

**PERFIL GENÔMICO DA SÍNDROME DO
XERODERMA PIGMENTOSO NO BRASIL:
AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES GERMINATIVAS E
SOMÁTICAS**

KARINA MIRANDA SANTIAGO

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção do Título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Joao Pedreira Duprat Neto

Co-orientadora: Dra. Maria Isabel Waddington Achatz

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

S235 Santiago, Karina Miranda

Perfil genômico da síndrome do xeroderma pigmentoso no Brasil: avaliação de alterações germinativas e somáticas / Karina Miranda Santiago - São Paulo, 2020.

99p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Joao Pedreira Duprat Neto

Descritores: 1. Neoplasias de Pele/Skin Neoplasms. 2. Carcinoma Basocelular/Carcinoma, Basal Cell. 3. Neoplasias Gástricas/Stomach Neoplasas. 4. Xeroderma Pigmentoso/Xeroderma Pigmentosum. 5. Reparo do DNA/DNA Repair. 6. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala/High-Throughput Nucleotide Sequencing 7. Radiação Ultravioleta/Ultraviolet Rays. 8. XPC/XPC. 9. XPV-POLH/XPV-POLH. 10. Variantes Germinativas/Germline Variants. 11. Variantes Somáticas/Somatic Variants. 12. Transições C>T/C>T Transitions. 13. Assinatura Mutacional/Mutational Signature.

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

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

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para enfrentar os desafios da vida.

Aos meu marido Wallas, meu pai Joselito, minha mãe Maurina e minhas irmãs Jenifer e Joyce, pelo amor incondicional e acolhimento. Nesse período que compreendeu o doutorado ocorreram muitas mudanças em nossas vidas, a contar pela chegada da Alice, hoje com 1 ano e 10 meses. Aprendemos juntos, e com muita leveza, a ser pais, avós e tias. Não tenho palavras para agradecer a entrega e o apoio diário.

Ao meu marido Wallas devo agradecimento especial por sempre ter apoiado minhas escolhas e incentivado muitas delas quando eu estava em dúvida. Sem seu total apoio não seria possível iniciar, percorrer e, sobretudo, concluir esta tese. Obrigada pela ajuda nesse exaustivo período de conclusão onde só podíamos contar um com o outro. Obrigada pelo amor e companheirismo ao longo dessa jornada de quase 16 anos.

Ao meu orientador Dr. João Duprat pela confiança e mentoria no desenvolvimento desse trabalho.

A minha co-orientadora Dra. Maria Isabel Achatz, que foi minha orientadora de mestrado e a grande incentivadora para eu iniciar o doutorado. As circunstâncias fizeram com que você tivesse que abrir mão de me orientar formalmente nesse trabalho, mas você foi a idealizadora e proveu o necessário para que ele pudesse ser realizado. Agradeço imensamente as inúmeras oportunidades que me concedeu e que me fizeram chegar onde hoje estou. Obrigada por trilhar minha carreira.

A minha supervisora de Fellowship Dra. Sharon A. Savage por me receber em seu departamento e possibilitar a execução deste estudo. Obrigada pela confiança, rica oportunidade e orientação.

A Dra. Dirce Maria Carraro que foi fundamental no final deste trabalho. Agradeço o suporte, ensinamento e incentivo.

A Dra. Giovana Tardin Torrezan, amiga de longa data, que também no final deste trabalho tive a felicidade de poder contar com seu apoio imensurável e incentivo. Espero um dia poder retribuir toda essa dedicação.

Aos amigos que fiz no mestrado e que pude compartilhar uma experiência de vida única durante o Fellowship nos EUA. Dra. Fernanda Fortes, Dra. Maisa Pinheiro e Dr. Kelvin de Andrade, obrigada pelas “preças que a vida pega na gente”.

A Dra. Julia B. H. de Mello pelo grande apoio com o preparo das amostras para envio ao centro colaborador.

Ao “pessoal do CIPE”, alguns amigos de longa data, agradeço a parceria, bons momentos e incentivo: Graziela Spilborghs, Jennice de Oliveira, Amanda Nóbrega, Dr. Mateus Barros, Dr. Fábio Marchi, Dra. Bruna Barros, Dra. Claudia de Paula, Dra. Carolina Berra, Dr. Rafael Brianese, MsC. Ana Miguez, Ana Araújo, Debora Andrade, MsC. Isabella Meira, Julia Oliveira, Juliano Chinoca, MsC. Paulo Pineda, Natalia de Angelis, MsC. Sara Silva e Dra. Vanessa Sá.

Aos membros da equipe do Biobanco, do Arquivo de Anatomia Patológica e do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center que estiveram engajados em prover as amostras do estudo: MsC Ana Paula Suenaga, Dra. Eloisa Olivieri, Louise Mota, Dr. Clóvis Antônio Pinto e Thiago.

Aos membros da equipe do CGR-DESL-DCEG-NCI (Amy Hutchinson, Kristie Jones e Mingyi Wang) e Westat-NCI (Ann Marie Petry e Katie Beebe) agradeço o apoio crucial e a preocupação com decisões que não comprometessem a qualidade do trabalho.

A equipe da secretaria da pós-graduação (Luciana Pitombeira e demais colaboradores), do apoio ao aluno (Suely Francisco) e bioinformática (MsC Alexandre Defelicibus) do A.C.Camargo Cancer Center, agradeço o suporte.

Ao instituto Oak Ridge de Ciência e Educação (ORISE - ORAU).

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do *Intramural Research Program* do *Division of Cancer Epidemiology and Genetics* (DCEG) no *National Cancer Institute* (NCI).

RESUMO

Santiago KM. **Perfil genômico da síndrome do xeroderma pigmentoso no Brasil: avaliação de alterações germinativas e somáticas.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

A síndrome do Xeroderma Pigmentoso (XP) ocorre frente à herança monogênica e bialélica de variantes germinativas patogênicas de perda ou redução de função em genes das vias de reparo por excisão de nucleotídeos ou síntese translesão. Consequentemente, é estabelecida deficiência na correção de lesões induzidas, principalmente por radiação ultravioleta, favorecendo alta sensibilidade à radiação solar e risco aumentado para o desenvolvimento de múltiplas lesões cutâneas pré-malignas e malignas. Visto que a heterogeneidade na manifestação clínica da síndrome é uma questão em discussão na literatura, para investigar este aspecto propusemos avaliar o perfil de variantes germinativas e variantes somáticas de tumores cutâneos e não cutâneos de indivíduos portadores de XP. Foi realizado o sequenciamento de alto desempenho utilizando a plataforma NextSeq (*Illumina*) para avaliar as regiões codificantes de 114 genes selecionados pela sua relevância em desordens dermatológicas, tumorigênese e fisiologia cutânea e resposta de dano ao DNA. Seis pacientes com fenótipo clínico da síndrome do XP e portadores de variantes germinativas clinicamente relevantes nos genes *XPC* ou *POLH/XPV* foram avaliados no estudo. Variantes germinativas de significado incerto foram identificadas, em heterozigose, no DNA de leucócito de cinco dos seis pacientes avaliados ocorrendo nos genes *DNAH11*, *PCDHB3*, *RGS22*, *SLC27A5*, *TTN* e *UGT2B10* e nenhuma das variantes identificadas apresentou perda de heterozigose do alelo selvagem nos tecidos tumorais. O polimorfismo de risco para carcinoma basocelular de pele (CBC) rs3769823[A] no gene *CASP8* não foi identificado em apenas um caso do estudo, o qual desenvolveu o menor número de tumores. O polimorfismo de risco rs1126809[A] no gene *TYR* foi detectado apenas no caso que apresentou o maior número de CBC. Amostras de DNA de nove CBCs de tecido armazenado em parafina e duas amostras de tumor gástrico de uma mesma peça cirúrgica, de tecido armazenado em parafina e congelado a fresco, foram avaliadas de forma pareada com o DNA de leucócito correspondente, para pesquisa de variantes somáticas. Variantes somáticas não foram identificadas na amostra de CBC da paciente XP-C com fenótipo menos agressivo da síndrome. O total de 235 variantes *missense* e 29 variantes de perda de função foram

identificadas em 71 genes para sete amostras de CBC, mínimo de 11 e máximo de 127 variantes por amostra, com 85,2% destas apresentando frequência alélica $\geq 20\%$. Com exceção de um CBC, mais de 95% das variantes somáticas identificadas representam alterações tipicamente fotoinduzidas (C:G>T:A e G:C>T:A). Embora pacientes XP acumulem maior número de mutações devido deficiência no mecanismo de reparo, não observamos carga mutacional diferente do observado em CBCs esporádicos. Vinte e sete genes apresentaram variantes somáticas em mais de uma amostra de CBC. Nenhum gene foi compartilhado entre as sete amostras de CBC. Entre os genes alterados em maior número de tumores estão incluídos genes *drivers* de CBC (*LATS1*, *NOTCH2*, *PTCH1*, *PTPN14* e *TP53*), bem como genes não clássicos na carcinogênese do CBC (*APC*, *FLG* e *TTN*). Uma variante *driver* em *SMO* foi recorrente em três CBCs de um mesmo paciente. Duas variantes somáticas foram identificadas no tumor gástrico de tecido congelado a fresco ocorrendo nos genes *GLI3* e *RBI*, não sendo as mesmas detectadas no tecido armazenado em parafina. Nesse trabalho, ressalta-se a heterogeneidade na manifestação clínica da síndrome do XP e a identificação de dois polimorfismos de risco, bem como destaca-se o papel central das vias *Sonic Hedgehog* e *Hippo* na carcinogênese do CBC de pacientes XP.

Descritores: Neoplasias de Pele. Carcinoma Basocelular. Neoplasias Gástricas. Xeroderma Pigmentoso. Reparo do DNA. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala. Radiação Ultravioleta. XPC. XPV-POLH. Variantes Germinativas. Variantes Somáticas. Transições C>T. Assinatura Mutacional.

ABSTRACT

Santiago KM. **[Genomic profile of xeroderma pigmentosum syndrome in Brazil: assessment of germline and somatic alterations]**. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

The Xeroderma Pigmentosum (XP) syndrome occurs on base of biallelic inheritance of pathogenic germline variants of loss of function or function reduction in genes that plays role in nucleotide excision repair and translesion synthesis. Consequently, patients are deficient in correct DNA lesions mainly induced by ultraviolet radiation, present high sensitivity to solar radiation and increased risk for the development of multiple premalignant and malignant skin lesions. Since the heterogeneity in the clinical manifestation is under constantly discussion in the literature, to investigate it we proposed to explore the profile of germline variants and somatic variants in skin and non-skin tumors from XP patients. High-performance sequencing using the NextSeq (Illumina) platform was performed to assess the coding regions of 114 genes selected for their relevance in dermatological disorders, skin carcinogenesis, cutaneous physiology and DNA damage response. Six patients with clinical phenotype of XP syndrome and carriers of clinically relevant germline variants in the *XPC* or *POLH/XPV* genes were evaluated in the study. Heterozygous germline variants of uncertain significance were identified in the leukocyte DNA from five of the six patients occurring in *DNAH11*, *PCDHB3*, *RGS22*, *SLC27A5*, *TTN* and *UGT2B10* genes. None of the identified variants showed loss of heterozygosity of the wild allele in tumor tissues. The *CASP8* risk polymorphism for basal cell carcinoma of the skin (BCC) rs3769823[A] was not identified in only one case of the study which developed the minor number of tumors. The *TYR* risk polymorphism rs1126809[A] was detected only in the case with the highest number of BCC. Somatic variants were investigated in DNA from nine samples of BCCs (tissue stored in paraffin) and two samples of gastric tumor from the same surgical (tissue stored in paraffin and fresh frozen), all paired with the corresponding leukocyte DNA. Somatic variants were not identified in the BCC sample of XP-C patient with a less aggressive syndrome phenotype. A total of 235 missense variants and 29 loss of function variants were identified in 71 genes for seven BCC samples. A minimum of 11 and a maximum of 127 variants per sample were detected, with 85.2% showing an allelic frequency $\geq 20\%$. Except for one BCC, more than 95% of the identified somatic variants

represented typically photoinduced mutations (C:G>T:A and G:C>T:A). Although XP patients accumulate a greater number of mutations due to deficiency in the repair mechanism, we did not observe different mutational load compared with sporadic BCCs. Twenty-seven genes showed somatic variants in more than one BCC sample. Genes shared between the seven BCC samples were not found. Among the altered genes in a greater number of tumors, it was identified BCC driver genes (*LATS1*, *NOTCH2*, *PTCH1*, *PTPN14* and *TP53*), as well as genes non-classical for BCC carcinogenesis (*APC*, *FLG* and *TTN*). A driver variant in *SMO* was recurrent in three BCCs from the same patient. Two somatic variants in *GLI3* and *RBI* genes were identified occurring only in the fresh frozen tissue of gastric tumor, not in the tissue stored in paraffin. In this work, the heterogeneous clinical manifestation of XP syndrome is highlighted, as well as the identification of two risk polymorphisms. In addition, this work emphasizes the central role of the Sonic Hedgehog and Hippo pathways in BCC carcinogenesis of XP patients.

Key-words: Skin Neoplasms. Carcinoma, Basal Cell. Stomach Neoplasas. Xeroderma Pigmentosum. DNA Repair. High-Throughput Nucleotide Sequencing. Ultraviolet Rays. XPC. XPV-POLH. Germline Variants. Somatic Variants. C>T Transitions. Mutational Signature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via de sinalização <i>Sonic Hedgehog</i> (SHH)	5
Figura 2	Desenho do estudo quanto a distribuição dos participantes e amostras	39
Figura 3	Comparação nos valores de cobertura das bases para as variantes somáticas identificadas pelos algoritmos <i>Mutect</i> e <i>Sentieon</i>	51
Figura 4	Diferença no número de variantes somáticas identificadas pelos algoritmos <i>Mutect</i> e <i>Sentieon</i> no tumor gástrico é atribuída ao critério de filtragem por frequência alélica	53
Figura 5	Perfil de cobertura e frequência alélica das variantes somáticas discordantes entre os algoritmos <i>Mutect</i> e <i>Sentieon</i>	54
Figura 6	Imagens dos alinhamentos das sequências vistas pelo visualizador IGV	55
Figura 7	Valores de Ti/Tv obtidos em cada amostra	56
Figura 8	Perfil das trocas de bases identificadas nas sete amostras de CBCs	57
Figura 9	Distribuição das variantes somáticas identificadas entre as sete amostras de CBCs em relação a frequência alélica	62
Figura 10	Genes em comum com os CBCs depositados no <i>COSMIC</i> e <i>cBioPortal</i>	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros de avaliação de qualidade da amostra de DNA.....	25
Tabela 2	Relação das 17 amostras selecionadas para o estudo e características das 11 amostras de tumores dos 6 casos participantes	41
Tabela 3	Perfil qualitativo dos dados de sequenciamento gerado por amostra.....	42
Tabela 4	Aspectos clínicos dos pacientes XP-C e XP-V	44
Tabela 5	Variantes germinativas classificadas como VUS identificadas nos pacientes XP-C e XP-V.....	47
Tabela 6	SNPs de suscetibilidade a CBC reportados <i>GWAS Catalog</i> e identificados nos pacientes XP-C e XP-V	49
Tabela 7	Carga mutacional dos tumores	58
Tabela 8	Número de variantes somáticas por gene alterado em mais de uma amostra de CBC e distribuição dos genes entre as amostras	60
Tabela 9	Variantes somáticas identificadas em comum com os CBCs contendo dados disponíveis no <i>COSMIC</i> e <i>cBioPortal</i>	64

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracil
6-4 PPs	Pyrimidine-(6-4)-Pyrimidone
8-oxoG	8-oxoguanine
ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACMG	American College of Medical Genetics
ANK2	Ankyrin 2
ANS	Agência Nacional de Saúde Suplementar
APC	APC regulator of WNT signaling pathway
ARID1A	AT-Rich Interaction Domain 1A
ASIP	Agouti Signaling Protein
ATR	ATR serine/threonine kinase
BAM	Binary Alignment Map
BCL	Basecall file
BCR	Biospecimen Core Resource
BER	Base Excision Repair
BLM	Bloom syndrome RecQ like helicase
bp	base pairs
BPC	Biopathology Center
BRCA1	Breast Cancer 1, early onset
BRCA2	Breast Cancer 2, early onset
C7	complement C7
CASP8	caspase 8
CBC	Carcinoma Basocelular
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CEC	Carcinoma Espinocelular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CGC	Cancer Gene Census
CGR	Cancer Genomics Research Laboratory
CIPE	Centro Internacional de Pesquisa

<i>CLPTM1L</i>	Cleft Lip and Palate Transmembrane Protein 1-Like
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CPDs	Cyclobutane Pyrimidine Dimers
<i>CRNKL1</i>	crooked neck pre-mRNA splicing factor 1
<i>CSMD1</i>	CUB and Sushi multiple domains 1
<i>CSMD2</i>	CUB and Sushi multiple domains 2
<i>CSMD3</i>	CUB and Sushi multiple domains 3
dbNSFP	database for Non-Synonymous SNPs' Functional Predictions
<i>DCC</i>	DCC netrin 1 receptor
DCEG	Division of Cancer Epidemiology and Genetics
DDB1	Damage specific DNA Binding protein 1
DESL	DNA Extraction and Staging Laboratory
DHH	Desert Hedgehog
<i>DNAH11</i>	Dynein Axonemal Heavy chain 11
DNP	Dinucleotídeos polimórficos
<i>DPCR1</i>	Diffuse Panbronchiolitis Critical Region 1
<i>DPP10</i>	Dipeptidyl Peptidase like 10
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ENIGMA	Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles
<i>ERBB2</i>	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
ERCC2	Excision Repair Cross-Complementation group 2
ERCC3	Excision Repair Cross-Complementation group 3
ERCC4	Excision Repair Cross-Complementation group 4
ERCC5	Excision Repair Cross-Complementation group 5
ESP	Exome Sequencing Project
ExAC	Exoma Aggregation Consortium
<i>FBXW7</i>	F-box and WD repeat domain containing 7
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
<i>FLG</i>	Filaggrin
GATK	Genome Analysis Toolkit
Gb	Gigabytes
GGR	Global Genome Repair

GLI	Glioma-Associated Oncogens Homolog
GLI1	Glioma-Associated Oncogens Homolog 1
GLI2	Glioma-Associated Oncogens Homolog 2
GLI3	Glioma-Associated Oncogens Homolog 3
GLOBOCAN	Global Cancer statistics
GLRA3	Glycine Receptor Alpha 3
gnomAD	Genome Aggregation Database
GWAS	Genome-Wide Association Study
H&E	Hematoxilina-Eosina
HRAS	HRas proto-oncogene, GTPase
ICGC	International Cancer Genome Consortium
IGV	Integrative Genomics Viewer
IHH	Indian Hedgehog
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INTS1	integrator complex subunit 1
IPA	Ingenuity Pathway
ITIH2	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2
KCNT2	potassium sodium-activated channel subfamily T member 2
KDR	Kinase insert Domain Receptor
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KG	1000Genomes
LATS1	Large Tumor Suppressor kinase 1
LATS2	Large Tumor Suppressor kinase 2
LoF	Loss of Function
LoH	Loss of Heterozygosity
MAF	Minor Allele Frequency
Mb	Megabase
MC1R	Melanocortin 1 Receptor
MINAS	Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Syndrome
MLH1	Mutl Homolog 1
MTA	Material Transfer Agreement
MUCL3	Mucin Like 3
MUTYH	MutY DNA Glycosylase
MYCN	MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor

MYH9	Myosin Heavy chain 9
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NBCCS	Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome
NCI	National Cancer Institute
NEBL	Nebulette
NER	Nucleotide Excision Repair
NGS	Next-Generation Sequencing
NOTCH1	Notch receptor 1
NOTCH2	Notch receptor 2
NRAS	NRAS proto-oncogene, GTPase
PADI6	Peptidyl Arginine Deiminase 6
PCAWG	Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes
PCDHB3	Protocadherin Beta 3
PCR	Polymerase Chain Reaction
POLE	DNA polymerase epsilon, catalytic subunit
POLH	DNA polymerase eta
PPP1R3A	Protein Phosphatase 1 Regulatory subunit 3A
PPP6C	Protein Phosphatase 6 Catalytic subunit
PRKCI	Protein Kinase C Iota
PTCH1	Patched-1
PTCH2	Patched-2
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTPN14	Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 14
PUVA	psoralen and ultraviolet A
QC	Quality Control
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RAC1	Rac family small GTPase 1
RB1	Retinoblastoma 1; RB transcriptional corepressor 1
RGS22	Regulator of G Protein Signaling 22
RNA Pol II	RNA polymerase II
ROS	Reactive Oxygen Species
SCBCN	Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SHH	Sonic Hedgehog

<i>SLC27A5</i>	solute carrier family 27 member 5
SMO	Smoothened
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNV	Single Nucleotide Variant
SSTR	Short Sequence-Specific Tandem Repeat
SUFU	Suppressor of Fused
T4N5	T4 endonuclease 5
TA	Termo de Assentimento
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Transcription Coupled Repair
TE	Tris-EDTA
Ti	Transição
TLS	Translesion Synthesis
<i>TMEM132D</i>	Transmembrane protein 132D
<i>TP53</i>	Tumor Protein p53
<i>TTN</i>	Titin
Tv	Transversão
TYR	Tyrosinase
TYRP1	Tyrosinase Related Protein 1
UDG/UNG	Uracil N-Glycosylase/Uracil-DNA-Glycosylase
<i>UGT2B10</i>	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B10
UTR	Untranslated Region
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
VAF	Variant Allele Fraction
VCF	Variant Call Format
VUS	Variant of Uncertain Significance
XP	Xeroderma Pigmentoso
XPA / XP-A	Xeroderma Pigmentosum, complementation group A
XPB / XP-B	Xeroderma Pigmentosum, complementation group B
XPC / XP-C	Xeroderma Pigmentosum, complementation group C
XPB / XP-D	Xeroderma Pigmentosum, complementation group D

XPE / XP-E	Xeroderma Pigmentosum, complementation group E
XPF / XP-F	Xeroderma Pigmentosum, complementation group F
XPB / XP-G	Xeroderma Pigmentosum, complementation group G
XPV / XP-V	Xeroderma Pigmentosum, complementation group V
YAP1	Yes1 associated transcriptional regulator

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Carcinoma basocelular de pele	2
1.1.1	Aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento	2
1.1.2	Aspectos genéticos e moleculares	3
1.2	Síndrome do xeroderma pigmentoso	6
1.2.1	Etiopatogenia	6
1.2.2	Aspectos clínicos	9
1.2.3	Manejo clínico e terapias em estudo.....	11
1.2.4	Aspectos moleculares somáticos dos tumores cutâneos.....	13
1.2.5	Diferenças fenotípicas	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	METODOLOGIA.....	18
3.1	Pacientes e aspectos éticos.....	18
3.2	Amostras biológicas.....	19
3.2.1	Sangue periférico e saliva	19
3.2.2	Tumor obtido de peça cirúrgica e congelado a fresco	21
3.2.3	Tumor obtido de biópsia e armazenado em parafina.....	22
3.2.4	Controle de qualidade pré-analítica	24
3.3	Painel de genes	26
3.4	Plataforma para sequenciamento de nova geração	27
3.5	Pré-processamento dos dados de sequenciamento	29
3.6	Investigação de variantes germinativas	32
3.7	Investigação de variantes somáticas	36
3.8	Análises estatísticas	38
4	RESULTADOS	39

4.1	Participantes do estudo	39
4.2	Avaliação de variantes germinativas	46
4.3	Perfil mutacional dos tumores	50
4.4	Perfil de genes mutados nos tumores.....	59
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÃO.....	79
7	REFERÊNCIAS.....	80

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Carta de aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP

APÊNDICES

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Apêndice 2 Termo de Assentimento (TA)

Apêndice 3 Painel de Genes para Sequenciamento de Nova Geração

Apêndice 4 *Pepiline* para identificação, seleção e classificação de variantes

Apêndice 5 Participantes e características das amostras excluídas do estudo

Apêndice 6 Variantes germinativas classificadas como provavelmente benigna, identificadas nos pacientes XP-C e XP-V

Apêndice 7 Variantes germinativas classificadas como benigna, identificadas nos pacientes XP-C e XP-V

Apêndice 8 Variantes somáticas identificadas nos tumores dos pacientes XP-C e XP-V

1 INTRODUÇÃO

Entre todas as neoplasias malignas descritas, o câncer de pele não melanoma é o mais frequente em homens e mulheres. Sua incidência aumenta com a idade, sendo observando mais frequentemente entre 55 e 75 anos. É mais comum em indivíduos de pele clara que apresentam, cumulativamente, outros fatores de risco genéticos e ambientais ¹⁻³.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento dos tumores de pele não melanoma incluem: diagnóstico de condição genética que conferem aumento no risco para câncer de pele, histórico familiar de câncer de pele, histórico pessoal prévio de câncer de pele, histórico pessoal de lesões pré-malignas da pele (ceratose actínica, também conhecida como queratose solar), fototipo cutâneo de maior sensibilidade à exposição solar, exposição solar recreativa por período prolongado na infância e juventude, exposição a câmeras de bronzeamento artificial, inflamação local crônica, imunossupressão por terapia após o transplante de órgão ou desencadeada pelo vírus da imunodeficiência humana, história prévia de tratamentos radioterápicos, exposição terapêutica com psoraleno associado à luz ultravioleta A (PUVA), e exposições a substâncias carcinogênicas (arsênio, compostos organofosfatados e coaltar) ²⁻⁴.

O fototipo cutâneo, uma escala de classificação criada em 1976 pelo médico norte-americano Thomas B. Fitzpatrick, avalia a sensibilidade à exposição solar ao levar em consideração a cor dos olhos e cabelo e a reatividade da pele à exposição solar (capacidade de bronzear e resposta do tipo queimadura solar) ⁵. A escala classifica o indivíduo em seis fototipos, do I a VI. O menor valor da escala é atribuído à pele muito sensível ao sol, que sempre queima e nunca bronzeia. O valor mais alto é destinado para a pele que quando exposta ao sol bronzeia intensamente e nunca apresenta resposta do tipo queimadura. Os fototipos de menor valor na escala estão associados com maior risco de câncer de pele ⁶.

O carcinoma de células escamosas e o carcinoma basocelular são os principais tumores dentro da categoria de câncer de pele não melanoma ⁷.

As estimativas mundiais fornecidas pelo banco de dados GLOBOCAN ao avaliar dados de 185 países para 36 tipos de tumores, incluindo tumores de pele não melanoma, porém não considerando os carcinomas basocelulares, mostram que as maiores taxas de incidência do câncer de pele não melanoma estão na América do Norte e na Austrália e Nova Zelândia, tanto para homens quanto para as mulheres ¹.

Devido a não obrigatoriedade de registro dos tumores de pele não melanoma, em decorrência do grande volume de casos e da complexidade do registro de múltiplos tumores em um mesmo indivíduo, existem dificuldades na obtenção das estimativas mundiais ^{7,8}. Desde 1962 observa-se um aumento anual de 3% a 8% na incidência dos tumores de pele não melanoma, sendo o carcinoma basocelular responsável por aumento anual de 10% ².

No Brasil, os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) de 2017 mostram que ocorreram 1.301 óbitos por câncer de pele não melanoma em homens e 949 óbitos em mulheres. O número de casos novos de câncer de pele não melanoma esperados, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 83.770 em homens e de 93.160 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 80,12 casos novos a cada 100 mil homens e 86,65 casos novos a cada 100 mil mulheres ⁴.

1.1 CARCINOMA BASOCELULAR DE PELE

1.1.1 Aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento

O carcinoma basocelular (CBC) tem origem nas células basais da epiderme e é responsável por 80% a 90% dos tumores primários de pele, sendo mais comum em pessoas de meia-idade e idosos acometendo regiões muito expostas ao sol ⁹.

O prognóstico para a maioria dos pacientes com CBC é excelente levando em consideração que, geralmente, as lesões apresentam crescimento lento, sendo necessário de seis meses a um ano para que atinjam um centímetro, e exibem baixo potencial metastático (<0.003% a 0.5%), podendo ser localmente invasivo e recidivar após tratamento ^{3,10,11}.

As células que dão origem aos CBCs são as localizadas na camada basal da epiderme. Mais raramente, quando influenciadas pelo estroma, as células pluripotentes imaturas da epiderme interfolicular e as localizadas na bainha externa do folículo piloso podem também originar os CBCs ¹².

As lesões se apresentam como um nódulo ou ferida "que não cicatriza". São clinicamente classificadas em lesões de crescimento indolente (inclui o CBC nodular, também conhecido como CBC sólido, e o CBC superficial) ou de crescimento agressivo (inclui o CBC micronodular, CBC esclerosante, também chamado morfeiforme, o CBC infiltrativo e o CBC metastático, também reconhecido como carcinoma basoescamoso) ^{3,13,14}.

O CBC nodular representa 50% a 70% das lesões e apresenta-se tipicamente como pápula ou nódulo de aspecto perláceo e translúcido, associada à telangiectasias, depressão central, podendo ser observado ulceração e erosão. O CBC superficial representa 5% das lesões

e apresenta-se como mácula eritematosa ou placa fina, e sua propagação lateral extensa subclínica é responsável pela sua significativa taxa de recorrência após o tratamento cirúrgico. O subtipo pigmentado representa 6% das lesões e engloba tanto o CBC nodular quanto o superficial, refletindo a capacidade de ambos em produzir pigmentos. O CBC esclerosante representa cerca de 10% das lesões e apresentar-se como placa endurecida de cor vermelha ou branca associada ou não à telangiectasias, com bordas mal definidas e grande probabilidade de recidiva e infiltração, sendo considerado, portanto, uma das lesões de pior prognóstico ³. O CBC metaplásico, um subtipo mais raro, apresenta características histológicas basalóides associadas às escamosas do CEC. Embora assemelha-se clinicamente e morfolologicamente ao CBC, tem comportamento mais agressivo, podendo ocasionar metástases ¹⁵.

A mortalidade por CBCs é baixa, porém estes tumores podem causar importantes sequelas em decorrência de tratamentos cirúrgicos ou por acometimento local mais agravante ¹².

A avaliação dos riscos de recorrência, obtida pela análise histológica da biópsia somada à localização anatômica da lesão, guiam a decisão do plano terapêutico. Lesão em região centrofacial, e retroauricular costumam estar associadas com maior taxa de excisão cirúrgica incompleta, por isso são consideradas de maior risco para recidivar ¹⁶.

1.1.2 Aspectos genéticos e moleculares

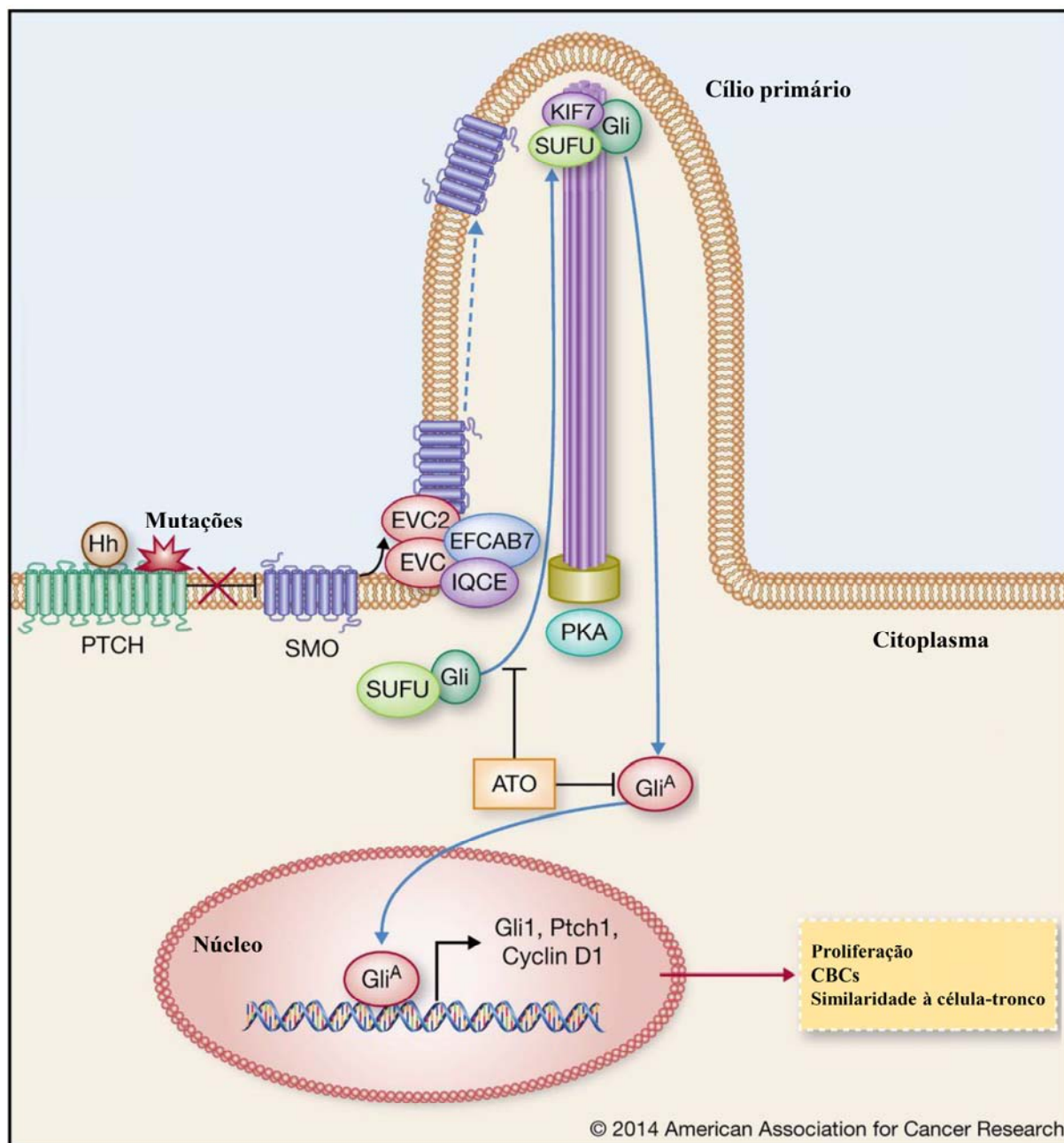
O CBC esporádico representa a maioria absoluta dos casos diagnosticados. Entre as condições genéticas hereditárias que predis põem ao CBC estão a síndrome de Gorlin, ou síndrome do nevo basocelular (NBCCS, do inglês *Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome*) e a síndrome do Xeroderma Pigmentoso. Entre as condições genéticas hereditárias que incluem o CBC em seu espectro de manifestação clínica, embora não considerado como fator de diagnóstico principal ou específico, estão as síndromes de Ataxia-Telangiectasia, Bloom, Werner, Rothmund-Thomson, Muir-Torre, Cowden, Rombo, Bazex-Dupré-Christol, Epidermólise bolhosa simples do tipo Dowling-Meara, Brooke-Spiegler e Schopf-Schultz-Passarge ^{17,18}.

