining old and new concepts in targeting telomerase for cancer therapy: transient, immediate, complete and combinatory attack (TICCA). *Cancer Cell Int*. 2023;23(1):197.
34. Gaspar TB, Sa A, Lopes JM, Sobrinho-Simoes M, Soares P, Vinagre J. Telomere Maintenance Mechanisms in Cancer. *Genes (Basel)*. 2018;9(5).
35. Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun*. 2013;4:2185.
36. Fan HC, Chang FW, Tsai JD, Lin KM, Chen CM, Lin SZ, et al. Telomeres and Cancer. *Life (Basel)*. 2021;11(12).
37. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194–217.
38. Dyer MA, Qadeer ZA, Valle-Garcia D, Bernstein E. ATRX and DAXX: Mechanisms and Mutations. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(3).
39. Park JK, Paik WH, Lee K, Ryu JK, Lee SH, Kim YT. DAXX/ATRX and MEN1 genes are strong prognostic markers in pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncotarget*. 2017;8(30):49796–806.
40. Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*. 2002;21(4):598–610.
41. De Vitis M, Berardinelli F, Sgura A. Telomere Length Maintenance in Cancer: At the Crossroad between Telomerase and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT). *Int J Mol Sci*. 2018;19(2).
42. VandenBussche CJ, Allison DB, Graham MK, Charu V, Lennon AM, Wolfgang CL, et al. Alternative lengthening of telomeres and ATRX/DAXX loss can be reliably detected in FNAs of pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Cytopathol*. 2017;125(7):544–51.

43. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science*. 2011;333(6041):425.
44. Missiaglia E, Dalai I, Barbi S, Beghelli S, Falconi M, della Peruta M, et al. Pancreatic Endocrine Tumors: Expression Profiling Evidences a Role for AKT-mTOR Pathway. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;28(2):245-55.
45. Marinoni I, Kurrer AS, Vassella E, Dettmer M, Rudolph T, Banz V, et al. Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Gastroenterology*. 2014;146(2):453-60 e5.
46. Hechtman JF, Klimstra DS, Nanjangud G, Frosina D, Shia J, Jungbluth AA. Performance of DAXX Immunohistochemistry as a Screen for DAXX Mutations in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Pancreas*. 2019;48(3):396-9.
47. Wang F, Xu X, Ye Z, Qin Y, Yu X, Ji S. Prognostic Significance of Altered ATRX/DAXX Gene in Pancreatic Neuroendocrine Tumors: A Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:691557.
48. Montpetit AJ, Alhareeri AA, Montpetit M, Starkweather AR, Elmore LW, Filler K, et al. Telomere length: a review of methods for measurement. *Nurs Res*. 2014;63(4):289-99.
49. Gabelli SB, Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Vogelstein B, Amzel LM. Structural effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;347:43-53.
50. Aubert G, Hills M, Lansdorp PM. Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res*. 2012;730(1-2):59-67.
51. Frank L, Rademacher A, Mucke N, Tirier SM, Koeleman E, Knotz C, et al. ALT-FISH quantifies alternative lengthening of telomeres activity by imaging of single-stranded repeats. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(11):e61.
52. Cai J, Zhu P, Zhang C, Li Q, Wang Z, Li G, et al. Detection of ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry in the progression of 211 paired gliomas. *Oncotarget*. 2016;7(13):16384-95.
53. Nishikawa T, Watanabe R, Kitano Y, Yamamichi A, Motomura K, Ohka F, et al. Reliability of IDH1-R132H and ATRX and/or p53 immunohistochemistry for molecular subclassification of Grade 2/3 gliomas. *Brain Tumor Pathol*. 2022;39(1):14-24.
54. Gisder DM, Overheu O, Keller J, Nopel-Dunnebacke S, Uhl W, Reinacher-Schick A, et al. DAXX, ATRX, and MSI in PanNET and Their Metastases: Correlation with Histopathological Data and Prognosis. *Pathobiology*. 2023;90(2):71-80.
55. Pipinikas CP, Dibra H, Karpathakis A, Feber A, Novelli M, Oukrif D, et al. Epigenetic dysregulation and poorer prognosis in DAXX-deficient pancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(3):L13-8.
56. Roy S, LaFramboise WA, Liu TC, Cao D, Luvison A, Miller C, et al. Loss of Chromatin-Remodeling Proteins and/or CDKN2A Associates With Metastasis of Pancreatic

Neuroendocrine Tumors and Reduced Patient Survival Times. *Gastroenterology*. 2018;154(8):2060–3 e8.

