



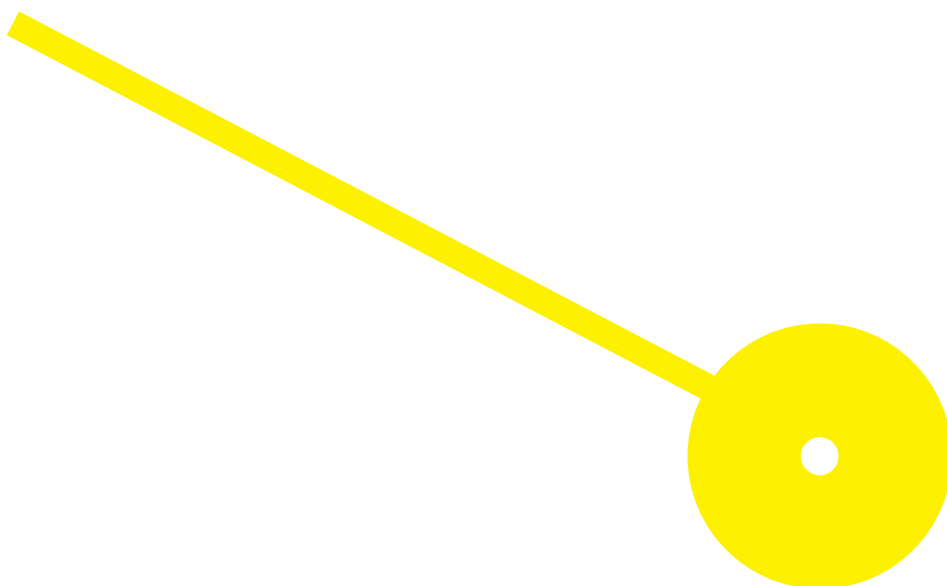
MESTRADO

Mestrado em Técnicas Laboratoriais em Biopatologia- Ramo de Patologia Molecular

# Análise de variantes no gene *STK11* e sua influência na resposta à imunoterapia

Ana Filipa Moreira Bessa

07/2023





**Análise de variantes no gene *STK11* e sua influência na resposta à imunoterapia**

**Autor**

Ana Filipa Moreira Bessa

**Orientadores**

Prof. Luís Cirnes, Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP); Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto (ESS|P.PORTO)

Prof Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva, ESS|P.PORTO

Prof. Carla Alexandra Cavaco Pinto, Instituto Português de Oncologia do Porto; ESS|P.PORTO

**Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Ramo/Área de Especialização em Patologia Molecular pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.**

## Agradecimentos

Quero começar por agradecer ao orientador deste projeto, Professor Luís Cirnes, por me ter integrado no seu grupo de trabalho no Ipatimup Diagnósticos e pela confiança depositada para a realização do trabalho, bem como à Dr. Margarida Dias, por me disponibilizar dados para a realização do projeto.

Quero também agradecer a toda a equipa do Ipatimup Diagnósticos, pois estiveram direta ou indiretamente ligados ao sucesso do projeto, seja pelos conhecimentos que me transmitiram, pela ajuda com o trabalho de laboratório ou mesmo pelas palavras de apoio e carinho ao longo do meu percurso na instituição. Em especial, um obrigada à Maria João Pina, que foi o meu braço direito na análise de resultados e à Patrícia Domingues que me orientou nas questões técnicas do trabalho e colaborou com resultados para este projeto. Quero ainda dirigir-me, em particular, à Salomé Tavares que me ajudou a dar os primeiros passos no laboratório.

Agradeço à Professora Carla e Professora Regina pela orientação durante o desenvolvimento do projeto.

Agradeço também aos meus pais, por me terem apoiado e guiado em mais uma etapa da minha vida.

Dirijo ainda um agradecimento aos meus amigos, pela força extra que me deram, em especial agradeço à Petra, Melany e Julieta, minhas amigas do mestrado, por dividirem comigo os altos e baixos deste percurso.

## Resumo

A imunoterapia é uma ferramenta terapêutica de sucesso usadas no tratamento do cancro de pulmão, contudo alguns doentes não respondem à imunoterapia, apresentando progressão da doença ou morte. Uma das possíveis explicações para o insucesso da imunoterapia são alterações no gene Serine/ threonine Kinase 11 (*STK11*), que podem conferir resistência à terapia, uma vez que este tem grande influência no sistema imunológico.

O objetivo deste projeto é estudar alterações genéticas no *STK11* em pacientes com cancro de pulmão sujeitos a imunoterapia e a sua possível associação com a resposta do doente à terapêutica.

Foram selecionados 38 doentes, procedeu-se à extração do ácido desoxirribonucleico (DNA), seguindo-se a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do *STK11*, o qual foi sequenciado para pesquisa de alterações genéticas.

Foram detetadas e classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas 14 alterações no *STK11*, não tendo sido identificado um codão ou exão com mais propensão a alterações. Pacientes com alterações no *STK11* apresentaram pior sobrevida global e pior sobrevida livre de progressão de doença.

Estes resultados sugerem que o *STK11* deve ser estudado na sua totalidade aquando da decisão terapêutica e que deve ser incluído em painéis de Sequenciação de Nova Geração (NGS).

**Palavras-chave:** Alterações genéticas no gene *STK11*, cancro do pulmão, imunoterapia

## Abstract

Immunotherapy is one of the successful therapeutic tools used in the treatment of lung cancer, however, some patients do not respond to immunotherapy, presenting disease progression or death. One of the possible explanations for the failure of immunotherapy are alterations in the gene Serine/threonine Kinase 11 (*STK11*), which may confer resistance to this therapy since it has a great influence on the immune system.

The objective of this project is to study genetic alterations in the *STK11* in patients with lung cancer undergoing immunotherapy and their possible association with the patient's response to therapy.

Thirty-eight patients were selected, deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted, followed by polymerase chain reaction (PCR) for amplification of *STK11*, which was sequenced to search for genetic alterations.

Fourteen alterations in *STK11* were detected and classified as pathogenic or probably pathogenic, with no area of the gene or exon more prone to alterations having been identified. Patients with alterations in *STK11* had worse overall survival and worse progression-free survival.

These results suggest that the entire coding *STK11* regions should be studied when making a therapeutic decision and that it should be included in Next Generation Sequencing (NGS) panels.

**Keywords:** *STK11* gene variants, lung cancer, immunotherapy

## Índice

<b>1.</b>	Introdução.....	1
<b>1.1.</b>	Cancro do pulmão.....	1
<b>1.1.1.</b>	Epidemiologia.....	1
<b>1.1.2.</b>	Tipos Histológicos.....	1
<b>1.1.3.</b>	Estadiamento.....	2
<b>1.1.4.</b>	Tratamento.....	2
<b>1.1.4.1</b>	Imunoterapia.....	3
<b>1.1.5.</b>	Percurso terapêutico dos pacientes com NSCLC.....	5
<b>1.2.</b>	Função biológica do <i>STK11</i> .....	6
<b>1.3.</b>	Alterações genéticas do <i>STK11</i> .....	11
<b>1.4.</b>	Relação do <i>STK11</i> com o sistema imunológico e impacto na imunoterapia.....	12
<b>1.5.</b>	Impacto preditivo e impacto prognóstico das alterações do <i>STK11</i> .....	16
<b>1.6.</b>	Status mutacional de <i>STK11</i> aliado à TMB e à expressão de PD-L1 na decisão terapêutica.....	17
<b>1.7.</b>	Falhas no sucesso da imunoterapia não relacionadas com alterações genéticas em <i>STK11</i> .....	17
<b>2.</b>	Objetivos do Projeto.....	19
<b>3.</b>	Materiais e Métodos.....	20
<b>3.1.</b>	Amostras.....	20
<b>3.2.</b>	Extração de DNA.....	20
<b>3.3.</b>	Quantificação e avaliação da qualidade de DNA.....	21
<b>3.4.</b>	Amplificação do gene <i>STK11</i> .....	22
<b>3.5.</b>	Eletroforese.....	23
<b>3.6.</b>	Sequenciação de Sanger.....	24
<b>3.7.</b>	Análise Estatística.....	26
<b>4.</b>	Resultados.....	27
<b>5.</b>	Discussão.....	32
<b>6.</b>	Conclusão.....	35
	Referências Bibliográficas.....	36

## Índice de Abreviaturas

NSCLC- Cancro de pulmão de não pequenas células

SCLC- Cancro de pulmão de pequena células

TNM- Tumor, gânglio, metástase

CTLA-4- Antígeno 4 associado a linfócitos citotóxicos

PD-1- Proteína de morte celular programada

TCR- Recetor de linfócitos T

MHC- Complexo principal de histocompatibilidade

APC- Célula apresentadora de antígeno

STK11- Serine threonine kinase 11

LKB1- Cinase hepática B1

AMP- Adenosina monofosfato

AMPK- Cinase ativada por AMP

ATP- Adenosina trifosfato

NADPH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo + hidrogénio

mTOR- Alvo da rapamicina em mamíferos

HIF-1 $\alpha$ - Fator induzido por hipoxia- 1

ULK1- Cinase ativadora de autofagia 1 tipo Unc-51

TFEB- Fator de transcrição EB

TFE3- Fator de transcrição E3

FOXO- Forkhead box O

PGC-1 $\alpha$ - Coativador gama 1-alfa do recetor ativado por proliferador de peroxissoma

ROS- Radicais livres de oxigénio

NRF2- Fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2

KEAP1- Proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch

DNA- Ácido desoxirribonucleico

CPS1- Carbamoil fosfato sintetase 1

KRAS- Homólogo oncogénico viral de sarcoma de rato Ki-ras2 Kristen

STING- Estimulador de genes interferões

dsDNA- DNA de cadeia dupla

TBK1- Cinase de ligação ao TANK 1

IRF3- Regulador de fatores de transcrição de interferão  
IFN- Interferão  
CXCL10- Quimiocina ligando 10 de motivo C-X-C  
SAM- S-adenosil metionina  
DNMT1- DNA metiltransferase-1  
EZH2- Histona-lisina N-metiltransferase  
CCL5- Ligante 5 de quimiocina CC  
NK- Natural killer  
TP53- Proteína de tumor 53  
SMARCA4- Regulador de cromatina dependente de actina, subfamília A, membro 4  
TMB- Tumor burden mutation  
STRADA-Adaptador alfa relacionado com STE20  
MO25- Proteína de rato 25  
FFPE- -Fixed Paraffin-Embedded  
RNA-Ácido ribonucleico  
EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético  
dNTP's- Desoxinucleótidos trifosfato  
TBE- Tris-Borato-EDTA  
UV- ultravioleta  
PCR- Reação em cadeia da polimerase  
ddNTP- didesoxinucleótidos trifosfato  
NGS- Sequênciação de nova geração  
NFE2L2- Fator de transcrição 2 BZIP do tipo NFE2  
MLPA- Amplificação de sonda dependente de ligação multiplex

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Hotspots mutacionais do STK11. A coluna da esquerda indica os aminoácidos (identificados por letra) da cadeia proteica original e a sua posição. A coluna do meio evidencia as variantes mais comuns no STK11 por ordem de frequência, sendo o asterisco indicativo de uma variante que resulta numa proteína truncante, o sp indica uma alteração de splicing no codão desse aminoácido, e as letras indicam que houve uma substituição de bases azotadas resultando na substituição do aminoácido da esquerda pelo da direita (também identificado por letra). A coluna da direita identifica o exão a que pertence o aminoácido em causa. (Fonte: Cancer Hotspots, 2023) .....	12
Tabela 2- Sequência dos pares de primers utilizados para amplificação de nove exões do gene STK11 e suas temperaturas de annealing.....	22
Tabela 3- Condições de PCR para amplificação dos 9 exões codificantes do gene STK11.....	23
Tabela 4- Frequência absoluta e relativa (em percentagem arredondada à unidade) de alterações genéticas encontradas em cada exão do gene <i>STK11</i> para um total de 16 alterações. ....	27
Tabela 5- Frequência relativa (em percentagem arredondada à unidade) de cada classificação, para cada exão, para o total de alterações encontradas em cada exão. ....	27
Tabela 6- Variantes patogénicas e provavelmente patogénicas detetadas no gene STK11...28	28
Tabela 7- Caracterização dos pacientes de acordo com a resposta terapêutica: “progressão da doença ou morte” ou “boa resposta durante um longo período” .....	29
Tabela 8- Caracterização da população estudada. Frequências absolutas e frequências relativas (em percentagem arredondada à unidade) de cada tipo e subtipo histológico. ....	30
Tabela 9- Frequências absolutas e frequências relativas (em percentagem arredondada à unidade) de alterações genéticas patogénicas/ provavelmente patogénicas de acordo com o tipo/ subtipo histológico.....	30
Tabela 10- Frequência absoluta e relativa (em percentagem arredondada à décima) de exões do <i>STK11</i> estudados.....	31

## Índice de Figuras

- Figura 1- Inibidores de checkpoints imunológicos PD1/PD-L1. Esquerda- A ligação de PD-L1 (presente em células tumorais) ao PD-1 (presente em linfócitos T) impede a atuação eficaz de linfócitos T na eliminação de células cancerígenas. Direita- A utilização de um anticorpo anti PD-(L)1 que bloqueie a ligação PD1-PD-L1 permite a atuação eficaz de linfócitos T na eliminação de células cancerígenas. (Fonte: Terese Winslow, 2015) ..... 4
- Figura 2- Inibidores de *checkpoints* imunológicos CTLA-4. Esquerda- A ligação de B7 (presente em células apresentadoras de antígeno) a CTLA-4 (presente em células cancerígenas) impede a atuação eficaz dos linfócitos T para eliminação de células tumorais. Direita- A utilização de um anticorpo para CTLA-4 que bloqueie a ligação CTLA-4 a B7 permite que a célula T efetue a sua função eficazmente. (Fonte: Terese Winslow, 2019).....5
- Figura 3- Ativação LKB1-AMPK e sua função no metabolismo celular, de forma a produzir energia. Para esse fim, o complexo ativado promove a acumulação e posterior  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos e reduz a síntese de lípidos; promove a acumulação de glucose e a glicólise e reduz a síntese de glicogénio. (Adaptado de: Elvire Pons-Tostivint et al, 2021).....7
- Figura 4- Ativação de LKB1-AMPK e sua consequência em mTORC1 e ULK1. A ativação de LKB1-AMPK inibe a mTORC1 e deste modo inibe a produção de proteínas, e regula negativamente HIF-1 $\alpha$ , o qual está envolvido no metabolismo anaeróbico. A ativação LKB1-AMPK vai também ativar ULK1 necessária para iniciar autofagia. (Fonte: Mohammed Bourouh , Paola A Marignani, 2022)..... 8
- Figura 5- Ativação dos fatores de transcrição TFEB/TFE3 via LKB1-AMPK, os quais estão envolvidos na promoção de autofagia. A ativação de LKB1-AMPK leva à inativação mTORC1 o qual promove a desfosforilação do TFEB e TFE3, ativando-os. (Fonte: Endo H, et al. 2018) ... 9
- Figura 6- Envolvimento da AMPK na ativação dos fatores de transcrição PGC-1 $\alpha$  e FOXO, fatores de transcrição relacionados com autofagia. AMPK ativado promove direta ou indiretamente fosforilação e desacetilação dos referidos fatores de transcrição, tornando-os funcionais. (Fonte: Lee DH., 2010)..... 9
- Figura 7- Representação da ativação da LKB1-AMPK devido a stress metabólico, o qual gera ROS, e a subsequente ação do fator de transcrição NRF2 na regulação de stress antioxidante por promover a transcrição de genes antioxidantes. (Fonte: Endo H, et al. 2018) .....10