Muitas características moleculares da biologia do CBC vieram de estudos de análise de ligação e associação para apontamento de *loci* de susceptibilidade em famílias com aspectos hereditários ligados ao desenvolvimento de CBCs. Nesse contexto, a síndrome de Gorlin, uma doença autossômica dominante que predis põem a múltiplos CBCs, demonstrou o papel crucial da via *Sonic Hedgehog* (SHH) e do gene *Patched* (*PTCH1*) no desenvolvimento do CBC ¹⁹⁻²¹.

O papel central da via SHH foi posteriormente demonstrado em CBCs esporádicos^{22,23} com a identificação frequente de eventos de perda de heterozigose (LoH, do inglês *Loss of Heterozygosity*) em região 9q21–q31, *locus* do gene *PTCH1*, bem como a identificação de variantes somáticas pontuais do tipo *missense* e *nonsense* ao longo de todo o gene *PTCH1*²⁴.

A via SHH tem importante papel no controle da proliferação celular em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário de mamíferos, processo que requer um rigoroso controle da expressão de inúmeros genes para correto estabelecimento das estruturas e órgãos do indivíduo. No tecido adulto essa via se mantém inativa, sendo reativada em processos de diferenciação, proliferação e manutenção do tecido. A ativação descontrolada da via SHH é identificada em tumores de pele, cérebro, fígado, bexiga, pâncreas, estômago, colón, mama, pulmão, próstata e tumores hematológicos tais como leucemia mielóide crônica e mieloma múltiplos. Recentemente a superativação da via SHH foi identificada em células tronco tumorais, uma subpopulação de células com capacidade de auto-renovação e que, portanto, possuem papel essencial na tumorigênese, progressão do tumor, metástase, recorrência e resistência a drogas²⁵.

Os ligantes da via SHH incluem, o *Sonic Hedgehog* (SHH), *Indian Hedgehog* (IHH) e *Desert Hedgehog* (DHH), que ao ligarem a proteína transmembrana PTCH, inibe sua função inibitória da cascata de sinalização. Com a ligação de SHH à PTCH ocorre liberação e ativação de outra proteína transmembrana, denominada *Smoothened* (SMO). A SMO migra para a estrutura celular cílio primário, uma pequena organela formada a partir de microtúbulos que leva à transdução do sinal ao citoplasma permitindo, por fim, a ativação da *Glioma-Associated Oncogenes Homolog* (GLI), um conjunto de proteínas da família de fatores de transcrição GLI1, GLI2 e GLI3. Na ausência do ligante, as proteínas GLI estão fosforiladas, ubiquinadas e parcialmente clivadas (forma inativa). Quando SMO é translocado para o cílio primário, o processo proteolítico é reprimido e as proteínas GLI na forma ativa ficam aptas para executar a transcrição dos genes alvos. O supressor de fusão (SUFU) liga-se diretamente aos fatores de transcrição GLI e os ancora no citoplasma, impedindo sua translocação nuclear, promove a fosforilação e, por fim, GLI é submetido a clivagem proteossômica o que termina por inibir a via do SHH, por inibição da ativação dos genes alvos do GLI² (Figura 1).



Fonte: Adaptado de Athar et al.²⁶

Figura 1 – Via de sinalização *Sonic Hedgehog* (SHH).

A maioria dos CBCs esporádicos apresentam mutações de perda de função em pelo menos um alelo do gene supressor tumoral *PTCH1*, impedindo então a repressão da cascata de sinalização da via SHH. Outros tumores CBCs apresentam mutações de ganho de função no oncogene *SMO*, resultando na hiperativação da via. Mutações de perda de função no gene *SUFU*, também identificadas em CBCs esporádicos, permite aumento na atividade transcripcional por GLI^{2,25}.

Outro gene que apresenta papel importante na carcinogênese das células basais da epiderme, em sua forma esporádica, é o *TP53*. A proteína codificada pelo *TP53*, a p53, é responsável pela manutenção da integridade do DNA ao atuar como sensor de estresse celular e efector do controle do ciclo celular, reparo do DNA, indução de apoptose e diferenciação celular ²⁷. O *TP53* é o gene relacionado à carcinogênese mais frequentemente mutado, sendo observado em mais de 50% dos tumores sequenciados ²⁸. Nos CBCs mutações no *TP53* são identificadas em mais de 50% dos casos ²⁹⁻³¹.

Na contramão de estudos direcionados para caracterizar a prevalência de variantes somáticas em genes supressores tumorais ou oncogenes específicos, desenhos experimentais que utilizaram sequenciamento de nova geração para avaliar de maneira abrangente o genoma tumoral, levaram a identificação de novos genes relacionados com o CBC ^{29,32,33}. Um estudo recente avaliou o sequenciamento completo do exoma de 12 CBCs e identificou variantes genéticas adquiridas na metade dos tumores avaliados, encontrando 165 genes alterados, incluindo genes sabidamente relacionados ao câncer. O estudo também destacou a frequência de transições do tipo C>T, uma troca de bases tipicamente induzida pela radiação ultravioleta e que será abordada mais adiante ²⁹.

1.2 SÍNDROME DO XERODERMA PIGMENTOSO

A prevalência estimada para a síndrome do Xeroderma Pigmentoso (XP) na população geral é de 1:1.000.000 ³⁴. A incidência é bastante variável dependendo da região. Estima-se que nos Estados Unidos e Europa ocorra 1 caso em cada 250 ou 450 mil nascimentos, respectivamente. Entretanto, no norte da África e no Japão, a incidência é muito maior, chegando a 1 caso a cada 20 mil nascimentos. A incidência do XP é maior em populações com maior taxa de endogamia. Em uma série de 40 pacientes XP da Argélia, a maioria descendente de árabes, a consanguinidade foi representada em 95% dos casos ³⁵. Embora desconhecida a incidência da síndrome no Brasil, estima-se que cerca de 1.000 pacientes afetados podem viver hoje no país ³⁶. O agrupamento por isolamento geográfico de uma comunidade no estado de Goiás (distrito de Araras, zona rural do município de Faina) contribuiu de forma expressiva para esta estimativa ³⁷.

1.2.1 Etiopatogenia

A identificação de variantes bialélicas patogênicas nos genes *XPA*, *ERCC3/XPB*, *XPC*, *ERCC2/XPB*, *DDB1/XPE*, *ERCC4/XPF* e *ERCC5/XPG*, em linhagem germinativa,

determinam o diagnóstico molecular da síndrome autossômica recessiva do Xeroderma Pigmentoso. Estes genes codificam proteínas envolvidas no sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês *Nucleotide Excision Repair*), que remove lesões que causam distorções na estrutura helicoidal do DNA ³⁸⁻⁴⁰. Entre as lesões reparadas por esta via estão os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e 6-4 fotoprodutos (6-4 PPs), ambos provocados pela radiação ultravioleta (UV), e grandes adutos de DNA induzidos por agentes químicos ambientais mutagênicos ou por drogas citotóxicas usadas em quimioterapia (compostos à base de platina, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas aromáticas) ⁴¹⁻⁴⁴.

O reconhecimento destas lesões ao DNA se dá por duas subvias do NER, o reparo genômico global (GGR, do inglês *Global Genome Repair*) e o reparo acoplado à transcrição (TCR, do inglês *Transcription Coupled Repair*). O GGR opera em qualquer lugar do genoma, sendo as proteínas XPC e XPE responsáveis pelo reconhecimento do dano. No TCR, processo de reparo mais rápido, o dano na fita de DNA transcrita de genes ativo é reconhecido pela RNA polimerase II (RNA Pol II). Após a etapa de reconhecimento do dano, as subvias convergem para remover o fragmento contendo a lesão e inserir novos nucleotídeos na fenda formada ^{45,46}.

Uma versão variante da síndrome do XP ocorre devido variantes germinativas bialélicas no gene *POLH/XPV* que codifica a polimerase eta (pol eta) envolvida no mecanismo de síntese translesão (TLS, do inglês *Translesion Synthesis*) que permite o reparo do DNA pós-replicativo, prevenindo a morte celular associada ao bloqueio da replicação do DNA. Na ausência da pol eta, os dímeros são replicados com menor eficiência e menor fidelidade por outras polimerases também envolvidas no mecanismo de síntese translesão, resultando em alterações no DNA. A pol eta é capaz de executar a síntese de DNA translesão quando diante de lesões como as induzidas por radiação UV (CPDs, 6-4 PPs e 7,8-dihidro-8-oxiguanina [8-oxoG]), sítio abásicos e adutos de DNA induzidos por cisplatina e oxaliplatina ^{38-40,47-49}.

Desta forma, a síndrome do XP é subdivida em oito grupos, classificados por alguns autores como “grupos de complementação”, que recebem o nome do gene que apresenta a variante germinativa patogênica: XP-A, XP-B, XP-C, XP-D, XP-E, XP-F, XP-G e XP-V ^{38,40,44}. Os grupos de complementação mais prevalentes, englobando cerca de 90% dos casos com caracterização molecular, são o XP-C, XP-A e XP-D com contribuição importante de efeitos fundadores. O XP-C é mais frequente no Norte da África e Europa, o XP-A no Japão e Europa e o XP-D na Europa, Oriente Médio e nos Estados Unidos ^{39,50-54}. No Brasil, o cenário até o momento conhecido indica que os grupos XP-C e XP-V são os mais frequentes ^{37,55}.

A principal característica associada à síndrome do XP é a sensibilidade exacerbada da pele à luz solar devido aos danos induzidos pelos componentes da radiação UV, UVB e UVA⁵⁶.

O espectro eletromagnético da radiação UVA e UVB difere nos efeitos biológicos e na profundidade de penetração das camadas da pele. A UVB, com comprimento de onda variando entre 280 e 320 nm e maior energia, é absorvida diretamente pelo DNA e pode causar alterações genéticas características em piridiminas adjacentes, transições C>T que serão detalhadas mais adiante. Alternativamente a UVB pode ser absorvida por outros cromóforos celulares, tendo sua energia transferida para o oxigênio e gerando espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) que interagem preferencialmente com a base guanina, gerando uma alteração genética característica, a transverso G>T (CG:AT), que também será mais detalhada posteriormente. A UVA, por apresentar comprimento de onda maior (320 e 400 nm), atravessa as camadas da epiderme e atinge a camada basal e derme subjacente. Os estudos até o momento mostram que quase não se observa absorção da radiação UVA pelo DNA, sendo seu efeito mutagênico atribuído a sua interação com o oxigênio celular, produzindo ROS capazes de induzir danos oxidativos ao DNA, incluindo o DNA de melanócitos localizados na junção epiderme-derme e de fibroblastos dérmicos^{47,57,58}. Pela abundância ao atingir a superfície da Terra e pela característica de penetrar profundamente a pele, acredita-se que a radiação UVA tenha contribuição maior no desenvolvimento vários tumores cutâneos^{47,58}.

Com exceção do efeito benéfico da estimulação da síntese de vitamina D, as consequências da exposição à radiação UV são adversas. Os efeitos agudos incluem, além do dano ao DNA (efeito direto), apoptose devido ao processo de queimadura solar dos queratinócitos cutâneos, eritema e aumento da síntese de mediadores inflamatórios associados, imunossupressão evidenciada pelo número reduzido de células de Langerhans e aumento da pigmentação (melanogênese) que resultam em lesões pigmentares lineares (efélides e lentigos). Cronicamente, os efeitos da exposição incluem fotoenvelhecimento, marcado pelo aspecto ressecado da pele e caracterizado histologicamente pela degeneração das fibras colágenas, espessamento e hiperplasia epidérmica, espessamento do estrato córneo, aspecto poiquilodérmico (áreas hiper e hipopigmentadas), formação de vasos telangiectásicos e múltiplas lesões pré-malignas e/ou múltiplos tumores primários malignos⁵⁷.

Estes efeitos na pele determinam o fenótipo característico da síndrome do XP e compõem o quadro clínico clássico, sendo observados em áreas do corpo mais expostas e em detrimento de mínima exposição solar, em idade incomum em relação à população geral, em média antes dos 20 anos de idade⁵⁶. Pacientes portadores da versão variante da síndrome do

XP (grupo XP-V) apresentam o mesmo quadro clínico, porém mais brando e de apresentação mais tardia ^{36,59}.

1.2.2 Aspectos clínicos

A síndrome do XP confere risco aumentado de 10.000 vezes para o desenvolvimento de tumores cutâneos não melanoma (CBCs e carcinoma espinocelulares - CECs) antes dos 9 anos de idade e risco aumentado em cerca de 2.000 vezes para o desenvolvimento de melanoma maligno antes dos 22 anos de idade ^{39,56,60}.

Além dos aspectos cutâneos, a síndrome do XP confere risco aumentado para lesões em tecidos epiteliais e mucosas de revestimento externo que estão expostos à radiação UV como da porção anterior do olho (córnea e conjuntiva) da cavidade oral (lábio, ponta da língua, gengiva e palato) ^{56,61-63}.

Lesões oculares são frequentes, sendo observada em mais de 90% dos casos e se iniciam tão cedo quanto as lesões cutâneas ⁶³. Geralmente a manifestação inicial da fotofobia inclui conjuntivite, neovascularização da córnea, olhos secos e hiperpigmentação das pálpebras. Diante de exposição crônica, a manifestação ocular pode evoluir para ceratite severa com formação de pterígios que pode crescer e progredir para opacificação da córnea, atrofia palpebral, entrópio ou ectrópio e perda de cílios. Não são infrequentes os casos que evoluem para o desenvolvimento de carcinomas de células epiteliais e de melanócitos das estruturas oculares. A depender do grau de comprometimento ocular, a perda da visão é inevitável ^{39,60,63,64}.

É observado também risco aumentado de 10 a 20 vezes no desenvolvimento de outras neoplasias primárias não relacionadas aos tecidos de revestimento externo, também chamadas de tumores internos, ocorrendo em maior frequência em indivíduos XP do grupo XP-C ^{39,50,51}. O primeiro estudo que associou de fato a ocorrência de tumores internos à síndrome do XP foi extraído de uma revisão bibliográfica conduzida com 830 indivíduos XP, dos quais 12 apresentaram tumores não cutâneos ³⁹. Entre os diferentes tipos de tumores já relatados estão as leucemias, tumor de sistema nervoso central (incluindo gliomas) e periférico, câncer de pulmão, câncer de útero (incluindo adenocarcinoma endocervical), câncer de mama, câncer gástrico (incluindo adenocarcinoma), câncer de tireoide (incluindo neuroendócrino) e câncer de ovário ^{39,50,51,55,60,65-68}.

Menopausa prematura, um sintoma de envelhecimento prematuro, foi recentemente observada em 31% (14/45) das pacientes avaliadas, ocorrendo por volta dos 29 anos. Insuficiência ovariana primária foi também reportada em nove desses casos. As pacientes

avaliadas apresentavam 18 anos de idade ou mais, e a idade da menarca, bem como a fertilidade, não foram apontadas como alteradas nessa coorte ⁶⁹.

Aproximadamente 30% dos indivíduos com XP podem também apresentar anormalidades neurológicas progressivas, que em sua forma mais branda pode se manifestar por hipo-reflexia, perda auditiva neurosensorial, espasticidade e neuropatia periférica. Em sua forma mais severa, o indivíduo pode apresentar perda neuronal, microcefalia, comprometimento intelectual e ataxia. A síndrome do XP com complicações neurológicas mais severas, ocorrendo antes da segunda década de vida e associada com a baixa estatura, desenvolvimento sexual imaturo e atrofia de múltiplos sistemas, é também reconhecida como síndrome de DeSanctis-Cacchione, um termo pouco utilizado já que preferivelmente os autores costumam se referir a estes pacientes como “portadores da síndrome do XP com manifestações neurológicas severas”. Anormalidades neurológicas foram relatadas em indivíduos XP dos grupos de complementação XP-A, XP-B, XP-D e XP-G ^{39,50,68,70–72}.

Estudos que exploram a causalidade de lesões em indivíduos XP, que não evoluem tecidos de revestimento, direcionam para a ação de danos oxidativos ao DNA gerados por processos metabólicos ou outras fontes ^{68,73}. Nesse sentido, está bem caracterizada a atuação da proteína XPC, inicialmente avaliada em camundongos e posteriormente em humanos ⁵⁰. A participação da proteína XPC no reconhecimento do dano oxidativo, ativando efetores da via de reparo por excisão de bases (BER, do inglês *Base Excision Repair*) foi demonstrada ^{68,73,74}. A consequência da identificação de variantes germinativas em um alelo do *XPC* ou da inativação de um alelo por hipermetilação em tecido constitutivo, é constantemente explorada em indivíduos sem fenótipo da síndrome do XP. Polimorfismos no *XPC* são amplamente estudados, especialmente os rs2228001 (p.Lys939Gln) e rs2228000 (p.Ala499Val), e os resultados mostram associação com maior risco ou pior prognóstico para tumores de pulmão, de bexiga, do trato digestivo, de mama, de tireoide, tumores colorretais e leucemia ^{75–83}.

Em termos de mortalidade, as evidências mais efetivas levam ao estudo conduzido no NIH onde pacientes tiveram o maior período de acompanhamento clínico, entre 1971 a 2009. Os autores mostraram que as principais causas de óbito entre os indivíduos com XP são os tumores de pele (34%) e as consequências da degeneração neurológicas (31%), seguido pelos tumores internos (17%) ⁵¹. A idade média de óbito entre indivíduos XP com e sem sintomas neurológicos é 29 e 37 anos, respectivamente ⁵⁰.

1.2.3 Manejo clínico e terapias em estudo

Testes genéticos laboratoriais para o diagnóstico pré e pós-natal da síndrome do XP não fazem parte das diretrizes de utilização do rol de procedimentos da Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). No entanto a pesquisa de variantes germinativas nos genes *XPA* e *XPC* é comercialmente oferecida por alguns laboratórios ao inserir esses dois genes nos painéis de sequenciamento para avaliação de risco de câncer hereditário.

Mediante suspeita clínica de XP, o indivíduo deve ser orientado sobre a necessidade de medidas radicais de fotoproteção, que inclui aplicação de cremes ou loções tópicas com fator de proteção solar ≥ 60 , uso de chapéus, luvas e óculos escuros e o uso de roupas que cubram toda a extensão do corpo incluindo os membros. Tecidos escuros ou de fibra sintética contendo partículas fotoprotetoras proporcionam melhor proteção. É recomendado também adaptar a casa, bem como o local de estudo ou trabalho com cortinas blecaute, que impedem a entrada dos raios solares, e com lâmpadas que possuem menor emissão de raios UV ^{59,84,85}.

Não existe terapia aprovada para uso nos pacientes XP. São recomendados autoexame e avaliação médica periódica cutânea e oftalmológica a cada 3 a 6 meses, bem como avaliação médica audiológica e neurológica de base na infância para identificar aqueles indivíduos com degeneração neurológica ^{46,86,87}. É recomendado avaliação periódica com equipe neurológica e otorrinolaringológica para indivíduos que apresentam degeneração neurológica. A adoção de reabilitação física para prolongar a função mantida e uso de aparelhos auditivos são considerados benéficos ^{46,59,87}.

A remoção cirúrgica de lesões é preferível a outros métodos como terapias a base de luz ou laser e até mesmo radioterapia, embora poucos estudos tentam mostrar a eficácia do tratamento de lesões pré-malignas com terapia fotodinâmica ^{46,88,89}.

Ao avaliar os processos biológicos envolvidos na deficiência de reparo em pacientes XP ou suas linhagens, alguns estudos levantaram potenciais terapias, algumas bem promissoras ⁴⁶.

Buscando suprir diretamente a deficiência de reparo do DNA dois processos são investigados: (1) a aplicação tópica de enzimas como a endonuclease V, derivada de bacteriófagos T4 (T4N5), encapsulada em lipossomos e comercialmente conhecida como dimericina ⁹⁰; (2) a segurança no procedimento de terapia gênica ⁹¹.

Também é estudado o uso de antibióticos aminoglicosídeos como a gentamicina e seu análogo geneticina que, em linhagens celulares de pacientes do grupo XP-C, mostrou-se promissor ao permitir a continuidade da tradução de transcritos de *XPC* contendo diferentes alterações que inserem códon de parada prematuro, pela incorporação aleatória de um aminoácido no local. A eficiência dessa estratégia mostrou variar de acordo com a sequência

de bases do códon, com o número de cópias da alteração que insere o códon de parada (se em homozigose ou em heterozigose) e sua localização em relação a junção exon-exon, e com o composto utilizado no tratamento ⁹².

Buscando minimizar os efeitos de fotossensibilidade e tumorigênese associados ao aumento nos níveis de ROS intracelular, investiga-se o uso oral de enzimas antioxidantes, tais como a coenzima Q, e inibidores da enzima NADPH oxidase ⁷².

O uso oral de retinóides (Acitretina e Isotretionina) reduz o desenvolvimento de lesões pré-malignas e tumores de pele malignos, porém o efeito terapêutico desaparece pouco tempo após a suspensão de sua administração. Além do efeito teratogênico, os retinóides induzem efeitos colaterais variados ^{93,94}.

O uso tópico do imunomodulador Imiquimod (comercialmente conhecido como Aldara) e do imunomodulador Interferon alfa intralesional, e o uso de inibidores de síntese de DNA como o antineoplásico análogo pirimídico 5-fluorouracil [5-FU] (comercialmente conhecido como Efurix) para tratamento e prevenção de lesões de pele pré-malignas (ceratóticas actínicas) e lesões malignas (CBC e CEC) têm papel importante na terapêutica ^{46,94,95}.

Para o tratamento de CBC o inibidor oral da via de *Sonic Hedgehog* (Vismodegib), já aprovado para uso em CBCs esporádicos recorrentes, localmente avançados ou metastáticos, se mostrou promissor, porém os efeitos tóxicos cumulativos devem ser considerados ⁹⁶⁻⁹⁸.

A utilização do anticorpo monoclonal humanizado anti-PD-1 pembrolizumabe (anticorpo anti-receptor de morte celular programada 1, comercialmente conhecido como Keytruda) foi avaliado, com resultados positivos, no tratamento de tumor de pele melanoma e não-melanoma ^{99,100}.

Acetoexamida e Glimepirida, fármacos do grupo das sulfonilurêias aprovados para o tratamento de diabetes mellitus do tipo 2, foram avaliados em linhagem celular de fibroblastos de paciente XP-A, com variante germinativa do tipo *frameshift*. Foi observado aumento na viabilidade celular pós exposição à radiação UV e aumento na eliminação das lesões CPDs. O mecanismo de ação, que ainda não é completamente conhecido, envolve a degradação da enzima MUTYH. A Acetoexamida e a perda de MUTYH protegem células, deficientes e proficientes em NER, da morte celular induzida por radiação UV, o que levanta a hipótese da existência de uma nova via, independente de NER, para remover danos induzidos por radiação UV. Os autores sugerem que a Acetoexamida ou inibidores de MUTYH seriam promissores para qualquer síndrome de hipersensibilidade a radiação UV e levantam a importância da integridade do MUTYH para prevenção de tumores do trato gastrointestinal. Portanto, terapias direcionadas para inativação de MUTYH devem considerar o tratamento focal ou tópico ^{46,101}.

1.2.4 Aspectos moleculares somáticos dos tumores cutâneos

A radiação UV induz alterações específicas no DNA, os chamados fotoprodutos CPDs, 6-4PPs e 8-oxoG que, cumulativamente e sem reparo apropriado, induzem a carcinogênese ^{47,58,102}.

Em resposta à absorção da energia da radiação UV, ocorrem ligações covalentes entre os carbonos 5 e 6 de duas pirimidinas adjacentes, formando um anel ciclobutano, que corresponde à lesão CPD. Quando as ligações covalentes ocorrem entre os carbonos 6 e 4 de duas pirimidinas adjacentes, é formado a lesão 6-4PP. Quando não reparados, no momento da replicação do DNA, esses fotoprodutos dão origem a mutações específicas, caracterizada por transições de base única C>T (C:G>T:A) e transições em tandem CC>TT (CC:GG>TT:AA) ^{47,58,102,103}.

Quando a radiação é absorvida por outros cromóforos celulares, a energia é transferida para o oxigênio, os ROS são formados. Estes interagem preferencialmente com a base guanina, gerando diferentes alterações conformacionais na estrutura do DNA, dentre elas a 8-oxoG, considerada um biomarcador para identificar estresse oxidativo. A 8-oxoG pode resultar em emparelhamento errôneo com a adenina e gerar uma alteração genética característica, a transverso G>T (G:C>T:A), devido ao erro de pareamento da 8-oxoG com uma adenina ^{47,58,102,104}.

A ocorrência de uma assinatura genética associada à fotocarcinogênese, induzidas por lesões UV, afetando genes que constituem vias importantes para o desenvolvimento de tumores cutâneos, tais como o *SMO*, *TP53*, *PTCH1*, *CDKN2A* e *PTEN*, foi identificada em tumores de pele melanoma e não melanoma de pacientes XP ^{33,105–108}. Alterações genéticas estabelecidas pela falta de reparo de dímero de pirimidinas induzidas por UV no gene *PTCH1* podem contribuir com a alta frequência de carcinomas basocelulares observados nos pacientes XP ¹⁰⁹. Em pacientes com mutações germinativas no gene *XPC*, mutações induzidas por UV foram encontradas apenas na fita não transcrita do gene *TP53* em tumores cutâneos, evidenciando que estes pacientes apresentam normalidade no reparo da fita transcrita de genes ativos ^{66,108}. Foi observado também em pacientes XP-C que, em tumores internos, as alterações identificadas no *TP53* não apresentam o padrão de mutação induzido por UV, possuem padrão de lesão induzida por dano oxidativo ⁶⁶.

Recentemente o perfil global de assinatura mutacional, explorado por sequenciamento completo do exoma de linhagem celular de paciente do grupo XP-V submetida a exposição à radiação UVA, mostrou que a deficiência da pol eta resulta em maior acúmulo de mutações C>T ou CC>TT. Uma única dose de radiação UVA, correspondendo a 30 minutos de exposição

solar, foi suficiente para permitir a detecção de assinatura mutacional similar à observada em câncer de pele melanoma (assinatura S7) do banco de dados público sobre mutações em câncer, o *COSMIC* (do inglês, *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*)⁴⁷.

1.2.5 Diferenças fenotípicas

Diversidade na manifestação clínica é observada em portadores da síndrome do XP nos diferentes grupos de complementação^{53,56}.

Os estudos de correlação genótipo-fenótipo detalham a heterogeneidade relacionada a *locus* e mostram que, embora todos os pacientes apresentem efélides, a reação exacerbada de queimadura solar é uma manifestação observada em grupos de complementação específicos, assim como o comprometimento neurológico. Para aqueles indivíduos de grupos de complementação que mantém a proficiência da subvia TCR do NER (grupos XP-C, XP-E e XP-V), no geral, não se observa reação de queimadura solar exacerbada para o tipo de pele e não é observado comprometimento neurológico. Acredita-se que, por não apresentarem reação de queimadura solar exacerbada, estes pacientes são diagnosticados tardiamente e, portanto, passam por longo período sem evitar exposição solar, refletindo assim no perfil comumente observado de gravidade nas manifestações, com risco maior para desenvolver tumores cutâneos^{46,53}. Para o grupo XP-C é observado frequência maior de casos com acometimento ocular grave, iniciado na infância como um dos sinais iniciais da síndrome, e podendo evoluir para diminuição da acuidade visual. Para pacientes do grupo XP-V, o acometimento ocular é mais brando e de início tardio^{53,55,110}.

Indivíduos XP de um mesmo grupo de complementação também podem apresentar diferenças nas manifestações clínicas⁵³. Observamos em um estudo anterior de nosso grupo que é heterogêneo o fenótipo (considerado principalmente pelo número de lesões desenvolvidas e tipo histológico) das famílias portadoras da mesma variante germinativa em *XPC*, a c.2251-1G>C. Essa variação no fenótipo ocorre mesmo entre pessoas que possuem hábitos semelhantes de fotoproteção, como observado para duas irmãs homozigotas para a variante germinativa, que tinham diferença de idade de 6 anos, e sempre residiram juntas⁵⁵. Embora não avaliado para as duas irmãs supracitadas, a associação da heterogeneidade clínica com níveis distintos de hipersensibilidade a radiação UV em detrimento a diferentes isoformas de *XPC*, foi anteriormente descrita em pacientes XP¹¹¹.

Tais diferenças fenotípicas podem também ser parcialmente explicadas pela intensidade e frequência da exposição à radiação UV. Portanto, em regiões tropicais como no Brasil, onde há maior incidência de luz UV, é esperado que pacientes XP tenham quadro de manifestação

clínica mais precoce e agressivo ³⁶. Essa associação foi observada no estudo prévio do grupo onde um paciente do grupo XP-E, que residia no Amazonas, faleceu aos 21 anos em decorrência da gravidade no curso do carcinoma espinocelular (CEC) de conjuntiva ocular que desenvolveu, em adição aos múltiplos tumores cutâneos ⁵⁵. Para indivíduos do grupo XP-E em geral observa-se fenótipo brando da síndrome, sendo normalmente diagnosticado na vida adulta ⁵³.

A importância da exposição e da latitude pode também refletir mudanças em padrões já bem definidos de manifestação. Indivíduos do grupo XP-V apresentam os primeiros sinais da síndrome por volta dos 20 anos de idade ⁵³. No entanto, os estudos com pacientes do Brasil mostram que os sinais da síndrome aparecem mais precocemente, por volta dos 7 anos ^{37,55}.

Estímulos biológicos (como alteração hormonal, inflamação e infecção) ou físicos (como o trauma) poderiam também somar a essas diferenças fenotípicas. O papel das modificações epigenéticas, embora ainda não explorado, poderia também explicar essas variações fenotípicas.

Polimorfismos em genes responsáveis por manter a integridade genômica são potenciais modificadores de riscos de doenças e *loci* que afetam a suscetibilidade ao desenvolvimento de melanoma englobando genes envolvidos em processos de pigmentação, reparo, sistema imune, metabolismo, controle do comprimento telomérico e receptores de vitamina D, já foram relatados ¹¹²⁻¹¹⁵.

Embora seja um evento raro, variantes germinativas patogênicas coexistindo em diferentes genes relacionados a síndromes de câncer hereditário já foi relatado em indivíduo de origem indiana com diagnóstico clínico de XP e que, aos 65 e 67 anos, desenvolveu dois tumores colônicos. O diagnóstico clínico de XP foi estabelecido na infância e embora fossem perceptíveis sinais cutâneos de danos induzidos por radiação UV, incluindo lesões cutâneas malignas e pré-malignas, outras características da síndrome do XP não foram observadas. A avaliação imuno-histoquímica dos dois tumores colônicos, adenocarcinoma mucinoso em região do ceco e adenocarcinoma em colón sigmoide, mostrou perda de expressão das proteínas MLH1 e PMS2. A avaliação de tecido constitutivo revelou que o paciente era portador de variante provavelmente patogênica em *MLH1* (c.306G>T; p.Glu102Asp) e variante em *XPA* (c.555+8A>G, em homozigose) que, na avaliação da linhagem de fibroblasto, mostrou resultar em diminuição na capacidade de reparo do DNA ¹¹⁶.

A variante c.555+8A>G no *XPA*, classificada como patogênica pelo *ClinVar*, foi identificada em vários indivíduos paquistaneses e indianos do estudo de Fassihi et al. ⁵³, que apresentam características dermatológicas e oftalmológicas brandas da síndrome do XP e nenhuma anormalidade neurológica. Estudo funcional adicional ¹¹⁷ mostrou que a c.555+8A>G

resulta na produção de variante de *splicing* que retém sete bases intrônicas, alterando a janela de leitura do transcrito. A variante está associada com a produção de baixos níveis do transcrito normal, podendo corresponder a 5%-10% da capacidade normal de reparo do DNA ^{53,117}.

A identificação de co-heranças, fenômeno também reconhecido como Síndrome da Neoplasia Hereditária Multilocus (MINAS, do inglês *Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Syndrome*), tem como facilitador a implementação de painéis multigenes em sequenciamento de nova geração para a avaliação de indivíduos em risco para desenvolvimento de tumores ^{118,119}.