57. Singhi AD, Liu TC, Roncaioli JL, Cao D, Zeh HJ, Zureikat AH, et al. Alternative Lengthening of Telomeres and Loss of DAXX/ATRX Expression Predicts Metastatic Disease and Poor Survival in Patients with Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Clin Cancer Res*. 2017;23(2):600–9.

58. Watson LA, Solomon LA, Li JR, Jiang Y, Edwards M, Shin-ya K, et al. Atrx deficiency induces telomere dysfunction, endocrine defects, and reduced life span. *J Clin Invest*. 2013;123(5):2049–63.

59. Pea A, Yu J, Marchionni L, Noe M, Luchini C, Pulvirenti A, et al. Genetic Analysis of Small Well-differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumors Identifies Subgroups With Differing Risks of Liver Metastases. *Ann Surg*. 2020;271(3):566–73.

60. Hackeng WM, Brosens LAA, Kim JY, O'Sullivan R, Sung YN, Liu TC, et al. Non-functional pancreatic neuroendocrine tumours: ATRX/DAXX and alternative lengthening of telomeres (ALT) are prognostically independent from ARX/PDX1 expression and tumour size. *Gut*. 2022;71(5):961–73.

61. Barthel FP, Wei W, Tang M, Martinez-Ledesma E, Hu X, Amin SB, et al. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat Genet*. 2017;49(3):349–57.

62. Venturini L, Daidone MG, Motta R, Collini P, Spreafico F, Terenziani M, et al. Telomere maintenance in Wilms tumors: first evidence for the presence of alternative lengthening of telomeres mechanism. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50(10):823–9.

63. Pezzolo A, Pistorio A, Gambini C, Haupt R, Ferraro M, Erminio G, et al. Intratumoral diversity of telomere length in individual neuroblastoma tumors. *Oncotarget*. 2015;6(10):7493–503.

64. Lee JC, Jeng YM, Liao JY, Tsai JH, Hsu HH, Yang CY. Alternative lengthening of telomeres and loss of ATRX are frequent events in pleomorphic and dedifferentiated liposarcomas. *Mod Pathol*. 2015;28(8):1064–73.

65. Liao JY, Lee JC, Tsai JH, Yang CY, Liu TL, Ke ZL, et al. Comprehensive screening of alternative lengthening of telomeres phenotype and loss of ATRX expression in sarcomas. *Mod Pathol*. 2015;28(12):1545–54.

66. Qadeer ZA, Harcharik S, Valle-Garcia D, Chen C, Birge MB, Vardabasso C, et al. Decreased expression of the chromatin remodeler ATRX associates with melanoma progression. *J Invest Dermatol*. 2014;134(6):1768–72.

67. Kong PL, Looi LM, Lau TP, Cheah PL. Correction: Assessment of Telomere Length in Archived Formalin-Fixed, Paraffinized Human Tissue Is Confounded by Chronological Age and Storage Duration. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168238.

68. Kitkumthorn N, Mutirangura A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. *Clin Epigenetics*. 2011;2(2):315–30.

69. Diplas BH, He X, Brosnan-Cashman JA, Liu H, Chen LH, Wang Z, et al. The genomic landscape of TERT promoter wildtype-IDH wildtype glioblastoma. *Nat Commun.* 2018;9(1):2087.
70. Calheiros J, Corbo V, Saraiva L. Overcoming therapeutic resistance in pancreatic cancer: Emerging opportunities by targeting BRCA1 and p53. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2023;1878(4):188914.
71. Dawkins JB, Wang J, Maniati E, Heward JA, Koniali L, Kocher HM, et al. Reduced Expression of Histone Methyltransferases KMT2C and KMT2D Correlates with Improved Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2016;76(16):4861-71.
72. Niu N, Lu P, Yang Y, He R, Zhang L, Shi J, et al. Loss of Setd2 promotes Kras-induced acinar-to-ductal metaplasia and epithelia-mesenchymal transition during pancreatic carcinogenesis. *Gut.* 2020;69(4):715-26.
73. Rodriguez-Escudero I, Oliver MD, Andres-Pons A, Molina M, Cid VJ, Pulido R. A comprehensive functional analysis of PTEN mutations: implications in tumor- and autism-related syndromes. *Hum Mol Genet.* 2011;20(21):4132-42.
74. Gabelli SB, Echeverria I, Alexander M, Duong-Ly KC, Chaves-Moreira D, Brower ET, et al. Activation of PI3Kalpha by physiological effectors and by oncogenic mutations: structural and dynamic effects. *Biophys Rev.* 2014;6(1):89-95.
75. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Jr., et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(15):6021-6.
76. Luchini C, Lawlor RT, Bersani S, Vicentini C, Paolino G, Mattiolo P, et al. Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) in Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Ready for Prime-Time in Clinical Practice? *Curr Oncol Rep.* 2021;23(9):106.
77. Cao Y, Gao Z, Li L, Jiang X, Shan A, Cai J, et al. Whole exome sequencing of insulinoma reveals recurrent T372R mutations in YY1. *Nat Commun.* 2013;4:2810.
78. Piacentini L, Fanti L, Berloco M, Perrini B, Pimpinelli S. Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *J Cell Biol.* 2003;161(4):707-14.
79. Kloppel G, Rindi G, Perren A, Komminoth P, Klimstra DS. The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement. *Virchows Arch.* 2010;456(6):595-7.