Figura 8- Produção de interferão tipo I e citocinas dependente de STING. STING recruta e ativa TBK1, a qual fosforila o fator de transcrição IRF3 para induzir a produção de IFN-I. TBK1 está também envolvida na produção de outras citocinas. (Fonte: Balka K.R. et al, 2020) .....13

Figura 9- Relação da via metabólica “serina-glicina-um carbono” com a via de sinalização mTORC1. A inativação de *STK11* ativa mTORC1 e este vai provocar a ativação da via metabólica “serina-glicina-um carbono”, levando a níveis aumentados do produto SAM (Fonte: Zeng J deng, et al, 2019).....14

Figura 10- Desregulação de *STK11* e suas consequências no funcionamento de STING. A desregulação do complexo LKB1-AMPK, promove indiretamente o aumento do funcionamento de enzimas de silenciamento epigenético envolvidas na metilação do promotor de STING, causando regulação negativa e repressão desta. (Adaptado de: Mograbi B, et al, 2021).....14

Figure 11- Representação esquemática do gene *STK11*, nomeadamente das zonas codificantes e não codificantes (UTR), e dos exões e intrões. Está representada na figura a distribuição das variantes genéticas por exão e o seu tipo.....28

## 1. Introdução

### 1.1. Cancro do pulmão

O cancro do pulmão é um problema de saúde que afeta milhares de pessoas todos os anos, e onde por vezes a terapia tem fraca eficácia. Existem diversas abordagens terapêuticas e regimes para os pacientes com cancro do pulmão, dependendo, de fatores relacionados com o tipo de tumor e estadiamento. Os doentes, quando sujeitos à imunoterapia, apresentam em alguns casos progressão da doença ou mesmo morte, e nesse sentido tem havido esforços para perceber os princípios biológicos associados à não resposta deste grupo de fármacos. Sabe-se que o *STK11* é um gene que poderá influenciar o funcionamento do sistema imune. Uma alteração genética neste gene pode ter influência na resposta dos pacientes à imunoterapia, por provocar alterações na resposta imunológica que impedirão a atuação de terapias como os inibidores de *checkpoints* imunológicos.

#### 1.1.1. Epidemiologia

O cancro do pulmão é o terceiro tipo de cancro mais diagnosticado em todo o mundo e a maior causa de morte relacionada com cancro (1). Em Portugal, é o quarto tipo de cancro mais frequente e a principal causa de morte relacionada com cancro, considerando todas as idades e género (1).

O cancro do pulmão estava inicialmente associado a países desenvolvidos, mas nos últimos anos tem-se vindo a registar uma incidência crescente da doença principalmente em países subdesenvolvidos (2).

#### 1.1.2. Tipos Histológicos

Existem diferentes tipos histológicos do cancro do pulmão. Pode-se dividir em dois grandes grupos histológicos: cancro do pulmão de não-pequenas células (*non-small cell lung cancer* - NSCLC) e cancro do pulmão de pequenas células (*small cell lung cancer* - SCLC). O NSCLC corresponde a 85-90% dos casos, e é o tipo mais comum de cancro do pulmão apresentando um crescimento e metastização mais lentos (3). Existem três subtipos de NSCLC, que se distinguem pelo tipo de células que entraram em proliferação descontrolada. O adenocarcinoma é o subtipo mais frequente correspondendo a 40%. Este pode surgir em não-fumadores e é mais comum em mulheres e jovens. O tumor tem início nas células que revestem os alvéolos pulmonares e produzem muco e é por norma mais periférico. Um outro subtipo é o carcinoma de células escamosas/carcinoma epidermóide, que corresponde a 25-30%, tem origem nas células de revestimento das vias aéreas dos pulmões, sendo um tumor mais

central, localizado perto dos brônquios. Este tipo de cancro afeta principalmente fumadores. O outro subtipo é o carcinoma de grandes células que corresponde a 10-15%, este pode surgir em qualquer zona do pulmão e é o subtipo mais agressivo, com capacidade de proliferação e metastização rápida (3). Há mais subtipos de NSCLC, como o carcinoma sarcomatóide, mas que não têm expressividade estatística. Já o SCLC corresponde a 10-15% dos cancros do pulmão, não afetando, usualmente, os não-fumadores. Este tipo de tumor prolifera rapidamente e tem mais propensão a metastizar do que o tipo NSCLC (3).

### **1.1.3. Estadiamento**

O estadiamento permite desenvolver um prognóstico e é importante para definir a terapia para cada paciente com base na magnitude do tumor primário, bem como na extensão da sua disseminação. O estadiamento, segundo a classificação TNM de 2017 (*tumor - T, node - N and distant metastasis - M*): T refere-se ao tamanho do tumor primário, N refere-se à disseminação da doença para os gânglios linfáticos próximos e M indica se existe presença de metástase à distância. O estadiamento TNM está dividido em cinco categorias: Estadio 0- carcinoma *in situ*; Estadio I- cancro localizado numa pequena região e não disseminado para os gânglios linfáticos ou para outros tecidos. Estadio II- cancro localizado numa região maior, mas que não se disseminou para os gânglios linfáticos ou outros tecidos; Estadio III- cancro disseminado para os gânglios linfáticos ou outros tecidos adjacentes; Estadio IV- com metastização à distância. Os estadios III e IV subdividem-se em IIIA e IIIB; IVA e IVB, respetivamente. O estadio IIIA pressupõem que o cancro disseminou para os gânglios linfáticos no tórax no mesmo lado do pulmão afetado. O estadio IIIB refere-se ao cancro que disseminou para gânglios do outro lado do tórax ou para outros órgãos. O estadio IVA pressupõe que o cancro se disseminou no tórax e/ou disseminou para uma área fora do tórax. O estadio IVB pressupõe que o cancro disseminou para fora do tórax para mais de um local num ou mais órgãos (4).

### **1.1.4. Tratamento**

O tratamento proposto ao paciente depende de vários fatores, tais como o tipo histológico (NSCLC ou SCLC), o estadiamento e a condição de saúde geral do paciente, podendo ser efetuado um único tipo de tratamento ou uma combinação de terapias. As terapias podem ser repetidas em função da evolução da doença. Existem várias abordagens terapêuticas para o cancro do pulmão, como a cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, e outras menos comuns como crioterapia, terapia fotodinâmica, terapia por radiofrequência e terapia laser.

### 1.1.4.1 Imunoterapia

Como parte de sua função normal, o sistema imunológico deteta e destrói células anormais e previne ou restringe o desenvolvimento de cancro. Não obstante, as células cancerígenas têm formas de evitar a destruição pelo sistema imunológico, por exemplo através de alterações genéticas que as tornam menos imunogênicas, através de proteínas na sua superfície que inativam as células imunológicas ou através de alteração do microambiente tumoral (5). A imunoterapia tem como função auxiliar o sistema imunológico na sua atuação para controlar o desenvolvimento de cancro (5).

Existem várias formas de imunoterapia, entre elas destacam-se os inibidores de *checkpoints* imunológicos, que são anticorpos que se ligam a proteínas de *checkpoint* imunológico, as quais são proteínas inibitórias do sistema imunológico, pois têm como função controlar a duração e a magnitude das respostas imunes (6). Quando as proteínas de *checkpoint* imunológico se associam ao seu ligando um sinal inibitório é produzido, e isso pode impedir que o sistema imunológico elimine eficazmente o tumor. Assim, os inibidores de *checkpoints* imunológicos funcionam bloqueando esta ligação (6).

Os inibidores mais comumente usados são os inibidores do antígeno 4 associado a linfócitos citotóxicos (CTLA-4) (como por exemplo: Ipilimumab e Tremelimumab) e da proteína de morte celular programada (PD-1) (como por exemplo: Pembrolizumab, Cemiplimab e Nivolumab) / ligando de PD-1 (PD-L1) (como por exemplo: Durvalumab). Por vezes é usada uma combinação de inibidores de CTLA-4 e PD-(L)1 (7).

A ligação de PD-L1 (em células tumorais) ao PD-1 (em linfócitos T) impede a atuação eficaz dos linfócitos T para eliminação de células tumorais (Figura 1-painel esquerdo). Bloquear a ligação de PD-L1 a PD-1 com um inibidor de *checkpoint* imunológico (anticorpo anti-PD-L1 ou anti-PD-1) permite a atuação eficaz dos linfócitos T na eliminação de células tumorais (Figura 1-painel direito)(8).

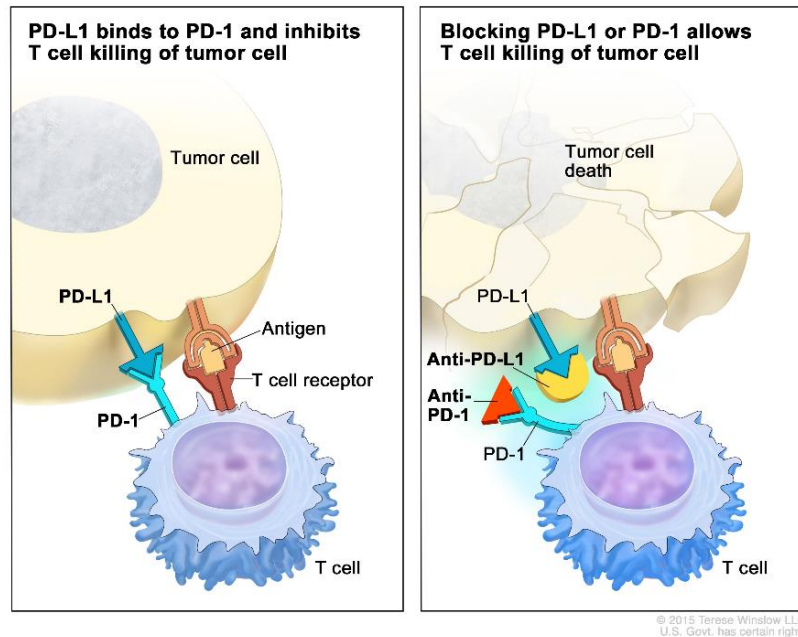


Figura 1- Inibidores de *checkpoints* imunológicos PD1/PD-L1. Esquerda- A ligação de PD-L1 (presente em células tumorais) ao PD-1 (presente em linfócitos T) impede a atuação eficaz de linfócitos T na eliminação de células cancerígenas. Direita- A utilização de um anticorpo anti PD-(L)1 que bloqueie a ligação PD1-PD-L1 permite a atuação eficaz de linfócitos T na eliminação de células cancerígenas. (Fonte: Terese Winslow, 2015)

Quando o recetor de linfócitos T (TCR) reconhece o complexo péptido-complexo principal de histocompatibilidade (MHC) à superfície da célula apresentadora de antígeno (APC) e recebe uma sinalização mediada pela interação entre CD28 (em linfócitos T) e B7-1/B7-2 (em APC), os linfócitos T podem ser ativados. No entanto, a ligação de B7-1/B7-2 a CTLA-4 (em linfócitos T) impede a atuação eficaz dos linfócitos T para eliminação de células tumorais (Figura 2–painel esquerdo). Bloquear a ligação de B7-1/B7-2 a CTLA-4 com um inibidor de *checkpoint* imunológico (anticorpo anti-CTLA-4) permite que a atuação eficaz dos linfócitos T na eliminação de células tumorais (Figura 2 –painel direito)(8).

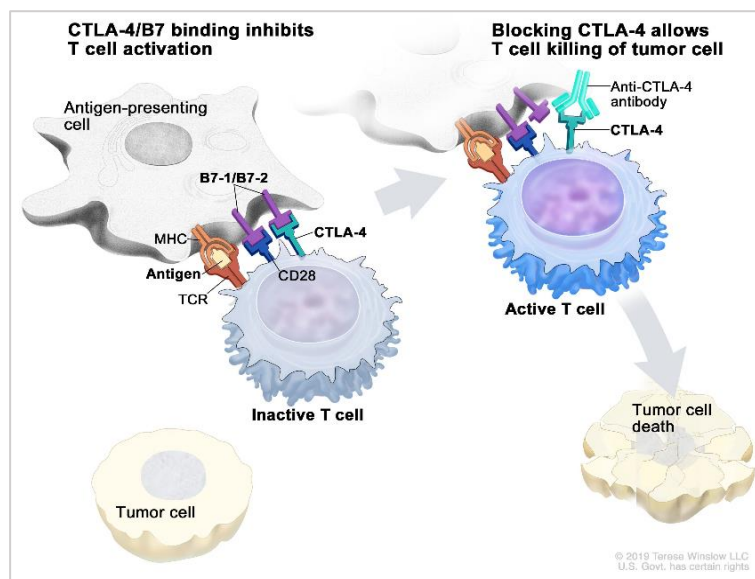


Figura 2- Inibidores de *checkpoints* imunológicos CTLA-4. Esquerda- A ligação de B7 (presente em células apresentadoras de antígeno) a CTLA-4 (presente em células cancerígenas) impede a atuação eficaz dos linfócitos T para eliminação de células tumorais. Direita- A utilização de um anticorpo para CTLA-4 que bloqueie a ligação CTLA-4 a B7 permite que a célula T efetue a sua função eficazmente. (Fonte: Terese Winslow, 2019)

### 1.1.5. Percurso terapêutico dos pacientes com NSCLC

Geralmente nos pacientes com carcinoma *in situ*, ou seja localizado, é realizada cirurgia com intuito curativo, sendo que nestes casos mais simples podem ser adotadas outras terapias menos comuns como crioterapia, terapia fotodinâmica, terapia por radiofrequência e terapia laser (9).

Para tumores em estadio I é frequente que se proceda à cirurgia para remoção do tumor, seguida de quimioterapia e/ou radioterapia e/ou imunoterapia, de forma a eliminar eventuais células cancerígenas que não tenham sido removidas pela cirurgia (9).