A caracterização dos aspectos moleculares germinativos e somáticos dos pacientes portadores da síndrome do Xeroderma Pigmentoso é de grande importância, tendo em vista que pode identificar variantes de suscetibilidade, variantes germinativas patogênicas previamente não relacionadas ao espectro da síndrome ou perfis somáticos tumorais não descritos. Essas informações podem contribuir no entendimento da diversidade do fenótipo e podem levantar questões relevantes para o melhorar o manejo dos pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de alterações germinativas e somáticas buscando contribuir com a compreensão do perfil mutacional de indivíduos portadores da síndrome do Xeroderma Pigmentoso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar alterações germinativas em um grupo de genes que possam modificar o risco para o desenvolvimento de tumores cutâneos ou outros fenótipos em pacientes XP-C e XP-V;
- Avaliar o perfil de alterações somáticas em tumores cutâneos basocelulares de pacientes XP-C e XP-V;
- Avaliar o perfil de alterações somáticas de um tumor gástrico de um paciente XP-V.

3 METODOLOGIA

Este é um estudo unicêntrico retrospectivo.

3.1 PACIENTES E ASPECTOS ÉTICOS

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center (número 2284/16 – Anexo 1). Em dezembro de 2016 recebeu a aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (número CAAE 60136616.8.0000.5432 – Anexo 2).

A proposta de investigação do estudo foi estruturada para dar continuidade no trabalho anterior do grupo que, ao avaliar número grande indivíduos com diagnóstico clínico da síndrome do Xeroderma Pigmentoso, possibilitou a identificação das variantes germinativas clinicamente relevantes nos genes XP relacionados à síndrome (CEP #1302/09) ^{55,120}. Na ocasião os participantes receberam laudo do teste genético durante consulta de aconselhamento genético coordenada pelos médicos do Departamento de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center.

Os critérios de inclusão foram: pacientes previamente identificados com variantes germinativas clinicamente relevantes nos genes relacionados à síndrome do Xeroderma Pigmentoso e que desenvolveram tumores primários com material disponível na instituição.

Os critérios de exclusão foram: pacientes com amostras em quantidade insuficiente para extração de DNA, ou com DNA em quantidade/qualidade insuficiente para aplicação na metodológica proposta.

Os registros de laudos patológicos (sistema ACProjects - H2TC), o sistema de busca do Banco de Macromoléculas do Biobanco (sistema ACProjects - Biobank) e o Arquivo do Banco de Tumores do Departamento de Anatomia Patológica e Biobanco foram acessados para selecionar os participantes que desenvolveram tumores primários e tinham material disponível na instituição.

Inicialmente foram selecionados 24 participantes com variantes germinativas clinicamente relevantes nos genes XP, previamente identificadas, que contribuiriam com 71 amostras incluindo tecido constitutivo (saliva e leucócito) e tumores. Conforme abordado nas

seções que seguem, o número de participantes incluídos nesse estudo foi reduzido para seis, que contribuíram com seis amostras de tecido constitutivo e 11 amostras de tumores.

As informações clínicas, incluindo tratamento quimioterápico ou radioterápico prévio à remoção da amostra de interesse para o estudo, foram obtidas mediante a consulta dos prontuários eletrônicos (sistema ACProjects – H2TC).

Os documentos Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1) e Termo de Assentimento (TA) (Apêndice 2) foram elaborados para atender possível necessidade de re-consentimento dos pacientes incluídos, para uso de seu material biológico. A aplicação do novo TCLE ou TA foi dispensável para todos os pacientes uma vez que estes assinaram TCLE anterior ao estudo, concordando com o armazenamento do excedente de seu material biológico no Biobanco da instituição (Banco de Tumores ou Banco de Macromoléculas) e uso em pesquisas científicas futuras aprovados pelo CEP. O Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center segue política descrita em trabalho previamente publicado ¹²¹.

3.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Todas as amostras utilizadas no estudo (amostras de tecido constitutivo e tumores) foram direcionadas para os *facilities* contratados para projetos conduzidos em colaboração com o *Division of Cancer Epidemiology and Genetics (DCEG)* do *National Cancer Institute (NCI)*. O envio ocorreu em acordo com as normas sanitárias de transporte de material biológico humano. Para o compartilhamento de material biológico com colaborador no exterior foi estabelecido um acordo entre as instituições envolvidas através da assinatura do documento *Material Transfer Agreement (MTA)*.

3.2.1 Sangue periférico e saliva

Todas as 24 amostras de sangue periférico ou saliva foram coletadas entre 2009 e 2011 para atender estudo prévio do grupo (CEP #1302/09) ^{55,120}.

O sangue periférico foi coletado em tubos à vácuo tampa roxa (BD Vacutainer Hemogard™ EDTA K2 Plus 4ml – 7,2mg EDTA K2). A equipe técnica do Biobanco do Banco de Macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center processou cada amostra de sangue para isolar a papa leucocitária para armazenamento. Foram solicitadas alíquotas de 1,5 a 5,0 ug de DNA genômico isoladas das papas leucocitárias.

O DNA solicitado da papa leucocitária foi isolado seguindo o protocolo do Banco de Macromoléculas. Inicialmente as amostras de sangue foram centrifugadas a 1.000rcf por 10-30

minutos, em temperatura ambiente, para isolar os componentes do sangue. O componente plasmático foi descartado e os demais componentes celulares (hemácias e leucócitos) foram homogeneizados e transferidos para novo tubo. As hemácias foram lisadas em aproximadamente 40 mL de tampão TE 1X pH 8,0 (100mM Tris e 10mM EDTA) mediante forte agitação e, após centrifugação de 3.500rpm por 7 minutos, o sobrenadante contendo o lisado de hemácias foi descartado. O processo de lise e descarte de hemácias se repetiu mais uma vez para garantir a completa remoção desse componente celular. O pellet contendo a papa leucocitária foi homogeneizado em 2 mL de TE 1X pH 8,0 e distribuído em dois microtubos de 1,5 mL. O homogeneizado foi centrifugado por 13.200rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Um microtubo contendo a papa leucocitária seguiu para o processo de extração de DNA e o tubo remanescente foi armazenado a -80°C. A extração da molécula de DNA seguiu de acordo com as recomendações do fabricante do protocolo manual do Qiagen Puregene Blood kit (QIAGEN) ou do protocolo automatizado do Qiacube DNA Blood kit (QIAGEN). O DNA genômico foi quantificado e teve sua pureza avaliada por espectrofotometria medindo-se a absorbância nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, no equipamento NanoDrop modelo ND-1000 (Thermo Scientific). Aproximadamente 1 µg de DNA foi utilizado para avaliar a integridade da molécula por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Invitrogen) em tampão TBE 1X pH 8,0 (Tris-base 89.2 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM) e utilizando o fluoróforo de ácidos nucleicos SYBR-Safe DNA gel stain (Life Technologies).

A saliva foi coletada em tubo coletor de saliva do kit Oragene OG-500 (Oragene - DNA Genotek) em volume aproximado de 2 mL. O kit se apresenta em sistema *all-in-one* permitindo a coleta, estabilização e transporte do DNA da saliva. O processamento da saliva para obtenção de DNA genômico foi realizado no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center utilizando o tampão PrepIT-L2P (Oragene - DNA Genotek) e o protocolo sugerido pelo fabricante (PD-PR-006, Oragene - DNA Genotek). Resumidamente, o procedimento se iniciou com a incubação da amostra de saliva a 50°C, em tubo coletor original, por período mínimo de uma hora. Em microtubo de 1,5mL foi depositado 500µL da saliva e acrescentado 20µL do reagente PrepIT-L2P (Oragene - DNA Genotek). Após homogeneização da solução em agitador, esta foi incubada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 5 minutos a 15.000 ref para descartar o precipitado contendo impurezas. Ao sobrenadante coletado em novo microtubo de 1,5mL, foi adicionado 600µL de etanol absoluto e a solução foi homogeneizada por inversão e incubada em temperatura ambiente por 10 minutos para permitir a completa precipitação do DNA. As impurezas foram removidas após centrifugação por 2 minutos a 15.000 ref e o pellet contendo precipitado de DNA foi lavado com etanol 70%. Após

completa remoção do etanol, o DNA foi ressuspensionado em tampão TE 1x pH 8,0. O DNA genômico foi quantificado e teve sua pureza avaliada por espectrofotometria no equipamento NanoDrop modelo ND-1000 (Thermo Scientific) e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Invitrogen) utilizando o fluoróforo de ácidos nucleicos GelRed (Biotium).

As amostras de DNA isoladas das papas leucocitárias e das salivas foram direcionadas para o *facility* contratado pelo DCEG-NCI, o *DNA Extraction and Staging Laboratory (DESL) at NCI-Frederick Cancer Genomics Research Laboratory (CGR)*, responsável pelo recebimento, registro e processamentos pré-analíticos das amostras de DNA que será detalhado nessa seção.

3.2.2 Tumor obtido de peça cirúrgica e congelado a fresco

Foram solicitadas ao Banco de Tumores da instituição alíquotas de 2µg de DNA genômico de duas amostras tumorais selecionadas obtidas de peça cirúrgica e que estavam armazenadas como tecido congelado.

A confirmação histológica e a avaliação da porcentagem tumoral foi realizada por patologista qualificado do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. Quando aplicável, e possível, a borda do tumor contendo tecido não neoplásico (tecido conjuntivo, adiposo e outros) foi separada por dissecação manual. O isolamento da molécula de DNA foi realizado pela equipe técnica do Banco de Macromoléculas que utilizou protocolo operacional padrão onde o tecido é inicialmente homogeneizado em 600 µL de solução de lise e 300 µg de proteinase K, ambos contidos no kit Cell Lysis Solution Gentra Puregene (QIAGEN), por 18 horas a 55°C sob agitação em um termobloco Termomixer (Eppendorf). A solução homogeneizada foi transferida para um tubo Phase Lock Gel - PLG (Eppendorf) e as três fases foram separadas por centrifugação após a adição de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1) (Sigma Aldrich Corporations) e a fase superior aquosa foi recuperada em novo tubo. A etapa de purificação com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1) foi realizada duas vezes. Para a precipitação do DNA foi utilizado duas vezes o volume de etanol absoluto (Merck Alpa) com o carreador glicogênio (Roche Diagnostic). Após a lavagem do precipitado de DNA com etanol 70%, este foi eluído em solução TE 1x pH 8,0.

A quantificação do DNA foi avaliada no fluorômetro Qubit 1.0 com o kit Quant-iT dsDNA High Sensitivity (ThermoFisher), segundo as recomendações do fabricante. A pureza do DNA foi avaliada por espectrofotometria no NanoDrop modelo ND-1000 (Thermo

Scientific). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR-Safe DNA gel stain (Life Technologies).

As amostras de DNA isoladas do tumor fresco congelado também foram direcionadas para o *facility DESL* para registro e processamentos pré-analíticos, que será detalhado nessa seção.

3.2.3 Tumor obtido de biópsia e armazenado em parafina

As lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E) das 45 amostras tumorais selecionadas que estavam fixadas em formalina e armazenadas em blocos de parafina no Arquivo do Banco de Tumores foram revisadas pelo patologista Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto buscando confirmar a presença de tecido tumoral no material e o tipo histológico. Nessa mesma lâmina, a área tumoral foi demarcada para facilitar o reconhecimento macroscópico da região correspondente no bloco de parafina.

Após disponibilização dos blocos de parafina contendo os tumores, cortes de 5 ou 10 µm foram confeccionados pela equipe técnica do Laboratório de Histologia do Departamento de Anatomia Patológica. Não foi estabelecido padrão para o número e espessura dos cortes – os materiais, em sua maioria, eram compostos por pequenas lesões obtidas de biópsias, não tendo a riqueza de tecido que geralmente é encontrado em peças cirúrgicas. Sendo assim, a decisão quanto ao número de cortes e espessura esteve na dependência da quantidade de tecido disponível para inclusão no projeto, buscando evitar esgotamento da amostra e, consequentemente, prejudicar eventual necessidade de utilização da amostra para benefício do manejo do paciente.

As macrodissecções (raspagem manual da lâmina não corada) foram feitas com auxílio de bisturi histológico estéril e descartável no laboratório do CIPE. Os produtos das macrodissecções, daqui em diante chamado de “materiais parafinados”, foram depositados em microtubos de 2 mL. Embora a porcentagem tumoral não tenha sido determinada, quando aplicável e possível, a borda do tumor contendo tecido não neoplásico foi separada por dissecção manual com base na demarcação da região tumoral em lâmina corada com H&E. Não foi possível isolar separadamente o tumor e o tecido normal adjacente de lesões pequenas.

Os raspados dos materiais parafinados foram direcionados para o *facility* contratado pelo DCEG-NCI, o *Westat, Inc.*, responsável pelo recebimento e registro do material. A extração de DNA foi realizada em outro *facility* também contratado pelo DCEG-NCI, o *Biospecimen Core Resource (BCR) in Biopathology Center (BPC)* no *Nationwide Children's Hospital*. Optou-se por seguir com a extração de DNA no *facility* do centro colaborador devido à proximidade da

data de recebimento dos cortes de parafina (março de 2017) e data de início do *Fellowship* no centro colaborador (abril de 2017), assim como por motivos orçamentais.

O protocolo padrão estabelecido pelo *BCR-BPC* recomenda iniciar o processo de desparafinização para extração de DNA e RNA, entrando com aproximadamente 1.200 mm² de área total de superfície da lesão por unidade de extração - o correspondente a 8 cortes de 10 µm de uma lesão com 150 mm² de área de superfície, por exemplo. No momento em que os cortes dos blocos de parafina foram feitos, era desconhecido qual o protocolo de extração de ácidos nucleicos que seria utilizado. A área de superfície da lesão não foi mensurada e os cortes foram feitos de forma a evitar o esgotamento das amostras. Desta forma, a recomendação de quantidade de material parafinado ideal para iniciar o processo de desparafinização não pode ser atendida.

O processo de desparafinização ocorreu pela aplicação de 1,4 mL do solvente orgânico n-Heptano (VWR Chemicals BDH). A solução foi homogeneizada por agitação a 3.000 rpm por 10 segundos, e incubada em temperatura ambiente por 10 minutos. Foi adicionado 70 µL de metanol (VWR Chemicals BDH) e a solução foi homogeneizada por agitação a 3.000 rpm por 10 segundos, e centrifugada a 9.000 rcf por 2 minutos. O sobrenadante contendo a parafina condensada foi descartado e ao pellet foi adicionado 1 mL de etanol absoluto (Sigma). Após breve agitação a solução foi centrifugada por 2 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi concentrado usando o evaporador centrífugo CentriVap (LABCONCO) a 37°C por 12 minutos. Na sequência foi iniciado o processo de lise celular onde, ao pellet, foram adicionados 300 µL do tampão de lise de tecido em parafina contido no kit Highpure miRNA (Roche), 48 µL de solução Dodecil Sulfato de Sódio-SDS a 10% (Fisher BioReagents) e 120 µL de Proteinase K contida no kit Highpure miRNA (Roche). Após homogeneizar a solução por agitação breve de 3 a 5 segundos a 3.000 rpm, esta foi encubada em termobloco na temperatura de 55°C por 45 minutos. Ao final do processo, a solução foi centrifugada por 15 minutos por 16.000 a 20.000 rpm para coletar separadamente o sobrenadante (contendo o RNA liberado) e o pellet (contendo o DNA precipitado).

A molécula de DNA foi isolada utilizando o kit AllPrep DNA/RNA FFPE (QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante, o qual garante otimização para reverter o máximo possível de modificação de formaldeído sem maiores degradações do DNA. A molécula de RNA foi isolada utilizando o kit HighPure miRNA (Roche) seguindo as recomendações do fabricante.

3.2.4 Controle de qualidade pré-analítica

Todas as amostras de DNA passaram pelo processo de estadiamento do *facility DESL* onde são avaliadas a integridade, a concentração e a identidade por perfil genético buscando assegurar o controle de qualidade das amostras antes da etapa de sequenciamento.

A integridade do DNA foi avaliada no equipamento BioAnalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies) utilizando o kit High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies). A concentração do DNA foi mensurada por fluorometria utilizando o kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (ThermoFisher).

O processo de validação da identidade da amostra foi conduzido por ensaio de genotipagem para avaliação de haplótipos e marcadores de gênero. Marcadores polimórficos foram utilizados para identificar discordância entre pares de amostras - genótipos distintos entre tecido normal (leucócito) e tumoral de um mesmo caso. Marcadores genéticos presentes em cromossomos sexuais foram usados para avaliar discordâncias entre o gênero identificado e o informado, sendo esta avaliação aplicada apenas para as amostras de DNA isoladas das papas leucocitárias. Amostras que apresentassem mais de um haplótipo dos marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (*SNP*, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) ou de sequências específicas curtas repetidas em tandem (*SSTR*, do inglês, *Short Sequence-Specific Tandem Repeat*) seriam consideradas como amostras contendo contaminação cruzada. As amostras foram avaliadas inicialmente por genotipagem de *SNPs* e, apenas para aquelas que apresentaram resultado “indeterminado” ou “indicando contaminação”, foram também avaliadas por genotipagem de *SSTR*.

Na Tabela 1 estão relacionados os parâmetros de avaliação de qualidade e valores de corte utilizados para selecionar as amostras elegíveis para a etapa analítica (sequenciamento). Amostras consideradas como “indeterminadas” na avaliação de integridade corresponderam àquelas com menor rendimento de DNA (inferior a 70ng de rendimento total), e essa quantidade de DNA pode ter sido insuficiente para permitir a detecção de banda ou rastro de DNA no gel. Amostras consideradas como “indeterminadas” nas avaliações de genotipagem falharam na amplificação do DNA, e essa falha pode ser decorrente de concentração muito baixa do DNA, presença de inibidores interferindo no ensaio de amplificação do DNA ou degradação excessiva do DNA impossibilitando a amplificação da região alvo.

Tabela 1 - Parâmetros de avaliação de qualidade da amostra de DNA.

Parâmetro de avaliação	Valores/Unidade	Critério de exclusão
Rendimento do DNA	– ng	– igual ou menor que 50 ng
Integridade do DNA	– Alta (ausência de degradação)	– Baixa
	– Média (traços de degradação)	– Indeterminada
	– Baixa (degradado)	
	– Indeterminada	
Status na genotipagem de <i>SNP</i>	– Aprovado	
	– Indeterminado	– Genótipo duplicado entre amostras não pareadas
	– Genótipo duplicado entre amostras não pareadas	– Em desacordo com amostra normal pareada
	– Em desacordo (<i>mismatch</i>)	
Status na genotipagem de <i>SSTR</i>	– Aprovado	
	– Indeterminado	– Genótipo duplicado entre amostras não pareadas
	– Genótipo duplicado entre amostras não pareadas	– Em desacordo com amostra normal pareada
	– Em desacordo (<i>mismatch</i>)	
Status na genotipagem de marcadores presentes em cromossomos sexuais	– Feminino	– Informação discordante
	– Masculino	– Indeterminado
	– Indeterminado	

3.3 PAINEL DE GENES

O método de sequenciamento de DNA aplicado nas amostras do estudo foi o sequenciamento de genes alvos (*Targeted Sequencing*). A seleção dos genes para customização do painel baseou-se naqueles que estão envolvidos nos processos de tumorigênese da pele (CBC e melanoma cutâneo), danos a pele, desordens dermatológicas induzidas pela radiação ultravioleta, fisiologia cutânea e resposta de dano ao DNA.

Os genes foram pré-selecionados com o auxílio da ferramenta *Biomarker research - BioProfile* do software *Ingenuity Pathway (IPA)* que permite identificar assinaturas gênicas, espécie específica, e traçar o perfil de uma doença/fenótipo/processo celular ao identificar genes que são sabidamente relevantes como biomarcadores e alvos terapêuticos. Foram excluídos da pré-seleção genes para os quais alterações genéticas não foram detectadas e genes para os quais foi reportada apenas uma evidência de associação com os processos/desordens de interesse.

Optou-se por construir um painel pequeno para garantir maior cobertura de profundidade das bases sequenciadas, pelo menos 50x para variantes germinativas e 300x para variantes somáticas, considerando que a maioria das amostras tumorais eram oriundas de tecidos armazenados em parafina. Desta forma, foram priorizados genes de vias canônicas envolvidas no desenvolvimento de tumores de pele (CBC e melanoma cutâneo), incluindo a via *Sonic Hedgehog* (SHH), classicamente envolvida no desenvolvimento de CBCs esporádicos e associados à Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide (SCBCN). Foram também priorizados genes de vias canônicas envolvidas no reparo de DNA. Os genes de vias canônicas foram selecionados com base nas informações contidas nas bases de dados do *IPA* e *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Foram priorizados também genes descritos na literatura como mutados em CBCs cutâneos^{29,33,122,123}, carcinoma espinocelular^{123,124}, queratinócitos normais¹²⁴ e melanoma cutâneos¹²³, de acordo com estudos de perfil de variantes em tumores, carga mutacional tumoral e variantes induzidas por radiação ultravioleta. Por fim, foram também priorizados da lista inicial de genes, aqueles listados entre os 114 genes relacionados à predisposição ao câncer¹²⁵. No total, o painel customizado para este estudo teve a inclusão de 114 genes (Apêndice 3).

O painel foi confeccionado pela empresa *Roche NimbleGen* usando o genoma humano de referência versão GRCh37/hg19. O painel permite detectar variantes pontuais de base única, pequenas deleções e pequenas inserções ao avaliar 1,03216 Mb de DNA com cobertura horizontal estimada de 98,9% (934.049 bases). O preparo de biblioteca foi realizado pelo sistema de captura (sondas) para permitir o enriquecimento do DNA genômico, em regiões de

interesse, mediado por hibridização. No Apêndice 3 estão descritos, para cada gene alvo do painel, a posição genômica (número do cromossomo, posição do primeiro nucleotídeo da primeira sonda que cobre a região alvo e posição do último nucleotídeo da última sonda que cobre a região alvo), a cobertura estimada em porcentagem e a estimativa do número de bases não cobertas devido regiões contendo repetições de bases e que geram baixa complexidade genômica.

3.4 PLATAFORMA PARA SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

As amostras elegíveis para o estudo (6/24 amostras constitutivas e 11/71 tumores) a foram purificadas para a preparação da biblioteca e sequenciamento no *facility* contratado pelo DCEG-NCI, NCI-Frederick CGR. O DNA genômico (50ng) foi purificado usando partículas magnéticas do reagente *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter Inc), de acordo com as recomendações do fabricante.

A preparação da biblioteca foi iniciada pela etapa de fragmentação enzimática do DNA genômico e pela etapa de ligação de adaptadores contendo sequências de indexação (*barcodes*) para individualização das amostras. Para a fragmentação enzimática foi utilizado o kit *KAPA HyperPlus Kit* (KAPA Biosystems) e para a ligação dos adaptadores foi utilizado o kit *Bioo Scientific NEXTflex DNA Barcoded Adapters* (Bioo Scientific), seguindo as recomendações do protocolo sugerido pela *KAPA Biosystems*. O DNA genômico fragmentado e ligado a adaptadores (20µL) foi amplificado utilizando os reagentes *KAPA HiFi HotStart ReadyMix* e *KAPA Library Amplification Primer Mix* (5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3' e 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3') (Kapa Biosystems): 98°C por 45 segundos, 7 ciclos de 98°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e extensão de 72°C por 1 minuto. O material amplificado foi purificado usando o reagente *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter Inc) de acordo com o protocolo sugerido pela *KAPA Biosystems*. As amostras de bibliotecas amplificadas foram quantificadas por fluorometria utilizando o reagente *Quant-iT PicoGreen dsDNA* (Life Technologies).

As bibliotecas foram combinadas (multiplexadas) em quantidades iguais para formar um *pool* de bibliotecas de amostras com massa total de 1,1µg. Ao *pool* de biblioteca foi adicionado 4µL de *NEXTflex HE Universal Oligo 1 250 µM* (Bioo Scientific) (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTTACACTCTTTCCCTACA CGACGCTCTTCCGATCT-3'), 40µL de *NEXTflex INV-HE blocking oligos 25µM* (Bioo Scientific) e 5µL de *COT-1 DNA 1mg/mL* (Invitrogen). O *pool* contendo essa mistura de

reagentes foi concentrado utilizando centrífuga a vácuo (*Eppendorf 5301 Vacuum Concentrator*) a 60°C por aproximadamente 1 hora. Posteriormente foi adicionado ao *pool* seco 7,5µL do reagente *NimbleGen Hybridization Buffer* (Roche NimbleGen) e 3µL do reagente *NimbleGen Hybridization Component A* (Roche NimbleGen), e submeteu-se ao aquecimento de 95°C por 10 minutos. O *pool* de bibliotecas seguiu para a etapa de enriquecimento para o painel de alvos customizados por captura de fase líquida utilizando o kit *NimbleGen's SeqCap EZ Choice Library* (Roche NimbleGen). Para isso, 4,5µL do reagente *EZ Choice Probe Library* (Roche NimbleGen) foram adicionados ao *pool* que, na sequência, foi hibridizado a 47°C por 64 a 72 horas. As etapas de lavagem e recuperação do DNA capturado foram realizadas de acordo com o protocolo *NimbleGen SeqCap EZ Library SR*. O *pool* (20µl) contendo DNA enriquecido para as regiões de interesse foi amplificado utilizando 25µL do reagente *2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix* (Kapa Biosystems) e 5µL do reagente *10x Library Amplification Primer Mix* (5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3' e 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3') (Kapa Biosystems): 98°C por 45 segundos, 12 ciclos de 98°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e extensão de 72°C por 1 minuto. O material amplificado foi purificado usando o reagente *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter Inc) de acordo com o protocolo sugerido pela *NimbleGen SeqCap EZ Library SR*. O *pool* enriquecido foi quantificado por PCR em tempo real (qPCR) no equipamento *LightCycler 480* (Roche) e usando o reagente *Kapa's Library Quantification Kit for Illumina* (Kapa Biosystems).

O sequenciamento por síntese da Illumina, na modalidade *paired-end*, foi a tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês, *Next-Generation Sequencing*) escolhida. Nesta modalidade o *pool* enriquecido de bibliotecas de DNA é ligado a adaptadores e depositado em uma superfície (placa) de vidro, denominada *flowcell*. A fita de DNA se liga aos adaptadores presentes na *flowcell* para amplificação clonal em fase sólida por PCR em ponte, resultando na formação de *clusters*. Cada *cluster* contém milhões de cópias do mesmo fragmento de DNA. A modalidade *paired-end* permite leitura dos fragmentos de DNA linearizados contidos nos *clusters*, a partir de ambas extremidades. A leitura dos fragmentos ocorre a partir da síntese de nova fita de DNA com a adição de deoxinucleotídeos contendo marcadores fluorescentes cliváveis. O sinal luminoso emitido a cada incorporação de deoxinucleotídeo, permite a leitura e determinação da sequência do fragmento (sequenciamento). A plataforma de NGS utilizada nesse estudo foi a *Illumina NextSeq500* (Illumina), que oferece solução completa integrando clusterização, amplificação, sequenciamento e análise de dados em um único instrumento. Foi utilizado o reagente *NextSeq High-Output v2 Kit 150 cycles (2x75bp paired-end)* (Illumina) que, conforme o protocolo do

fabricante e utilizando o *NextSeq500*, é capaz de gerar, por corrida de sequenciamento, 400 milhões de leituras de aproximadamente 150 pares de bases (bp) em um total de 60 gigabytes (Gb) de dados.

Foram feitas duas corridas de sequenciamento. Na primeira corrida foi utilizada uma canaleta (*lane*) da *flowcell* para sequenciar um *pool* contendo bibliotecas de 14 amostras multiplexadas, correspondendo aos tumores de pele CBC e as amostras normais pareadas (leucócitos). Na segunda corrida foi utilizado uma *lane* da *flowcell* para sequenciar o outro *pool* contendo bibliotecas de três amostras multiplexadas, sendo duas amostras de tumor de estômago obtidas de tecido congelado a fresco e de tecido parafinado de um mesmo paciente, e a amostra normal pareada (leucócito).

3.5 PRÉ-PROCESSAMENTO DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO

Os arquivos *.BCL* (*Basecall file*) de saída do sequenciador, os quais contém a leitura das bases e índices de qualidade para cada ciclo de sequenciamento, foram processados seguindo um conjunto ordenado de comandos em programas de computador (*pipeline*) estabelecido no *facility CGR*. No final do processo, arquivos nos formatos *.BAM* (*Binary Alignment Map*) e *.VCF* (*Variant Call Format*) e arquivos *QC_files* (*Quality Control files*) foram disponibilizados por acesso remoto ao servidor local para análises subsequentes. As etapas do *pipeline* para processamento dos dados foram descritas resumidamente a seguir.

O programa *bcl2fastq v2.17* (Illumina) foi usado para: (1) combinar os arquivos de imagem gerados após a corrida de sequenciamento, arquivos *.BCL*; (2) converter os arquivos *.BCL* em arquivos *.FASTQ*, que são arquivos de texto no formato codificado e compactado e que trazem os dados da leitura de bases do sequenciamento (também chamados de *reads*) e dados de métricas de qualidade; (3) separar as amostras multiplexadas (desmultiplexar) em um *pool*.

Os arquivos no formato *.FASTQ* foram usados como arquivos de entrada (*input*) para o programa *Trimmomatic v0.36*¹²⁶ para remoção das sequências de bases dos indexadores, processo também denominado de trimagem dos *reads*. O *Trimmomatic* foi também usado para trimagem baseado nos scores de qualidade, trimagem por sequências contendo ambiguidade de bases (comumente observado em sequências com repetições longas), trimagem de bases 5' e 3', e trimagem por tamanho.

O mapeamento dos *reads* foi iniciado pelo alinhamento com a sequência humana referência GRCh37/hg19 utilizando o programa *Novoalign v3.00.05*

(<http://www.novocraft.com>). O arquivo de saída *.BAM* do *Novoalign* foi usado para finalizar o processo de mapeamento com a etapa de marcação e remoção das *reads* duplicadas utilizando a ferramenta *MarkDuplicates* do programa *Picard* v1.83 (<https://broadinstitute.github.io/picard>). As *reads* duplicadas compreendem sequências de DNA originadas a partir de fragmentos contendo a mesma sequência de nucleotídeos, formados em decorrência de fragmentações do DNA no mesmo local e amplificados durante o preparo das bibliotecas. Essas sequências duplicadas também ocorrem devido artefatos gerados por regiões repetitivas. A remoção de *reads* duplicadas contribui para que a cobertura das regiões genômicas não seja superestimada e não haja impacto na eficiência de detecção das variantes.

Dados de qualidade pós-alinhamento e pré-chamada de variantes foram obtidos avaliando os arquivos no formato *.BAM*. O programa *verifyBamID* (<http://genome.sph.umich.edu/wiki/VerifyBamID>) foi utilizado para avaliar a estimativa da taxa de contaminação em cada amostra, aplicando corte de 5%. Este corte foi estabelecido com base em dados empíricos do *facility* CGR para variantes detectadas por sequenciamento de exoma de amostras germinativas, que comumente mostram número elevado de falso positivo e falso negativo na chamada de variantes, excedendo a taxa de 5%. O programa *Picard* v1.83 (<https://broadinstitute.github.io/picard>) foi utilizado para obter relatórios de controle de qualidade (*QC reports*) contendo métricas da qualidade do alinhamento, estimativa de enviesamento das *reads* que estão alinhadas em regiões ricas em bases GC, e métricas de artefatos tais como informações sobre a probabilidade da troca de base do tipo C>T e G>A, selecionadas randomicamente, ser um artefato do processo de oxidação (*oxidation error rate*) estabelecido no molde inicial da molécula de DNA, antes da etapa de adição de adaptadores no preparo das bibliotecas (*pre-adapter artifact*). A métrica de artefato também traz informação sobre a sequência referência das bases ao redor da troca de base avaliada (*sequence context*).

O programa *SAMtools*¹²⁷ foi usado para agrupar os arquivos *.BAM* do sequenciamento de DNA de amostras de um mesmo indivíduo obtidas do tecido tumoral e do normal (leucócito). O programa *BAM-matcher*¹²⁸ foi utilizado para confirmar a eficiência do pareamento das amostras ao determinar o quanto os arquivos *.BAM* agrupados representam amostras de mesma origem biológica ao comparar seus genótipos. Posteriormente foi realizada mais uma etapa de marcação e remoção das *reads* duplicadas utilizando a ferramenta *MarkDuplicates* do programa *Picard* v1.83 (<https://broadinstitute.github.io/picard>).

Para aumentar a qualidade do mapeamento das *reads*, os arquivos *.BAM* foram usados na etapa de realinhamento local direcionado para regiões ricas em pequenas inserções e deleções (*indels*), seguido da etapa de recalibração da qualidade das bases devido a erros dos

ciclos de sequenciamento. A seleção dessas regiões ricas em *indels* foi baseada no banco de dados referência *1000Genome phase-1 known INDELs* e no banco de dados referência *Mills and 1000Genomes gold standard known INDELs*, conforme recomendado pelo manual de boas práticas do *Genome Analysis Toolkit* (GATK).

A identificação de variantes somáticas (*somatic variant calling*) foi feita por dois algoritmos, o *Mutect v.3.1-0*¹²⁹ e o *Sentieon Genomics v.201711.03* (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/115717v2>), comparando uma amostra teste (tumor) e uma amostra referência (normal-leucócito). Foram aplicados os parâmetros padrão (*default*) dos filtros para seleção das variantes somáticas e exclusão daquelas com baixa qualidade. O *Mutect*, cujos filtros aplicados foram utilizados no modo *high-confidence*, aplica o método Bayesiano para detectar variantes somáticas do tipo *SNV* (do inglês, *Single Nucleotide Variant*) em frequência alélica bem baixa, requerendo uma quantidade pequena de *reads*. O *Sentieon* aplica o algoritmo *TNhaplotyper* para identificar variantes somáticas do tipo *SNV* e *indels*. Foi também utilizado um painel de amostras normais representado por uma lista de variantes germinativas originadas do projeto *Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes* (PCAWG) do *International Cancer Genome Consortium* (ICGC) em conjunto com o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (<https://www.biorxiv.org/content/early/2017/11/01/208330>). O painel de amostras normais aumenta a qualidade da chamada de variantes somáticas por incrementar a remoção de variantes germinativas e artefatos, identificados como variantes raras, porém recorrentes, que corresponderiam a falsos positivos. Variantes detectadas em pelo menos duas amostras no painel de normais foram excluídas.