Anexos

Anexo I – Método de cálculo para a quantificação relativa dos telómeros

Os cálculos efetuados para a apresentação e análise dos resultados da quantificação absoluta do tamanho dos telómeros numa amostra em estudo é o seguinte:

1 – Para o conjunto de primers de telómeros (TEL), deve ser calculada a diferença da quantificação por cada ciclo, $\Delta Cq(TEL)$, entre o DNA genómico da amostra em estudo e a amostra de DNA genómico de referência. O valor de $\Delta Cq(TEL)$ pode ser positivo, nulo ou negativo.

$$\Delta Cq(TEL) = Cq(TEL, DNA da amostra) - Cq(TEL, DNA referência)$$

2 – Para o conjunto de primers de cópia única (SCR), deve ser calculada a diferença da quantificação por cada ciclo, $\Delta Cq(SCR)$, entre o DNA genómico da amostra em estudo e a amostra de DNA genómico de referência. O valor de $\Delta Cq(SCR)$ pode ser positivo, nulo ou negativo.

$$\Delta Cq(SCR) = Cq(SCR, DNA da amostra) - Cq(SCR, DNA referência)$$

$$3 - \Delta \Delta Cq = \Delta Cq(TEL) - \Delta Cq(SCR)$$

4 – O comprimento relativo dos telómeros da amostra em estudo, face a amostra de referência é igual a $2^{-\Delta \Delta Cq}$. A unidade utilizada para este parâmetro é a unidade arbitrária (u.a).

5 – O comprimento absoluto dos telómeros da amostra em estudo é obtido pela seguinte igualdade:

$$= \text{Comprimento do telómero do DNA referência} \times 2^{-\Delta \Delta Cq}$$

A quantificação relativa de telómeros diz respeito ao comprimento relativo de telómeros na amostra alvo e a quantificação absoluta de telómeros corresponde ao comprimento total de telómeros da amostra alvo por célula diploide.

Anexo II – Classificação ENETS

O grupo ENETS desenvolveu e publicou um sistema de classificação de estadiamento TNM para NETs da zona intestinal anterior – estômago, duodeno e pâncreas. A Tabela 6 demonstra os critérios de classificação para a categorização do estadio T segundo a classificação ENETS (79).

Tabela 6 – Critérios para a categorização de T, do estadiamento TNM, no sistema de classificação ENETS, em PanNETs (79).

	Sistema de Classificação ENETS
T1	Neoplasia confinada ao pâncreas, com < 2 cm
T2	Neoplasia confinada ao pâncreas, com 2 a 4 cm
T3	Neoplasia confinada ao pâncreas, com > 4 cm ou invasão tumoral do duodeno ou ducto biliar
T4	Invasão de órgãos adjacentes ou invasão vascular

Anexo III – Aprovação comissão de ética

Comissão de Ética para a Saúde / Ethics Committee for Health
Centro Hospitalar Universitário de São João/Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
Porto - Portugal

CES

Ethics Reference Number:	138/2007
Project Title:	<i>Tumores Neuroendócrinos Gastro-Entero-Pancreáticos</i>
Researcher Name:	John Rodrigues Preto, MD

The Ethics Committee for Health (Comissão de Ética para a Saúde - CES) approved this study on 19-12-2007.

Yours sincerely

14-04-2020

The Secretary of Ethics Committee for Health


Pedro Brito, PhD

Comissão de Ética para a Saúde
Centro Hospitalar Universitário de São João EPE
Email: comissao.etica@hsjsoa.mim-saude.pt Tel: 00351 225512126

Anexo IV – Licença reprodução de imagem

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

This Agreement between Ana Raquel Costa Borges ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5871911509787
License date	Sep 18, 2024
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature
Licensed Content Title	Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours
Licensed Content Author	Aldo Scarpa et al
Licensed Content Date	Feb 15, 2017
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Would you like a high resolution image with your order?	no