Para tumores em estadio II é comum realizar imunoterapia ou quimioterapia antes da cirurgia, para reduzir a dimensão do tumor com o intuito de facilitar o procedimento cirúrgico (9).

Para tumores em estadio III ou IV, está indicado o estudo dos biomarcadores de forma identificar possíveis terapias dirigidas a alvos moleculares que poderão ser administradas em concomitância com quimioterapia ou radioterapia.

O tratamento inicial para o estadio IIIA, com resultado de biomarcadores negativo, é quimioterapia, combinada ou não com radioterapia. A cirurgia pode ser uma opção após o tratamento neoadjuvante. Nos casos em que a realização de quimioterapia não for possível, a imunoterapia pode ser considerada (9).

O procedimento comum de tratamento para o estadió III B, com resultado de biomarcadores negativo, é quimioterapia e radioterapia (se o paciente reunir condições para tal) e caso a doença se mantiver estável após duas destas sessões pode ser sugerido imunoterapia. Os pacientes que não apresentam as condições necessárias para seguir a terapia descrita, são geralmente tratados apenas por radioterapia ou, menos frequentemente, apenas com quimioterapia. Se em algum caso a realização de cirurgia, quimioterapia e radioterapia não for favorável, a imunoterapia pode ser considerada como tratamento primário (9).

O estadió IV do cancro do pulmão é dificilmente curável devido à disseminação da doença, sendo o principal objetivo do tratamento prolongar a vida do paciente e a sua qualidade e aliviar sintomas.

No caso de o cancro ter metastizado apenas para um local (o que não é comum) –estadió IVA, a prática terapêutica, caso o resultado de biomarcadores seja negativo, passa por realizar cirurgia ou radioterapia na metástase e posteriormente tratar o tumor primário (9).

Nos casos em que o cancro disseminou em grande escala –estadió IV B, é comum, caso o resultado de biomarcadores seja negativo, testar o tumor para a expressão da proteína PD-L1. Tumores com sobre-expressão de PD-L1 geralmente respondem melhor à imunoterapia com base em inibidores de *checkpoints* imunológicos, os quais podem ser aplicados em monoterapia (Pembrolizumab, Atezolizumab ou Cemiplimab; Nivolumab e Ipilimumab; Durvalumab e Tremelimumab) ou em concomitância com quimioterapia (9).

Se, em qualquer um dos estadios, o cancro progredir durante qualquer que seja o tratamento inicial, um tratamento de segunda linha deve ser tido em conta.

Um tumor primário do pulmão de pequenas dimensões que recidive nos pulmões pode ser tratado com cirurgia ou radioterapia (se não tiverem sido usados antes). Os cancros que recidivam nos gânglios linfáticos entre os pulmões geralmente são tratados com quimioterapia em conjunto ou não com radioterapia (se não tiver sido usada antes). No caso dos cancros que recidivam em outros locais que não a zona do pulmão, a quimioterapia, as terapias dirigidas e/ou a imunoterapia são os tratamentos mais frequentes.

Em certos pacientes, o tratamento tem apenas intuito paliativo, sendo que nestes casos os tratamentos frequentes são a quimioterapia, radioterapia ou mesmo outras terapias dirigidas.

## **1.2. Função biológica do *STK11***

O gene serine threonine kinase 11 (*STK11*), codifica para a proteína cinase hepática B1 (LKB1), está localizado no braço curto do cromossoma 19 (19p 13.3) e é constituído por nove exões codificantes e um não codificante (10). A proteína LKB1 está expressa numa proporção equilibrada em todos os

tecidos do corpo, nomeadamente no pulmão, sendo as exceções os tecidos conjuntivo e tecidos moles, no qual a expressão proteica é mais baixa e ainda o olho onde a proteína não é expressa.

A proteína em questão funciona como supressor tumoral e desempenha importantes funções a nível de metabolismo energético (proteínas, lípidos e glúcidos). A proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) está a jusante da LKB1 na cascata de sinalização, sendo ativada por fosforilação(11). Esta funciona como sensor metabólico e é ativada por acumulação de adenosina monofosfato (AMP) em detrimento de adenosina trifosfato (ATP), promovendo a mudança do estado anabólico (consumo de energia) para catabólico (produção de energia, nomeadamente sob a forma de ATP e nicotinamida adenina dinucleotídeo + hidrogénio (NADPH)). A AMPK promove a acumulação e posterior  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos e reduz a síntese de lípidos; promove a acumulação de glucose e a glicólise e reduz a síntese de glicogénio (Figura 3)(12).

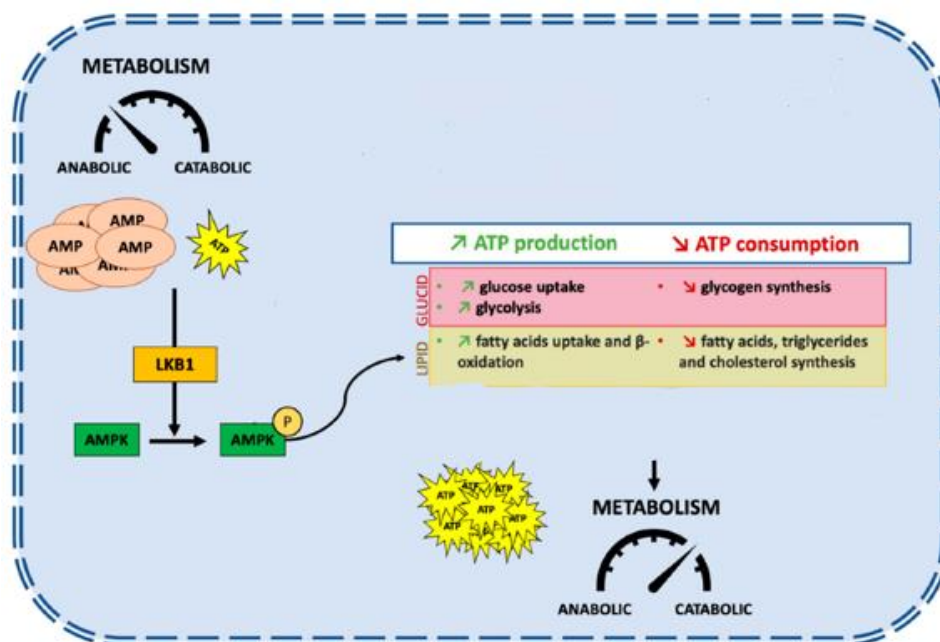


Figura 3– Ativação LKB1-AMPK e sua função no metabolismo celular, de forma a produzir energia. Para esse fim, o complexo ativado promove a acumulação e posterior  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos e reduz a síntese de lípidos; promove a acumulação de glucose e a glicólise e reduz a síntese de glicogénio. (Adaptado de: Elvire Pons-Tostivint et al, 2021)

O alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) está presente em inúmeras vias de sinalização e existe em duas formas, a mTORC1 e mTORC2. A mTORC1 atua principalmente a nível do crescimento celular, metabolismo, síntese de proteínas e inibe autofagia, já mTORC2 atua a nível da proliferação celular e apoptose (13). A ativação de LKB1-AMPK inibe a mTORC1 (11) e deste modo inibe a produção de proteínas, e regula negativamente o fator induzido por hipoxia- 1 (HIF-1 $\alpha$ ) o qual está envolvido no metabolismo anaeróbico, nomeadamente relacionado com angiogénese e glicólise anaeróbica (12). A

referida ativação vai também ativar a cinase ativadora de autofagia 1 tipo Unc-51 (ULK1) necessária para iniciar autofagia, que consiste na degradação e reutilização de componentes celulares(14) (Figura 4)(15).

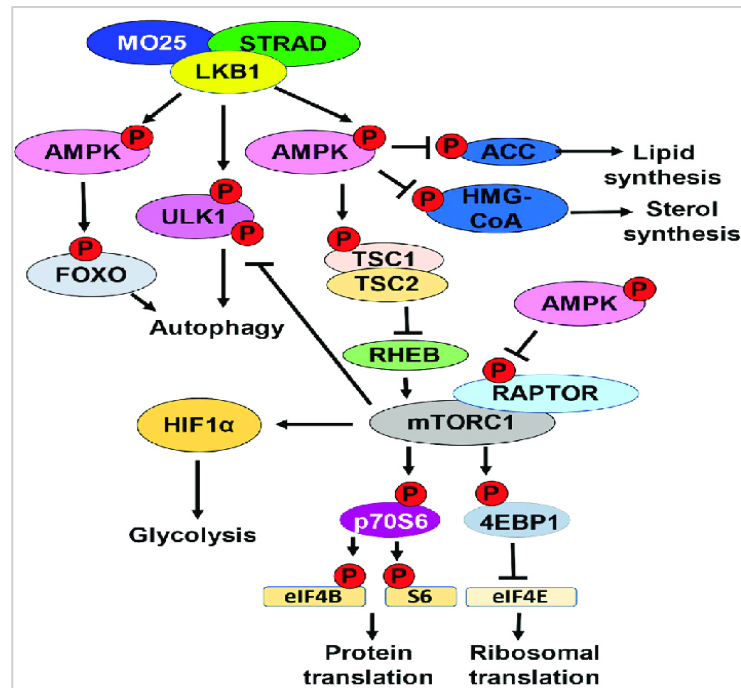


Figura 4- Ativação de LKB1-AMPK e sua consequência em mTORC1 e ULK1. A ativação de LKB1-AMPK inibe a mTORC1 e deste modo inibe a produção de proteínas, e regula negativamente HIF-1 $\alpha$ , o qual está envolvido no metabolismo anaeróbico. A ativação LKB1-AMPK vai também ativar ULK1 necessária para iniciar autofagia. (Fonte: Mohammed Bourouh , Paola A Marignani, 2022)

A inativação mTORC1 promove ainda a desfosforilação do TFEB e TFE3, ativando-os e a AMPK está envolvida na ativação FOXO e PGC-1 $\alpha$ , todos eles fatores de transcrição relacionados com expressão de genes envolvidos em autofagia (16) (Figuras 5 e 6)(17)(18).

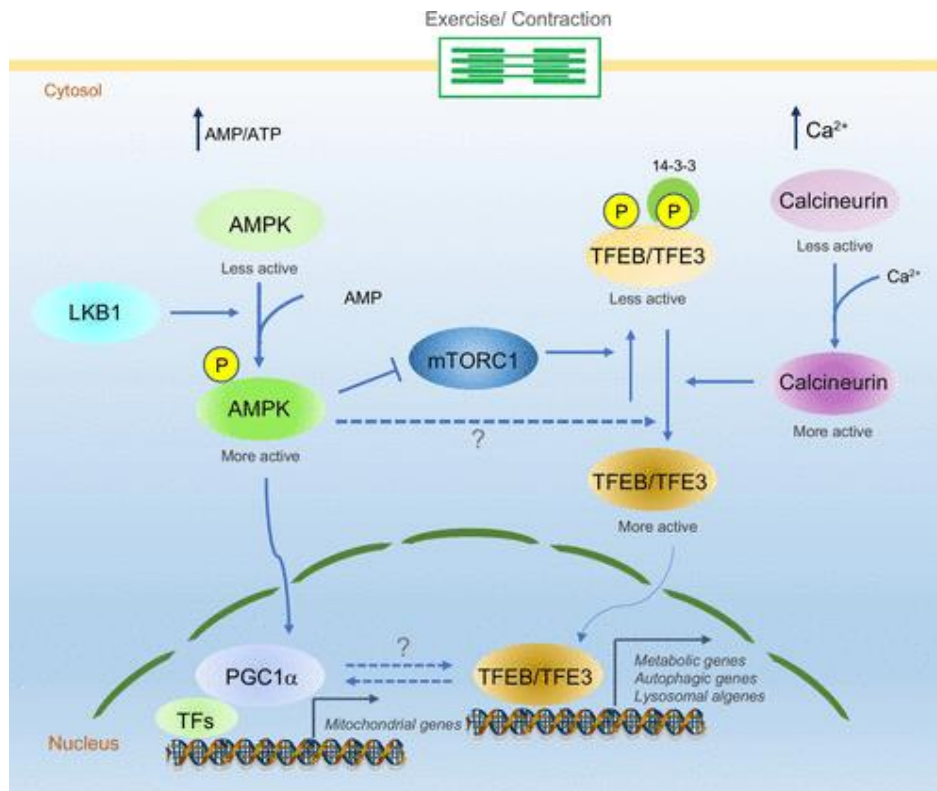


Figura 5- Ativação dos fatores de transcrição TFEB/TFE3 via LKB1-AMPK, os quais estão envolvidos na promoção de autofagia. A ativação de LKB1-AMPK leva à inativação mTORC1 o qual promove a desfosforilação do TFEB e TFE3, ativando-os. (Fonte: Endo H, et al. 2018)

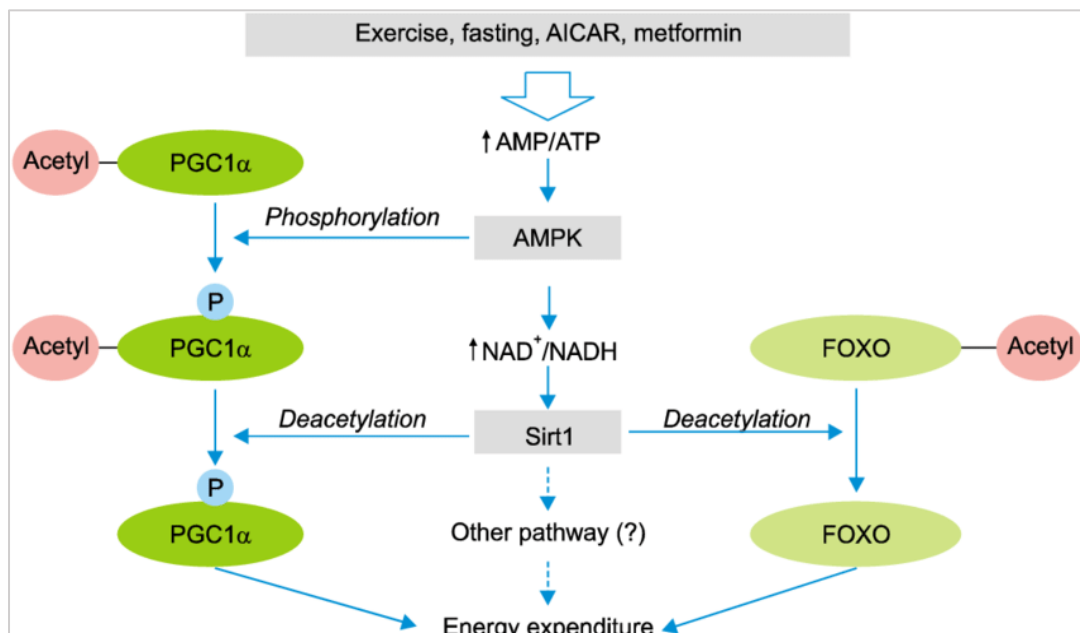


Figura 6- Envolvimento da AMPK na ativação dos fatores de transcrição PGC-1 $\alpha$  e FOXO, fatores de transcrição relacionados com autofagia. AMPK ativado promove direta ou indiretamente fosforilação e desacetilação dos referidos fatores de transcrição, tornando-os funcionais. (Fonte: Lee DH., 2010)

A ativação LKB1-AMPK está envolvida na resolução de situações de stress oxidativo, envolvendo dano no DNA por radicais livres de oxigênio (ROS), que se formam como resultado do metabolismo aeróbio. O AMPK ativado fosforila e ativa o fator de transcrição NRF2, o qual interage com *KEAP1*, que é um gene que codifica uma ubiquitina ligase, que é um regulador negativo da degradação proteossomal de NRF2. O NRF2 está envolvido na transcrição de genes antioxidantes, como descrito abaixo (Figura 7) (17).