A identificação de variantes germinativas (*germline variant calling*) no leucócito do sangue foi feita seguindo parâmetros *default* do algoritmo *GATK HaplotypeCaller v.3.8*, disponibilizados pela equipe do *Broad Institute*.

Após realizar os processos de chamada de variantes os programas geram arquivos de texto no formato *.VCF* contendo informações sobre a posição da variante no genoma referência, qualidade média da base para as *reads* que contém a variante chamada, genótipo observado, número de leituras do alelo (*allelic depth*), cobertura vertical ou de profundidade (*read depth*), e fração alélica para o alelo alterado em relação ao alelo referência.

A anotação das variantes foi feita usando os programas *SnpEff v4.3r*¹³⁰ e *ANNOVAR*¹³¹, tendo como arquivo de entrada o formato *.VCF*. Foram anotadas: (1) posições genômicas das variantes; (2) os nomes dos genes; (3) identificação das variantes em diferentes transcritos; (4) informações funcionais das variantes, tal como impacto na função da proteína; (5) as frequências das variantes em diferentes populações, extraídas dos bancos de dados como o

ExAC (*Exoma Aggregation Consortium*), *ExAC_nonTCGA* (representado por dados de exoma de amostras não tumorais), *ESP* (*Exome Sequencing Project*), *KG* (*1000Genomes*), e *gnomAD_exomes* (extraídos dos dados de exoma depositados no *The Genome Aggregation Database - gnomAD*); (6) informações contidas no banco de dados público de variantes somáticas, o *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC)*; (7) informações do banco de dados público *ClinVar*, que relacionam variantes genéticas humanas e seus fenótipos; (8) e predição de patogenicidade anotadas pelo banco de dados *dbNSFP* (*database for Non-Synonymous SNPs' Functional Predictions*), que inclui algoritmos individuais ou de integração de dados de predição que se baseiam na função e estrutura da proteína e na conservação dos aminoácidos.

Para as amostras de leucócitos e de tumor foram considerados como critérios satisfatórios de qualidade de sequenciamento, cobertura média de profundidade de pelo menos 50x e 300x, respectivamente, e >97% das regiões-alvo cobertas pelo menos 50x. Amostras que não atenderam o critério foram excluídas do estudo.

O Apêndice 4 ilustra resumidamente o conjunto ordenado das etapas e programas (*pipeline*) utilizados no processamento dos dados de sequenciamento.

3.6 INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES GERMINATIVAS

Os arquivos *.VCF* foram re-anotados para filtragem de variantes (*post-calling filtering*) utilizando o programa *VarSeq v2.1.1* (Golden Helix). As variantes foram selecionadas a partir da aplicação dos seguintes filtros: cobertura $\geq 50x$; frequência do alelo variante $\geq 25\%$; alelo variante ausente ou em frequência $< 1\%$ nos banco de dados populacionais *ExAC* e *ESP* (*MAF*, do inglês *Minor Allele Frequency*); *SNV* presente em região codificante e que resulta em troca de aminoácido (*missense*) e em códon de parada prematuro (*nonsense*); *indel* presente em região codificante e que não muda a matriz de leitura (*inframe*); *indel* presente em região codificante e que mudam a matriz de leitura (*frameshift*); *SNV* e *indel* presente em sítio de *splicing* (posições -2, -1 e +1, +2); *SNV* em região codificante, que não resulta em troca de aminoácido (*synonymous*), classificada como patogênica ou de significado incerto pelo banco de dados público do *ClinVar*; e *SNV* e *indel* em região não codificante (UTR, intron e região intergênica) e classificada como patogênica pelo banco de dados do *ClinVar*.

A frequência do alelo variante na população brasileira foi manualmente consultada no banco de dados público do ABraOM (Arquivo Brasileiro Online de Mutações, disponível no

website <http://abraom.ib.usp.br/>). O ABraOM reúne dados de exoma de 609 indivíduos idosos do estado de São Paulo e tem por objetivo fornecer dados sobre a variabilidade genética em indivíduos brasileiros ¹³².

As variantes filtradas foram também manualmente consultadas no banco de dados do *ClinVar* que atualiza os dados semanalmente, às segundas-feiras, e interpreta as variantes em benigna, provavelmente benigna, benigna/provavelmente benigna, de significado clínico incerto (VUS, do inglês *Variant of Uncertain Significance*), provavelmente patogênica, patogênica/provavelmente patogênica, patogênica e interpretação conflitante. A interpretação de patogenicidade das variantes foi atualizada em relação ao dado fornecido no arquivo de saída de filtragem de variantes pelo programa *VarSeq*. Essa atualização permitiu excluir variantes reclassificadas como benigna, provavelmente benigna, benigna/provavelmente benigna que receberam revisão de grupos de especialistas na área (gene e fenótipo). Este *status* de revisão é denominado “revisado por painel de especialistas” e, no geral, esse painel é composto por um conjunto de pesquisadores que gerenciam consórcios de reclassificação de variantes como por exemplo o *Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (ENIGMA)-BRCA Exchange* para os genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Foi também consultada manualmente a ferramenta pública *Varsome* (<https://varsome.com/>) que segue as recomendações do *American College of Medical Genetics (ACMG)* ¹³³ para interpretar e classificar variantes genéticas associadas a doenças mendelianas. A *ACMG* recomenda classificar as variantes em cinco classes: benigna, provavelmente benigna, VUS, provavelmente patogênica e patogênica. Essa classificação é feita com base na descrição prévia de variantes no gene em questão, tipo da variante (sinônima, *inframe*, *frameshift*, *nonsense*, *missense*, entre outras), localização da variante na proteína (*hotspot* ou domínio importante), predição *in silico*, frequência populacional, segregação familiar, estudos funcionais *in vitro* ou *in vivo*, fenótipo e histórico familiar.

No estudo, os critérios e *scores* da *ACMG* não foram usados de forma estrita por três motivos: (1) os pacientes avaliados já possuem fenótipo principal (síndrome Xeroderma Pigmentoso) previamente atribuído a variante germinativa no gene *XPC* ou *POLH/XPV*; (2) os critérios da *ACMG* foram estabelecidos para classificar variantes de alta penetrância em genes relacionados às condições Mendelianas e nosso estudo buscou variantes de baixa penetrância (alelos de risco) em genes que não estão claramente associados aos fenótipos específicos de XP ¹³⁴; (3) a grande maioria dos genes que compõem o painel foram selecionados com base na literatura acerca de genes frequentemente mutados ou associados ao desenvolvimento dos CBCs. Sendo assim, não foram considerados os *scores* da *ACMG* PP4 (fenótipo do paciente ou

história familiar é altamente específico para o genótipo) e BP5 (variante identificada em paciente com outra variante patogênica que explica o fenótipo). Caso contrário, ao assumir que o *score* PP4 não é aplicável e o BP5 é aplicável, todas as variantes seriam classificadas como benigna e provavelmente benigna. Corroborando com a decisão em não usar rigorosamente os *scores* da *ACMG*, foi reportado que o *score* PP4 não deve ser utilizado quando da avaliação de variante de achado incidental ¹³⁴.

O *score* BS1 da *ACMG* foi utilizado para distinguir variantes que apresentaram classificação de benigna ou provavelmente benigna pelos critérios da *ACMG* e classificação conflitante no *ClinVar*, sendo classificada como VUS e benigna e/ou provavelmente benigna. O *score* BS1 é aplicado quando a frequência alélica da variante (incluindo subpopulações/grupos étnicos) é maior do que a esperada para o fenótipo, ou seja, é maior do que o valor de corte recomendado para variantes benignas em um determinado gene. Os dados de frequência alélica utilizados foram os dos bancos públicos *gnomAD Exomes* e *gnomAD Genomes*, recuperados por meio da ferramenta *Varsome*. O valor de corte da frequência alélica foi extraído do algoritmo de análise do *Varsome* que, ao recuperar a frequência alélica de todas as variantes reportadas clinicamente no gene, calcula e recomenda o uso do valor de corte para classificar variantes como benignas.

A classificação das variantes seguiu conforme descrito abaixo:

- Patogênica: (1) Variante classificada como patogênica pelo *ClinVar*, revisada por painel de especialistas. (2) Variante classificada como patogênica pelo *ClinVar* de forma consensual entre os diferentes depósitos e classificada como patogênica pelos critérios da *ACMG* de acordo com a ferramenta *Varsome*.
- Provavelmente patogênica: (1) Variante classificada como provavelmente patogênica pelo *ClinVar*, revisada por painel de especialistas. (2) Variante classificada como provavelmente patogênica pelo *ClinVar* de forma consensual entre os diferentes depósitos e classificada como provavelmente patogênica pelos critérios da *ACMG* de acordo com a ferramenta *Varsome*. (3) Variante não depositada no *ClinVar* e classificada como patogênica ou provavelmente patogênica pelos critérios da *ACMG* de acordo com a ferramenta *Varsome*.
- VUS: (1) Variante classificada como VUS pelo *ClinVar*, revisada por painel de especialistas. (2) Variante classificada como VUS pelo *ClinVar* de forma consensual e classificada como VUS pelos critérios da *ACMG* de acordo com a ferramenta *Varsome*. (3) Variante classificada pelo *ClinVar* de forma não consensual (interpretação conflitante) entre os diferentes depósitos e classificada como benigna ou provavelmente

benigna pelos critérios da *ACMG* de acordo com a ferramenta *Varsome*, **não considerando** a aplicação do *score* BS1. (4) Variante não depositada no *ClinVar* e classificada como VUS pelos critérios da *ACMG* de acordo com a ferramenta *Varsome*.

- Provavelmente benigna: (1) Variante classificada como provavelmente benigna **ou** benigna/provavelmente benigna pelo *ClinVar*, revisada por painel de especialistas. (2) Variante classificada como provavelmente benigna **ou** benigna/provavelmente benigna pelo *ClinVar* de forma consensual entre os diferentes depósitos e classificada como benigna **ou** provavelmente benigna pelos critérios da *ACMG* de acordo com a ferramenta *Varsome*. (3) Variante classificada pelo *ClinVar* de forma não consensual (interpretação conflitante) entre os diferentes depósitos e classificada como benigna **ou** provavelmente benigna pelos critérios da *ACMG* de acordo com a ferramenta *Varsome*, **considerando** a aplicação do *score* BS1. (4) Variante não depositada no *ClinVar* e classificada como benigna **ou** provavelmente benigna pelos critérios da *ACMG* de acordo com a ferramenta *Varsome*.
- Benignas: (1) Variante classificada como benigna pelo *ClinVar*, revisada por painel de especialistas. (2) Variante classificada como benigna pelo *ClinVar* de forma consensual entre os diferentes depósitos e classificada como benigna pelos critérios da *ACMG* de acordo com a ferramenta *Varsome*.

Para as variantes não classificadas como benignas ou provavelmente benignas foram listados os algoritmos preditores de patogenicidade e as frequências populacionais (incluindo as populações com frequência máxima $>0,01$), ambas recuperadas pela consulta manual à ferramenta pública *Varsome*. Exceção se aplicou ao preditor *CADD*, listado apenas no arquivo *.VCF*, para o qual foi considerado o valor de corte *PHRED-scaled score* ≥ 15 para sugerir que a variante é prejudicial ¹³⁵.

Todas as variantes foram inspecionadas visualmente para avaliar a qualidade do sequenciamento (alinhamento, cobertura e sequência de bases adjacentes) e confirmar sua presença. Os arquivos *.BAM* e o programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV) ¹³⁶ foram utilizados para essa etapa de interpretação visual.

Entre todos os genes do painel, aqueles de maior interesse para investigação germinativa foram: *BLM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CASP8*, *CDKN2A*, *CLPTMIL*, *HERC2*, *MLH1*, *PADI6*, *PMS2*, *POLE*, *PTCH1*, *PTCH2*, *RGS22*, *RPA1*, *SUFU*, *TGM3*, *TP53* e *TYR*.

O Apêndice 4 ilustra resumidamente os critérios aplicados para selecionar e classificar variantes germinativas identificadas pelo *pipeline* de análise dos dados de sequenciamento.

3.7 INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES SOMÁTICAS

Os arquivos *.VCF* dos algoritmos usados na identificação de variantes somáticas foram re-annotados para filtragem de variantes (*post-calling filtering*) utilizando o programa *VarSeq v2.1.1* (Golden Helix). As variantes foram selecionadas a partir da aplicação dos seguintes filtros: cobertura $\geq 300x$, frequência do alelo variante $>5\%$ e alelo variante ausente ou em frequência $<0,1\%$ no DNA de leucócito.

As variantes identificadas por cada algoritmo (*Mutect* e *Sentieon*) foram comparadas para avaliar a concordância.

Foram selecionadas para avaliação variantes que ocorreram em região codificante ou em sítio canônico de *splicing* (posições -2, -1 e +1, +2). Variantes que ocorreram em região UTR, região de *splicing*, intron e região intergênica não foram avaliadas.

As variantes selecionadas não foram validadas por outra metodologia como sequenciamento de *amplicon* com alta cobertura ou sequenciamento direto por Sanger. No entanto, foi estabelecido critério de confiança buscando remover da lista final de variantes, aquelas com maior chance de serem artefatuais. A aplicação desses critérios levou em consideração que variantes artefatuais poderiam ser originárias do processamento e armazenamento do tecido tumoral. As amostras do estudo foram fixadas em formalina e armazenadas em blocos de parafina por período longo.

É amplamente conhecido que a formalina induz modificações na molécula de DNA, incluindo fragmentação e deaminação hidrolítica de bases que, após amplificação do DNA durante por reação de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), resulta no estabelecimento de variantes artefatuais do tipo C>T/G>A não reprodutíveis^{137–139}. O DNA com fragmentação moderada gera número reduzido de cópias após amplificação e, consequentemente, baixa cobertura de sequenciamento contendo artefatos C>T/G>A não reprodutíveis, em baixa frequência. Quando a fragmentação do DNA é exacerbada, o número de cópias é drasticamente reduzido e uma troca de base artefactual em algumas dessas cópias pode ser interpretada, erroneamente, como variante de frequência moderada a alta. Sendo assim, foi observada uma correlação inversa entre a cobertura do sequenciamento e a detecção de trocas de bases artefatuais C>T/G>A (correlação de *Spearman*, $r = -0.24$, $p < 0.0001$), sendo detectadas em maior proporção quando a frequência alélica está na faixa de 1-10% e em menor proporção na faixa de 10-25%¹⁴⁰.

Assim, para estabelecer maior nível de confiança na detecção das variantes somáticas em amostras armazenadas em parafina, foi estabelecido o seguinte critério para compor a

segunda etapa de seleção por filtragem: (i) variantes com frequência alélica $>25\%$, a cobertura inicialmente proposta $\geq 300x$ foi mantida; (ii) variantes com frequência alélica entre 5% a 25%, foram consideradas apenas quando sua cobertura atingiu o dobro do valor inicialmente proposto ($\geq 600x$). Essa segunda etapa de seleção por filtragem não foi aplicada na amostra de tumor gástrico de tecido congelado a fresco.

O Apêndice 4 ilustra resumidamente os critérios aplicados para selecionar variantes somáticas identificadas pelo *pipeline* de análise dos dados de sequenciamento.

Para avaliar a razão Ti/Tv o número de transições (Ti) foi dividido pelo número de transversões (Tv) de bases. As transições são representadas por substituições que ocorrem entre bases da mesma classe, entre purinas ($A>G$ e $G>A$) ou entre pirimidinas ($T>C$ e $C>T$). As transversões ocorrem entre bases de classes diferentes ($A>T$, $A>C$, $T>A$, $T>G$, $C>A$, $C>G$, $G>T$ e $G>C$). Para este cálculo foram consideradas variantes em sítios canônicos de *splicing*, variantes em regiões codificantes (incluindo variantes sinônimas) e variantes intrônicas, todas estas selecionadas após aplicar critérios restritivos de filtragem por frequência e cobertura (variantes com cobertura $\geq 300x$ e frequência alélica do alelo variante $>25\%$ e variantes com cobertura $\geq 600x$ e frequência alélica do alelo variante entre 5 - 25%). O cálculo da razão Ti/Tv é utilizado para avaliar enriquecimento das classes de variantes (transições e transversões) e, indiretamente, sugerir abundância de variantes artefatuais.

Para avaliar a carga mutacional foi calculada a fração entre o número de variantes somáticas por megabase (Mb) de DNA sequenciado. O painel utilizado no estudo sequenciou 1,03216 Mb de DNA. Foram realizados dois cálculos avaliando variantes do tipo SNV e pequenas inserções/deleções: (1) considerando variantes somáticas totais identificadas pelo algoritmo *Mutect*, sem aplicar filtros de seleção por cobertura, frequência alélica, região do genoma e efeito na proteína; e (2) considerando variantes em sítios canônicos de *splicing*, variantes em regiões codificantes (incluindo variantes sinônimas) e variantes intrônicas, todas estas selecionadas após aplicar critérios restritivos para exclusão daquelas com maior chance de serem artefatuais (foram mantidas variantes ausentes ou em frequência $<0,1\%$ no DNA de leucócito, variantes com cobertura $\geq 300x$ e frequência alélica do alelo variante $>25\%$ e variantes com cobertura $\geq 600x$ e frequência alélica do alelo variante entre 5 - 25%).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Por ser um estudo de caráter exploratório avaliando um coorte com poucos indivíduos (seis), testes estatísticos para comparação de grupo e correlação com características clínico-patológicas não foram aplicados. Para variáveis quantitativas foram consideradas as medidas resumo de posição e dispersão, como média, mediana e valores mínimo e máximo. Para as variáveis qualitativas foram consideradas as frequências absoluta e relativa (%).

4 RESULTADOS

4.1 PARTICIPANTES DO ESTUDO

Nesse estudo foram selecionados inicialmente 24 participantes portadores de variantes germinativas nos genes *XPC* ou *XPV*, sendo 17 com fenótipo da síndrome do XP e sete sem fenótipo (incluindo pais e irmãos). Entre amostras de tecido constitutivo (leucócito e saliva) e amostras de tumor, foram inicialmente selecionadas 71 amostras para avaliar alterações genéticas germinativas e somáticas em regiões de éxons por sequenciamento completo do exoma. Após reunir as amostras disponíveis dos participantes elegíveis, o desenho do estudo foi revisto com o pesquisador do centro colaborador no *NCI*, Dra. Sharon Savage (Figura 2).

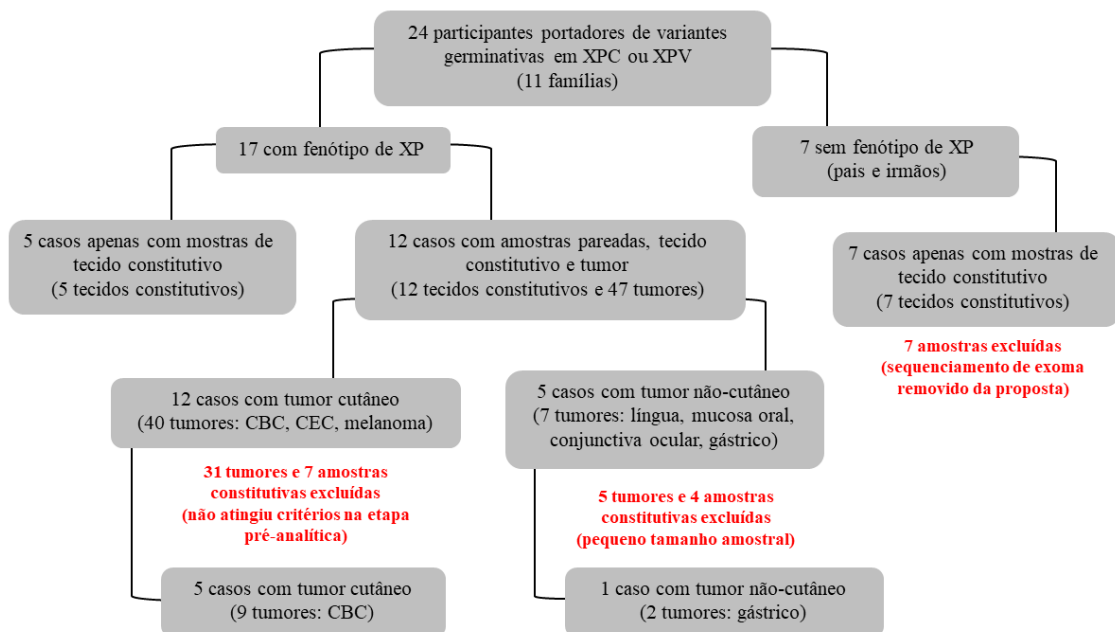


Figura 2 - Desenho do estudo quanto a distribuição dos participantes e amostras.

Optamos pela exclusão de cinco tumores não cutâneos (5/7 amostras) uma vez que o tamanho amostral pequeno dificultaria as análises dos resultados (Figura 2 e Apêndice 5). Duas amostras de tumor de estômago, obtidas da mesma peça cirúrgica, cujo DNA pôde ser obtido tanto de tecido fresco congelado como de tecido parafinado, foram mantidas (Tabela 2) para

servir como importante referência quanto aos dados de sequenciamento gerados a partir de tecidos armazenados em parafina.

As 40 amostras de tumores cutâneos armazenadas em parafina que permaneceram no estudo seguiram para o processo de extração de DNA: 37 carcinomas basocelulares (CBCs) de pele e 3 melanomas cutâneos. O total de 31 amostras de DNA de tumor parafinado foram excluídas do estudo na etapa de controle de qualidade pré-analítico do DNA por apresentar baixo rendimento, integridade comprometida ou resultados indicativos de contaminação ou troca de amostras (Figura 2 e Apêndice 5).

Como o rendimento do DNA das amostras de tumores parafinados era insuficiente para mais de uma abordagem metodológica e validações, optou-se então por ajustar a metodologia de sequenciamento para garantir maior cobertura da região sequenciada e, consequentemente, maior confiança no resultado encontrado. Desta forma, o sequenciamento completo do exoma foi substituído pelo sequenciamento de painel gênico customizado.

Devido essa mudança na metodologia de sequenciamento, foram também excluídos do estudo sete amostras de tecido constitutivo de participantes sem fenótipo de XP (Figura 2 e Apêndice 5).

Para os participantes que tiveram todas as amostras tumorais excluídas do estudo, o DNA da amostra normal pareada (leucócito ou saliva) foi também excluído (Figura 2 e Apêndice 5).

Ao final, o estudo pôde ser conduzido com seis participantes contribuindo com nove tumores de cutâneos (CBCs) armazenados em parafina e um tumor não cutâneo, tumor gástrico, com duas amostras. A Tabela 2 apresenta a relação dos participantes e das amostras que permaneceram no estudo, o detalhamento das características do tecido tumoral e do processamento, bem como identificação da amostra normal pareada. O Apêndice 5 traz a relação de todas as amostras excluídas do estudo.

O rendimento do DNA das amostras tumorais armazenadas em parafina variou de 70ng a 720ng. A integridade do DNA dessas amostras foi classificada como “média”, com exceção da amostra XB00069 que manteve seu DNA em alta integridade. As amostras foram classificadas como “indeterminada” na avaliação de genotipagem por *SNP/SSTR*, com exceção da XB00064 que foi classificada como “aprovada”. A amostra XB00040 foi excluída do estudo por não atender os critérios mínimos de cobertura para os dados de sequenciamento. As métricas de cobertura de sequenciamento de todas as amostras são mostradas na Tabela 3.

Tabela 2 - Relação das 17 amostras selecionadas para o estudo e características das 11 amostras de tumores dos 6 casos participantes.

Identificações do participante	Variantes responsáveis pelo grupo XP ¹	ID da amostra de DNA de leucócito	Tumor								
			Tipo de armazen.	Tempo em bloco ²	Tamanho ³	Idade	Topografia	Histologia	Tumor e normal separado ⁴	N. cortes/ Espessura ⁵	ID da amostra de DNA
XPSPAC02F0 7002-1001 2P0 [†]	<i>POLH</i> c.571A>C (p.Thr191Pro) ^{hm}	XB00002 7002_1001_Blood	Fresco	NA	8,5x7,0	50	Estômago anterior medial [*]	Adenocarcinoma invasor misto ^{**}	Não ^{***}	NA	7002_1001_Frozen
			Parafina	119	8,5x7,0	50	Estômago anterior medial [*]	Adenocarcinoma invasor misto ^{**}	Não	10/5	7002_1001_FFPE
XPSPAC03F0 7003-1001 3P0 [†]	<i>XPC</i> c.2251-1G>C ^{ht} c.2564delT (p.Leu855ArgfsTer7) ^{ht}	XB00003	Parafina	123	0,9x0,8x0,4	21	Pele retro auricular	CBC nodular	Não	10/5	XB00032
			Parafina [#]	94	1,5x1,0x0,3	23	Pele malar	CBC micronodular, pigmentado e ulcerado	Sim	10/5	XB00039
			Parafina [#]	94	2,2x2,0x0,7	23	Pele mento	CBC micronodular e ulcerado	Não	22/5	XB00040
XPSPAC04F0 7004-1001	<i>POLH</i> c.1222_1225delACTT (p.Thr408LeufsTer36) ^{ht}	XB00004	Parafina	59	0,5x0,4x0,2	52	Pele malar	CBC nodular	Não	1/10	XB00048
XPSPAC05F0 7005-1001 4P0 [†]	<i>XPC</i> c.2251-1G>C ^{ht} c.1969G>T (p.Glu657Ter) ^{ht}	XB00005	Parafina	78	0,9x0,8x0,2	18	Pele malar	CBC nodular	Sim	11/5	XB00050
XPSPAC10F1 7007-1002 9P1 [†]	<i>XPC</i> c.2251-1G>C ^{hm}	XB00010	Parafina	118	0,2x0,1x0,1	20	Pele nasal	CBC nodular, esclerosante e pigmentado	Não	32/5	XB00064
			Parafina [#]	22	0,3x0,3	14	Pele zigomática	CBC nodular e superficial	Sim	15/5	XB00069
XPSPAC32F0 7012-1001 24P0 [†]	<i>XPC</i> c.2251-1G>C ^{hm}	XB00021	Parafina [#]	22	0,3x0,3	14	Pele sobranceira	CBC nodular e adenóide	Sim	15/5	XB00071
			Parafina [#]	22	1,0x1,0	14	Pele zigomática	CBC nodular e esclerosante	Sim	10/5	XB00072

Legenda: (ID) Identificação. (^{hm}) Variante identificada em homozigose (^{ht}) Variante identificada em heterozigose. (armaz.) Armazenamento. (NA) Não se aplica. ([†]) Identificação do participante conforme descrito na publicação prévia do grupo ⁵⁵. ([†]) Tumores sincrônicos. (^{*}) Lesões removidas da mesma peça cirúrgica e armazenadas de forma diferente: congelada a fresco em Biobanco ou fixada em formalina e inserida em bloco de parafina para diagnóstico patológico. (^{**}) Adenocarcinoma invasor, pouco diferenciado, tipo misto de Laurén com predomínio do componente difuso. (^{***}) Porcentagem de tumor determinada e com valor atribuído de 90%, sendo os 10% remanescente de tecido conjuntivo não separável. (¹) Alteração genética germinativa responsável pela síndrome do Xeroderma Pigmentoso. As nomenclaturas das variantes seguem as sequências referências NM_006502 para o gene *POLH/XPV* e NM_004628 para o gene *XPC*. Todas as variantes são classificadas como patogênicas pelos critérios da *ACMG*, com exceção à variante *POLH* c.571A>C que é classificada como variante de significado incerto. (²) Tempo em meses que o tecido tumoral ficou armazenado em bloco de parafina, compreendendo o período entre a data da cirurgia até a data de extração do DNA. (³) Tamanho da lesão, em centímetros, conforme informação que consta em laudo patológico – não corresponde ao tamanho da lesão macrodissecada. (⁴) Separação macroscópica do tecido tumoral e normal por macrodissecções (raspagem manual da lâmina). (⁵) Número de cortes dos blocos de parafina que foram direcionados à extração de DNA e espessura dos cortes em micrômetros.

Tabela 3 – Perfil qualitativo dos dados de sequenciamento gerado por amostra.

ID do paciente	ID da amostra	Tipo da amostra (topografia do tumor)	Total de reads	Cobertura de extensão *	Tamanho médio das reads	Cobertura média de profundidade	Bases cobertas ≥10x	Bases cobertas ≥50x
XPSPAC02F0	XB00002	[#] Leucócito	344.915.556	80,64 x	74,9204	4.538,03 x	99,59%	98,92%
	7002_1001_Frozen	[#] Tumor de estômago (fresco)	451.125.448	79,23 x	74,8763	5.464,47 x	99,59%	99,01%
	7002_1001_FFPE	[#] Tumor de estômago (parafina)	148.942.842	60,8 x	73,545	381,23 x	99,14%	97,92%
XPSPAC03F0	XB00003	Leucócito	87.408.188	78,74 x	74,9057	1.406,36 x	99,78%	99,58%
	XB00032	Tumor de pele (parafina)	68.049.914	78,82 x	74,4417	1.002,79 x	99,38%	98,81%
	XB00039	Tumor de pele (parafina)	63.312.242	67,37 x	74,3226	372,53 x	98,98%	97,77%
	XB00040	Tumor de pele (parafina)	2.981.978	65,08 x	na	14,54 x	67,27%	na
XPSPAC04F0	XB00004	Leucócito	82.749.450	79,71 x	74,954	1.392,53 x	99,79%	99,53%
	XB00048	Tumor de pele (parafina)	50.657.720	64,17 x	73,9184	365,95 x	98,81%	97,6%
XPSPAC05F0	XB00005	Leucócito	75.353.666	79,39 x	74,9187	1.275,74 x	99,78%	99,56%
	XB00050	Tumor de pele (parafina)	53.635.932	69,86 x	74,4867	356,59 x	99,09%	97,83%
XPSPAC10F1	XB00010	Leucócito	76.178.702	77,65 x	74,9094	1.228,37 x	99,81%	99,63%
	XB00064	Tumor de pele (parafina)	56.094.216	70,73 x	74,3759	413,89 x	99,07%	97,99%
XPSPAC32F0	XB00021	Leucócito	78.932.630	79,37 x	74,9279	1.312,1 x	99,74%	99,49%
	XB00069	Tumor de pele (parafina)	73.319.970	72,89 x	74,958	614,84 x	99,49%	98,97%
	XB00071	Tumor de pele (parafina)	77.253.908	79,02 x	74,8044	1.091,89 x	99,52%	99,06%
	XB00072	Tumor de pele (parafina)	81.067.818	72,61 x	74,9662	652,96 x	99,5%	99%

Legenda: (ID) Identificação. ([#]) Amostras que foram sequenciadas na corrida 2. (*) Baseado no total de *reads* em região alvo, determinada no desenho do painel gênico (também referido em inglês como *On-Target Reads*). (na) não avaliado.

Em relação às características histopatológicas dos tumores cutâneos selecionados para o estudo, estes foram dos subtipos nodular e micronodular, puro ou associados a outro subtipo (Tabela 2).

O único caso do estudo que desenvolveu tumores não cutâneos (tumores internos), foi o XPSPAC02F0. Aos 38 anos foi diagnosticado com carcinoma mucoepidermóide em glândula submandibular, para o qual recebeu tratamento radioterápico adjuvante à cirurgia e esvaziamento cervical. Aos 50 anos foi submetido a gastrectomia total e esvaziamento linfonodal em decorrência do adenocarcinoma gástrico misto invasivo e pouco diferenciado, positivo para metástase linfonodal. Aos 52 anos foi diagnosticado com metástase em fígado, de perfil imunohistoquímico sugestivo de tumor gástrico, e iniciou o tratamento quimioterápico. Recebeu três regimes quimioterápicos, ordenados conforme segue: (1) dois ciclos de Etoposide, Leucovorin e 5-Fluorouracil; (2) dois ciclos de Paclitaxel e Carboplatina; e (3) dois ciclos de Irinotecan e Cisplatina. Aos 54 anos foi a óbito em decorrência da progressão da doença que evoluiu com metástase sistêmica afetando fígado, pulmão, peritônio e ossos.

Todos os seis pacientes foram diagnosticados com XP na infância. O único paciente que foi a óbito foi o XPSPAC02F0. Embora todos os pacientes apresentem manifestações oculares, apenas os do grupo XP-C evoluíram com diminuição da acuidade visual ou perda de visão. Além de CBCs, todos os pacientes desenvolveram carcinoma espinocelular. Os pacientes do grupo XP-C apresentam fenótipo mais agressivo quando considerado as manifestações oculares e o número de tumores desenvolvidos em determinado período. Exceção na agressividade do fenótipo se faz para a paciente XP-C XPSPAC10F1, filha de pais consanguíneos que tiveram no total quatro filhos diagnosticados com a síndrome. A paciente XPSPAC10F1 é a irmã mais nova. A paciente XPSPAC32F0 foi diagnosticada com meses de vida e, desde então, apresenta rotina sem nenhuma exposição solar e casa adaptada com lâmpadas de LED, no entanto, desenvolveu um número grande de tumores de pele em curto período de tempo.