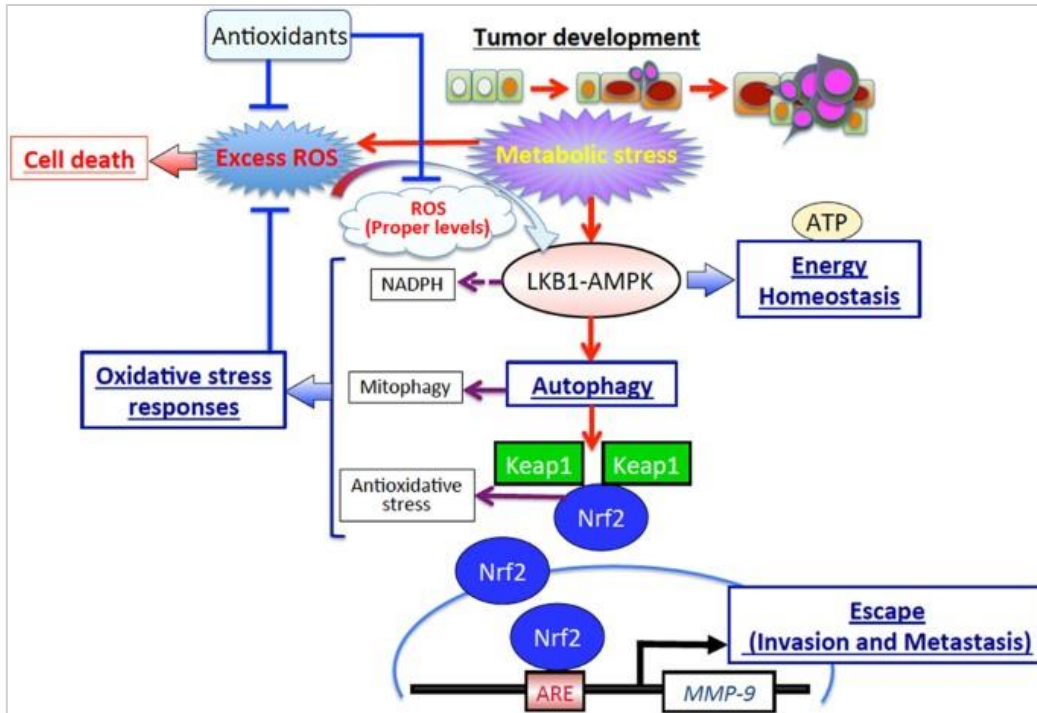


Figura 7- Representação da ativação da LKB1-AMPK devido a stress metabólico, o qual gera ROS, e a subsequente ação do fator de transcrição NRF2 na regulação de stress antioxidante por promover a transcrição de genes antioxidantes. (Fonte: Endo H, et al. 2018)

O *STK11/LKB1* desempenha funções no metabolismo da glutamina, a qual é uma fonte de energia nas células cancerígenas e a glutamina também atua como doador de azoto na síntese de pirimidina e purina através da carbamoil fosfato sintetase 1 (CPS1), uma enzima do ciclo da ureia. Foi demonstrado que *STK11/LKB1* regula negativamente a transcrição de CPS1 via efeitos mediados por AMPK e que as células do cancro de pulmão mutantes *KRAS/STK11* regulam positivamente a expressão de CPS1, permitindo a divisão celular e o desenvolvimento do tumor.

Além disso, o metabolismo da glutamina também desempenha um papel crucial na homeostase redox via glutatona, a qual está envolvida na proteção das células contra danos oxidativos, devido à capacidade de a glutatona passar do estado oxidado a reduzido. A enzima glutamato-cisteína ligase condensa glutamato e cisteína em g-glutamilcisteína, e depois a glutatona é produzida via glutatona sintetase. O NRF2 é um fator de transcrição com papel fundamental na defesa celular contra stress oxidativo, regulando a glutatona sintetase. Assim, pode-se dizer que KEAP1 promove a transcrição de genes que codificam proteínas antioxidantes e que a perda de *STK11/LKB1* implica uma acumulação

de ROS. A perda de *STK11/LKB1* resulta no aumento do nível de ROS e elevado stress redox, o qual induz a seleção positiva para perda de KEAP1, que promove a regulação positiva da via NRF2 com um aumento na transcrição da glutamato-cisteína ligase, catalisando a produção de glutathione. Essa ativação da via NRF2 permite que células deficientes em *STK11/LKB1* destoxifiquem e promove a sobrevivência de forma independente de *STK11/LKB1*(12).

Devido a todas as mudanças no metabolismo de forma a produzir mais energia e reduzir o seu gasto, enquanto se mantém a homeostasia redox, a proliferação celular e crescimento acontecem numa taxa mais baixa.

### **1.3. Alterações genéticas do *STK11***

As alterações genéticas do *STK11* são principalmente somáticas e estão presentes em várias linhas celulares tumorais, sendo que a maior prevalência dessas alterações é em cancro do pulmão. As alterações de perda de função neste gene são principalmente *nonsense*, perda de heterozigotia, inserções, deleções do gene completo ou intragénicas, e deleções cromossómicas, resultando em proteínas truncadas, principalmente, e outros problemas na sua produção, perda da atividade de cinase (o domínio catalítico com atividade cinase localiza-se nos codões 50-337), problemas de estabilidade e alteração da localização da proteína (12), sendo que esta localiza-se normalmente no nucleoplasma e adicionalmente no citosol (19). Um dos principais *hotspots* mutacionais do gene é a repetição de seis cisteínas em c.837-842, bem como mutações de *splicing* em quase todos os exões/intrões, tanto no local aceitador como dador, entre outros (Tabela 1) (20)(21). Até à data não foram descritos na literatura *hotspots* mutacionais do gene *STK11* específicos no cancro do pulmão.

Tabela 1- Hotspots mutacionais do *STK11*. A coluna da esquerda indica os aminoácidos (identificados por letra) da cadeia proteica original e a sua posição. A coluna do meio evidencia as variantes mais comuns no *STK11* por ordem de frequência, sendo o asterisco indicativo de uma variante que resulta numa proteína truncante, o sp indica uma alteração de splicing no codão desse aminoácido, e as letras indicam que houve uma substituição de bases azotadas resultando na substituição do aminoácido da esquerda pelo da direita (também identificado por letra). A coluna da direita identifica o exão a que pertence o aminoácido em causa. (Fonte: Cancer Hotspots, 2023)

Aminoácido	Variante	Exão
K84	*	1
X97	sp	1
X125	sp	2
X155	sp	3
E165	*QK	4
H174	HDLR Y	4
P179	LQR	4
N181	ISTY	4
D194	YNVGH	4
G196	VGR	4
X200	sp	5
S216	FS	5
Q220	*P	5
P221	LPS	5
E223	*KV	5
W239	C*S	5
G242	VWGR	5
X245	sp	5
G251	VCR	6
X288	sp	6
X307	sp	7
W308	LC*	8

#### 1.4. Relação do *STK11* com o sistema imunológico e impacto na imunoterapia

Sabe-se que existe uma ligação entre *STK11* e o *STING*. *STING* é uma proteína citosólica ativada pela presença de DNA de cadeia dupla (dsDNA) livre no citoplasma, resultante por exemplo de um tumor. Essa ativação promove a oligomerização da *STING* no retículo endoplasmático-membrana de Golgi e a proteína passa a ser capaz de recrutar e ativar a cinase de ligação ao TANK 1 (TBK1), a qual fosforila o fator de transcrição IRF3 para induzir a produção de interferões tipo I (IFN-I) e TBK1 está também

envolvida na produção de outras citocinas como por exemplo CXCL10, levando ao recrutamento de células T (Figura 8)(22).

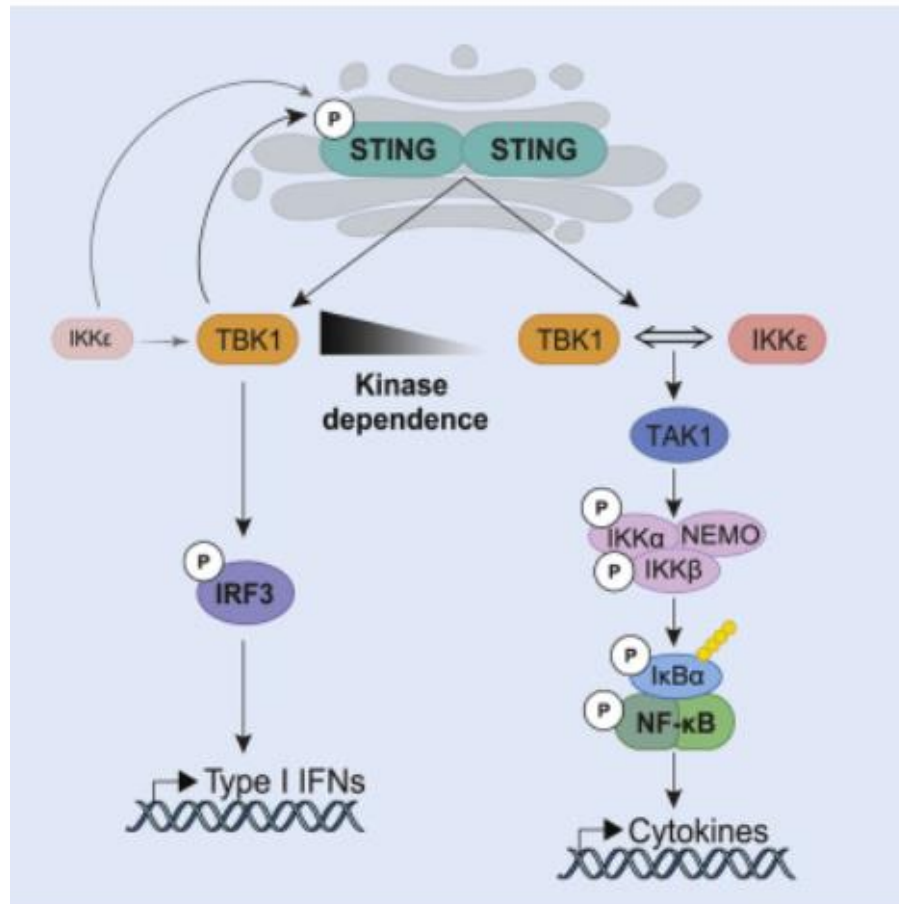


Figura 8- Produção de interferão tipo I e citocinas dependente de STING. STING recruta e ativa TBK1, a qual fosforila o fator de transcrição IRF3 para induzir a produção de IFN-I. TBK1 está também envolvida na produção de outras citocinas. (Fonte: Balka K.R. et al, 2020)

A inativação de *STK11* ativa mTORC1 e este vai provocar a ativação da via metabólica “serina-glicina-um carbono” (Figura 9) (23), levando a níveis aumentados do produto S-adenosil metionina (SAM), que é um substrato para múltiplas enzimas de silenciamento epigenético, como a DNA metiltransferase-1 (DNMT1) e a histona-lisina N-metiltransferase (EZH2), que estão diretamente envolvidas na metilação do promotor de *STING*, causando regulação negativa e repressão desta (Figura 10) (16).

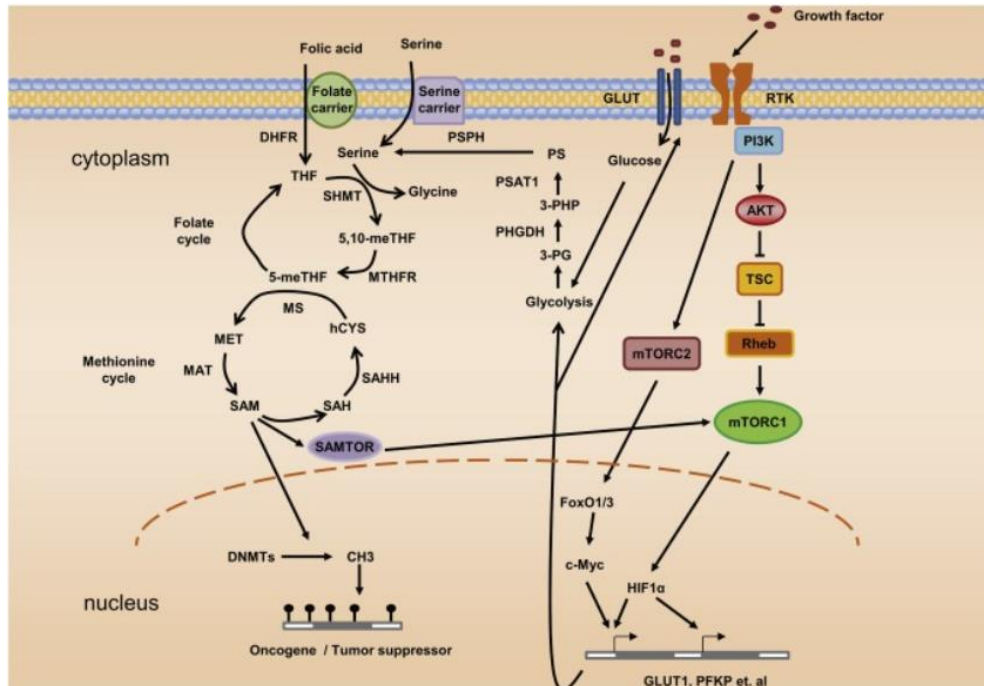


Figura 9- Relação da via metabólica “serina-glicina-um carbono” com a via de sinalização mTORC1. A inativação de *STK11* ativa mTORC1 e este vai provocar a ativação da via metabólica “serina-glicina-um carbono”, levando a níveis aumentados do produto SAM (Fonte: Zeng J deng, et al, 2019)

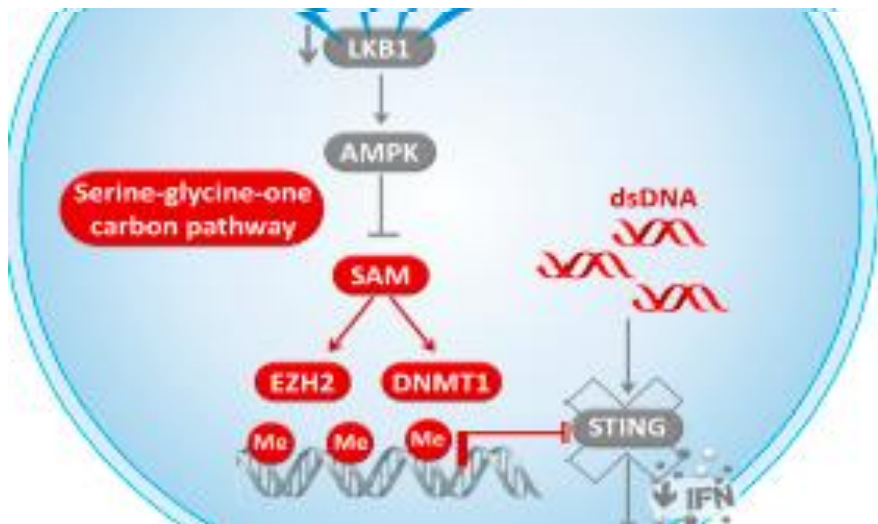


Figura 10- Desregulação de *STK11* e suas consequências no funcionamento de STING. A desregulação do complexo LKB1-AMPK, promove indiretamente o aumento do funcionamento de enzimas de silenciamento epigenético envolvidas na metilação do promotor de STING, causando regulação negativa e repressão desta. (Adaptado de: Mograbi B, et al, 2021)

O IFN-I apresenta diversas funções a nível do sistema imune, as quais ficam comprometidas, devido às alterações em *STK11*, pois há uma redução na produção da molécula. Destacam-se para este estudo a capacidade de IFN-I induzir a expressão de CCL5 e outras quimiocinas de células T(24) (25). CCL5 regula o recrutamento, migração, ativação e proliferação de células T e células natural killer (NK). Além disso, o IFN-I aumenta a citotoxicidade das células NK(26). Destaca-se ainda a capacidade do interferão induzir a produção do ligando PD-L1 (27), alvo de alguns inibidores de *checkpoints* imunológicos (28). O interferão pode ainda aumentar a expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade e deste modo promover a resposta de células T CD8 e T CD4 (29)(30), tem também a capacidade de ativar macrófagos tipo 1(31) e de atenuar a resposta regulatória dos linfócitos T reguladores, pois evita a sua infiltração e proliferação no tumor(26)(24) (32). O IFN-I aumenta a expressão de antígenos associado ao tumor, resultando num maior reconhecimento e captação dos mesmos por células apresentadoras de antígeno e apresentação às células T CD8 (citotóxicas). Promove também a diferenciação, maturação e migração das células dendríticas para os gânglios linfáticos para ativar as células T CD8+ e aumentam a acumulação intratumoral das mesmas (26). Os IFN-I inibem a infiltração de neutrófilos, a sua longevidade e a produção de citocinas pelos mesmos(26). Os neutrófilos, através da sua atividade inflamatória promovem o cancro, pelo aumento de danos no DNA, angiogénese e imunossupressão (33). O IFN-I inibe ainda respostas de células T helper 17 (34), as quais produzem citocinas que promovem a produção e recrutamento de neutrófilos (35)(24). Além disso, os IFNs do tipo I diminuem a diferenciação e a maturação das células supressoras derivadas da linhagem mieloide e bloqueiam sua atividade supressora nas células T CD8+(26)(24). Estas células são caracterizadas pela capacidade de suprimir as respostas imunes e se expandirem durante um evento tumoral(36).

Uma outra vertente afetada pelas alterações em *LKB1* é o metabolismo energético das células imunes, já que, como referido anteriormente, a proteína em questão desempenha funções a nível metabólico. Para a ativação das células T, estas alteram a sua atividade metabólica de forma a atender aos gastos energéticos provenientes do crescimento celular, proliferação e execução da sua função. As células T ativadas geram ATP principalmente por promoverem a acumulação de glicose e efetuarem glicólise. As vias de transdução de sinal que regulam o metabolismo das células T ainda não são totalmente compreendidas. Sabe-se, no entanto, que um dos alvos que ligam *LKB1* ao metabolismo celular é a proteína AMPK, ativada por *LKB1* sob condições de stress energético, promovendo a conservação de ATP por ativação de vias catabólicas e inibição de vias anabólicas. Sabe-se também que *LKB1* tem um papel de relevo na viabilidade e renovação das células estaminais hematopoiéticas. Assim, percebe-se que alterações em *LKB1* podem ter um impacto significativo na ativação e execução das funções de células T.

Por todas estas razões, alterações no *STK11* têm um impacto significativo no funcionamento do sistema imunológico, nomeadamente na quantidade e função de células T, sugerindo que terapias para o cancro do pulmão baseadas no sistema imunológico como os inibidores de *checkpoints* imunológicos não executem a sua função, quando administrados num paciente que apresente *LKB1* alterado.

### **1.5. Impacto preditivo e impacto prognóstico das alterações do *STK11***

As alterações no *STK11* são frequentemente acompanhadas de mutações em outros genes tais como *KRAS* (atividade proto-oncogénica), *KEAP1*, *TP53* (gene supressor tumoral) e *SMARCA4* (codifica para uma proteína com atividade de helicase e ATPase, regulando a transcrição de genes (37)), e assim, a previsão do impacto prognóstico e preditivo das alterações no *STK11* deve ser avaliado tendo em conta essas mutações concomitantes.

O prognóstico está relacionado com a progressão natural da doença. Um biomarcador de prognóstico informa sobre o possível desfecho (recorrência da doença, progressão da doença ou morte), independentemente do tratamento recebido.

O teste preditivo está relacionado com o impacto de um tratamento específico sobre a progressão natural da doença. Um biomarcador prediz se o efeito do tratamento (experimental, comparado com grupo de controlo) é diferente para pacientes biomarcador-positivo em comparação com pacientes biomarcador-negativo (38).

A presença de mutações no *STK11* em associação com mutações adicionais no *KRAS*, *KEAP1* ou *SMARCA4* foi descrita como um fator prognóstico negativo para a sobrevida global de pacientes com NSCLC (16). Em contraste, as mutações *STK11/TP53* conferiram um melhor prognóstico. Sabe-se que mutações no *TP53* favorecem um sistema imunológico mais forte, nomeadamente uma maior densidade de células CD8+ (12).

Por outro lado, não se sabe com certeza se as mutações *STK11* são preditivas de resposta à imunoterapia, já que existem resultados contraditórios. Aferiu-se, no entanto, que em alguns casos de NSCLC com mutações *STK11* tratadas com imunoterapia em primeira linha, as mutações concomitantes *KRAS* (39), *TP53* ou *KEAP1* foram associadas a resistência à terapia usando inibidores de *checkpoints* imunológicos. Já mutações concomitantes *STK11/SMARCA4* tem um valor preditivo positivo para a capacidade de resposta à terapia referida (16), que deve estar relacionado com o facto de mutações em *SMARCA4* proverem infiltração de linfócitos T e expressão de PDL-1.

## **1.6. Status mutacional de *STK11* aliado à TMB e à expressão de PD-L1 na decisão terapêutica**

O *status* mutacional do gene *STK11*, juntamente com a expressão de PD-L1 e a carga mutacional tumoral (TMB), que consiste no número de mutações somáticas por milhão de bases de sequência genômica investigada, podem ajudar a prever quais os pacientes que beneficiarão de imunoterapia (40).

Embora haja uma relação linear entre o nível de benefício dos inibidores de *checkpoint* e o nível da expressão tumoral PD-L1, existem tumores que respondem à imunoterapia e que apresentam uma expressão de PD-L1 baixa ou indetetável (16). Em contraste, existem também tumores com elevada expressão de PD-L1 que não respondem à imunoterapia, demonstrando as limitações de PD-L1 para seleção de terapia (16).

Valores elevados de TMB são um potencial biomarcador preditivo de alta taxa de resposta à imunoterapia (41). A explicação passa pela capacidade das células tumorais com alto TMB terem tendência a produzir antígenos mais imunogênicos, cujo reconhecimento pelas células T, sobretudo pelos linfócitos T citotóxicos, é mais eficaz e esse é precisamente um dos aspectos mais importantes na predição da resposta à imunoterapia (41). Os tumores de pulmão de não pequenas células são dos tumores com maior TMB (42). Existem, no entanto, alguns estudos que se contrapõem e mostram que o TMB não é eficaz para prever a resposta à terapia (43).

## **1.7. Falhas no sucesso da imunoterapia não relacionadas com alterações genéticas em *STK11***

Caracterizar o *status STK11*, através da análise de mutações do gene *STK11* pode não ser suficiente para identificar pacientes com falhas na atividade de LKB1.

Existem mecanismos não mutacionais que também resultam em diminuição da expressão de *STK11/LKB1*, tais como a hipermetilação da região promotora do *STK11*; a desacetilação da proteína que resulta na instabilidade da mesma, sendo depois encaminhada para a via ubiquitina-proteossoma (44); e os microRNAs têm também influência na fase pós-traducional (12).

Além disso, alterações em proteínas auxiliares da LKB1 podem resultar no mau funcionamento desta, apesar de *STK11* não apresentar nenhuma alteração genética.

LKB1 é ativado alostericamente, ou seja, há uma alteração da estrutura da proteína, induzida pela ligação de um ligando que provoca a regulação da atividade da enzima. A estrutura da LKB1 consiste em 2 lobos de cada lado da bolsa de ligação do ligando ATP(45). LKB1 é a unidade cataliticamente ativa

de um complexo heterotrimérico com STRADA e MO25. STRADA é uma pseudocinase que induz uma alteração conformacional em LKB1 para formar o estado cataliticamente ativo e faz com que LKB1 seja transportada do núcleo para o citoplasma. MO25 fortalece a interação entre LKB1 e STRADA e, como resultado, aumenta a atividade cinase de *STK11*. O loop de ativação de LKB1, essencial no processo de ativação da cinase pois forma a bolsa que liga o substrato, é mantido no lugar por MO25(46).

Outra razão para a variabilidade no sucesso da imunoterapia é a existência de mutações concomitantes com a alteração em *STK11*, tal como descrito na secção 1.5.

Um estudo mostrou prognóstico pior numa coorte que apesar de expressar LKB1 estava em quantidade reduzida, (no entanto, os resultados não foram estatisticamente significativos). Este estudo não avaliou mutações *STK11* e, portanto, a relação entre expressão e status mutacional de *STK11* permanece desconhecido (47).

Diferentes mutações podem induzir microambientes diferentes e influenciar a terapia e sobrevivência (16).

## 2. Objetivos do Projeto

O objetivo deste projeto é investigar alterações genéticas no gene *STK11*, em pacientes sujeitos a imunoterapia e relacionar os resultados com a resposta terapêutica, e desta forma estabelecer a causa-efeito das alterações no gene *STK11* de forma a tentar encontrar uma alteração genética relevante que seja causadora de possíveis resistências.

Os objetivos específicos do projeto são:

- 1) Efetuar sequenciação do gene *STK11*, que foi amplificado a partir de amostras de DNA extraídas de tumor de pulmão;
- 2) Análise de variantes em *software* apropriado e sua classificação de acordo com bases de dados;
- 3) Correlacionar as variantes encontradas no gene com o sucesso da imunoterapia nos pacientes, através de dados de literatura relativos à sobrevida global e sobrevida livre de progressão de doença em doentes com alterações em *STK11*.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Amostras

Para o presente estudo foram utilizadas 38 amostras de DNA extraído a partir de tecido pulmonar tumoral fixado em formol tamponando a 10% e embebido em parafina. Os critérios de inclusão utilizados na seleção destas amostras foram: pertencerem a pacientes com diagnóstico de cancro do pulmão em fase avançada; paciente terem sido submetidos a imunoterapia, nomeadamente com inibidores de *checkpoints* imunológicos (anti PDL-1/PD-1 e anti CTLA-4); a colheita das amostras ter sido efetuada antes do paciente ter sido submetido à terapia com inibidores de *checkpoints* imunológicos.

#### 3.2. Extração de DNA

Antes de efetuar a extração, as preparações histológicas dos pacientes são revistas por um patologista para averiguar se o corte de tecido é composto totalmente ou parcialmente por tumor. Quando é parcial, o patologista efetua uma marcação na preparação histológica do tecido em causa, com o objetivo de delimitar o tumor e obter a maior percentagem de DNA tumoral na extração. Após esta etapa é realizada a macrodisseção que consiste na remoção por raspagem do tecido de interesse delimitado e apenas este segue para a extração.

A extração e purificação de DNA a partir de tecido pulmonar tumoral fixado e embebido em parafina foi efetuada pelo método automático Maxwell® DNA FFPE (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, (Promega, Wisconsin) baseado na extração por partículas magnéticas (48). Para tal, são utilizados dois a cinco cortes histológicos com uma espessura de 10 a 20 µm estendidos em lâmina, dependendo do tamanho do tecido. O corte é raspado para um tubo *ependorf* estéril, onde é adicionado óleo mineral para a dissolução da parafina aquando do aquecimento a 80°C. Posteriormente é adicionada a *master mix*, composta por tampão de lise para lisar células, proteinase K, que promove a degradação de proteínas, a 10mM e *blue dye* que é um corante que permite distinguir fases, isto é, distinguir a parafina dos restantes componentes. Após centrifugação dos *ependorfs* para ocorrer a separação da fase apolar, que contém o óleo e a parafina, da fase aquosa, que contém a *master mix*, é removida a fase aquosa para um outro *ependorf* que é colocado num bloco de aquecimento a 56°C durante 30 minutos, temperatura ótima para ocorrer a digestão proteica. Após este passo, a amostra é incubada no termobloco a 80°C durante 4 horas para ocorrer a rutura das pontes metilénicas inter e intraproteicas causadas pela fixação em formol (49). Após arrefecimento, a amostra é incubada com

RNase A, que promove a degradação de RNA, à temperatura ambiente durante 5 minutos, seguida de centrifugação. A amostra é transferida para os poços do equipamento *Maxwell® FFPE Cartridge* que contém tampão de ligação e esferas magnéticas as quais fornecem uma fase sólida móvel para captar DNA. O equipamento *Maxwell®* é magnético, deste modo imobiliza as esferas magnéticas ligadas ao DNA no primeiro poço. As amostras sofrem várias lavagens em diferentes poços antes de o DNA ser eluído em tubos que contém água livre de nucleases (48). Por fim, os tubos são colocados num suporte magnético para remoção das esferas magnéticas que possam ter sido eluídas juntamente com DNA.