O paciente XPSPAC04F0 é o único caso do estudo detectado com uma única cópia mutada de gene XP, apresentando uma variante germinativa patogênica no gene *POLH* em heterozigose. Embora o mecanismo molecular da síndrome do XP não esteja completamente elucidado para o paciente XPSPAC04F0, este apresenta fenótipo característico da síndrome XP. A Tabela 4 mostra o detalhamento clínico dos participantes.

Tabela 4 – Aspectos clínicos dos pacientes XP-C e XP-V.

ID do paciente (ID do CBC no estudo)	Grupo XP	Sexo	Idade na 1ª manifestação	Gravidade dos sintomas oftalmológicos	Idade na 1ª biópsia de pele	Número de tumores*				Observações
						Período de avaliação (idade ao início)	CBC**	CEC	Melanoma	
XPSPAC02F0 2P0 [†]	XP-V	M	8 anos	Fotofobia	17 anos	36 anos (17 anos)	Pele: 30 - nodular (20) - superficial (3) - esclerosante (2) - metatípico (1) - s/i (4)	22 (pele) 3 (lábios)	9 (pele)	Trabalhou em lavoura até os 17 anos.
XPSPAC03F0 3P0 [†] (XB00032 XB00039 XB00040)	XP-C	F	2 anos	Tumor e perda total da visão	4 anos	18 anos e 10 meses (4 anos)	Pele: 37 - nodular (21) - micronodular (7) - superficial (1) - esclerosante (3) - metatípico (1) - s/i (4) Lábios: 3	8 (pele) 5 (lábios) 2 (ocular)	10 (pele)	Longos períodos sem acompanhamento dermatológico e sem uso de medidas fotoprotetoras (12/2007 a 09/2009 e outros).
XPSPAC04F0 (XB00048)	XP-V	M	6 anos	Fotofobia	12 anos	22 anos e 3 meses (32 anos)	Pele: 82 - nodular (56) - micronodular (2) - superficial (4) - esclerosante (1) - s/i (19) Lábios: 2	7 (pele) 2 (lábios)	8 (pele)	Tabagista por 6 anos. Costume de frequentar praia sem uso de proteção solar.
XPSPAC05F0 4P0 [†] (XB00050)	XP-C	F	4 meses	Perda parcial da visão	1 anos	19 anos e 1 mês (5 anos)	Pele: 104 - nodular (60) - micronodular (2) - superficial (18) - esclerosante (12) - metatípico (2) - s/i (10) Lábios: 2	5 (pele) 1 (lábios)	29 (pele)	Pouca exposição solar desde o diagnóstico da síndrome (aos 4 meses).

Cont/ Tabela 4

ID do paciente	Grupo XP	Sexo	Idade na 1ª manifestação	Gravidade dos sintomas oftalmológicos	Idade na 1ª biópsia de pele	Número de tumores*				Observações
						Período de avaliação (idade ao início)	CBC**	CEC	Melanoma	
XPSPAC10F1 9P1 [¶] (XB00064)	XP-C	F	10 anos	Diminuição da acuidade visual	15 anos	11 anos e 2 meses (16 anos)	Pele: 5 - nodular (3) - superficial (1) - s/i (1) Lábios: 1	10 (pele)	NA	Possui outros 3 irmãos com diagnóstico clínico e molecular do XP.
XPSPAC32F0 24P0 [¶] (XB00069 XB00071 XB00072)	XP-C	F	9 meses	Diminuição da acuidade visual	4 anos	2 anos e 11 meses (12 anos)	Pele: 11 - nodular (11)	4 (pele)	1 (pele)	Possui 1 irmão com diagnóstico clínico e molecular do XP. Não frequenta escola por opção da mãe - aulas com professores na residência.

Legenda: (ID) Identificação. (¶) Identificação do participante conforme descrito na publicação prévia do grupo ⁵⁵. (M) Masculino. (F) Feminino. (s/i) Sem informação - indisponível. (NA) Não se aplica. (*) Revisão de prontuário hospitalar realizada em dezembro de 2019. Foram consideradas apenas lesões revisadas em exame histopatológico. (**) Está representado o componente histológico principal que subdivide o CBC nas principais categorias clínicas, porém não indica que essas lesões são puras, sem associação de subtipos, sem diferenciação ou sem outros componentes

4.2 AVALIAÇÃO DE VARIANTES GERMINATIVAS

O sequenciamento do DNA de leucócito dos seis pacientes do estudo, não revelou variantes germinativas clinicamente relevantes (patogênicas ou provavelmente patogênicas), porém variantes de significado incerto foram detectadas em todos os pacientes avaliados, com exceção do paciente XPSPAC02F0. Quando a avaliação foi direcionada aos genes de interesse para investigação germinativa (genes associados a fenótipos relevantes para a pergunta do estudo), destacou-se apenas uma variante identificada no gene *RGS22*. A frequência do alelo variante para as VUS germinativas foram avaliadas no tecido tumoral para identificação de ocorrência de perda de heterozigose. Nenhuma das variantes germinativas avaliadas apresentou perda de heterozigose nos tecidos tumorais (Tabela 5).

Entre as variantes germinativas classificadas como provavelmente benignas, cinco ocorreram em genes de interesse para investigação germinativa: *CLPTMIL*, *POLE*, *PTCH1*, *PTCH2* e *RGS22*. Os Apêndices 6 e 7 trazem a relação de todas as variantes germinativas identificadas e classificadas como provavelmente benignas e benignas, respectivamente.

Em caráter exploratório, avaliamos oito SNPs de suscetibilidade a CBC reportados no banco de dados público *Genome-Wide Association Study Catalog* (*GWAS Catalog*), um repositório curado de todos os estudos de associação ampla de genomas (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Study*) publicados e que avaliaram pelo menos 100.000 SNPs e identificaram associações com p valor $<1 \times 10^{-5}$ ¹⁴¹ (Tabela 6). Destacamos nessa avaliação dois SNPs. O alelo menos comum [A] do rs3769823 no gene *CASP8* foi observado em todos os pacientes do estudo, com exceção da paciente XPSPAC10F1, com fenótipo mais brando da síndrome e que desenvolveu o menor número de tumores CBC entre os pacientes avaliados; 5 CBCs em 134 meses (Tabela 4) com média de 1,2 tumores por ano. O alelo menos comum [A] do rs1126809 no gene *TYR* foi observado no nosso estudo ocorrendo apenas na paciente XPSPAC05F0, que apresentou o maior número de CBC dos casos avaliados no estudo; 104 CBCs em 229 meses (Tabela 4) com média de 5,3 tumores por ano.

Tabela 5 - Variantes germinativas classificadas como VUS identificadas nos pacientes XP-C e XP-V.

Paciente (amostra)	Gene	Identificador no dbSNP	VAF	c.(HGVS)	p.(HGVS)	ClinVar*	Varsome - ACMG*	Frequência populacional (AbraOM/gnomAD Exomes v2.1.1)	LoH do alelo selvagem no tumor? (VAF no tumor)	Preditores <i>in silico</i> que classificam a variante como prejudicial
XPSPAC03F0 (XB00003)	RGS22	rs146190924	0,49	NM_015668.5:c.2530G>A	p.(Val844Ile)	não consta	VUS	não consta/0.000938	Não (0,47 CBC_XB00032) (0,43 CBC_XB00039)	CADD; DANN; MutationTaster; FATHMM-MKL; FATHMM-XF; LRT; EIGEN; EIGEN PC; SIFT; Polyphen2
	TTN	rs754054875	0,47	NM_001267550.2:c.21859C>G	p.(Leu7287Val)	VUS	VUS	0.000821/0.00000403	Não (0,51 CBC_XB00048)	MutationTaster; FATHMM-MKL; FATHMM-XF; EIGEN; EIGEN PC; SIFT; MetaSVM; MetaLR; Polyphen2
XPSPAC04F0 (XB00004)	DNAH11	rs370932895	0,47	NM_001277115.2:c.10472G>A	p.(Arg3491His)	VUS	Provavelmente benigna	0.000821/0.000647	Não (0,36 CBC_XB00048)	CADD; DANN; MutationTaster; FATHMM-MKL; FATHMM-XF; LRT; DEOGEN2; EIGEN; EIGEN PC; SIFT; PROVEAN; PrimateAI; Polyphen2
XPSPAC05F0 (XB00005)	SLC27A5	não consta	0,43	NM_012254.3:c.453_454delGGinsTT	p.(Ala152Ser)	não consta	VUS	não consta/não consta	Não (0,47 CBC_XB00050)	não se aplica
	TTN	rs72647861	0,48	NM_001267550.2:c.2611G>T	p.(Val871Leu)	Conflitante (Provavelmente benigna/VUS)	Provavelmente benigna	não consta/0.0000717	Não (0,46 CBC_XB00050)	CADD; FATHMM-MKL; SIFT; SIFT4G

Cont/ Tabela 5

Paciente (amostra)	Gene	Identificador no dbSNP	VAF	c.(HGVS)	p.(HGVS)	ClinVar*	Varsome - ACMG*	Frequência populacional (AbraOM/gnomAD Exomes v2.1.1)	LoH do alelo selvagem no tumor? (VAF no tumor)	Preditores <i>in silico</i> que classificam a variante como prejudicial
XPSPAC05F0 (XB00005)	<i>PCDHB3</i>	rs541148618	0,34	NM_018937.4:c.1737_1749del	p.(Ala580ThrfsTer3)	não consta	VUS	não consta/0.0049	Não (0,24 CBC_XB00050)	não se aplica
XPSPAC10F1 (XB00010)	<i>TTN</i>	rs562393563	0,48	NM_001267550.2:c.54146A>G	p.(Asn18049Ser)	não consta	VUS	não consta/0.0000122	Não (0,45 CBC_XB00064)	<i>MutationTaster;</i> <i>FATHMM-MKL;</i> <i>FATHMM-XF;</i> <i>EIGEN; EIGEN PC;</i> <i>SIFT; PROVEAN;</i> <i>REVEL; PrimateAI;</i> <i>Polyphen2</i>
XPSPAC32F0 (XB00021)	<i>UGT2B10</i>	rs754926782	0,51	NM_001075.6:c.675A>G	p.(Ile225Met)	não consta	VUS	não consta/0.0000162	Não (0,46 CBC_XB00069) (0,49 CBC_XB00071) (0,41 CBC_XB00072)	não se aplica

Legenda: (*) As ferramentas que forneceram as informações apresentadas são frequentemente atualizadas – os dados apresentados foram obtidos de acesso realizado em março de 2020. (VAF) Frequência alélica da variante (do inglês, *Variant Allele Fraction*).

Tabela 6 – SNPs de suscetibilidade a CBC reportados *GWAS Catalog* e identificados nos pacientes XP-C e XP-V.

Gene	SNP	Alelo de risco (S/V)	OR*	Frequência populacional no AbraOM**	Frequência populacional no gnomAD - Genomes**	Genótipo					
						XPSPAC02F0	XPSPAC03F0	XPSPAC04F0	XPSPAC05F0	XPSPAC10F1	XPSPAC32F0
<i>CLPTMIL</i>	rs401681	C (S)	1.21; 1.23; 1.25	0,551 [#]	s/i	C/C	C/C	T/T	T/T	T/T	C/T
<i>CLPTMIL</i>	rs421284	T (S)	1.11; 1.14	s/i	s/i	T/T	T/T	C/C	C/C	C/T	C/T
<i>CASP8</i>	rs3769823	A (S)	1.12	s/i	0,337	A/G	A/G	A/G	A/G	G/G	A/A
<i>PADI6</i>	rs7538876	A (V)	1.25; 1.28	0,334	0,365	G/G	G/A	G/A	A/A	G/G	G/G
<i>RGS22</i>	rs2199333	C (S)	1.16	s/i	s/i	C/C	C/T	C/T	C/T	C/C	C/C
<i>TGM3</i>	rs214803	C (S)	1.21	s/i	0,260	C/C	A/A	A/C	C/A	A/A	A/A
<i>TP53</i>	rs78378222	G (V)	1.49; 1.41; 2.07; 2.16; 2.24	s/i	0,011	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T
<i>TYR</i>	rs1126809	A (V)	1.14; 1.12	0,146	0,176	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G

Legenda: (S/V) Alelo selvagem / Alelo variante. (*) *Odds ratio* dos estudos depositados no *GWAS Catalog*. (s/i) Sem informação - indisponível. ([#]) Valor estimado pela subtração da frequência do alelo variante. (**) Os dados apresentados foram extraídos da base de dados do AbraOM por acesso ao website realizado em abril de 2020 e da base de dados *dbSNP Short Genetic Variations* (referente ao gnomAD - Genomes) por acesso ao website realizado em junho de 2020.

4.3 PERFIL MUTACIONAL DOS TUMORES

Foram utilizados dois algoritmos para identificação de variantes somáticas, o *Mutect* e o *Sentieon*, nas 10 amostras de tumores (CBCs cutâneos e gástricos) pareadas com tecido normal do mesmo paciente (leucócito). Observamos que o *Sentieon* apresentou porcentagens de cobertura média por base superiores ao do *Mutect* em todas as amostras (Figura 3A). Com exceção da amostra de tumor gástrico armazenada em parafina, os valores de porcentagem das bases com cobertura acima de 100x foi semelhante entre os algoritmos (Figura 3B).

O tumor gástrico teve o sequenciamento realizado em duas amostras que corresponderam ao seu tecido armazenado em parafina e tecido congelado a fresco, ambos obtidos da mesma peça cirúrgica. Essa estratégia possibilitou que os dados de sequenciamento gerados servissem como controle de qualidade de DNA em relação ao meio de armazenamento do tecido, permitindo então validar os valores de corte de cobertura e frequência alélica estabelecidos nesse estudo como confiáveis. O sequenciamento das duas amostras de tumor gástrico foi realizado em corrida de sequenciamento independente dos CBCs e, portanto, pôde alcançar alta cobertura média de profundidade (Tabela 3). O tempo de armazenamento do tumor gástrico em bloco de parafina foi próximo ao do CBC com maior tempo de armazenamento em parafina (119 e 123 meses, respectivamente, Tabela 2), conferindo então maior confiança ao extrapolar interpretações dos dados.

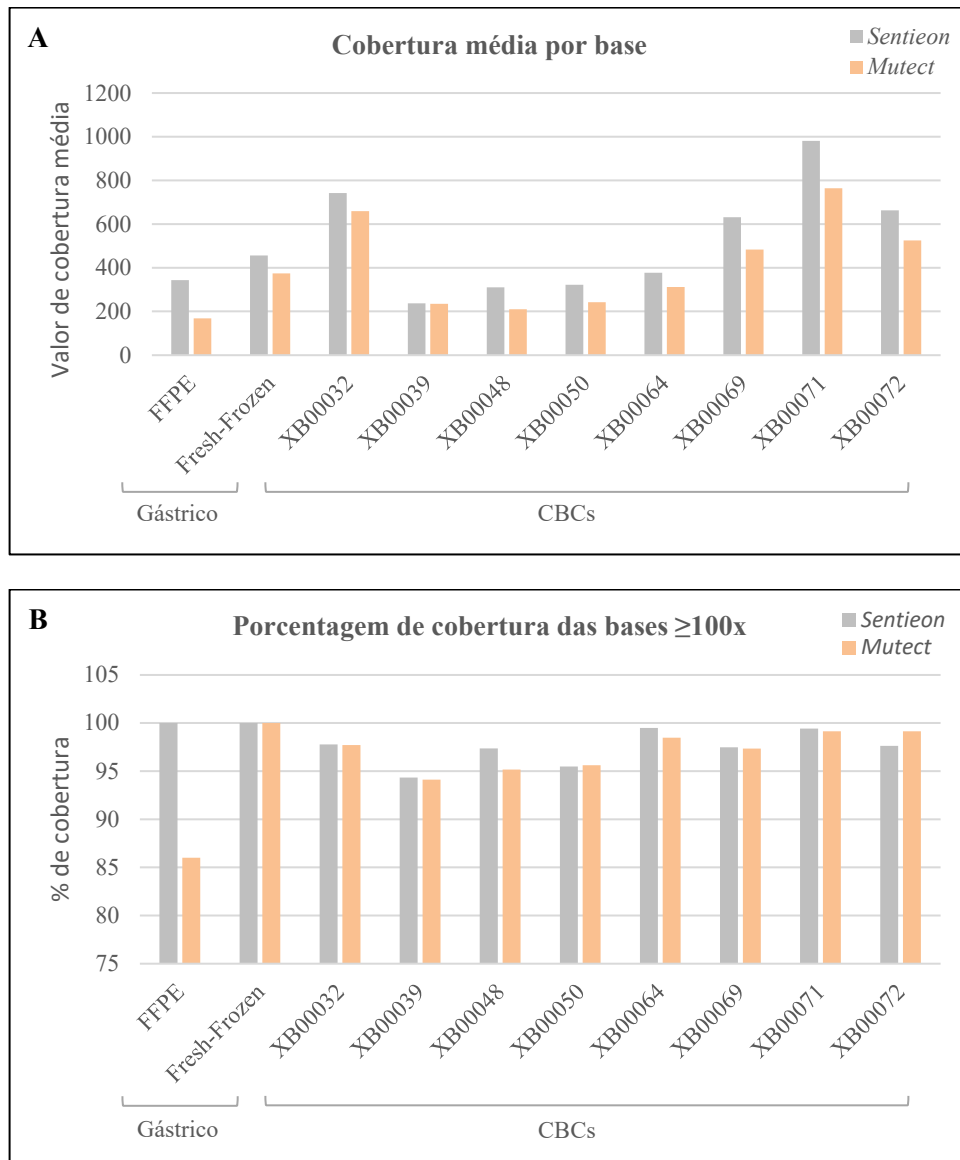


Figura 3 – Comparação nos valores de cobertura das bases para as variantes somáticas identificadas pelos algoritmos *Mutect* e *Sentieon*.

(A) Gráfico de barras mostra a distribuição de cobertura média por base e por amostras entre os algoritmos *Mutect* e *Sentieon*. (B) Gráfico de barras mostra a porcentagem de bases cobertas mais de 100x em cada amostra, para os algoritmos *Mutect* e *Sentieon*. (FFPE) Tecido do tumor gástrico armazenado em parafina (do inglês, *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*). (*Fresh-Frozen*) Tecido do tumor gástrico congelado a fresco.

Para compreender a divergência entre o *Mutect* e *Sentieon* em relação à porcentagem de bases com cobertura acima de 100x na amostra de câncer gástrico armazenada em parafina (FFPE), avaliamos a cobertura em relação à frequência alélica das variantes somáticas. Observamos o número de variantes identificadas pelo *Sentieon* foi maior quando comparada ao *Mutect*, respectivamente 204 e 7 (Figura 4A), porém a frequência alélica das variantes identificadas pelo *Sentieon* estava entre 0,8% - 3,1%, com cobertura variando entre 123x – 807x (Figura 4B). As variantes identificadas pelo *Mutect* apresentaram frequência alélica entre 2,9% - 22,6% (Figura 4A), com cobertura variando entre 49x – 274x. Portanto, o *Sentieon* identificou maior número de variantes com frequência alélica baixa. Pelos critérios de seleção de variantes que estabelecemos na seção de materiais e métodos, levando em consideração principalmente o tipo de material do estudo (DNA de amostra armazenadas em parafina), todas as variantes identificadas pelo *Sentieon* devem ser desconsideradas por maior chance de serem artefatuais. Ademais, a identificação de número maior de variantes em frequência alélica baixa quando comparado o tumor gástrico FFPE e o tumor gástrico congelado a fresco (*Frozen*) (Figura 4A), corrobora com o julgamento destas variantes serem artefatuais. Desta forma, consideramos que os dados de sequenciamento do tumor gástrico validam os valores de corte da primeira seleção por filtragem (cobertura $\geq 300x$ e frequência alélica $\geq 5\%$) estabelecidos nesse estudo como confiáveis.

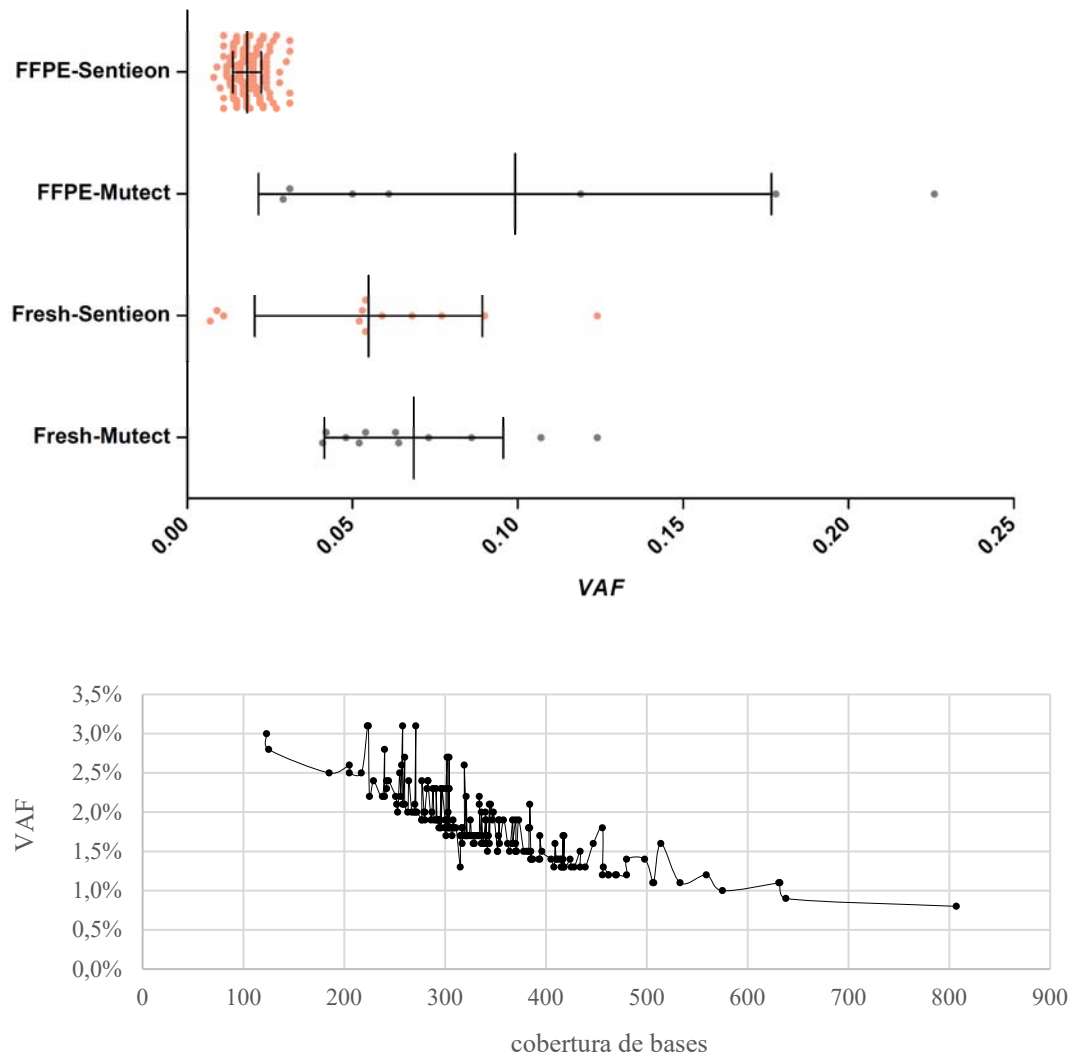


Figura 4 – Diferença no número de variantes somáticas identificadas pelos algoritmos *Mutect* e *Sentieon* no tumor gástrico é atribuída ao critério de filtragem por frequência alélica.

(A) Frequência alélica das variantes identificadas pelos algoritmos *Mutect* e *Sentieon* na amostra de tumor gástrico de tecido armazenado em parafina e tecido congelado a fresco. Cada ponto do gráfico *boxplot* representa uma variante. (B) Gráfico de dispersão para comparar a relação entre a frequência alélica e a cobertura vertical da base sequenciada, representadas por cada ponto, para as variantes identificadas pelo algoritmo *Sentieon* na amostra de tumor gástrico armazenada em parafina. (VAF) Frequência alélica da variante (do inglês, *Variant Allele Fraction*). (FFPE) Tecido armazenado em parafina (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*). (*Fresh*) Tecido congelado a fresco.

Buscando compreender melhor a concordância na identificação de variantes somáticas pelos diferentes algoritmos, comparamos as coordenadas genômicas de todas as variantes identificadas em todas as amostras. Encontramos que 14,6% das variantes identificadas pelo *Mutect* e 20,3% das variantes identificadas pelo *Sentieon* eram comuns aos dois algoritmos. O perfil de cobertura e frequência alélica das variantes somáticas discordantes mostra que a maioria destas apresentam, no algoritmo *Mutect*, baixa cobertura (média de cobertura foi 398x) e no algoritmo *Sentieon* apresentam baixa frequência alélica (média de frequência foi 2%) (Figura 5).

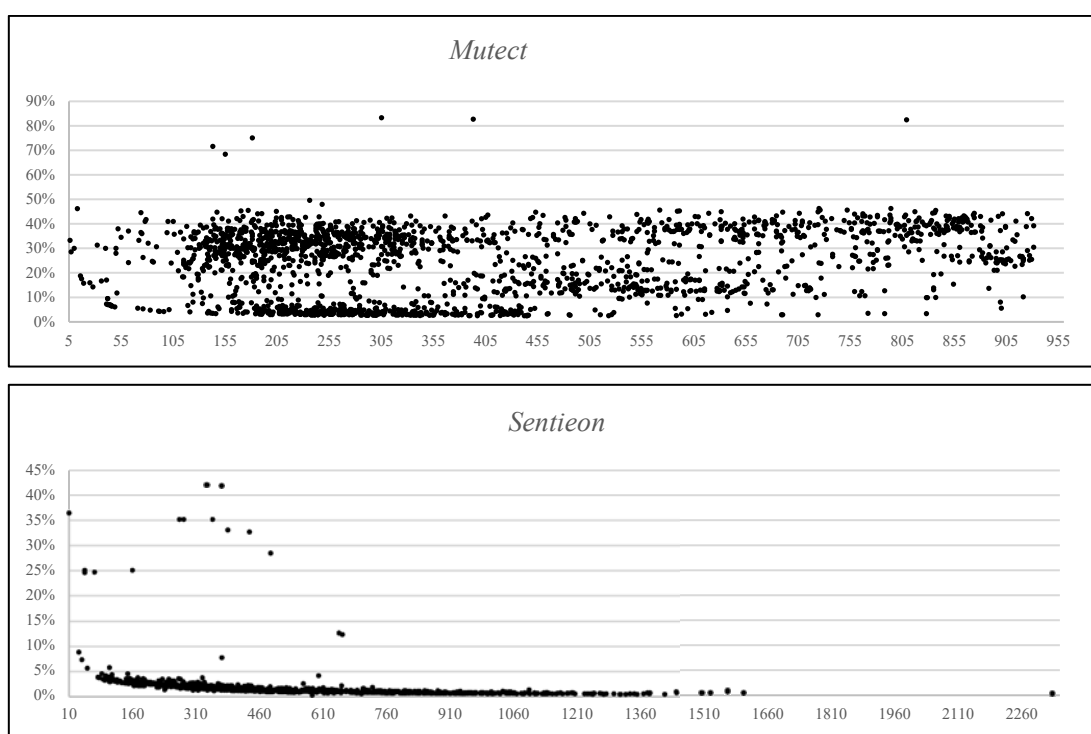


Figura 5 – Perfil de cobertura e frequência alélica das variantes somáticas discordantes entre os algoritmos *Mutect* e *Sentieon*.

Quando considerado apenas as 1.047 variantes somáticas únicas com frequência alélica $\geq 5\%$ e cobertura $\geq 300x$, o algoritmo *Sentieon* contribuiu com a identificação de apenas 72 variantes. Não houve concordância entre os dois algoritmos para nove destas 72 variantes identificadas. As nove amostras foram inspecionadas visualmente no IGV para avaliar o alinhamento e confirmar a frequência da variante. Com exceção de uma variante, todas as demais foram validadas por apresentar bom alinhamento, sequências de boa qualidade e não estar presente nas amostras normais pareadas de leucócitos. A variante não validada, chr17:7578711:CTTTTTTT>C, corresponde a uma região não codificante do gene *TP53* e

ocorreu dentro de uma região de homopolímero onde foram detectadas sequências com deleção de 2 a 7 bases. Essa variante está presente em todas as amostras avaliadas no estudo, incluindo as amostras normais de leucócitos, em baixa frequência e/ou baixa cobertura, preferencialmente em uma orientação de sequência de bases, reforçando nosso julgamento em ser uma variante artefactual e não uma variante verdadeira.

Também para inspeção visual no IGV selecionamos duas variantes somáticas em *tanden*, identificadas apenas pelo algoritmo *Mutect*. O critério para seleção foi valores extremos de cobertura de sequenciamento. As sequências de ambas amostras estão alinhadas corretamente e, portanto, julgamos ser variantes verdadeiras (Figura 6).

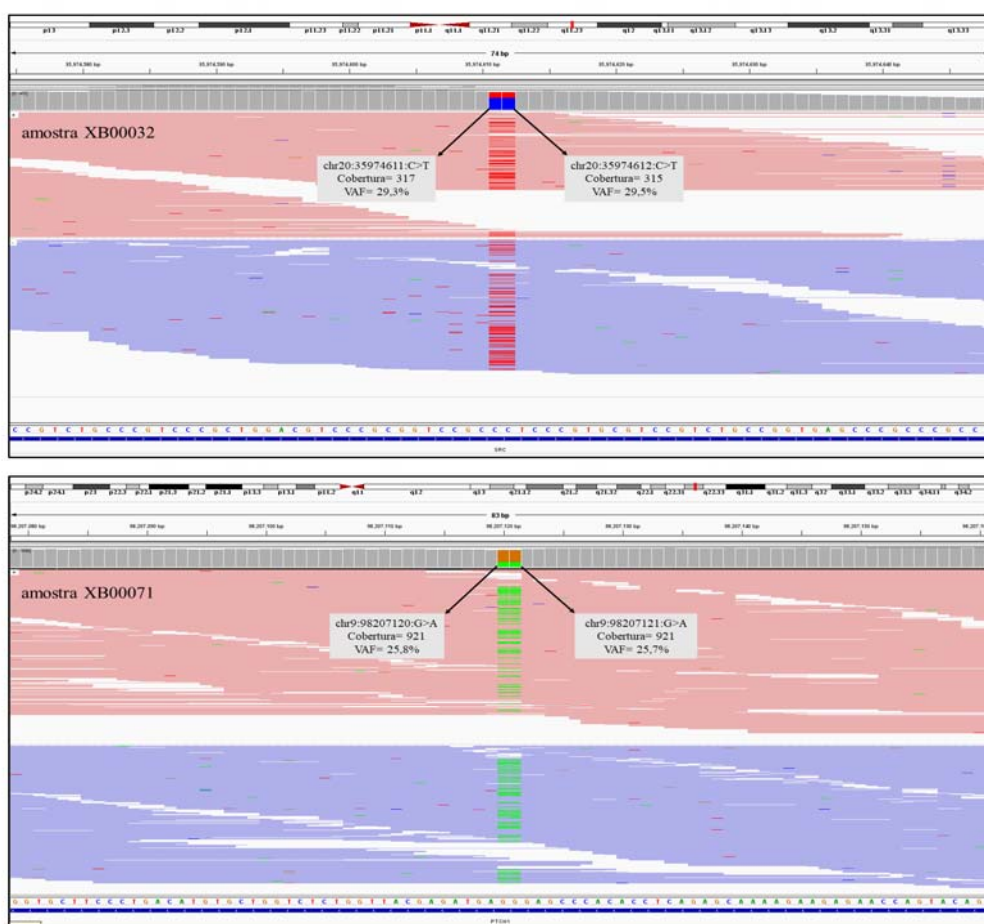


Figura 6 – Imagens dos alinhamentos das sequências vistas pelo visualizador IGV.

As bases em destaque nas sequências individuais geradas pelo sequenciamento das amostras de CBC XB00032 e XB00071 são as que diferem da sequência referência.

Diante dos dados expostos acima, optamos por seguir com a análise de todas as variantes somáticas, incluindo as que não foram concordantes entre os dois algoritmos. Considerando

que o maior volume de variantes foi identificado pelo *Mutect*, priorizamos os valores de cobertura e frequência alélica deste algoritmo para as variantes concordantes.

As variantes somáticas identificadas por cada algoritmo foram avaliadas pelo programa *VarSeq* (Golden Helix) para anotação e filtragem das variantes somáticas possivelmente verdadeiras, aplicando filtros que selecionaram aquelas com cobertura $\geq 300x$ e frequência alélica $\geq 5\%$. Adicionalmente, foram aplicados os critérios mais restritivos de filtragem para selecionar variantes com cobertura $\geq 300x$ e VAF $> 25\%$ e variantes com cobertura $\geq 600x$ e VAF entre 5 - 25%. Após restringir os critérios de filtragem, nenhuma variante foi identificada nas amostras de CBC XB00064 e tumor gástrico FFPE.

Para avaliar o perfil de variantes somáticas identificadas nas amostras, consideramos variantes sinônimas e não sinônimas, variantes em sítios canônicos de *splicing* e variantes em regiões intrônicas, totalizando então 623 variantes na avaliação.

A proporção de alterações de bases do tipo transição (Ti) e transversão (Tv) foi avaliado. Valor baixo na razão Ti/Tv foi observado para a amostra de tumor gástrico congelado a fresco (*Frozen*) e para a amostra de CBC XB00048, esta última diferindo das demais amostras de CBC que apresentaram valores altos (Figura 7).