### **3.3. Quantificação e avaliação da qualidade de DNA**

Após extração de DNA é efetuada a sua quantificação e avaliação do grau de pureza através da leitura espectrofotométrica das amostras aos comprimentos de onda 280nm, 260nm e 230nm. Para tal, foi utilizado o espectrofotômetro *NanoDrop® 2000* (Thermo Scientific, Wilmington) que permite fazer leituras espectrofotométricas no espectro completo (de 190 a 840 nm), apresentando um limite mínimo de deteção de DNA de 2ng/ $\mu$ L. A leitura espectrofotométrica ao comprimento de onda 260nm neste equipamento permite efetuar diretamente a quantificação do DNA presente na amostra, não sendo necessário utilizar a fórmula para o cálculo. Similarmente o equipamento fornece os valores das razões de absorvância lidas aos comprimentos de onda de 260nm/280nm e de 260nm/230nm que permitem avaliar o grau de pureza da amostra (50). A leitura ao comprimento de onda 280nm permite detetar a presença de proteína, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente neste comprimento de onda. Já a leitura ao comprimento de onda 230nm permite detetar a presença de contaminantes que absorvem neste comprimento de onda, tais como ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), carboidratos e fenol (50) Deste modo a razão de absorvâncias 260nm/280nm, corresponde à razão: "absorvância de ácidos nucleicos/absorvância a 280nm de contaminantes". Valores entre 1,8-2,0 são indicativos de que o DNA tem um grau de pureza ótima para ser usado em reações de amplificação, já se o rácio apresentar valores significativamente menores, pode sugerir a presença de contaminantes, e a impossibilidade de usar a amostra extraída para reação de amplificação. Já a razão de absorvâncias 260nm/230nm, corresponde à razão: "absorvância de ácidos nucleicos/absorvância a 230nm de contaminantes". Valores entre 2,0-2,2 são indicativos de que o DNA tem um grau de pureza aceitável para ser usado em reações de amplificação, já se o rácio apresentar valores significativamente menores, pode sugerir a presença de contaminantes, e a impossibilidade de usar a amostra extraída para reação de amplificação.

Para a amplificação, foi utilizada, quando possível, uma concentração de DNA entre 50 e 100 ng/ $\mu$ L.

### 3.4. Amplificação do gene *STK11*

A amplificação do gene *STK11* foi efetuada por um método de reação em cadeia da polimerase (PCR) simples, onde foram amplificados os nove exões codificantes do gene *STK11*. A sequência dos *primers* utilizados na amplificação dos nove exões e suas temperaturas de *annealing* encontram-se registados na Tabela 2.

Tabela 2- Sequência dos pares de *primers* utilizados para amplificação de nove exões do gene *STK11* e suas temperaturas de *annealing*.

Exão		<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>	Tamanho dos amplicões (bp)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)
1	1.1	TGGAGAAGGGGAAGTCGGAACACAA	ATCTTGACGGCCCTCCTGCACA	322	52,5
	1.2	AAGGCTCTTACGGCAAGGTGAAGGA	TTGCCTGAGTGAAAGTCCGTAACGC	315	55,9
2	2	GACTCCAGGGATCCAGGCCATCAT	CTCAGGGCCCTTTTTCAGCAAGC	346	53,0
3	3	GTCCTCCAGAGCCCTTTTCTGG	GACAAGCAGTGTGGCCTCACGGAAA	265	55,4
4	4	TGCCTGGACTTCTGTGACTTCCC	CGAACGGGTGCAGTGCCTGTG	350	60,2
5	5	TGGCACCTCAAAATCTCCGACCTG	CGGCTGTGGCCAGAGAGGGTCTG	375	60,9
	5 A	ATTGACGGCCTGGAGTACCTGCATA	CGGGGCACTTACAGGGTGAC	341	60,9
6	6	TCTGTCCCTGGGGTAGAGCTGGG	CCCTACATTTCTGCACAAAAGCCCC	276	55,1
7	7	GTATCACCCAGGGCCTGACAACAG	GGTAACAGGACACTGCCAGAGA	341	56,3
8	8	GGCCCAGAGGAGCTGGGTCG	CTGCTCCCGTGGGACATCCTGG	330	59,0
9	9	TGGGCAGCAGCTGTAAGTGCCT	GCGTTGTCCCACATGCCCA	358	59,0
	9 A	CCCAGAAGAGGAGGCCAGTCACAAT	GACGGTCACCATGACTGACTAGCG	303	59,0

O processo de amplificação passa por ciclos sequenciais de desnaturação da dupla hélice de DNA (*melting*) por aplicação de temperatura elevada (95° C), depois há uma diminuição da temperatura e os *primers* ligam-se (*annealing*) e depois a temperatura estabiliza nos 72° C iniciando a síntese de DNA devido à ação de uma DNA polimerase. Devido às especificidades de cada exão a temperatura de *annealing* correspondente a cada um é diferente e por isso *annealing* dos *primers* às respetivas sequências é feito num patamar de temperaturas (64°C-62°C-60°C), tendo cada patamar uma duração 90 segundos. O processo de amplificação é constituído por repetição destes ciclos 38 vezes. (Tabela 3).

Tabela 3– Condições de PCR para amplificação dos 9 exões codificantes do gene *STK11*.

Temperatura	Tempo	Etapas	Número de ciclos
95°C	15 minutos	Desnaturação	1x
95°C	30 segundos	Desnaturação	38x
64°C	90 segundos	<i>Annealing</i>	
62°C	90 segundos		
60°C	90 segundos		
72°C	90 segundos	Extensão	1x
72°	10 minutos	Extensão	

Para a amplificação utilizou-se o kit *QIAGEN @ Multiplex PCR Kit*. A *master mix* contém a DNA polimerase termoestável (*HotStartTaq DNA Polymerase*), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), tampão e o cofator enzimático  $MgCl_2$ . A *Q-Solution* altera o comportamento de *melting* DNA e geralmente melhora um PCR com rendimento não ideal causado por *templates* que possuem estruturas secundárias ou altos conteúdos de GC (guanina e citocina) (51).

Para um volume total de 15µL de mistura de reação, utilizaram-se 7,5 µL de *master mix*, 3 µL de água destilada livre de DNase, 1 µL de *Q-solution*, 0,75 µL de cada *primer forward* e *reverse* a 10 mM e 1,5 – 2 µL da amostra de DNA. Nos casos com pouca quantidade de material genético extraído as condições da reação de amplificação foram modificadas, de forma a torná-la mais eficaz.

Em cada amplificação foi introduzido um controlo negativo, designado também por branco, que corresponde a um tubo com a mistura reacional sem DNA, com a finalidade de monitorizar possíveis contaminações. Deste modo, são validadas apenas as amplificações em que o conteúdo do controlo negativo não apresente produtos de amplificação.

### 3.5. Eletroforese

Os amplicões foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2% (4g/200mL), com a finalidade de separar os diferentes amplicões pelo seu peso molecular (52). O princípio de separação dos amplicões é baseado no tamanho dos mesmos.

A eletroforese em gel de agarose foi realizada para averiguar: i) se houve amplificação do DNA em todas as amostras; ii) se não houve contaminação na reação de amplificação, que se deteta através da análise do controlo negativo; iii) se o produto amplificado é o pretendido, através da sua comparação com um marcador de peso molecular.

Para a preparação do gel de agarose a 2% (4g/200mL) foram dissolvidas 4g de agarose em 200mL de tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) a 1x, através de aquecimento. Após dissolução foram adicionados 6 µL de *Redsafe* previamente diluído em 1mL de água. O *Redsafe* é um fluorocromo que se intercala na molécula do DNA, e quando é excitado por um comprimento de onda da luz ultravioleta (UV) emite luz com comprimento de onda da região do espectro visível. Por fim, a mistura é vertida no suporte do gel que contém pentes para formar poços, ficando à temperatura ambiente para solidificação.

Para a separação eletroforética utilizou-se uma tina de eletroforese onde se colocava o gel e TBE a 1x e nesse gel foi adicionada uma mistura de 3 µL da amostra com 3 µL do tampão de carregamento (Azul de Bromofenol), o qual por apresentar maior densidade e cor, facilita a adição da amostra nos poços. A eletroforese foi realizada a uma voltagem de 170V durante 15 minutos.

Para visualização dos fragmentos utilizou-se o transiluminador Quantity One (Bio-rad, California) para captar a emissão de luz visível do fluorocromo, após este ter sido excitado por luz UV emitida pelo transiluminador. O *Redsafe* cora o DNA de forma dependente da concentração, de modo que quanto maior é a concentração de DNA em uma banda no gel, maior é a intensidade dessa banda quando visualizada sob a luz ultravioleta; assim esta relação permite estimar a quantidade de DNA presente numa dada banda (53).

### 3.6. Sequenciação de Sanger

Após amplificação por PCR, efetuou-se uma purificação enzimática seguida da sequenciação pelo método de Sanger, para se obter a sequência genética dos exões.

Ao produto de PCR foram adicionados 2 µL de ExoAP (Thermo Fischer, Massachusetts), que é uma mistura enzimática que promove a digestão de excedentes e resíduos resultantes da reação de PCR. A exonuclease I, digere o excesso de *primers*, enquanto a enzima fosfatase alcalina, desfosforila os dNTPs. A desfosforilação torna os dNTPs inutilizáveis, de forma a não interferirem com a sequenciação que se segue, pois, o sequenciamento tem uma proporção bem estabelecida de nucleótidos (54).

Esta mistura enzimática com os produtos de PCR foi incubada no termociclador (Bio-rad, California) para proporcionar condições térmicas ótimas de funcionamento da enzima (37°C) e após efetuar a sua função a temperatura subiu (85°C) de forma a inativar as enzimas.

Antes da reação de Sanger propriamente dita fez-se uma preparação da sequenciação, conhecida como sequenciação direta, que foi efetuada usando o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied, Foster City). O *BigDye*, que contém dNTPs, didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) marcados com fluoróforos, DNA polimerase e MgCl<sub>2</sub>, foi preparado recorrendo a 100 µL de *BigDye* puro a 2,5x, 125 µL tampão de *BigDye* a 1x e 550 µL de água destilada ultrapura livre de nucleases. Para esta reação

de sequenciação, com um volume de 6,25 µL preparou-se uma mistura de 4 µL de *BigDye*, 0,5 µL de cada *primer* (*forward e reverse*) a 10 µM e 1,25 µL do produto de PCR purificado enzimaticamente. A mistura foi depois incubada no termociclador (Bio-rad, California) em ciclos de [95° C-55° C-60° C]. Nesta etapa dá-se a desnaturação do DNA de cadeia dupla, sendo que o DNA em cadeia simples é depois emparelhado com *primers* e alongado com recurso a dNTPs para construir a nova cadeia dupla. Os ddNTPs acoplados a um fluoróforo, que varia de cor consoante o nucleótido (A, G, T e C) quando anexados à sequência, irão emitir fluorescência com base no nucleótido associado. Os ddNTPs são usados para interromper a síntese de DNA devido à falta de um grupo hidroxilo livre na sua estrutura que é necessário para a ligação do seguinte nucleótido, assim a sequência irá ser alongada com dNTPs até que um ddNTP seja utilizado (55). Como os dNTPs e os ddNTPs têm probabilidade igual de serem usados, cada sequência terminará com comprimentos variados e com diferentes nucleótidos na última posição.

Após a reação de sequenciação direta foi efetuada uma purificação em coluna por filtração em gel dos produtos de sequenciação, através de um método validado pelo laboratório, utilizando *Sephadex G50* (33,3 g da substância dissolvida em 5000 mL de água). Esta purificação teve como objetivo remover excedentes da reação de sequenciação. A purificação pode ser realizada em coluna individual ou em placa de 96 poços. Em ambos os casos o processo consiste em encher a coluna/poços com o *Sephadex G50* e centrifugar durante 4 min a 4400 ou 3800 rpm, respetivamente, para compactar a malha. O produto a purificar foi pipetado para a coluna/poços com a malha de *Sephadex G50* e foi centrifugado nas condições acima referidas de forma a ser filtrado e caiu num tubo/placa que continha 10 µL de formamida que permite manter o DNA linear e conservado.

O produto de sequenciação purificado seguiu para o sequenciador capilar 3130XL (Applied, Foster City) para ser efetuada eletroforese capilar num gel de poliacrilamida na qual as sequências são alinhadas por tamanho crescente. A análise dos produtos sequenciados foi efetuada com recurso ao software *Mutation Surveyor V3.24*. Os eletroferogramas obtidos no sequenciador que contêm a informação das sequências genéticas são comparadas com sequências *wild type*, permitindo aferir alterações genéticas. Este *software* tem inúmeras características que o tornam interessante do ponto de vista da análise, tais como a grande sensibilidade e precisão com que deteta variantes, a grande quantidade de dados que analisa num curto espaço de tempo e o facto de ser compatível com diferentes formatos de resultados de sequenciação provenientes de diferentes sequenciadores (56).

### **3.7. Análise Estatística**

Foi utilizada estatística descritiva nomeadamente frequências absolutas e frequências relativas para análise dos dados obtidos. Esta estatística foi útil na caracterização da amostra em termos histológicos; na análise da proporção de casos estudados por cada exão; na análise, por exão, da percentagem de alterações encontradas; e ainda para analisar, por exão e por tipo histológico, a percentagem de cada tipo de alterações encontradas (benignas/ provavelmente benignas, patogénicas/ provavelmente patogénicas e não descritas em bases de dados).

#### 4. Resultados

Sabe-se que alterações no gene *STK11* são potenciais causadoras de resistência à imunoterapia. Este projeto visa encontrar alterações no gene *STK11* que possam estar na base da referida resistência.

No total dos 38 casos foram encontradas 16 alterações genéticas. A Tabela 4 apresenta a frequência absoluta e frequência relativa de alterações genéticas encontradas em cada exão para o total de 16 alterações.

Tabela 4- Frequência absoluta e relativa (em percentagem arredondada à unidade) de alterações genéticas encontradas em cada exão do gene *STK11* para um total de 16 alterações.

	Exões								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Alterações % (n/N)	25% (4/16)	0% (0/16)	0% (0/16)	13% (2/16)	25% (4/16)	19% (3/16)	0% (0/0)	13% (2/16)	6% (1/16)

N- número total de alterações, (N=16); n- número de alterações encontradas em cada exão.

As alterações foram classificadas de acordo com as bases de dados GnomAD (57), ClinVar (58), COSMIC (59), My Cancer Genome (60), CbioPortal(61), GDC (62), OncoKB (63) e Cancer Hotspots (64). Na Tabela 5 apresenta-se para cada exão a frequência absoluta e frequência relativa de cada classificação, para o total de alterações encontradas nesse exão, sendo de particular interesse as alterações classificadas como patogénicas/ provavelmente patogénicas, uma vez que são estas que conferem alterações na proteína LKB1.

Tabela 5- Frequência relativa (em percentagem arredondada à unidade) de cada classificação, para cada exão, para o total de alterações encontradas em cada exão.

Exão	Não descrita % (n <sub>1</sub> /N)	Benignas/Provavelmente Benigna % (n <sub>2</sub> /N)	Patogénica/ Provavelmente Patogénica % (n <sub>3</sub> /N)
1	50% (2/4)	0% (0/4)	50% (2/4)
2	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)
3	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)
4	0% (0/2)	0% (0/2)	100% (2/2)
5	0% (0/4)	0% (0/4)	100% (4/4)
6	0% (0/3)	0% (0/3)	100% (3/3)
7	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)
8	0% (0/2)	0% (0/2)	100% (2/2)
9	0% (0/1)	0% (0/1)	100% (1/1)
Todos os exões	12,5% (2/16)	0% (0/0)	87,5% (14/16)

N- número total de alterações em cada exão; n<sub>1</sub>- número de alterações não descritas encontradas em cada exão; n<sub>2</sub>- número de alterações benignas/provavelmente benignas encontradas em cada exão; n<sub>3</sub>- número de alterações patogénicas/provavelmente patogénicas encontradas em cada exão;

Foram detetadas 14 variantes classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas (Tabela 6) e duas variantes de significado desconhecido não descritas nas bases de dados consultadas (c.127G>A p.(Ala43Thr); c.243G>T p.(Lys81Asn)).

Tabela 6- Variantes patogénicas e provavelmente patogénicas detetadas no gene *STK11*.

Alteração genética	Alteração na proteína	Exão
c.613G>A	p.(Ala205Thr)	5
c.503A>G	p.(His168Arg)	4
c.180_185del	p.(Tyr60*)	1
c.717G>A	p.(Trp239*)	5
c.862+1G>T	p.(?)	6
c.842_843insC	p.(Val282Arg fs*6)	6
c.580G>T	p.(Asp194Tyr)	4
c.647C>T	p.(Ser216Phe)	5
c.921-12G>A	p.(?)	8
c.1233delC	p.(Asn412Thr fs*98)	9
c.842_843delinsT	p.(Tyr281Leu fs*19)	6
c.149_150insAGGT	p.(Met51Gly fs*113)	1
c.662C>T	p.(Pro221Leu)	5
c.1062C>T	p.(Phe354Leu)	8

A Figura 11 representa o gene *STK11*, nomeadamente os exões e intrões e ainda as zonas codificantes e não codificantes. Neste esquema está representada a distribuição das alterações genéticas patogénicas/provavelmente patogénicas de acordo com o exão e o tipo de variante.

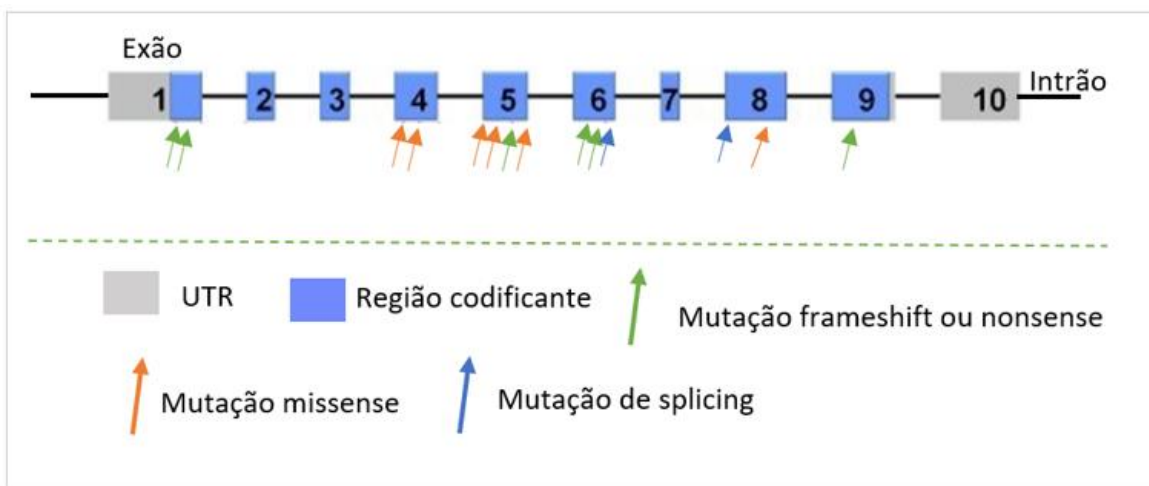


Figure 11- Representação esquemática do gene *STK11*, nomeadamente das zonas codificantes e não codificantes (UTR), e dos exões e intrões. Está representada na figura a distribuição das variantes genéticas por exão e o seu tipo.

Os pacientes foram organizados em dois grupos: casos com variantes patogénicas/provavelmente patogénicas no gene *STK11* e casos sem alterações no referido gene. No que respeita à resposta à terapia, em ambos os grupos existiam pacientes com “progressão da doença ou morte” e “boa resposta durante um longo período” (Tabela 7). Até à data, não foi possível ter acesso aos dados relativos ao tempo de resposta de cada doente que nos permita fazer uma correlação entre a presença de variantes patogénicas/provavelmente patogénicas no gene *STK11* e a resposta à terapia.

Tabela 7- Caracterização dos pacientes de acordo com a resposta terapêutica: “progressão da doença ou morte” ou “boa resposta durante um longo período”.

Caracterização dos pacientes de acordo com a resposta terapêutica	Número de pacientes	Alterações patogénicas/provavelmente patogénicas	Número de alterações	Exão
“Progressão da doença ou morte”	19	c.613G>A; p.(Ala205Thr)	8	5
		c.503A>G; p.(His168Arg)		4
		c.180_185del; p.(Tyr60*)		1
		c.717G>A; p.(Trp239*)		5
		c.862+1G>T; p.(?)		6
		c.842_843insC; p.(Val282Arg fs*6)		6
		c.580G>T; p.(Asp194Tyr)		4
c.1062C>T; p.(Phe354Leu)	8			
“Boa resposta durante um longo período”	19	c.647C>T; p.(Ser216Phe)	6	5
		c.921-12G>A; p(?)		8
		c.1233delC, p.(Asn412Thr fs*98)		9
		c.842_843delinsT; p.(Tyr281Leu fs*19)		6
		c.149_150insAGGT; p.(Met51Gly fs*113)		1
c.662C>T; p.(Pro221Leu)	5			

Das 38 amostras de tumor estudadas, 35 eram de carcinoma de pulmão de não pequenas células (30 dos quais adenocarcinomas e 5 carcinomas de células escamosas/epidermóide) e três de tipo histológico desconhecido (embora o subtipo de carcinoma de células escamosas tenha sido excluído) (Tabela 8).

Tabela 8- Caracterização da população estudada. Frequências absolutas e frequências relativas (em percentagem arredondada à unidade) de cada tipo e subtipo histológico.

<b>Tipo Histológico (N<sub>1</sub>=38)</b>	<b>% (n<sub>1</sub>/N<sub>1</sub>)</b>	<b>Subtipo Histológico (N<sub>2</sub>=35)</b>	<b>% (n<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>)</b>
Carcinoma de pulmão de não pequenas células	92% (35/38)	Adenocarcinoma	86% (30/35)
		Carcinoma epidermóide	14% (5/35)
Desconhecido	8% (3/38)	-----	-----

N<sub>1</sub>- número total de casos, (N=38); n<sub>1</sub>- número de casos de cada tipo histológico; N<sub>2</sub>- número total de casos em que se identificou o subtipo histológico, (N=35); n<sub>2</sub>- número de casos de cada subtipo histológico.

A Tabela 9 representa as frequências absolutas e frequências relativas de alterações genéticas patogénicas/ provavelmente patogénicas de acordo com o tipo/ subtipo histológico, para o total de casos de cada tipo/subtipo histológico.

Tabela 9- Frequências absolutas e frequências relativas (em percentagem arredondada à unidade) de alterações genéticas patogénicas/ provavelmente patogénicas de acordo com o tipo/ subtipo histológico.

<b>Tipo/Subtipo Histológico</b>	<b>Alterações patogénicas/ provavelmente patogénicas em cada tipo histológico, % (n/N)</b>
Adenocarcinoma	40% (12/30)
Carcinoma epidermóide	0% (0/5)
Desconhecido	67% (2/3)

N- número total de casos de cada tipo/subtipo histológico; n- número de alterações patogénicas/provavelmente patogénicas encontradas em cada tipo/subtipo histológico.

É de referir que a análise da totalidade do gene *STK11* não foi possível em algumas amostras devido à fraca quantidade/qualidade de DNA obtido. Na Tabela 10 é apresentada a frequência absoluta e relativa de exões que puderam ser estudados.

Tabela 10- Frequência absoluta e relativa (em porcentagem arredondada à décima) de exões do *STK11* estudados.

	<b>Exões</b>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Amostras estudadas com sucesso % (n/N)	86,8% (33/38)	97,4% (37/38)	100% (38/38)	92,1% (35/38)	92,1% (35/38)	81,6% (31/38)	97,4% (37/38)	97,4% (37/38)	94,7% (36/38)

N- número total de amostras, (N=38); n- número de amostras em que foram realizadas com sucesso as técnicas de amplificação/sequenciação.

## 5. Discussão

Neste estudo, são relatadas alterações genéticas no gene *STK11*, em particular alterações patogénicas/provavelmente patogénicas e o seu provável impacto negativo na resposta à imunoterapia.

No presente estudo foram detetadas 14 variantes patogénicas/provavelmente patogénicas no gene *STK11* em 38 doentes com carcinoma do pulmão. Estas variantes foram encontradas em vários exões (exceto nos exões 2, 3 e 7) o que sugere a não existência de exões *hotspot*, isto é, regiões mais propícias a sofrerem alterações. Destas alterações, 8 estão presentes em posições nucleotídicas, que de acordo com a literatura (20)(21), apresentam elevada frequência mutacional (*hotspots* mutacionais). No entanto, os resultados mostram que não há um codão em particular que esteja repetidamente alterado. A presença de todas estas alterações com inexistência de *hotspots* no gene *STK11* sugere que este gene deve ser estudado na sua totalidade aquando da decisão terapêutica podendo mesmo ser incluído em painéis de NGS. Contudo, será necessário aumentar a amostragem para averiguar este indício de ausência de *hotspots* no gene *STK11*. A literatura, até à data, também não descreve no cancro do pulmão um codão ou exão do *STK11* em particular com tendência a alterações genéticas.

No presente estudo não foi possível obter os dados de tempo de resposta à imunoterapia de forma a poder correlacionar a presença ou ausência de mutações no *STK11* com a resposta à terapia. Na literatura está descrito que alterações em *STK11* podem induzir uma má resposta à imunoterapia (65–72). Até à data, no entanto, não foi descrita, na literatura, nenhuma alteração em concreto no gene *STK11* que induza resistência à imunoterapia. Alguns estudos mostram que pacientes com alterações no gene *STK11*, apresentam pior sobrevida global (tempo desde o início do tratamento até morte) e pior sobrevida livre de progressão de doença (tempo desde o início do tratamento até recidiva) do que os pacientes cujos tumores não apresentam alterações no gene em estudo, tanto para os casos tratados com anticorpos anti-PD-L1/ anti-PD-1(65–72), bem como em casos tratados com anticorpos anti-CTLA-4 (69,70). Todos estes resultados foram observados em cancro de pulmão de não pequenas células, nomeadamente em adenocarcinoma e carcinoma epidermóide e, em alguns casos as coortes apresentavam maior prevalência de adenocarcinoma em relação a carcinoma epidermóide (65,67,68,70–72) e com a especificação de que os pacientes apresentavam doença em fase avançada (65–68,70–72). As alterações genéticas apresentadas foram estudadas por Sequenciação de Nova Geração (NGS), utilizando diferentes painéis de genes, nomeadamente MSK-IMPACT(67,69), GUARDANT OMNI (71), FOUNDATION ONE CDX ou FOUNDATION ONE ARRAY (72).

Como já referido (16), atualmente, o uso do *status* mutacional de *STK11* como marcador preditivo é controverso. Consequentemente, a imunoterapia não deve ser automaticamente excluída em pacientes com mutações *STK11*. Apoiam, no entanto, a ideia de que no caso de progressão rápida do

tumor sob tratamento ou no caso de não estar a haver resposta, a consideração de uma mutação *STK11* pode permitir rápida adaptação da terapia para esses pacientes (73). A terapia a fornecer a estes pacientes vai variar dependendo das especificidades de cada um, nomeadamente o estado de saúde geral, idade, os tratamentos já efetuados/linhas em que foram aplicados, a resposta a cada terapia prévia e outras alterações genéticas presentes.

De acordo com a literatura o gene *STK11* está alterado em 8–21% dos pacientes com adenocarcinoma de pulmão e em 1,5–5% dos pacientes com carcinoma de células escamosas/carcinoma epidermóide (12). No presente estudo verificou-se que 40% dos casos de adenocarcinoma apresentam alterações patogénicas/provavelmente patogénicas no gene *STK11*, não tendo sido detetadas mutações nos casos de carcinoma epidermóide. A nossa amostra tem o dobro de alterações (40%) em adenocarcinoma do que o descrito na literatura (20%), no entanto este aumento pode dever-se ao facto de que a população usada neste projeto ser pequena. Estes dados estão, no entanto, em concordância com a literatura, no sentido em que há maior prevalência de alterações em adenocarcinoma relativamente ao carcinoma epidermóide (11). No entanto, o carcinoma epidermóide, ao contrário do descrito na literatura não apresentou alterações patogénicas. Isto pode dever-se ao facto de a população que se utilizou neste projeto ter pouca representatividade de carcinoma epidermóide (apenas 14% de casos com carcinoma epidermóide, mas 86% de casos com adenocarcinoma).