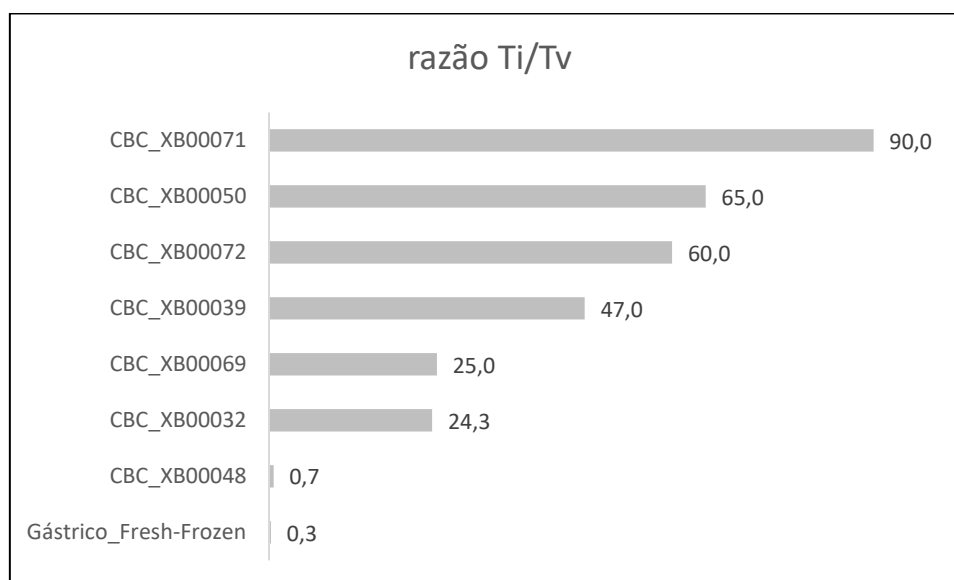


Figura 7 – Valores de Ti/Tv obtidos em cada amostra.

Para a avaliação do perfil de troca de bases, apenas as sete amostras de CBCs foram consideradas devido ao pequeno número de variantes somáticas identificadas na amostra de tumor gástrico de tecido congelado a fresco ($n=5$). Observamos que 93,4% (582/623) das SNVs eram alterações C:G>T:A e 28,5% ($n=166$) destas alterações ocorreram em nucleotídeos

adjacentes, compondo então a alteração em dinucleotídeos CC>TT (ou GG>AA). A frequência de alterações C:G>T:A no contexto de bases YC ou CY e alterações G>A no contexto de bases yG ou Gy (onde Y = C ou T e onde y = G ou A) foi de 93,1% (n= 580). A frequência das alterações G:C>T:A, que podem ser induzidas por estresse oxidativo como também por radiação UV, foi de 2,5% (n= 16). Para avaliar a frequência dessas alterações ponderando efeito menor da radiação UV, consideramos apenas alterações C>A que ocorreram no contexto de bases RCR e alterações G>T que ocorreram no contexto de base rGr (onde R = A ou G e r = T ou C), uma vez que as citosinas deste contexto de base não estão envolvidas na formação de fotodímeros quando expostas a radiação UV, estando, portanto, mais relacionadas à oxidação da guanina ¹⁴². Observamos que a taxa de alterações G:C>T:A no contexto RCR ou rGr foi de 0,4% (n= 3).

Ao avaliar o perfil de variantes somáticas em cada um dos sete CBCs, com exceção do tumor XB00048, confirmamos que o perfil de variantes identificado é consistente com o perfil de mutações induzidas por radiação UV, com mais de 95% das variantes representando alterações tipicamente fotoinduzidas (C:G>T:A e G:C>T:A) (Figura 8). Observamos que 45% das alterações identificadas no CBC XB00048 não representam mutações tipicamente fotoinduzidas. O tumor XB00048 foi desenvolvido pelo paciente XPSPAC04F0, único caso do estudo com uma única cópia alterada de gene XP (*POLH*) em tecido constitutivo.

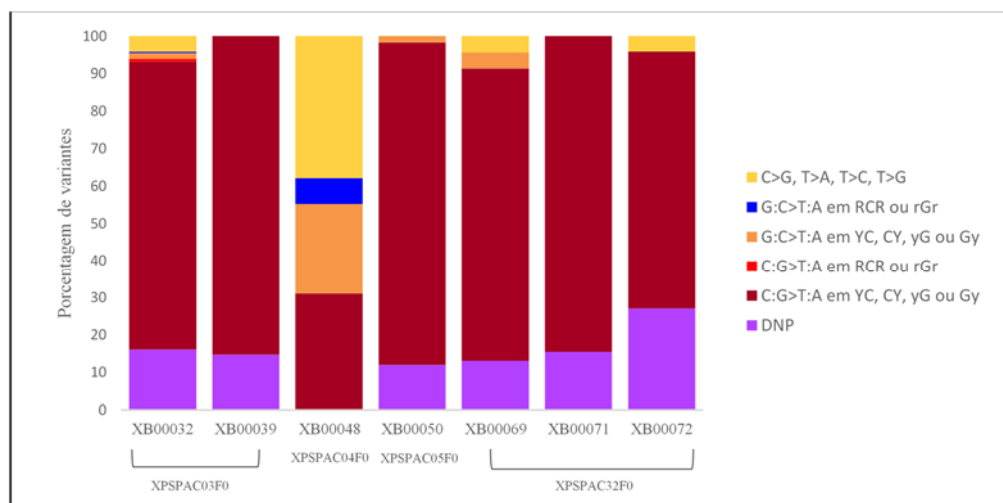


Figura 8 – Perfil das trocas de bases identificadas nas sete amostras de CBCs.

(DNP) Dinucleotídeos polimorficos CC>TT ou GG>AA.

Na avaliação da carga mutacional, foi observado que quando nenhum filtro de seleção foi aplicado (Tabela 7 - Total - *Mutect*), duas amostras de CBC se destacam com maior carga

mutacional, acima de 600 mutações/Mb, a XB00048 e XB00050. O tempo de armazenamento em parafina dessas duas amostras foi de 59 (XB00048) e 78 meses (XB00050), estando entre as amostras do estudo armazenadas por menor tempo. A carga mutacional da amostra de tumor gástrico armazenada por 119 meses em parafina (204.4 mutações/Mb) foi ligeiramente menor quando comparada com duas das três amostras de CBC armazenadas em parafina por tempo menor (22 meses). Após restringir os critérios de filtragem por cobertura e frequência alélica (Tabela 7 - Seleção) para desconsiderar possíveis variantes artefatuais (cobertura $\geq 300\times$ e VAF $>25\%$ e variantes com cobertura $\geq 600\times$ e VAF entre 5 - 25%), a amostra com maior carga mutacional (294,5 mutações/Mb) foi a XB00032, cujo tecido ficou armazenado em parafina por 123 meses (Tabela 2). Os valores obtidos para a avaliação da carga mutacional na amostra de tumor gástrico, comparando o tecido armazenado em parafina e o tecido congelado a fresco, aumenta nossa confiança em selecionar variantes somáticas possivelmente verdadeiras ao aplicar os filtros de cobertura e frequência alélica mais restritivos. Conforme esperado, os sete tumores de pele CBC apresentaram valores maiores quando comparado ao tumor gástrico *Frozen* (Tabela 7 - Seleção).

Tabela 7 - Carga mutacional dos tumores.

ID do participante	Amostra		Total - <i>Mutect</i>		Seleção	
	ID	Tumor	Número de variantes	Carga mutacional	Número de variantes	Carga mutacional
XPSPAC02F0	Frozen	Gástrico-fresco	31	30,0	5	4,8
	FFPE	Gástrico-parafina	211	204.4	0	0
XPSPAC03F0	XB00032	CBC-parafina	438	424.4	304	294,5
	XB00039	CBC-parafina	534	517.4	47	45,5
XPSPAC04F0	XB00048	CBC-parafina	683	661.7	29	28,1
XPSPAC05F0	XB00050	CBC-parafina	700	678.2	66	63,9
XPSPAC10F1	XB00064	CBC-parafina	456	441.8	0	0
XPSPAC32F0	XB00069	CBC-parafina	272	263.5	26	25,2
	XB00071	CBC-parafina	291	281.9	90	87,2
	XB00072	CBC-parafina	442	428.2	61	59,1

Na sequência, restringimos a avaliação de variantes somáticas excluindo aquelas que não ocorreram em região codificante ou sítio de *splicing*, bem como variantes sinônimas. No total, a avaliação de variantes somáticas em oito amostras de CBC pareadas identificou 262 variantes em sete amostras, com uma média de 37 variantes por amostra (mínimo de 11 e máximo de 127). Apenas duas variantes somáticas foram identificadas na amostra de tumor gástrico de tecido congelado a fresco.

Todas as variantes somáticas identificadas foram classificadas como SNV. Em relação ao efeito da alteração, 235 foram classificadas como *missense* (substituição de um aminoácido) e 29 como perda de função (LoF, do inglês *Loss of Function*). Entre as variantes LoF, 27 são substituições de bases em regiões codificantes (alterações *nonsense*) e duas são substituições de bases em sítio canônico de *splicing*. Todas as variantes foram identificadas em heterozigose. A média da frequência alélica das variantes identificadas foi 32%, sendo que a maioria das amostras (85,2%) apresentou variantes com frequência alélica $\geq 20\%$.

4.4 PERFIL DE GENES MUTADOS NOS TUMORES

Dos 114 genes avaliados no painel, 71 apresentaram variantes somáticas nas sete amostras de CBCs avaliadas. Vinte e sete genes apresentaram variantes em mais de uma amostra de CBC (Tabela 8) e nenhuma variante foi recorrente entre as amostras, porém observamos duas variantes ocorrendo entre duas amostras de dois pacientes e outra variante ocorrendo em três amostras de um mesmo paciente. Nenhum gene foi compartilhado entre as sete amostras de CBC. Variantes LoF foram observadas em 11 genes.

Todos os sete CBCs avaliados apresentaram variantes somáticas em genes considerados importantes para o desenvolvimento e/ou progressão do CBC. Nesse sentido, foram identificadas variantes nos genes *GLI3*, *GLI2*, *SHH*, *PTCH1*, *PTCH2*, *SUFU* e *SMO*, que fazem parte da via *Sonic Hedgehog*, e nos genes *CASP8*, *ERBB2*, *FBXW7*, *HRAS*, *LATS1*, *LATS2*, *MYCN*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NRAS*, *PPP6C*, *PTPN14*, *RAC1*, *YAP1* e *TP53*. Seis das sete amostras avaliadas apresentaram pelo menos uma variante somática em gene da via *Sonic Hedgehog*. Outros genes identificados como frequentemente mutados em CBCs também apresentaram variantes somáticas nas amostras do nosso estudo, a saber: *ARID1A*, *C7*, *DPCR1*, *PCDHB3* e *TMEM132D*, que apresentaram variantes em mais de uma amostra, e *CDKN2A*, *CDKN1A*, *CRNKL1*, *CSMD1*, *CSMD2*, *CSMD3*, *DCC*, *DPP10*, *ITIH2*, *KCNT2*, *NEBL*, *PPP1R3A* e *RBI*.

Tabela 8 – Número de variantes somáticas por gene alterado em mais de uma amostra de CBC e distribuição dos genes entre as amostras.

Gene	Número de variantes	Número de variantes LoF	Número de CBCs com variante	Identificação da amostra de CBC						
				XPSPAC03F0		XPSPAC04F0	XPSPAC05F0	XPSPAC32F0		
				XB00032	XB00039	XB00048	XB00050	XB00069	XB00071	XB00072
<i>TTN</i>	56	6	6	LoF			LoF		LoF	LoF
<i>FLG</i>	16	0	5							
<i>DPCR1 (MUCL3)</i>	9	0	4							
<i>LATS1*</i>	8	3	4			LoF			LoF	
<i>PTCH1*</i>	8	1	3				LoF			
<i>APC*</i>	7	0	5							
<i>DNAH11</i>	7	0	4							
<i>ANK2</i>	7	0	3							
<i>NOTCH1*</i>	7	0	2							
<i>NOTCH2*</i>	6	0	4							
<i>ARID1A*</i>	6	1	3	LoF						
<i>INTS1</i>	6	0	3							
<i>POLE*</i>	6	0	2							
<i>PTPN14</i>	5	3	4		LoF		LoF	LoF		
<i>TP53*</i>	5	1	3		LoF					
<i>BRCA2*</i>	4	1	4					LoF		
<i>KDR*</i>	4	1	2	LoF						
<i>PTCH2</i>	4	0	2							
<i>PADI6</i>	3	0	3							
<i>BRCA1*</i>	3	0	2							
<i>C7</i>	3	2	2	LoF					LoF	
<i>GLRA3</i>	3	2	2						LoF	
<i>PCDHB3</i>	3	0	2							
<i>TMEM132D</i>	3	1	2						LoF	
<i>ATR*</i>	2	0	2							
<i>MYH9*</i>	2	0	2							
<i>PRKCI</i>	2	0	2							

Legenda: (*) Gene incluído na lista do *COSMIC Cancer Gene Census* (CGC) - que cataloga genes que contêm mutações com implicação causal na tumorigênese, mutações *drivers*. A cor verde indica amostra que apresenta variante(s) no gene. (LoF) Alteração de perda de função.

O gene mais frequentemente mutado foi o *TTN*, com o total de 56 variantes somáticas detectadas em seis das sete amostras de CBC. Este gene com 364 exons codifica a maior proteína humana, a titin¹⁴³. Do total de variantes identificadas no gene *TTN*, apenas duas não representavam alterações tipicamente fotoinduzidas (C:G>T:A). Curiosamente, a única amostra de CBC que não apresentou variante em *TTN* (XB00039) foi da mesma paciente (XPSPAC03F0) que no outro CBC avaliado (XB00032), apresentou o maior número de variantes nesse gene (29). Para avaliar se essas 29 variantes estavam presentes em frequência alélica inferior ao limite atribuído pelos critérios estabelecidos no estudo e, por isso, não estavam presentes na lista final de variantes, selecionamos algumas delas por amostragem para inspeção visual no IGV e confirmamos que estas não estavam presentes na amostra XB00039.

As duas variantes somáticas identificadas em mais de duas amostras de CBCs são do tipo *missense*. A variante p.Gly34995Glu no gene *TTN* foi identificada no CBC de dois pacientes, XPSPAC04F0 (amostra XB00048) e XPSPAC05F0 (amostra XB00050). A variante p.Leu412Phe no *SMO* foi identificada nos três CBCs da paciente XPSPAC32F0: XB00069 (VAF 19,5%; cobertura 503x), XB00071 (VAF 24,8%; cobertura 763) e XB00072 (VAF 14,5%; cobertura 491). Por apresentar frequência alélica e cobertura abaixo dos valores de corte considerados no estudo, a variante identificada nas amostras XB00069 e XB00072 foi eliminada na etapa de seleção por filtragem, porém a inspeção visual do alinhamento das sequências pelo programa IGV confirma ser uma variante verdadeira. Por esta razão, o gene *SMO* não está listado na Tabela 8. Não sabemos se essa diferença na frequência alélica pode ser justificada por diferentes porcentagens de células tumorais no tecido, uma vez que esse parâmetro histológico não foi avaliado. Embora esses tumores tenham sido removidos no mesmo procedimento cirúrgico e sejam anatomicamente próximos (Tabela 2), compartilham apenas essa variante, sugerindo então não serem tumores clonais.

Para investigar a frequência alélica das variantes somáticas identificadas nos genes mutados entre as sete amostras de CBCs, consideramos apenas genes com mais de três variantes. Ao avaliar a mediana da frequência alélica observamos que a maioria dos genes (16/20) apresentam valores acima de 30% (Figura 9). Apenas duas variantes apresentaram frequência alélica maior que 50%, uma variante *missense* no gene *FLG* (p.Ser3935Leu) e uma variante *nonsense* no gene *PTPN14* (p.Gln159Ter), ambas com frequência alélica de 83%.

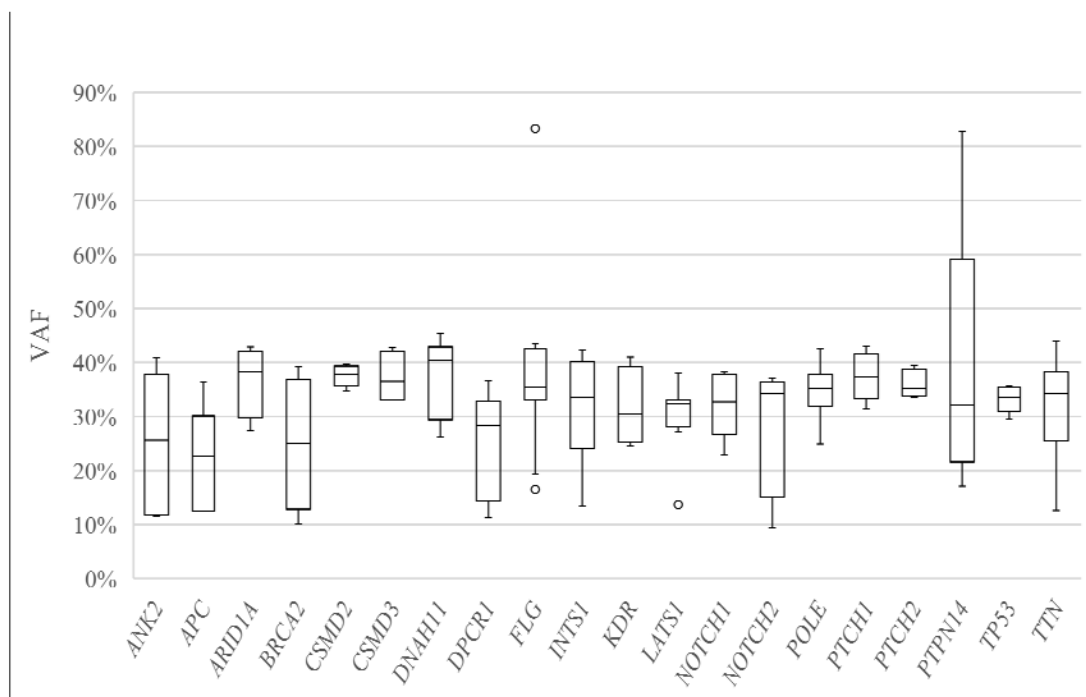


Figura 9 – Distribuição das variantes somáticas identificadas entre as sete amostras de CBCs em relação a frequência alélica.

Diagrama de caixa mostrando a distribuição dos valores de frequência alélica da variante (VAF) divididos em três quartis, com indicação da mediana e com linhas fora das caixas indicando valores mínimos e os máximos.

Fizemos uma avaliação comparativa entre dados da literatura de CBCs com os dados gerados no presente estudo. Inicialmente avaliamos se as variantes somáticas identificadas entre as sete amostras do nosso estudo também estavam registradas no *COSMIC* v91 e no *cBioPortal*. O *COSMIC* é um repositório público que disponibiliza informações sobre mutações somáticas identificadas nos estudos realizados no projeto *Sanger Institute Cancer Genome Project* e também identificadas nos dados importados dos projetos *International Cancer Genome Consortium (ICGC)* e *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*. O *COSMIC* tem em seu repositório dados de estudos que, juntos, avaliaram 735 CBCs. A maioria dos tumores são esporádicos. O repositório público de dados do *cBioPortal* contém informações de um único estudo em CBC, não disponível no *COSMIC* ³³. Os dados depositados no *cBioPortal* correspondem ao sequenciamento do exoma de 126 CBCs pareados tumor/normal (100 esporádicos e 26 de pacientes com síndrome de Gorlin) e sequenciamento de painel de 167 CBCs sendo 40 destes pareados (163 esporádicos e 4 de pacientes com síndrome de Gorlin). Observamos que 24 variantes somáticas foram identificadas em comum (Tabela 9). Pelo banco de dados público de câncer *COSMIC*, nenhuma destas é considerada mutação *driver* devido ao pequeno número de

registros na base de dados, embora as variantes p.Arg248Trp e p.Arg196Ter no *TP53* são alteração recorrentes com 944 e 422 registros, respectivamente.

Na sequência, extraímos dos dados do *COSMIC* e *cBioPortal* a informação da porcentagem de mutações nos 27 genes do nosso estudo que apresentaram variantes somáticas em mais de uma amostra de CBC. Em avaliação comparativa sem aplicar métodos estatísticos, observamos que os genes *drivers* clássicos de CBC listados no nosso grupo de 27 de genes (*PTCH1* e *TP53*) apresentam frequência similar quando comparados os dados de amostras não homogêneas do *COSMIC* e os dados homogêneos do *cBioPortal*, estando entre os genes mais mutados em CBCs esporádicos e não esporádicos. Embora o número de CBCs que avaliamos no nosso estudo seja pequeno para estabelecer quais genes são frequentemente mutados em CBCs de pacientes com síndrome do XP, observamos que o padrão de genes alterados em maior número de CBCs do nosso estudo difere ao incluir *FLG*, *APC*, *DNAH11*, *DPCR1*(*MUCL3*), *PTPN14*, *NOTCH2*, *LATS1*, *BRCA2* antes do *PTCH1* e *TP53* (Figura 10).

Tabela 9 – Variantes somáticas identificadas em comum com os CBCs contendo dados disponíveis no *COSMIC* e *cBioPortal*.

Gene	HGVS c.	HGVS p.	ID do caso_amostra do nosso estudo	Número de casos da literatura com a variante detectada no CBC (característica)	Origem do estudo	Estudo
<i>ANK2</i>	c.4280G>A	p.Arg1427Gln	XPSPAC03F0_XB00032	2	<i>COSMIC</i> e <i>cBioPortal</i>	³² , ³³
<i>ERBB2</i> *	c.590C>T	p.Pro197Leu	XPSPAC32F0_XB00069	1	<i>cBioPortal</i>	³³
<i>FLG</i>	c.5170G>A	p.Gly1724Arg	XPSPAC03F0_XB00039	2	<i>COSMIC</i> e <i>cBioPortal</i>	³² , ³³
<i>KDR</i> *	c.3728C>T	p.Pro1243Leu	XPSPAC32F0_XB00071	1	<i>cBioPortal</i>	³³
<i>LATS1</i> *	c.244C>T	p.Arg82Ter	XPSPAC32F0_XB00071	2 (resistência ao Vismodegib)	<i>COSMIC</i> e <i>cBioPortal</i>	³² , ³³
<i>MYCN</i> *	c.188C>T	p.Pro63Leu	XPSPAC32F0_XB00069	4	<i>cBioPortal</i>	³³
<i>MYH9</i> *	c.1603C>T	p.Pro535Ser	XPSPAC32F0_XB00071	3	<i>cBioPortal</i>	³³
<i>NEBL</i>	c.1996C>T	p.Pro666Ser	XPSPAC03F0_XB00032	1	<i>cBioPortal</i>	³³
<i>NOTCH2</i> *	c.2507C>T	p.Pro836Leu	XPSPAC32F0_XB00072	1	<i>cBioPortal</i>	³³
<i>PTCH1</i> *	c.2048C>T	p.Ser683Phe	XPSPAC03F0_XB00032	1	<i>COSMIC</i>	¹⁴⁴
<i>PTCH1</i> *	c.1993C>T	p.Arg665Cys	XPSPAC03F0_XB00032	5 (1 síndrome de Gorlin e 1 pós terapia para transplante de órgão)	<i>COSMIC</i>	³² , ¹⁴⁵ , ¹⁴⁶ , ¹⁴⁷
<i>PTCH1</i> *	c.2308C>T	p.Arg770Ter	XPSPAC05F0_XB00050	1	<i>COSMIC</i>	¹⁴⁸
<i>PTCH1</i> *	c.1703C>T	p.Pro568Leu	XPSPAC05F0_XB00050	1 (metástase)	<i>COSMIC</i>	¹⁴⁴
<i>RAC1</i> *	c.85C>T	p.Pro29Ser	XPSPAC32F0_XB00071	2 (1 resistência ao Vismodegib)	<i>cBioPortal</i>	³³
<i>SMO</i> *	c.1234C>T	p.Leu412Phe	XPSPAC32F0_XB00069 XPSPAC32F0_XB00071 XPSPAC32F0_XB00072	11 (2 resistência ao Vismodegib)	<i>COSMIC</i> e <i>cBioPortal</i>	³² , ³³

Cont/ Tabela 9

Gene	HGVS c.	HGVS p.	ID do caso_amostra do nosso estudo	Número de casos da literatura com a variante detectada no CBC (característica)	Origem do estudo	Estudo
<i>TMEM132D</i>	c.1541C>T	p.Pro514Leu	XPSPAC03F0_XB00032	1 (resistência ao Vismodegib)	<i>cBioPortal</i>	33
<i>TP53*</i>	c.632C>T	p.Thr211Ile	XPSPAC03F0_XB00032	3 (1 HPV positivo)	<i>COSMIC</i>	149, 150, 151
<i>TP53*</i>	c.742C>T	p.Arg248Trp	XPSPAC03F0_XB00039	12 (sensível à inibição pelo Vismodegib)	<i>COSMIC</i> e <i>cBioPortal</i>	152, 151, 29, 153, 154, 33
<i>TP53*</i>	c.586C>T	p.Arg196Ter	XPSPAC03F0_XB00039	17 (1 resistência ao Vismodegib)	<i>COSMIC</i> e <i>cBioPortal</i>	103, 31, 155, 32, 33
<i>TP53*</i>	c.380C>T	p.Ser127Phe	XPSPAC05F0_XB00050	5 (2 resistência ao Vismodegib)	<i>COSMIC</i> e <i>cBioPortal</i>	151, 33
<i>TTN</i>	c.34252C>T	p.Leu11418Phe	XPSPAC03F0_XB00032	1	<i>COSMIC</i>	32
<i>TTN</i>	c.6023G>A	p.Gly2008Asp	XPSPAC03F0_XB00032	1	<i>cBioPortal</i>	33
<i>TTN</i>	c.76865G>A	p.Trp25622Ter	XPSPAC32F0_XB00071	1	<i>cBioPortal</i>	33
<i>TTN</i>	c.41260G>A	p.Gly13754Ser	XPSPAC32F0_XB00072	1	<i>cBioPortal</i>	33

Legenda: (*) Gene incluído na lista do *COSMIC Cancer Gene Census* (CGC) - que cataloga genes que contêm mutações com implicação causal na tumorigênese, mutações *drivers*.

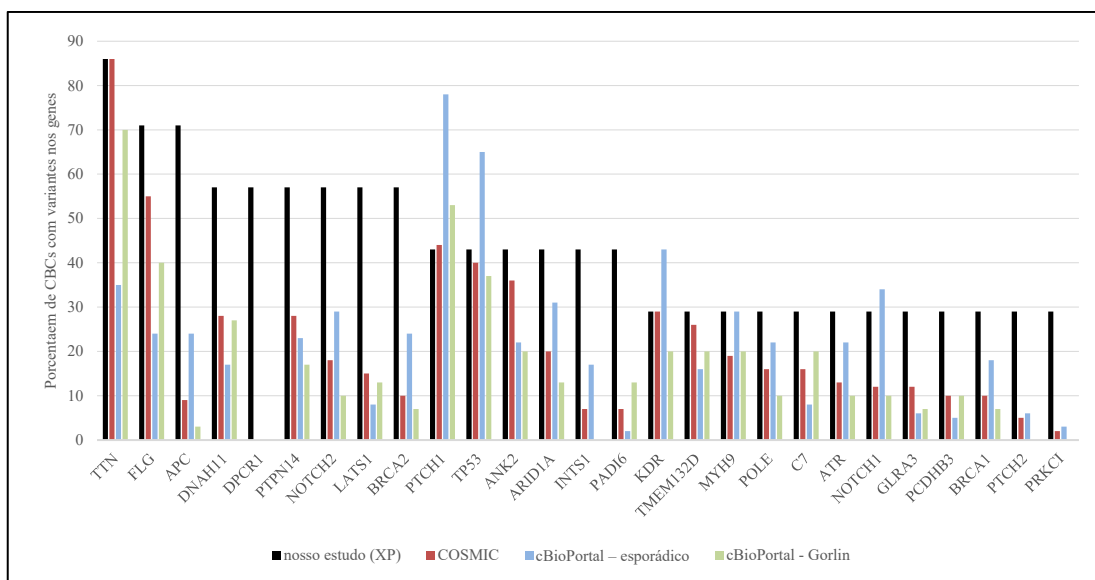


Figura 10 – Genes em comum com os CBCs depositados no *COSMIC* e *cBioPortal*.

A porcentagem de CBC que apresentam variantes nos genes relacionados é mostrada de forma agrupada para comparação dos valores entre amostras do nosso estudo em pacientes com síndrome do XP, amostras dos estudos depositados no *COSMIC* e amostras do estudo depositado no *cBioPortal* (tumores esporádicos e tumores de pacientes com síndrome de Gorlin). Dados ausentes no *cBioPortal* foram recuperados da publicação do estudo de Bonilla et al. ³³.

Embora nosso estudo tenha casuística pequena para avaliar o poder estatístico de associações, notamos que o CBC com maior carga mutacional (XB00032) e o tumor que apresentou as duas variantes somáticas com maior frequência alélica nos genes *FLG* e *PTPN14* (XB00039) foram diagnosticados na paciente que menos fez uso de medidas fotoprotetoras, desenvolveu grande número de tumores cutâneos e tumor em conjuntiva ocular (XPSPAC03F0) (Tabela 4). O CBC XB00064 que não apresentou variantes no painel de genes avaliado foi da paciente XP-C com fenótipo menos agressivo da síndrome, que desenvolveu o menor número de tumores entre os seis pacientes do estudo (XPSPAC10F1). Vale ressaltar que, antes de aplicar critérios mais restritivos para seleção de variantes, o CBC XB00064 apresentou variantes somáticas *missense* em frequência alélica de 5% nos genes *ATR* (p.Ser1660Leu), *PTCH1* (p.Leu1397Phe) e *TTN* (p.Arg31255Lys e p.Arg18933Lys).

Em relação ao tumor gástrico, as duas variantes somáticas identificadas ocorreram nos genes *RBI* (variante *nonsense* p.Glu675Ter) e *GLI3* (variante *missense* p.Leu1258Ile) (Apêndice 8). Apenas a variante identificada no gene *RBI* está registrada no *COSMIC* porém sem relação com tumor gástrico. Na inspeção visual utilizando o IGV confirmamos que as sequências do tecido armazenado em parafina dessa mesma peça tumoral não apresentaram as variantes identificadas no tecido congelado a fresco.

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, foram avaliados seis pacientes portadores de variantes germinativas clinicamente relevantes nos genes *XPC* ou *POLH/XPV*. Foram investigados 114 genes por sequenciamento de alto desempenho explorando variantes germinativas e somáticas, avaliando oito carcinomas basocelulares cutâneos e dois fragmentos de um tumor gástrico.

Buscando explorar a co-ocorrência de variantes germinativas que predispuessem ao maior risco para tumores de pele e outros fenótipos associados a síndrome do XP, avaliamos os seis pacientes incluídos no estudo. Variantes germinativas patogênicas ou provavelmente patogênicas não foram identificadas nos genes avaliados. Identificamos em 5/6 pacientes variantes de significado incerto (VUS) ocorrendo nos genes *DNAH11*, *PCDHB3*, *RGS22*, *SLC27A5*, *TTN* e *UGT2B10*, com informação limitada, ou sem informação, sobre sua associação com câncer de pele e com pouca informação disponíveis em bancos de dados. A perda de heterozigose do alelo selvagem no tumor é o mecanismo mais comum para inativação bialélica em genes supressores tumorais e sua identificação pode, portanto, auxiliar na classificação de VUS ^{156,157}. Todas as VUS que identificamos foram avaliadas quanto a perda de heterozigose do alelo selvagem no tumor, e esse evento não foi observado para nenhuma VUS.

Variantes germinativas em *DNAH11* são encontradas em pacientes com síndrome de Kartagener, caracterizada por *situs inversus* e imotilidade ciliar, também chamada de discinesia ciliar primária. O gene *DNAH11* codifica a dineína ciliar, geradora da força mecânica no movimento ciliar. Perda ou modificação da estrutura da dineína clinicamente reduz o *clearance* do muco nas vias aéreas e seios sinusais e reduz a motilidade espermática ^{158,159}. Como membro de complexos de proteínas motoras associadas a microtúbulos, a dineína desempenha um papel indispensável na ativação da MAPK quinase 3/6 e p38 regulando processos como sobrevivência celular, diferenciação e migração celular, bem resposta inflamatória e resposta imunológica ¹⁶⁰. Um estudo caso controle que avaliou pacientes com câncer de mama negativas para variantes germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* identificou um caso entre 54 avaliados apresentando variantes germinativas, classificadas como potencialmente deletérias, ocorrendo nos genes *DNAH11* (deleção *frameshift*) e *TTC8* (variante *nonsense*) ¹⁶¹.

Para os genes *PCDHB3*, *RGS22*, *SLC27A5* e *UGT2B10* poucas variantes germinativas do tipo SNV e *indel* foram descritas, sendo elas VUS, benignas ou provavelmente benignas de

acordo com os bancos de dados *ClinVar* e *Varsome*. O gene *PCDHB3* codifica uma proteína de adesão célula-célula dependente de cálcio. O gene *RGS22* codifica uma proteína reguladora negativa da via de sinalização GTPase. O gene *SLC27A5* participa da síntese de Acetil-CoA envolvido no metabolismo da bile. O gene *UGT2B10* codifica uma uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase importante no processo de glicuronidação do metabolismo de fase II e eliminação de xenobióticos tóxicos e compostos endógenos. Com exceção ao gene *RGS22* que confere aumento no risco para CBC ¹⁶², nenhum dos demais genes foram descritos previamente como associados à predisposição ao câncer ou modificadores de risco.

Variantes germinativas patogênicas no gene *TTN*, com diferentes padrões de herança e ocorrendo em domínios diversos da proteína, são identificadas em doenças cardíacas (cardiomiopatia dilatada) e musculares esqueléticas. Variantes germinativas patogênicas em *TTN* são também identificadas em praticamente todos os indivíduos das populações controle dos estudos, colocando em questionamento sua relevância na correlação com o fenótipo ¹⁶³.

Vale ressaltar que, embora a intensão primária do estudo era avaliar a co-ocorrência de variantes germinativas, esse objetivo foi comprometido devido alteração na metodologia do estudo. O sequenciamento de exoma apresenta cobertura média de 120x a 150x ¹⁶⁴, um valor baixo para identificar variantes somáticas em amostras armazenadas em parafina e com massa de DNA insuficiente para validações. Desta forma, optamos pelo sequenciamento de painel gênico, uma metodologia que confere maior cobertura, priorizando a busca de variantes em genes relevantes para o desenvolvimento e progressão do carcinoma basocelular ou genes frequentemente mutados nesse tumor. Consequentemente, diminui-se o número de genes com maior relevância clínica para investigação germinativa.

Entre os genes do painel com maior interesse para investigação germinativa estavam os genes *BLM* (associado a Síndrome de Bloom), *MLH1* (associado a Síndrome de Lynch e de Muir-Torre), *PTCH1*, *PTCH2* e *SUFU* (associados a Síndrome de Gorlin), *BRCA1* (associado a Anemia de Fanconi), *TYR* (associado ao Albinismo Oculocutâneo) e *CDKN2A* (associado ao Melanoma Familiar). Os genes listados apresentam penetrância variável, porém são fortemente associados com os fenótipos específicos, para os quais estávamos interessados em avaliar co-heranças que justificassem maior predisposição ao desenvolvimento de tumores de pele. No entanto, neste estudo detectamos apenas variantes provavelmente benignas em dois destes genes, *PTCH1* e *PTCH2* (Apêndice 5).

Também estavam inclusos genes que se destacaram por apresentar SNPs associados com o aumento no risco para desenvolver câncer de pele melanoma e não melanoma em estudos de GWAS. Nesse sentido, foram considerados os genes *CLPTMIL*, *CASP8*, *HERC2*, *PADI6*,

RGS22, *TGM3*, e *TYR* ^{165–168}. Genes que codificam proteínas sensoras ou efetoras em processos de reparo do DNA, tais como *BRCA2*, *PMS2*, *POLE*, *RPA1* e *TP53*, também estavam incluídos na lista de genes de maior interesse para avaliação germinativa.

No nosso estudo, foi identificada uma variante germinativa no gene *CLPTMIL* (rs376590693) classificada como provavelmente benigna pelos critérios de classificação de patogenicidade estabelecidos. O gene *CLPTMIL* codifica a proteína *cleft lip and palate transmembrane protein 1-like* e pouco se sabe sobre sua função, porém foi observada associação com apoptose induzida pela cisplatina ¹⁶⁹. A associação dessa variante com risco para desenvolvimento de tumor não foi relatada na literatura e nem no *GWAS Catalog*. Os critérios da *ACMG* não foram elaborados para classificar variantes de baixa penetrância e variantes em genes sem clara definição de correlação com o fenótipo ¹³⁴. Sendo assim, não devemos desconsiderar possível papel modificador de risco de variantes provavelmente benignas ou benignas (Apêndices 6 e 7) identificadas nos genes do nosso painel de maior interesse para investigação germinativa.

Variantes germinativas em genes que codificam proteínas que apresentam papel central na regulação da pigmentação, tais como receptor da melanocortina-1 (MC1R), proteína sinalizadora agouti (ASIP), tirosinase (TYR) e tirosinase relacionada à proteína (TYRP1), conferem risco maior para câncer de pele, incluindo tumores pigmentados e não pigmentados e possivelmente interagem com variantes em outros genes ¹⁷⁰. Variantes somáticas no gene *CASP8* que potencialmente inibem a apoptose são observadas em CBCs ^{33,171} e a inativação da caspase-8 em queratinócitos basais da epiderme ativa inflamação cutânea crônica e hiperproliferação em camundongos ¹⁷².

Duas pacientes XP-C com fenótipos distintos, principalmente no que se refere ao número de tumores desenvolvido ajustado pelo tempo de seguimento, apresentaram genótipos em SNPs associados com aumento no risco para CBC que sugerem uma possível explicação para heterogeneidade clínica. O SNP rs3769823[A] no gene *CASP8* ¹⁷³ não foi identificado apenas na paciente XPSPAC10F1 que desenvolveu o menor número de tumores CBC entre os pacientes avaliados. Por outro lado, o SNP rs1126809[A] no gene *TYR* ^{167,174}, foi observado apenas na paciente XPSPAC05F0, que apresentou o maior número de CBC entre os casos avaliados (Tabela 4). Os estudos que identificaram a associação de risco destes SNPs avaliaram populações com ancestralidade europeia. A frequência populacional do SNP *TYR* rs1126809[A] no banco de dados ABraOM (banco do projeto Arquivo Brasileiro Online de Mutações) é de 14,6%. De acordo com a base de dados *dbSNP Short Genetic Variations* foram descritos 4 alelos para na posição genômica referente ao SNP *CASP8* rs3769823. No banco de dados

ABraOM está reportado apenas o alelo variante [G] (frequência = 63%), detectado na maioria dos pacientes do estudo (5/6), não sendo, portanto, possível determinar a frequência populacional do alelo de risco, o alelo selvagem [A]. No entanto, ao avaliar os dados de frequência populacional do gnomAD - Genomes observa-se que a frequência do alelo de risco [A] (frequência = 33,7%) é menor do que a observada para o alelo [G] (frequência = 66,2 %).

Embora nossos dados não forneçam parâmetros suficientes para avaliar o importante papel da exposição e fotoproteção modulando a gravidade na expressão do fenótipo, essa associação é amplamente reconhecida na síndrome do XP.

Nosso estudo avaliou o perfil de mutações somáticas de oito CBCs desenvolvidos pelos pacientes XP. Todos os tumores selecionados para o estudo são provenientes de biópsias, sendo o tecido fixado em formalina e armazenado em parafina. A formalina é um fixador de tecidos, o mais amplamente utilizado na prática histológica devido sua excelente capacidade de preservar tecidos e seus componentes, fácil manuseio, menor toxicidade e compatibilidade com colorações diversas ¹³⁸. Fixações em formalina acima de uma semana induzem ligações cruzadas entre ácidos nucleicos, proteínas e outros componentes teciduais, o que resulta no bloqueio da amplificação do DNA por reação de PCR ^{175,176}. A diminuição do pH da formalina ao longo do tempo aumenta a taxa de formação de sítios apurínicos ou apirimidínicos e, eventualmente, decomposição e degradação, podendo resultar em DNA fragmentado e baixo rendimento em reação de amplificação por PCR ¹³⁹. A formalina também interage com os ácidos nucleicos ao romper ligações de hidrogênio entre as bases adenina e timina, favorecendo o processo de desnaturação e criando sítios para outras interações químicas ¹³⁸. Quando comparado ao DNA de tecidos congelados a fresco, os tecidos fixados em formalina exibem alta quantidade de trocas C:G>T:A não reproduzíveis, geradas após reação de amplificação por PCR em sítios onde a citosina deu origem a uracila (ou a timina, para citosina metilada) por processo de deaminação hidrolítica induzido pela formalina. Foi demonstrado que essas trocas já são observadas após o terceiro dia de fixação ^{137,177}.

A identificação de variantes somáticas por sequenciamento NGS em amostras originadas de tecido que foi fixado em formalina e armazenado em parafina é crucial na rotina clínica para avaliar o perfil tumoral e selecionar terapias alvos para genes *drivers* ¹⁷⁸ sendo, portanto, essencial garantir que variantes falso positivas sejam excluídas nas análises. Nesse sentido, buscando eliminar variantes somáticas artefatuais estabelecidas pela deaminação de citosinas não metiladas, estudos recentes têm avaliado o pré-tratamento do DNA com a enzima uracil-DNA glicosilase (UDG/UNG) comercial, antes da etapa de amplificação do DNA ^{140,179}. Fisiologicamente a UDG atua na via celular de reparo por excisão de bases (BER) reconhecendo

as uracilas originadas da deaminação de citosinas não metiladas e criando sítios abásicos que serão processados pelas demais enzimas da via ¹⁸⁰. *In vitro*, o tratamento com UDG remove as citosinas deaminadas, impedindo que estas gerem trocas artefatuais C:G>T:A. Estes estudos, além de demonstrarem uma eficiente redução de variantes artefatuais pós tratamento com UDG, mostram que variantes somáticas artefatuais ocorrem geralmente em frequências alélicas baixas, menor que 10% ^{140,179}.

Embora no nosso estudo as amostras de tumor armazenado em parafina não tenham passado pela etapa de pré-tratamento com UDG, nossos dados sugerem que variantes artefatuais, geradas pelo processo de fixação em formalina, foram excluídas pela aplicação do critério restritivo de seleção por frequência alélica e cobertura. Quando comparando dois tecidos de um mesmo tumor gástrico, um congelado a fresco e outro armazenado em parafina, foi observado que as variantes identificadas pelo algoritmo *Mutect* apresentaram valor de razão Ti/Tv (trocas de bases transição/transversão) de 7 na amostra de parafina e 0,4 na amostra de tecido fresco (dado não mostrado). Para as amostras de CBCs foi observado valor médio de razão Ti/Tv de 29,9. Após aplicar os critérios de seleção de variantes por cobertura e frequência, e considerando variantes identificadas pelos dois algoritmos utilizados no estudo, observamos que a amostra de tecido de tumor gástrico em parafina teve todas as variantes excluídas, enquanto a amostra congelada apresentou valor semelhante de razão de Ti/Tv (0,3). Para as amostras de CBCs foi observado valor médio de razão Ti/Tv de 44,6.

No estudo de Berra et al. ¹⁷⁹ o tratamento com enzima UDG comercial de amostras de melanoma cutâneo, câncer de pulmão e câncer colorretal, armazenadas em parafina, mostrou uma redução maior na razão Ti/Tv (em média de 75,5%), no entanto, nosso estudo avalia tumores de pacientes síndrômicos cujo mecanismo de reparo falho resulta no aumento de alterações do tipo transição. A razão de Ti/Tv é maior em regiões codificantes. Para sequenciamento total do exoma é esperado valor de 2,766 enquanto que para o sequenciamento total do genoma a razão encontrada tem valores entre 2,0 e 2,1 ¹⁸¹. O estudo de Freudenberg-Hua et al. ¹⁸² que avaliou a razão de Ti/Tv ponderando diferentes categorias funcionais, considera como normalidade razão de Ti/Tv entre 1,82 e 3,02 quando considerado região codificante e não codificante, variantes sinônimas e não sinônimas.

O perfil genômico dos CBCs avaliados no nosso estudo mostra três genes não *drivers* mutados em maior número de tumores (*APC*, *FLG* e *TTN*). Sobre tudo, ao avaliar um painel gênico customizado e que incluiu 11 genes que atuam na via *SHH* (*GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *GSK3B*, *PRKACG*, *PTCH1*, *PTCH2*, *SHH*, *SMO*, *STK36* e *SUFU*), nossos resultados mostram que no grupo de tumores avaliados, CBCs de pacientes XP pouco explorados na literatura, os dados se

assemelham ao apontar o papel central da via *Sonic Hedgehog* observada em trabalhos que avaliam CBCs esporádicos e de pacientes com síndrome de Gorlin ^{29,32}. Dos oito tumores avaliados no nosso estudo, apenas um (CBC_XB00048) não apresentou variante somática *missense* ou de perda de função em genes desta via. Entre os genes da via *Sonic Hedgehog* o *PTCH1* foi o que apresentou variantes somáticas em maior número de amostras (4/8 CBCs), corroborando com os dados que mostram sua alta frequência em CBCs esporádicos (57-75%) ^{29,32,33,122}.

A variante somática *missense* p.Leu412Phe no *SMO* foi detectada em três CBCs desenvolvidos pelo paciente XPSPAC32F0. Por ter sido detectada nos três tumores sincrônicos, a variante provavelmente apresenta papel *driver* nestes tumores, embora possivelmente os três tumores não sejam clonais. Mutações no gene *SMO* são encontradas em cerca de 20% dos tumores esporádicos ³³. A variante p.Leu412Phe no *SMO* possui 54 registros no *COSMIC* e, no estudo de Sharpe et al. ³², foi identificada em uma amostra de CBC primário e recidivado após tratamento com inibidor da via *Sonic Hedgehog* (Vismodegib). Por esse motivo os autores sugerem que o *SMO* tem papel *driver* naquele tumor e, sobretudo, atribuí ao gene a reativação da via de *Sonic Hedgehog* e, consequentemente, resistência do tumor ao tratamento com Vismodegib.

Em CBC resistentes a Vismodegib é observado mutações em *SMO* em maior a frequência ¹²², pelo menos 2,2 vezes maior quando comparada ao tumores não tratados ³³. Essa associação é reforçada pela observação de que CBCs de pacientes com síndrome de Gorlin, com variantes germinativas no gene *PTCH1*, geralmente não apresentam mutações somáticas em *SMO* e são mais responsivos ao tratamento com inibidores de SMO ^{33,122,183}. Nossos dados indicam que a ativação da via *Sonic Hedgehog* nos CBCs de pacientes XP, também preferencialmente não ocorre por ativação de SMO. A avaliação de maior número de CBCs confirmando essa observação, pode sugerir que terapia com inibidores de SMO podem ser efetiva para uma parcela considerável de tumores que um paciente XP desenvolver. Pelo menos dois estudo já mostraram a efetividade do uso de Vismodegib no tratamento de CBCs em pacientes XP ^{96,184}.

Um dos três CBCs desenvolvidos pela paciente XPSPAC32F0, o CBC_XB00071, também apresentou a variante *nonsense* p.Arg82Ter no gene supressor tumoral *LATS1*. No comparativo com os outros dois CBCs da paciente, o CBC_XB00071 apresentou carga mutacional maior (Tabela 7) e 100% das variantes típicas de alterações fotoinduzidas (C:G>T:A) (Figura 8). No estudo de Sharpe et al. ³² essa variante foi detectada no CBC recidivado, o que reforça sua relevância no processo carcinogênico.

Mutações em *LATS1* são encontradas em até 16% dos CBCs ³³. *LATS1* é uma proteína quinase supressora tumoral que atua na via de sinalização *Hippo*, uma cascata de fosforilações que resulta na inativação de YAP, por LATS1/2 inibindo sua atividade como fator de transcrição, sendo mantido no citoplasma. A translocação de LATS1/2 do núcleo para o citoplasma, onde desempenham seu papel efetor na via *Hippo*, é realizada por PTPN14 ². Mutações de perda de função no gene *PTPN14* estão associadas com localização nuclear de *YAP1*, sugerindo que *PTPN14* possa ser um novo gene supressor tumoral em CBC. Mutações *PTPN14* são encontradas em 23% dos CBCs, indicando a importância da ativação da via *Hippo-YAP* na carcinogênese do CBC ³³.

No nosso estudo, identificamos mutações de perda de função no gene *PTPN14* ocorrendo em três CBCs, CBC_XB00039, CBC_XB00050 e o CBC_XB00069. A variante identificada no CBC_XB00039 apresentou frequência alélica de 82%, sugerindo ainda mais seu papel como *driver* nesse tumor por conferir vantagem seletiva ¹⁸⁵. O CBC_XB00048 foi o único CBC do estudo que não apresentou variantes somáticas em genes da via *Sonic Hedgehog*, porém apresentou duas variantes de perda de função no *LATS1*, sugerindo então o papel *driver* da via *Hippo-YAP* também nesse tumor.

O CBC_XB00048 também se diferenciou dos demais CBCs por apresentar 45% das variantes somáticas não representadas por mutações tipicamente fotoinduzidas (C:G>T:A e G:C>T:A no contexto de YC ou CY). Os estudos em tumores de pele são unânimes em apontar que o perfil de mutações predominante é de transição C>T, sugerindo papel importante da mutagênese induzida pela radiação ultravioleta. Este perfil é observado tanto nos CBCs esporádicos quanto nos CBCs de pacientes com síndrome de Gorlin ³².

Um estudo recente que avaliou o sequenciamento do exoma explorando o perfil de mutações que são induzidas por radiação UVA em linhagem de fibroblasto de pacientes XP-V (XP30RO, homozigota para mutação p.Ala35fs no gene *POLH*) mostrou aumento expressivo de transições C>T, principalmente ocorrendo em potenciais dímeros de pirimidinas, e destacou a similaridade da assinatura mutacional com a identificada em câncer de pele baseado nos dados do *COSMIC*. Foi também observado nível alto de transições C>T e transversões C>A na linhagem de fibroblasto de pacientes XP-V não irradiada com UVA ⁴⁷, perfil este semelhante ao que encontramos no tumor.

O CBC_XB00048 foi diagnosticado no paciente XPSPAC04F0, único caso do estudo com uma única cópia alterada de gene XP (*POLH*) em tecido constitutivo. O perfil germinativo desse paciente precisa ser melhor explorado para identificar eventos menos comuns que possam elucidar o mecanismo de inativação do outro alelo do gene *POLH*, como variantes intrônicas

profundas que afetam *splicing* ou variantes em região promotora, bem como outros eventos biológicos de inativação gênica como epimutação constitucional (metilação do promotor).

O gene *TP53*, um dos primeiros genes caracterizados quanto ao perfil predominante de transições C>T em tumores cutâneos, também considerado gene *driver* no CBC, apresentou variantes somáticas em 3/8 CBCs avaliados no nosso estudo. Mutação no *TP53* são encontradas entre 28 - 66 % dos CBCs esporádicos e 24% dos CBCs de pacientes com síndrome de Gorlin^{29,32,33,122}. Embora pouco explorado, foi demonstrado que linhagem celular de câncer de pele (BCC/KMC1) com mutações no gene *TP53* são mais resistentes à atividade efetora do Imiquimod em induzir a produção de espécies reativas de oxigênio para estimular a via ATM/ATR e contribuir com a ativação do processo de apoptose dependente de p53¹⁸⁶.

Com base nos dados inicialmente observados em tumores de pulmão não pequenas células e melanoma, muitos estudos tem mostrado evidências concretas de que qualquer tumor com alta carga mutacional responde melhor a imunoterapia e acredita-se que essa associação está relacionado com níveis maiores de neoantígenos e melhor indução de resposta imune tumoral^{187,188}. A carga mutacional varia entre os diferentes tumores conforme demonstrado pelo estudo que avaliou 167 tipos de câncer, mostrando variação entre 0,8 mutações/Mb (síndrome mielodisplásica) a 45,2 mutações/Mb (carcinoma espinocelular de pele)¹²³. Valores maiores costumam ser encontrados em tumores relacionados à exposição a carcinógenos (radiação UV e tabaco, por exemplo)¹⁸⁹. Mesmo entre amostras de um mesmo tipo de tumor, algumas se destacam com carga mutacional maior¹²³.

No nosso estudo, observamos que, ao ajustar o cálculo para descartar possíveis variantes artefatuais, o tumor gástrico difuso apresentou carga mutacional de 4,8 mutações/Mb. Um estudo recente avaliou 63 pacientes com câncer gástrico avançado por sequenciamento de painel contendo 161 genes relevantes para tumores sólidos, painel comercialmente conhecido como *Oncomine Comprehensive* (Thermo Fisher Scientific) e que interroga 409 genes relacionados ao câncer para calcular a carga mutacional considerando mutações SNVs sinônimas e não-sinônimas. Embora houvesse representação de tumores do subtipo com células em anel de sinete, estes não foram classificados entre não diferenciado ou subtipo difuso. Os autores identificaram que os valores de carga mutacional variaram entre 0 e 446 mutações/Mb, com média de 4,23 mutações/Mb. O valor de corte considerado para alta carga mutacional foi 14,31 mutações/Mb e alta carga mutacional mostrou associação significativa com maior taxa de resposta e maior sobrevida livre de progressão após imunoterapia com bloqueadores de *checkpoints*¹⁹⁰.

O estudo que avaliou o sequenciamento completo do exoma de 12 CBCs esporádicos contendo >80% de células tumoral (cobertura média de 65x), identificou 75,8 mutações/Mb de DNA codificante ²⁹. Atwood et al. ¹²² ao avaliar 14 CBC esporádicos de tecido fresco por sequenciamento completo do exoma (cobertura média de 114x), identificaram carga mutacional média de 42 mutações/Mb, variando entre 5 - 107 mutações/Mb. O estudo de Sharpe et al. ³² avaliou 27 CBC esporádicos por sequenciamento completo do exoma (cobertura média de 67x) e identificou carga mutacional média de 50,5 mutações/Mb, variando entre 2,4 - 162,2 mutações/Mb. CBCs de pacientes com síndrome de Gorlin apresentam carga mutacional menor quando comparado aos tumores esporádicos, com média variando entre 21 e 33,5 mutações/Mb ^{32,33}. No nosso estudo observamos que os CBC de pacientes com síndrome de XP apresentam carga mutacional média de 75,4 mutações/Mb, variando de 0 a 294,5 mutações/Mb (Tabela 7). Pacientes XP acumulam maior número de mutações devido deficiência no mecanismo de reparo de lesões induzidas no DNA, incluindo lesões induzidas por radiação UV. Por essa razão, seria esperado valor médio maior de carga mutacional quando comparado aos CBCs esporádicos.

Os tumores de pele CBC estão entre os tumores com carga mutacional mais elevada ^{29,32,122}, inclusive quando comparado a carcinomas espinocelulares de pele e melanoma cutâneo ¹²³. É discutível o quanto a alta carga mutacional do CBC reflete o comportamento biológicos do tumor, que apresenta crescimento lento e raramente sofre metástase ²⁹. De forma geral, é também discutido que variações nos valores de carga mutacional podem ser consequência de questões metodológicas atribuídas ao cálculo, tais como cobertura de sequenciamento, alinhamento do genoma ou o algoritmo e critérios usados para selecionar variantes. Sabidamente, o cálculo da carga mutacional é influenciado pelo tamanho da região do genoma em investigação (sequenciamento de exoma ou painel gênico) e, consequentemente, profundidade de sequenciamento. Não existe uma padronização sobre qual o melhor método para determinar a carga mutacional. Na pesquisa, o método mais comum é o exoma, no entanto, na prática clínica, os painéis contendo poucos genes (300-500) são os escolhidos ¹⁹¹.

Um estudo recente que investigou a carga mutacional considerando mutações não sinônimas do tipo SNVs e pequenas indels em regiões codificantes no sequenciamento de exoma de tumores depositados na base de dados do TCGA, propôs o uso de painel contendo 524 genes representativos para 15 tipos de tumores e que mostrou correlação com resultados gerados por sequenciamento de exoma ¹⁶⁴. Os valores de corte para identificar tumores com maior probabilidade de resposta ao tratamento não são consistentes entre os diferentes estudos e, de fato, devem ser flexíveis levando em consideração o tipo do tumor, o tamanho da região avaliada, a consideração ou não de mutações sinônima e quais genes são considerados na

avaliação, uma vez que mutações *hotspot* e genes frequentemente mutados podem influenciar nos resultados ^{164,190}.

O painel utilizado no nosso estudo abrange 29 dos 524 genes do estudo de Xu et al. ¹⁶⁴, incluindo o gene titin (*TTN*). Um estudo recente que avaliou a representatividade da carga mutacional quando comparada dados de sequenciamento do exoma (10.224 amostras do *TCGA* para 33 tipos de tumores) com dados de sequenciamento NGS de gene alvo, o *TTN* (24 amostras de câncer colorretal), mostrou correlação alta em tumores reconhecidamente hipermutados (>10 mutações por Mb) tais como melanoma cutâneo, câncer colorretal, carcinoma de endométrio, adenocarcinoma de pulmão e carcinoma urotelial de bexiga ¹⁹².

O *TTN* é encontrado frequentemente mutado em vários tipos de tumores, conforme observado nos dados do *COSMIC*. No nosso estudo foi o gene que apresentou maior número de variantes somáticas, especialmente alterações tipicamente fotoinduzidas (C:G>T:A), ocorrendo em maior número de CBC, 6/8 tumores quando considerado critérios restritivos de seleção por frequência alélica e cobertura de sequenciamento. Também foi o gene que apresentou o maior número de variantes germinativas entre os casos avaliados (3/6 casos). Este gene codifica uma proteína grande (>30.000 aminoácidos) e, por esse motivo, apresenta maior risco de acumular mutações causadas por erros randômicos no reparo do DNA. Foi demonstrado que a alta frequência de mutações é também atribuída ao baixo nível de expressão e tempo de replicação mais longo durante o ciclo celular. Portanto, suspeita-se que a maioria das mutações nesse gene sejam neutras (*passengers*), categorizando assim o gene *TTN* como um gene neutro, não associado ao câncer ¹⁹³.

Considerando o papel relevante do gene *TTN* em avaliar a carga mutacional de amostras de câncer de pele, ressaltamos a diferença observada em duas amostras de CBC de uma mesma paciente do nosso estudo, a paciente XPSPAC03F0, que menos fez uso de medidas fotoprotetoras. O tumor que apresentou 294,5 mutações/Mb (maior carga mutacional entre os CBCs avaliados no estudo), teve o maior número de variantes somáticas não sinônimas em região codificante do gene *TTN* (n= 29; amostra XB00032). Por outro lado, o tumor que acumulou 45,5 mutações/Mb foi o único CBC avaliado no estudo que não apresentou variantes em *TTN* (amostra XB00039). Estes CBCs, ambos desenvolvidos na região da face, são de subtipos histológicos diferentes; curiosamente o CBC com menor carga mutacional é do subtipo mais agressivo (micronodular) (Tabela 2). Também curiosamente, o CBC com menor carga mutacional foi desenvolvido após um longo período de 21 meses sem avaliação dermatológica (Tabela 4).

De forma geral, observamos grande variação no perfil de genes contendo variantes somáticas. Diferenças no número de mutações em tumores de pele (subtipo não especificado) também foi observado no estudo de Tan et al.¹⁹³ que avaliou o perfil de mutações *missenses* dos dados do *COSMIC* v68. Foi observado que cerca de 25% dos tumores apresentaram mais de 125 mutações *missenses* enquanto outros 25% tiveram apenas duas mutações no máximo. Os autores sugerem que diferenças podem ser devido a diferentes subtipos de tumores de pele e concluem que a razão para essa diferença ainda precisa ser elucidada. O trabalho de Tate et al.¹⁹⁴ mostrou que uma mutação de perda de função bialélica no gene *LATS1* foi detectada em CBC infiltrativo de um paciente com síndrome de Gorlin, porém não foi detectada no CBC superficial do mesmo paciente. Tumores de regiões de exposição crônica ao sol (face, couro cabeludo, antebraço e parte superior do tórax) aparentemente apresentam maior número de variantes em comparação com tumores de regiões de exposição intermediária (não especificadas). Sobretudo, para tumores desenvolvidos em regiões de exposição intermediária, é observada tendência no aumento do número de variantes relacionado ao aumento na idade do paciente²⁹.

Depois do gene *TTN*, o segundo gene identificado com maior número de variantes somáticas no nosso estudo, ocorrendo em mais da metade dos CBC avaliados, foi o *FLG* que codifica a proteína filagrina, essencial para manter a hidratação cutânea. Sua deficiência pode comprometer a adesão celular e a maturação dos queratinócitos. Quando detectada em tecido constitutivo em homozigose, mutações no *FLG* representam fator de risco aumentado para dermatite atópica e ictiose vulgar podendo, nesse grupo, também aumentar a suscetibilidade em desenvolver ceratose actínica^{195,196}. A associação do gene *FLG* com tumores cutâneos é pouco explorada. Um estudo caso controle mostrou não existir associação entre mutações de perda de função no gene *FLG* e o desenvolvimento de melanoma cutâneo¹⁹⁷. Sua regulação positiva foi encontrada no estudo que avaliou o perfil de expressão gênica de dois CBCs¹⁹⁸.

O estudo de Moreno et al.⁴⁷ mostrou a contribuição importante de transversões C>A, potencialmente originadas de bases oxidadas, no DNA de linhagem de paciente XP-V não irradiada com UVA. Este dado reforça a hipótese amplamente discutida na literatura de que a mutagênese basal causada por estresse oxidativo, pode estar associada com a ocorrência de tumores internos. Devido ao número pequeno de variantes identificadas no tumor gástrico avaliado no nosso estudo, a avaliação do perfil de mutações não pôde ser realizada.

Sabidamente, nosso painel não prioriza genes com alta frequência mutacional em tumores gástricos, incluindo genes que definem o subtipo difuso de pior prognóstico (genes *CDH1* e *RHOA*), desenvolvido pelo paciente do nosso estudo. Neste sentido, apenas estão

inclusos no nosso painel os genes *APC*, *ARID1A*, *CSMD3*, *CTNNB1*, *FLG*, *PIK3CA* e *TP53*^{164,199–202}. Não foram identificadas variantes somáticas ou germinativas em nenhum dos oito genes. Possivelmente, essa baixa representativa de genes *drivers* para câncer gástrico, contribuiu com a ausência da identificação de variantes somáticas em genes relevantes. Variantes foram identificadas no gene *RBI* e *GLI3*. O *RBI* codifica uma proteína associada a cromatina e que, entre várias funções celulares, destaca-se seu papel em controlar a transcrição de genes envolvidos no ciclo celular, atuando como regulador negativo do ciclo celular, bem como seu papel de inibir replicação do DNA²⁰³. O *GLI3* atua como fator de transcrição, com papel importante na via *Sonic Hedgehog*, controlando o desenvolvimento do tecido, imunidade e em diferentes processos tumorigênicos, entre eles crescimento independente de ancoragem, angiogênese, proliferação e migração²⁰⁴. As duas variantes identificadas nesses dois genes foram detectadas em frequência alélica baixa (0.05) na amostra do tumor congelada a fresco, porém não foram detectadas na segunda amostra do mesmo tumor armazenada em parafina, possivelmente devido heterogeneidade tumoral ou contaminação com amostra normal.

6 CONCLUSÃO

A caracterização molecular dos pacientes com síndrome do Xeroderma Pigmentoso fornece informações relevantes para compreender variações na expressividade do fenótipo. Nesse estudo, variantes germinativas patogênicas ou provavelmente patogênicas não foram detectadas nos genes avaliados. Variantes de significado incerto foram observadas em genes não associados a síndromes de predisposição ao câncer. No entanto, identificamos uma sugestiva associação de dois SNPs modificadores de risco para carcinoma basocelular cutâneo modulando a apresentação clínica de duas pacientes XP-C, em relação ao número de tumores desenvolvidos.

Os carcinomas basocelulares cutâneos dos pacientes com síndrome do Xeroderma Pigmentoso avaliados no estudo apresentam perfil de mutações semelhantes ao observado em carcinomas basocelulares cutâneo esporádicos, com prevalência de alterações consistentes com mutagênese induzida por radiação ultravioleta (C:G>T:A e G:C>T:A). No entanto, observamos representação reduzida dessa assinatura de mutações no carcinoma basocelular desenvolvido pelo paciente heterozigoto para alteração germinativa patogênica no gene *POLH/XPV*. A busca do perfil somático de mutações no contexto de deficiência nas proteínas de reparo relacionadas à síndrome do Xeroderma Pigmentoso e consequente acúmulo de maior número de mutações, não revelou maior carga mutacional comparado a carcinomas basocelulares esporádicos.

Embora maior número de carcinomas basocelulares tenha apresentado variantes somáticas em três genes não clássicos na carcinogênese desse tumor cutâneo (*APC*, *FLG* e *TTN*), o papel das vias *Sonic Hedgehog* e *Hippo*, bem caracterizadas em carcinomas basocelulares somáticos e de pacientes com síndrome de Gorlin, foi também destacado em carcinomas basocelulares de pacientes XP. Nos tumores avaliados a ativação da via *Sonic Hedgehog* não ocorre preferencialmente por mutações ativadoras no *SMO*.

Apenas duas variantes somáticas foram identificadas na amostra de tumor gástrico congelada a fresco ocorrendo em baixa frequência alélica nos genes *RBI* e *GLI3*, de relevância desconhecida na carcinogênese do tumor gástrico.

7 REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
2. Bakshi A, Chaudhary SC, Rana M, Elmets CA, Athar M. Basal cell carcinoma pathogenesis and therapy involving hedgehog signaling and beyond. *Mol Carcinog*. 2017 Dec 1;56(12):2543–57.
3. Smith H, Wernham A, Patel A. When to suspect a non-melanoma skin cancer. *BMJ*. 2020 Mar 11;368:m692.
4. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020/incidência de câncer no Brasil. INCA. 2019. Disponível em: <https://bit.ly/3cgPAWx>. [2020 apr 15].
5. Weinstock MA. Assessment of sun sensitivity by questionnaire: validity of items and formulation of a prediction rule. *J Clin Epidemiol*. 1992;45(5):547–52.
6. D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV Radiation and the Skin. *Int J Mol Sci*. 2013 Jun 7;14(6):12222–48.
7. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2012 May 23;166(5):1069–80.
8. American Cancer Society-ACS. Cancer facts & figures 2020. Disponível em: <https://bit.ly/3cbVXum>. [2020 apr 15].
9. Iwasaki JK, Srivastava D, Moy RL, Lin HJ, Kouba DJ. The molecular genetics underlying basal cell carcinoma pathogenesis and links to targeted therapeutics. *J Am Acad Dermatol*. 2012 May 1;66(5):e167–78.10.
10. Weiss GJ, Korn RL. Metastatic basal cell carcinoma in the era of hedgehog signaling pathway inhibitors. *Cancer*. 2012 Nov;118(21):5310–9.
11. Monteiro Bandeira A, Bandeira V, Da Silva JF, Mazza E. Carcinomas basocelulares: Estudo clínico e anatomopatológico de 704 tumores. *An Bras Dermatol*. 2003 Jan;78(1):23–34.