O presente trabalho apresentou do ponto de vista técnico algumas falhas e limitações na sua execução. Das amostras utilizadas, 10 (26,3% de casos) não puderam ser analisadas com êxito na sua totalidade, pois não se conseguiu efetuar a amplificação/sequenciação de todos os exões. Esta limitação deve-se ao facto de as amostras utilizadas serem de arquivo e assim algumas apresentavam pouca quantidade de material e outras amostras apesar de ainda terem material já teriam má qualidade. Em nenhum dos casos se verificou uma ausência de amplificação de todos os exões, que poderia ser sugestivo de falhas graves na extração de material genético que foi efetuada pelo método automático. O que se verificou foi a ausência de amplificação de apenas alguns exões em cada um destes 10 casos, sendo as falhas verificadas em diferentes exões. Isto pode ser sugestivo de falhas na amplificação quer devido à quantidade de DNA insuficiente para ser amplificado e sequenciado, quer devido à má qualidade da amostra. Como já referido na secção de Materiais e métodos, a concentração ideal de DNA para amplificação é entre 50 e 100 ng/ $\mu$ L e os rácios 260nm/280nm e 260nm/230nm devem apresentar valores compreendidos entre 1,8–2 e -2,0–2,2 respetivamente, para as amostras serem consideradas como tendo pureza aceitável (50).

No sentido de completar este projeto, é necessário estudar os pacientes para mutações concomitantes do gene *STK11* tais como *KEAP1*, *TP53*, *SMARCA4* e *NFE2L2*, as quais podem criar uma sinergia com

*STK11* e influenciar a imunoterapia, justificando assim que certos pacientes tenham boa resposta à terapia, mas apresentem alterações no *STK11* e vice-versa. Além das mutações concomitantes mais frequentemente estudadas, podem, no entanto, existir outras alterações a criar sinergia com alterações em *STK11*.

Seria de interesse futuramente completar o estudo com uma amostra maior, para poder haver uma maior representatividade das alterações genéticas e assim possivelmente chegar a uma conclusão definitiva sobre que alterações genéticas em *STK11* são mais relevantes, se estas existirem. E ainda, incluir os exões em falta, que ficaram por estudar, quer por qualidade, quer por quantidade de DNA insuficiente.

Seria interessante no futuro considerar o tipo específico de inibidor de checkpoint imunológico usado, uma vez que diferentes fármacos têm alvos diferentes e assim pode estar a introduzir-se variabilidade. Por exemplo, um dos efeitos das alterações em *STK11* é a diminuição de expressão de PD-L1, que é um fator de impacto para terapias que se baseiam em anticorpos anti PD-L1 mas não impacta o funcionamento dos anticorpos anti CTLA-4.

Seria vantajoso detetar grandes deleções do gene *STK11*, recorrendo ao método de amplificação de sonda dependente de ligação multiplex (MLPA) em zonas do *STK11* onde estas estejam descritas como sendo frequentes uma vez que Sanger não deteta esse tipo de alterações. Pela mesma razão seria importante o estudo de alterações epigenéticas.

## **6. Conclusão**

No presente estudo foram detetadas alterações no gene *STK11*, tendo sido classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas 87,5%. Estas mutações foram detetadas em vários exões o que pressupõe a não existência de locais *hotspots* no gene. Contudo será necessário aumentar a casuística para averiguar este dado. Tendo em consideração o que está descrito na literatura, pacientes com alterações em *STK11* apresentam pior sobrevida global e pior sobrevida livre de progressão de doença, e de acordo com os resultados do presente estudo, é sugerido que o status mutacional do gene *STK11* deve ser estudado na sua totalidade aquando da decisão terapêutica e que este estudo deve ser incluído em painéis de NGS.

## Referências Bibliográficas

1. Organization W Health. Cancer Today [Internet]. 2020 [cited 2023 Feb 27]. Available from: [https://gco.iarc.fr/today/onlineanalysismultibars?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=620&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&](https://gco.iarc.fr/today/onlineanalysismultibars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=620&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&)
2. Siddiqui. FSSVAH. Lung Cancer [Internet]. 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482357/>
3. Cancro do pulmão: os diferentes tipos [Internet]. [cited 2023 Feb 24]. Available from: <https://www.lusiadas.pt/blog/doencas/cancro/cancro-pulmao-diferentes-tipos>
4. Cancer Research UK. Stages of cancer [Internet]. 2020 [cited 2022 Feb 28]. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/whatis/cancer/stagesofcancer#:~:text=The TNM staging system stands for Tumour%2C Node%2C Metastasis.&text=The system uses letters and numbers to describe the cancer.&text=So for example a small, may be T4 N3>
5. Institute NC. Immunotherapy to Treat Cancer [Internet]. 2019 [cited 2023 Jun 22]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy>
6. Carlino MS, et al. Immune checkpoint inhibitors in melanoma. *Lancet* [Internet]. 2021;398(10304):1002–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067362101206X>
7. Daga H. First-line Immunotherapy for Advanced Non-small-cell Lung Cancer. *Japanese J Lung Cancer*. 2021;91(2):88–94.
8. Waldman AD, et al. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020;20(11):651–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
9. American Cancer Society. Treatment Choices for Non-Small Cell Lung Cancer, by Stage. 2023.
10. Wang ZJ, et al. Germline mutations of the LKB1 (STK11) gene in Peutz-Jeghers patients. *J Med Genet*. 1999;36(5):365–8.
11. Compton SE, et al. LKB1 controls inflammatory potential through CRTC2-dependent histone acetylation. *Mol Cell* [Internet]. 2023;83(11):1872–1886.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.04.017>
12. Pons-Tostivint E, et al. Stk11/lkb1 modulation of the immune response in lung cancer: From biology to therapeutic impact. *Cells*. 2021;10(11).
13. Zou Z, et al. MTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: Progress and challenges.

- Cell Biosci [Internet]. 2020;10(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00396-1>
14. Li N, et al. Role of the LKB1/AMPK pathway in tumor invasion and metastasis of cancer cells (Review). *Oncol Rep.* 2015;34(6):2821–6.
  15. Bourrouh M, et al. The Tumor Suppressor Kinase LKB1: Metabolic Nexus. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10(April).
  16. Mograbi B, et al. The importance of stk11/lkb1 assessment in non-small cell lung carcinomas. *Diagnostics.* 2021;11(2):1–16.
  17. Endo H, et al. Glucose starvation induces LKB1-AMPK-mediated MMP-9 expression in cancer cells. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–16.
  18. Lee DH. Sirt1 as a New Therapeutic Target in Metabolic and Age-Related Diseases. *Chonnam Med J.* 2010;46(2):67.
  19. STK11 [Internet]. 2023 [cited 2023 Feb 23]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000118046-STK11/subcellular>
  20. Launonen V. Mutations in the human LKB1/STK11 gene. *Hum Mutat.* 2005;26(4):291–7.
  21. Donnelly LL, et al. Functional assessment of somatic STK11 variants identified in primary human non-small cell lung cancers. *Carcinogenesis.* 2021;42(12):1428–38.
  22. Balka KR, et al. TBK1 and IKK $\epsilon$  Act Redundantly to Mediate STING-Induced NF- $\kappa$ B Responses in Myeloid Cells. *Cell Rep* [Internet]. 2020;31(1):107492. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.056>
  23. Zeng J deng, et al. Serine and one-carbon metabolism, a bridge that links mTOR signaling and DNA methylation in cancer. *Pharmacol Res* [Internet]. 2019;149(July):104352. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104352>
  24. Ndembe G, et al. LKB1: Can We Target an Hidden Target? Focus on NSCLC. *Front Oncol.* 2022;12(May):1–16.
  25. Bhat H, Zaun G, et al. Arenavirus Induced CCL5 Expression Causes NK Cell-Mediated Melanoma Regression [Internet]. Vol. 11, *Frontiers in Immunology.* 2020. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01849>
  26. Yu R, et al. Type I interferon-mediated tumor immunity and its role in immunotherapy. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2022;79(3):1–24. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04219-z>
  27. Zhu Y, et al. STING: A master regulator in the cancer-immunity cycle. *Mol Cancer.* 2019;18(1):1–15.
  28. Chen L, et al. Functional roles of CCL5/RANTES in liver disease. *Liver Res* [Internet]. 2020;4(1):28–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.livres.2020.01.002>

29. Thelemann C, et al. Interferon- $\gamma$  induces expression of MHC class II on intestinal epithelial cells and protects mice from colitis. *PLoS One*. 2014;9(1):1–10.
30. Früh K, et al. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol*. 1999 Feb;11(1):76–81.
31. Hu X, et al. Regulation of IFN and TLR Signaling During Macrophage Activation by Opposing Feedforward and Feedback Inhibition Mechanisms. *Immunol Rev* [Internet]. 2008;41–56. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2008.00707.x/full>
32. Gangaplara A, et al. Type I interferon signaling attenuates regulatory T cell function in viral infection and in the tumor microenvironment. *PLoS Pathog*. 2018;14(4):1–27.
33. Uribe-Querol E, et al. Neutrophils in cancer: Two sides of the same coin. *J Immunol Res*. 2015;2015.
34. Wilke CM, et al. Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis*. 2011 May;32(5):643–9.
35. Shao H, et al. Bidirectional Effect of IFN- $\gamma$  on Th17 Responses in Experimental Autoimmune Uveitis. 2022;2(March):1–13.
36. Sivanand. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2019;176(3):139–48.
37. NIH. SMARCA4 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4 [ Homo sapiens (human) ] [Internet]. [cited 2023 Mar 7]. p. 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6597>
38. Sciences oncotype dx by exact. Teste preditivo ou prognóstico: por que isto importa? [Internet]. [cited 2023 Mar 7]. Available from: <https://www.oncotypeiq.com/pt-br/cancer-de-mama/profissional-de-saude/oncotype-dx-breast-recurrence-score/preditivo-ou-prognostico>
39. Manolakos P, et al. A Critical Review of the Prognostic and Predictive Implications of KRAS and STK11 Mutations and Co-Mutations in Metastatic Non-Small Lung Cancer. *J Pers Med*. 2023;13(6):1010.
40. American Lung Association. STK11 and Lung cancer [Internet]. 2021 [cited 2023 Mar 3]. Available from: <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/symptoms-diagnosis/biomarker-testing/stk11>
41. Lawlor RT, et al. Tumor mutational burden as a potential biomarker for immunotherapy in pancreatic cancer: Systematic review and still-open questions. *Cancers (Basel)*. 2021;13(13).
42. Alexandrov LB, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415–21.
43. McGrail DJ, et al. High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2021 May;32(5):661–72.
44. Zhang Y, et al. The ubiquitin ligase E6AP facilitates HDAC6-mediated deacetylation and

- degradation of tumor suppressors. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):3–6.
45. RCSB. Structure of the heterotrimeric LKB1-STRADalpha-MO25alpha complex [Internet]. 2009. Available from: <https://www.rcsb.org/structure/2WTK>
  46. NCBI. STK11 serine/threonine kinase 11 [ Homo sapiens (human) ] [Internet]. 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=6794>
  47. Hasegawa T, et al. Association between the efficacy of pembrolizumab and Low STK11/LKB1 expression in high-PD-L1-expressing non-small-cell lung cancer. *In Vivo (Brooklyn).* 2020;34(5):2997–3003.
  48. Rsc M, Ffpe DNA, Rsc M, Ffpe DNA. Maxwell(R) RSC DNA FFPE Kit Technical Manual #TM437.
  49. Rodia Js., et al. Methylene Bridge Formation via Carbonium Ions in the Phenol-Formaldehyde Reaction. *J Org Chem* [Internet]. 1959 Jan 1;24(1):21–6. Available from: <https://doi.org/10.1021/jo01083a007>
  50. Scientific T. 260/280 and 260/230 Ratios. *Ratio.* 1975;2–3.
  51. Qiagen. Is Q-Solution required for PCR with QIAGEN's PCR kits? [Internet]. [cited 2023 Mar 8]. Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=66b24579-8104-44be-8754-550624868882&lang=en>
  52. Lee PY, et al. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012 Apr;(62).
  53. Technology Networks. agarose gel electrophoresis, how it works and its uses [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 8]. Available from: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/agarose-gel-electrophoresis-how-it-works-and-its-uses-358161>
  54. Thermofisher. Proper PCR Cleanup before Sanger Sequencing – Seq It Out #12 [Internet]. 2016 [cited 2023 Mar 9]. Available from: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/proper-pcr-cleanup-before-sanger-sequencing-seq-it-out-12/#:~:text=You can simply heat up,to perform any other steps.>
  55. Gomes A, et al. Chapter 5 – Genetic Testing Techniques. In: Robin NH, Farmer MBBT-PCG, editors. Elsevier; 2018. p. 47–64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323485555000053>
  56. Oti M, et al. In Silico Tools for Gene Discovery. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2011;760(i):175–87. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-61779-176-5>
  57. gnomAD [Internet]. 2023. Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/>
  58. ClinVar [Internet]. 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
  59. COSMIC [Internet]. 2023. Available from: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
  60. My Cancer Genome [Internet]. 2023. Available from: <https://www.mycancergenome.org/>

61. cBioPortal [Internet]. 2023. Available from: <https://www.cbioportal.org/>
62. GDC [Internet]. 2023. Available from: <https://portal.gdc.cancer.gov/>
63. OncoKB [Internet]. 2023. Available from: <https://www.oncokb.org/>
64. Cancer Hotspots [Internet]. 2023. Available from: <https://www.cancerhotspots.org/>
65. Biton J, et al. TP53, STK11, and EGFR mutations predict tumor immune profile and the response to anti-PD-1 in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2018;24(22):5710–23.
66. Pore N, et al. Resistance to durvalumab and durvalumab plus tremelimumab is associated with functional STK11 mutations in patients with non-small cell lung cancer and is reversed by STAT3 knockdown. *Cancer Discov.* 2021;11(11):2828–45.
67. Wang S, et al. The role of distinct co-mutation patterns with TP53 mutation in immunotherapy for NSCLC. *Genes Dis* [Internet]. 2022;9(1):245–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.04.001>
68. Wang H, et al. Less immune cell infiltration and worse prognosis after immunotherapy for patients with lung adenocarcinoma who harbored STK11 mutation. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2020;84:106574. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576920309255>
69. Xavier CB, et al. Interplay between Tumor Mutational Burden and Mutational Profile and Its Effect on Overall Survival: A Pilot Study of Metastatic Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancers (Basel).* 2022;14(21).
70. Rosellini P, et al. Clinical impact of STK11 mutation in advanced-stage non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. 2022;172:85–95. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804922003057>
71. Aggarwal C, et al. Baseline Plasma Tumor Mutation Burden Predicts Response to Pembrolizumab-based Therapy in Patients with Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020;26(10):2354–61.
72. Papillon-Cavanagh S, et al. STK11 and KEAP1 mutations as prognostic biomarkers in an observational real-world lung adenocarcinoma cohort. *ESMO Open* [Internet]. 2020;5(2):e000706. Available from: <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2020-000706>
73. Dagogo-Jack I, et al. Clinicopathologic Characteristics of BRG1-Deficient NSCLC. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2020 May;15(5):766–76.