12. Didona D, Paolino G, Bottoni U, Cantisani C. Non melanoma skin cancer pathogenesis overview. *Biomedicines*. 2018 Jan 2;6(1):6.
13. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol*. 2006 Feb 17;19(S2):S127–47.
14. Pyne J, Mint E, Barr E, Clark S, Hou R. Basal cell carcinoma: variation in invasion depth by subtype, sex, and anatomic site in 4,565 cases. *Dermatol Pract Concept*. 2018 Oct 31;8(4):314–9.
15. Tarallo M, Cigna E, Frati R, Delfino S, Innocenzi D, Fama U, et al. Metatypical basal cell carcinoma: a clinical review. *J Exp Clin Cancer Res*. 2008 Dec 7;27(1):65.
16. Kappelin J, Nielsen K, Nilsson F, Bjellerup M, Ahnliide I. Surgical treatment of basal cell carcinoma – a case series on factors influencing the risk of an incomplete primary excision. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2020 Mar 2;jdv.16327.
17. Castori M, Morrone A, Kanitakis J, Grammatico P. Genetic skin diseases predisposing to basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol*. 2012 May;22(3):299–309.
18. Parren LJMT, Frank J. Hereditary tumour syndromes featuring basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 2011 Jul;165(1):30–4.
19. Farndon PA, Del Mastro RG, Kilpatrick MW, Evans DRG. Location of gene for Gorlin syndrome. *Lancet*. 1992 Mar 7;339(8793):581–2.
20. Gailani MR, Bale SJ, Leffell DJ, DiGiovanna JJ, Peck GL, Poliak S, et al. Developmental defects in gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9. *Cell*. 1992 Apr 3;69(1):111–7.
21. Chenevix-Trench G, Wicking C, Berkman J, Sharpe H, Hockey A, Haan E, et al. Further localization of the gene for nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) in 15 Australasian families: linkage and loss of heterozygosity. *Am J Hum Genet*. 1993;53(3):760–7.
22. M.shanley S, Dawkins H, J.wainwright B, Wicking C, Heenan P, Eldon M, et al. Fine deletion mapping on the long arm of chromosome 9 in sporadic and familial basal cell carcinomas. *Hum Mol Genet*. 1995 Jan;4(1):129–33.

23. Quinn AG, Sikkink S, Rees JL. Delineation of two distinct deleted regions on chromosome 9 in human non-melanoma skin cancers. *Genes, Chromosom Cancer*. 1994 Dec 1;11(4):222–5.
24. Teh M-T, Blaydon D, Chaplin T, Foot NJ, Skoulakis S, Raghavan M, et al. Genomewide single nucleotide polymorphism microarray mapping in basal cell carcinomas unveils uniparental disomy as a key somatic event. *Cancer Res*. 2005;65:8597–603.
25. Jeng K-S, Chang C-F, Lin S-S. Sonic hedgehog signaling in organogenesis, tumors, and tumor microenvironments. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 23;21(3):758.
26. Athar M, Li C, Kim AL, Spiegelman VS, Bickers DR. Sonic hedgehog signaling in basal cell nevus syndrome. *Cancer Res*. 2014 Sep 15;74(18):4967-75.
27. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. 2017 May 1;7(5):1016-36.
28. Stracquadiano G, Wang X, Wallace M, Grawenda AM, Zhang P, Hewitt J, et al. The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes HHS Public Access. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(4):251–65.
29. Jayaraman SS, Rayhan DJ, Hazany S, Kolodney MS. Mutational landscape of basal cell carcinomas by whole-exome sequencing. *J Invest Dermatol*. 2014;134(1):213–20.
30. Lacour JP. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. *Br J Dermatol*. 2002 Apr;146(s61):17–9.
31. Reifemberger J, Wolter M, Knobbe CB, Köhler B, Schönicke A, Scharwächter C, et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 2005 Jan;152(1):43–51.
32. Sharpe HJ, Pau G, Dijkgraaf GJ, Basset-Seguin N, Modrusan Z, Januario T, et al. Genomic analysis of smoothened inhibitor resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2015;27(3):327–41.
33. Bonilla X, Parmentier L, King B, Bezrukov F, Kaya G, Zoete V, et al. Genomic analysis identifies new drivers and progression pathways in skin basal cell carcinoma. *Nat Genet*. 2016;48(4):398–406.

34. Kleijer WJ, Laugel V, Berneburg M, Nardo T, Fawcett H, Gratchev A, et al. Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst)*. 2008;7(5):744–50.
35. Bouadjar B, Aït-Belkacem F, Daya-Grosjean L, Sarasin a, Larbaoui SL, Ferhat R, et al. [Xeroderma pigmentosum: a study in 40 Algerian patients]. *Ann Dermatol Venereol*. 1996 Jan;123(5):303–6.
36. Menck CFM, Munford V. DNA repair diseases: what do they tell us about cancer and aging? *Genet Mol Biol*. 2014;37(1 suppl. 1):220–33.
37. Munford V, Castro LP, Souto R, Lerner LK, Vilar JB, Quayle C, et al. A genetic cluster of patients with variant xeroderma pigmentosum with two different founder mutations. *Br J Dermatol*. 2017;176(5):1270–8.
38. Stary A, Sarasin A. The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome. 2002;84(1):49–60.
39. Kraemer KH, Lee MM, Scotto J. Xeroderma pigmentosum: cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol*. 1987;123(2):241–50.
40. Cleaver JE, Lam ET, Revet I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet*. 2009;10(11):756–68.
41. De Boer J, Hoeijmakers JHJ. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):453–60.
42. Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2003;544(2–3):99–106.
43. Gillet LCJ, Schärer OD. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev*. 2006;106(2):253–76.
44. Shuck SC, Short EA, Turchi JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res*. 2008 Jan;18(1):64–72.
45. Sugawara K. Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair. *Carcinogenesis*. 2008;29(3):455–65.
46. Weon JL, Glass DA. Novel therapeutic approaches to xeroderma pigmentosum. *Br J Dermatol*. 2019 Aug;181(2):249–55.

47. Moreno NC, de Souza TA, Garcia CCM, Ruiz NQ, Corradi C, Castro LP, et al. Whole-exome sequencing reveals the impact of UVA light mutagenesis in xeroderma pigmentosum variant human cells. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(4):1941–53.
48. Patra A, Zhang Q, Lei L, Su Y, Egli M, Guengerich FP. Structural and kinetic analysis of nucleoside triphosphate incorporation opposite an abasic site by human translesion DNA polymerase η . *J Biol Chem.* 2015 Mar;290(13):8028–38.
49. Masutani C, Kusumoto R, Iwai S, Hanaoka F. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase ϵ . *EMBO J.* 2000 Jun;19(12):3100–9.
50. Zebian A, Shaito A, Mazurier F, Rezvani HR, Zibara K. XPC beyond nucleotide excision repair and skin cancers. *Mutat Res.* 2019 Oct-Dec;782:108286.
51. Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, et al. Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. *J Med Genet.* 2011 Mar;48(3):168–76.
52. Moriwaki S, Kraemer KH. Xeroderma pigmentosum--bridging a gap between clinic and laboratory. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2001 Apr;17(2):47-54.
53. Fassihi H, Sethi M, Fawcett H, Wing J, Chandler N, Mohammed S, et al. Deep phenotyping of 89 xeroderma pigmentosum patients reveals unexpected heterogeneity dependent on the precise molecular defect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(9):E1236–45.
54. Soufir N, Ged C, Bourillon A, Austerlitz F, Chemin C, Sary A, et al. A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group c from North Africa. *J Invest Dermatol.* 2010;130(6):1537–42.
55. Santiago KM, Castro LP, Neto JPD, de Nóbrega AF, Pinto CAL, Ashton-Prolla P, et al. Comprehensive germline mutation analysis and clinical profile in a large cohort of Brazilian xeroderma pigmentosum patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020 Apr 1. Epub ahead of print.
56. Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, Brooks BP, Tamura D, DiGiovanna JJ. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience.* 2007 Apr 14;145(4):1388-96.
57. Kadarko AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Ito S, Pipitone MA, Abdel-Malek ZA. Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? *Pigment Cell Res.* 2003;16(5):434–47.

58. Schuch AP, Moreno NC, Schuch NJ, Menck CFM, Garcia CCM. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic Biol Med*. 2017 Jun;107:110-124.
59. Digiovanna JJ, Kraemer KH. Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J Invest Dermatol*. 2012;132(3 part 2):785–96.
60. Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC. The Role of Sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer: the xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol*. 1994 Aug;130(8):1018–21.
61. Hadj-Rabia S, Oriot D, Soufir N, Dufresne H, Bourrat E, Mallet S, et al. Unexpected extradermatological findings in 31 patients with xeroderma pigmentosum type C. *Br J Dermatol*. 2013 May;168(5):1109–13.
62. Al Wayli H. Xeroderma pigmentosum and its dental implications. *Eur J Dent*. 2015;9(1):145–8.
63. Brooks BP, Thompson AH, Bishop RJ, Clayton JA, Chan C-C, Tsilou ET, et al. Ocular manifestations of xeroderma pigmentosum: long term follow-up highlights the role of DNA repair in protection from sun damage. *Ophthalmology*. 2013;120(7):1324–36.
64. Caso E, Marcos A, Morales M, Belfort R. Simultaneous squamous cell carcinoma and malignant melanoma of the conjunctiva in a teenager with xeroderma pigmentosum: case report. *Indian J Ophthalmol*. 2019 Jul;67(7):1190–2.
65. Kraemer KH, Lee MM, Scotto J. Dna repair protects against cutaneous and internal neoplasia: Evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis*. 1984;5(4):511–4.
66. Giglia G, Dumaz N, Drougard C, Avril MF, Daya-Grosjean L, Sarasin A. p53 Mutations in skin and internal tumors of xeroderma pigmentosum patients belonging to the complementation group C. *Cancer Res*. 1998;58(19):4402–9.
67. DiGiovanna JJ, Patronas N, Katz D, Abangan D, Kraemer KH. Xeroderma pigmentosum: spinal cord astrocytoma with 9-year survival after radiation and isotretinoin therapy. *J Cutan Med Surg*. 1998 Jan;2(3):153–8.
68. Lai JP, Liu YC, Alimchandani M, Liu Q, Aung PP, Matsuda K, et al. The influence of DNA repair on neurological degeneration, cachexia, skin cancer and internal neoplasms: autopsy report of four xeroderma pigmentosum patients (XP-A, XP-C and XP-D). *Acta Neuropathol Commun*. 2013 May 8;1:4.

69. Merideth M, Tamura D, Angra D, Khan SG, Ferrell J, Goldstein AM, et al. Reproductive health in xeroderma pigmentosum. *Obstet Gynecol.* 2019 Oct;134(4):814–9.
70. Hessel A, Siegle RJ, Mitchell DL, Cleaver JE. Xeroderma pigmentosum variant with multisystem involvement. *Arch Dermatol.* 1992 Sep;128(9):1233–7.
71. Reed WB, Sugarman GI, Mathis RA. DeSanctis-Cacchione Syndrome: a case report with autopsy findings. *Arch Dermatol.* 1977 Nov;113(11):1561–3.
72. Hosseini M, Ezzedine K, Taieb A, Rezvani HR. Oxidative and energy metabolism as potential clues for clinical heterogeneity in nucleotide excision repair disorders. *J Invest Dermatol.* 2015;135(2):341–51.
73. Robbins JH. Xeroderma pigmentosum. Defective DNA repair causes skin cancer and neurodegeneration. *JAMA J Am Med Assoc.* 1988 Jul;260(3):384–8.
74. D’errico M, Parlanti E, Teson M, Bernardes De Jesus BM, Degan P, Calcagnile A, et al. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO J.* 2006;25:4305–15.
75. Bai X, Jin F, Fu Y, Yu Z, Zhao L, Ren J, et al. Clinicopathological significance and prognostic value of Xeroderma pigmentosum complementary group C (XPC) expression in sporadic breast cancer patients. *Med Oncol.* 2012;29(3):1543–53.
76. Matakidou A, Eisen T, Fleischmann C, Bridle H, Houlston RS. Evaluation of xeroderma pigmentosum XPA, XPC, XPD, XPF, XPB, XPG and DDB2 genes in familial early-onset lung cancer predisposition. *Int J Cancer.* 2006;119(4):964–7.
77. He J, Shi T-Y, Zhu M-L, Wang M-Y, Li Q-X, Wei Q-Y. Associations of Lys939Gln and Ala499Val polymorphisms of the *XPC* gene with cancer susceptibility: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2013 Oct;133(8):1765–75.
78. Jiang X, Zhou LT, Zhang SC, Chen K. XPC polymorphism increases risk of digestive system cancers: Current evidence from a meta-analysis. *Chinese J Cancer Res.* 2012 Mar;24(3):181–9.
79. Santos LS, Gomes BC, Gouveia R, Silva SN, Azevedo AP, Camacho V, et al. The role of CCNH Val270Ala (rs2230641) and other nucleotide excision repair polymorphisms in individual susceptibility to well-differentiated thyroid cancer. *Oncol Rep.* 2013 Nov;30(5):2458–66.

80. Wang Y, Li Z, Liu N, Zhang G. Association between CCND1 and XPC polymorphisms and bladder cancer risk: A meta-analysis based on 15 case-control studies. *Tumor Biol.* 2014 Nov;35(4):3155–65.
81. Strom SS, Estey E, Outshoorn UM, Garcia-Manero G. Acute myeloid leukemia outcome: Role of nucleotide excision repair polymorphisms in intermediate risk patients. *Leuk Lymphoma.* 2010 Apr;51(4):598–605.
82. Santos LS, Gomes BC, Bastos HN, Gil OM, Azevedo AP, Ferreira TC, et al. Thyroid cancer: The quest for genetic susceptibility involving dna repair genes. *Genes (Basel).* 2019;10(8):586.
83. Dai Y, Song Z, Zhang J, Gao W. Comprehensive assessment of the association between XPC rs2228000 and cancer susceptibility based on 26835 cancer cases and 37069 controls. *Biosci Rep.* 2019 Dec 20;39(12):BSR20192452.
84. Horiki S, Miyauchi-Hashimoto H, Tanaka K, Nikaido O, Horio T. Protective effects of sunscreens on photocarcinogenesis, photoaging, and DNA damage in XPA gene knockout mice. *Arch Dermatol Res.* 2000;292(10):511–8.
85. Tamura D, DiGiovanna JJ, Khan SG, Kraemer KH. Living with xeroderma pigmentosum: comprehensive photoprotection for highly photosensitive patients. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2014 Apr;30(2–3):146–52.
86. Kraemer KH, DiGiovanna JJ. Xeroderma Pigmentosum. 2003 Jun 20 [updated 2016 Sep 29]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1397/>
87. Moriwaki S, Kanda F, Hayashi M, Yamashita D, Sakai Y, Nishigori C. Xeroderma pigmentosum clinical practice guidelines. *J Dermatol.* 2017;44(10):1087–96.
88. Larson DM, Cunningham BB. Photodynamic therapy in a teenage girl with xeroderma pigmentosum type C. *Pediatr Dermatol.* 2012 May;29(3):373–4.
89. Fernández-Guarino M, Mavura D, Fernández-González P, Chapa P, Ravazzano C, Jaén L, et al. Daylight photodynamic therapy is an option for the treatment of actinic keratosis in patients with xeroderma pigmentosum in Africa. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Mar;29:101631.

90. Yarosh D, Klein J, O'Connor A, Hawk J, Rafal E, Wolf P. Effect of topically applied T4 endonuclease V in liposomes on skin cancer in xeroderma pigmentosum: a randomised study. *Lancet*. 2001 Mar;357(9260):926–9.
91. Warrick E, Garcia M, Chagnoleau C, Chevallier O, Bergoglio V, Sartori D, et al. Preclinical corrective gene transfer in xeroderma pigmentosum human skin stem cells. *Mol Ther*. 2012;20(4):798–807.
92. Kuschal C, DiGiovanna JJ, Khan SG, Gatti RA, Kraemer KH. Repair of UV photolesions in xeroderma pigmentosum group C cells induced by translational readthrough of premature termination codons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(48):19483–8.
93. Kraemer KH, DiGiovanna JJ, Peck GL. Chemoprevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum. *J Dermatol*. 1992 Nov;19(11):715–8.
94. Lambert WC, Lambert MW. Development of effective skin cancer treatment and prevention in xeroderma pigmentosum. *Photochem Photobiol*. 2015;91(2):475–83.
95. Weisberg NK, Varghese M. Therapeutic response of a brother and sister with xeroderma pigmentosum to imiquimod 5% cream. *Dermatologic Surg*. 2002;28(6):518–23.
96. Fife D, Laitinen MA, Myers DJ, Landsteiner PB. Vismodegib therapy for basal cell carcinoma in an 8-year-old chinese boy with xeroderma pigmentosum. *Pediatr Dermatol*. 2017 Mar;34(2):163–5.
97. Axelson M, Liu K, Jiang X, He K, Wang J, Zhao H, et al. U.S. Food and Drug Administration approval: Vismodegib for recurrent, locally advanced, or metastatic basal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2013 May;19(9):2289–93.
98. Leavitt E, Lask G, Martin S. Sonic hedgehog pathway inhibition in the treatment of advanced basal cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2019 Nov;20(11):1–12.
99. Salomon G, Maza A, Boulinguez S, Paul C, Lamant L, Tournier E, et al. Efficacy of anti-programmed cell death-1 immunotherapy for skin carcinomas and melanoma metastases in a patient with xeroderma pigmentosum. *Br J Dermatol*. 2018 May;178(5):1199–203.
100. Hauschild A, Eichstaedt J, Möbus L, Kähler K, Weichenthal M, Schwarz T, et al. Regression of melanoma metastases and multiple non-melanoma skin cancers in xeroderma pigmentosum by the PD1-antibody pembrolizumab. *Eur J Cancer*. 2017 May;77:84-87.

101. Mazouzi A, Battistini F, Moser SC, Orozco M, Kubicek S, Correspondence JIL, et al. Repair of UV-Induced DNA damage independent of nucleotide excision repair is masked by MUTYH molecular cell repair of uv-induced dna damage independent of nucleotide excision repair is Masked by MUTYH. *Mol Cell*. 2017;68:797–807.
102. Cadet J, Sage E, Douki T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res*. 2005 Apr 1;571(1-2):3-17.
103. Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 May;90(9):4216–20.
104. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions. *J Biol Chem*. 1992;267(1):166–72.
105. Wang Y, DiGiovanna JJ, Stern JB, Hornyak TJ, Raffeld M, Khan SG, et al. Evidence of ultraviolet type mutations in xeroderma pigmentosum melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(15):6279–84.
106. Kim MY, Park HJ, Baek SC, Byun DG, Houh D. Mutations of the p53 and PTCH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias. *J Dermatol Sci*. 2002;29(1):1–9.
107. Couvé-Privat S, Bouadjar B, Avril MF, Sarasin A, Daya-Grosjean L. Significantly high levels of ultraviolet-specific mutations in the smoothened gene in basal cell carcinomas from dna repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res*. 2002;62(24):7186–9.
108. Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat*. 2003;21(3):217–28.
109. D’Errico M, Calcagnile A, Canzona F, Didona B, Posteraro P, Cavalieri R, et al. UV mutation signature in tumor suppressor genes involved in skin carcinogenesis in xeroderma pigmentosum patients. *Oncogene*. 2000;19(3):463–7.
110. Schelini MC, Fernando L, Chaves OB, Toledo MC, Rodrigues FW, De Oliveira T, et al. Xeroderma pigmentosum: ocular findings in an isolated Brazilian Group with an identified genetic cluster. *J Ophthalmol*. 2019 Oct 31;2019:4818162.

111. Khan SG, Muniz-Medina V, Shahlavi T, Baker CC, Inui H, Ueda T, et al. The human XPC DNA repair gene: arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function. *Nucleic Acids Res.* 2002 Aug;30(16):3624–31.
112. Berwick M. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jun;92(11):874–97.
113. Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Sanyal S, Soucek P, Haufröid V, et al. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis.* 2004 May;25(5):757–63.
114. Vogelsang M, Wilson M, Kirchhoff T. Germline determinants of clinical outcome of cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016;29(1):15–26.
115. Potrony M, Badenas C, Aguilera P, Puig-Butille JA, Carrera C, Malveyh J, et al. Update in genetic susceptibility in melanoma. *Ann Transl Med.* 2015;3(15):1–12.
116. Whitworth J, Skytte AB, Sunde L, Lim DH, Arends MJ, Happerfield L, et al. Multilocus inherited neoplasia alleles syndrome. *JAMA Oncol.* 2016 Mar;2(3):373-9.
117. Sidwell RU, Sandison A, Wing J, Fawcett HD, Seet JE, Fisher C, et al. A novel mutation in the XPA gene associated with unusually mild clinical features in a patient who developed a spindle cell melanoma. *Br J Dermatol.* 2006;155(1):81–8.
118. Stradella A, Del Valle J, Rofes P, Feliubadaló L, Grau Garces È, Velasco À, et al. Does multilocus inherited neoplasia alleles syndrome have severe clinical expression? *J Med Genet.* 2019 Aug;56(8):521–5.
119. Silva-Smith R, Sussman DA. Co-occurrence of Lynch syndrome and juvenile polyposis syndrome confirmed by multigene panel testing. *Fam Cancer.* 2018 Jan;17(1):87–90.
120. Santiago KM, De Nóbrega AF, Rocha RM, Rogatto SR, Achatz MI. Xeroderma pigmentosum: Low prevalence of germline XPA mutations in a Brazilian XP population. *Int J Mol Sci.* 2015;16(4):8988–96.
121. Campos AHJFM, Silva AA, Mota LDDC, Olivieri ER, Prescinoti VC, Patrão D, et al. The value of a tumor bank in the development of cancer research in Brazil: 13 years of experience at the A.C.Camargo Hospital. *Biopreserv Biobank.* 2012 Apr;10(2):168–73.

122. Atwood SX, Sarin KY, Whitson RJ, Li JR, Kim G, Rezaee M, et al. Smoothened variants explain the majority of drug resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2015;27(3):342–53.
123. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*. 2017;9(1):1–14.
124. Shen Y, Stanislauskas M, Li G, Zheng D, Liu L. Epigenetic and genetic dissections of UV-induced global gene dysregulation in skin cells through multi-omics analyses. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12.
125. Rahman N. Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature*. 2014;505(7483):302–8.
126. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug;30(15):2114–20.
127. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug;25(16):2078–9.
128. Wang PPS, Parker WT, Branford S, Schreiber AW. BAM-matcher: a tool for rapid NGS sample matching. *Bioinformatics*. 2016;32(17):2699–701.
129. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol*. 2013 Mar;31(3):213–9.
130. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of drosophila melanogaster strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012;6(2):80–92.
131. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010 Sep;38(16):e164.
132. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat*. 2017 Jul;38(7):751–63.

133. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405–24.
134. Amendola LM, Jarvik GP, Leo MC, McLaughlin HM, Akkari Y, Amaral MD, et al. Performance of ACMG-AMP Variant-interpretation guidelines among nine laboratories in the clinical sequencing exploratory research consortium. *Am J Hum Genet*. 2016 Jul;99(1):247.
135. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014;46(3):310–5.
136. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2013 Mar;14(2):178–92.
137. Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, Von Haeseler A, Pääbo S. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res*. 2001 Dec 1;29(23):4793–9.
138. Zsikla V, Baumann M, Cathomas G. Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J Clin Pathol*. 2004 Jun;57(6):654–6.
139. Sikorsky JA, Primerano DA, Fenger TW, Denvir J. DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Apr;355(2):431–7.
140. Wong SQ, Li J, Tan AYC, Vedururu R, Pang JMB, Do H, et al. Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing. *BMC Med Genomics*. 2014;7(1):1–10.
141. Macarthur J, Bowler E, Cerezo M, Gil L, Hall P, Hastings E, et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1):D896–D901.

142. Hu J, Adar S, Selby CP, Lieb JD, Sancar A. Genome-wide analysis of human global and transcription-coupled excision repair of UV damage at single-nucleotide resolution. *Genes Dev.* 2015 May;29(9):948–60.
143. Gigli M, Begay RL, Morea G, Graw SL, Sinagra G, Taylor MRG, et al. A review of the giant protein titin in clinical molecular diagnostics of cardiomyopathies. *Front Cardiovasc Med.* 2016 Jul;3:21.
144. Von Hoff DD, Lorusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, et al. Inhibition of the Hedgehog Pathway in Advanced Basal-Cell Carcinoma *Abstract.* *N Engl J Med.* 2009;361:1164–72.
145. Harwood CA, Attard NR, O'Donovan P, Chambers P, Perrett CM, Proby CM, et al. PTCH mutations in basal cell carcinomas from azathioprine-treated organ transplant recipients. *Br J Cancer.* 2008 Oct;99(8):1276–84.
146. Heitzer E, Lassacher A, Quehenberger F, Kerl H, Wolf P. UV fingerprints predominate in the PTCH mutation spectra of basal cell carcinomas independent of clinical phenotype. *J Invest Dermatol.* 2007 Dec;127(12):2872–81.
147. Huang YS, Bu DF, Li XY, Ma ZH, Yang Y, Lin ZM, et al. Unique features of PTCH1 mutation spectrum in Chinese sporadic basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013 Feb;27(2):235–41.
148. Zhang H, Ping XL, Lee PK, Wu XL, Yao YJ, Zhang MJ, et al. Role of PTCH and p53 genes in early-onset basal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2001;158(2):381–5.
149. McGregor JM, Berkhout RJM, Rozycka M, Ter Schegget J, Bouwes Bavinck JN, Brooks L, et al. p53 mutations implicate sunlight in post-transplant skin cancer irrespective of human papillomavirus status. *Oncogene.* 1997;15(14):1737–40.
150. CAMPBELL C, QUINN AG, ANGUS B, REES JL. The relation between p53 mutation and p53 immunostaining in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 1993 Sep;129(3):235–41.
151. Caldeira S, Filotico R, Accardi R, Zehbe I, Franceschi S, Tommasino M. p53 mutations are common in human papillomavirus type 38-positive non-melanoma skin cancers. *Cancer Lett.* 2004 Jun;209(1):119–24.
152. Rady P, Scinicariello F, Wagner RF, Tyring SK. Advances in brief p53 mutations in basal cell carcinomas 1. *Cancer Res.* 1992;52:3804–6.

153. Matsumura Y, Nishigori C, Yagi T, Imamura S, Takebe H. Characterization of p53 gene mutations in basal-cell carcinomas: comparison between sun-exposed and less-exposed skin areas. *Int J Cancer*. 1996 Mar;65(6):778–80.
154. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med*. 2017 Jun;23(6):703–13.
155. Moles JP, Moyret C, Guillot B, Jeanteur P, Guilhaud JJ, Theillet C, et al. p53 gene mutations in human epithelial skin cancers. *Oncogene*. 1993;8(3):583–8.
156. Liu R, Kain M, Wang L. Inactivation of X-linked tumor suppressor genes in human cancer. *Futur Oncol*. 2012 Apr;8(4):463–81.
157. Khiabani H, Hirshfield KM, Goldfinger M, Bird S, Stein M, Aisner J, et al. Inference of germline mutational status and evaluation of loss of heterozygosity in high-depth, tumor-only sequencing data. *JCO Precis Oncol*. 2018 Nov;(2):1–15.
158. Yue Y, Huang Q, Zhu P, Zhao P, Tan X, Liu S, et al. Identification of pathogenic mutations and investigation of the Notch pathway activation in Kartagener syndrome. *Front Genet*. 2019 Aug 22;10:749.
159. Boaretto F, Snijders D, Salvo C, Spalletta A, Mostacciuolo ML, Collura M, et al. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia by a targeted next-generation sequencing panel: molecular and clinical findings in Italian patients. *J Mol Diagnostics*. 2016 Nov;18(6):912–22.
160. Cheung PY, Zhang Y, Long J, Lin S, Zhang M, Jiang Y, et al. p150Glued, dynein, and microtubules are specifically required for activation of MKK3/6 and p38 MAPKs. *J Biol Chem*. 2004 Oct;279(44):45308–11.
161. Shahi RB, De Brakeleer S, Caljon B, Pauwels I, Bonduelle M, Joris S, et al. Identification of candidate cancer predisposing variants by performing whole-exome sequencing on index patients from BRCA1 and BRCA2-negative breast cancer families. *BMC Cancer*. 2019 Dec;19(1):313.
162. Stacey SN, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasdottir A, Thorleifsson G, Gudjonsson SA, et al. Germline sequence variants in TGM3 and RGS22 confer risk of basal cell carcinoma. *Hum Mol Genet*. 2014 Jun 1;23(11):3045–53.

163. Chauveau C, Rowell J, Ferreira A. A rising titan: TTN review and mutation update. *Hum Mutat.* 2014;35(9):1046–59.
164. Xu Z, Dai J, Wang D, Lu H, Dai H, Ye H, et al. Assessment of tumor mutation burden calculation from gene panel sequencing data. *Onco Targets Ther.* 2019 May 6;12:3401-3409.
165. Stacey SN, Sulem P, Masson G, Gudjonsson SA, Thorleifsson G, Jakobsdottir M, et al. New common variants affecting susceptibility to basal cell carcinoma. *Nat Genet.* 2009 Aug;41(8):909–14.
166. Yang X, Yang B, Li B, Liu Y. Association between TERT-CLPTM1L rs401681[C] allele and NMSC cancer risk: a meta-analysis including 45,184 subjects. *Arch Dermatol Res.* 2013 Jan;305(1):49–52.
167. Chahal HS, Wu W, Ransohoff KJ, Yang L, Hedlin H, Desai M, et al. Genome-wide association study identifies 14 novel risk alleles associated with basal cell carcinoma. *Nat Commun.* 2016 Aug 19;7:12510.
168. Roberts MR, Asgari MM, Toland AE. Genome-wide association studies and polygenic risk scores for skin cancer: clinically useful yet? *Br J Dermatol.* 2019 Dec;181(6):1146-55.
169. Yamamoto K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y. A novel gene, CRR9, which was up-regulated in CDDP-resistant ovarian tumor cell line, was associated with apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(4):1148–54.
170. Scherer D, Kumar R. Genetics of pigmentation in skin cancer--a review. *Mutat Res.* 2010 Oct;705(2):141-53.
171. Stacey SN, Helgason H, Gudjonsson SA, Thorleifsson G, Zink F, Sigurdsson A, et al. New basal cell carcinoma susceptibility loci. *Nat Commun.* 2015 Apr 9;6:6825
172. Kovalenko A, Kim JC, Kang TB, Rajput A, Bogdanov K, Dittrich-Breiholz O, et al. Caspase-8 deficiency in epidermal keratinocytes triggers an inflammatory skin disease. *J Exp Med.* 2009 Sep;206(10):2161–77.
173. Lin Y, Chahal HS, Wu W, Cho HG, Ransohoff KJ, Dai H, et al. Association between genetic variation within vitamin D receptor-DNA binding sites and risk of basal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2017 May;140(9):2085–91.

174. Liyanage UE, Law MH, Han X, An J, Ong J-S, Gharahkhani P, et al. Combined analysis of keratinocyte cancers identifies novel genome-wide loci. *Hum Mol Genet.* 2019 Sep 15;28(18):3148-3160.
175. Gouveia GR, Ferreira SC, Sabino EC, Siqueira SAC, Pereira J. Comparação de três protocolos distintos para extração de RNA de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina. *J Bras Patol Med Lab.* 2011 Dec;47(6):649–54.
176. Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagnostics.* 2008;10(3):203–11.
177. Kim S, Park C, Ji Y, Kim DG, Bae H, Vrancken M Van, et al. Deamination effects in formalin-Fixed, Paraffin-embedded tissue samples in the era of precision medicine. *J Mol Diagnostics.* 2017;19(1):137–46.
178. Hastings RJ, Bown N, Tibiletti MG, Debiec-Rychter M, Vanni R, Espinet B, et al. Guidelines for cytogenetic investigations in tumours. *Eur J Hum Genet.* 2016 Jan;24(1):6-13.
179. Berra CM, Torrezan GT, de Paula CA, Hsieh R, Lourenço S V, Carraro DM. Use of uracil-DNA glycosylase enzyme to reduce DNA-related artifacts from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues in diagnostic routine. *Appl Cancer Res.* 2019 Dec;39(1):7.
180. Jacobs AL, Schär P. DNA glycosylases: In DNA repair and beyond. *Chromosoma.* 2012 Feb;121(1):1-20.
181. Ebersberger I, Metzler D, Schwarz C, Pääbo S. Genomewide comparison of DNA sequences between humans and chimpanzees. *Am J Hum Genet.* 2002 Jun;70(6):1490–7.
182. Freudenberg-Hua Y, Freudenberg J, Kluck N, Cichon S, Propping P, Nöthen MM. Single nucleotide variation analysis in 65 candidate genes for CNS disorders in representative sample of the European population. *Genome Res.* 2003 Oct;13(10):2271–6.
183. Chiang A, Jaju PD, Batra P, Rezaee M, Epstein EH, Tang JY, et al. Genomic stability in syndromic basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2018 May;138(5):1044–51.

184. Soura E, Plaka M, Dessinioti C, Chasapi V, Stefanaki C, Antoniou C, et al. Use of vismodegib for the treatment of multiple basal cell carcinomas in a patient with xeroderma pigmentosum. *Pediatr Dermatol*. 2018 Nov;35(6):e334–6.
185. Shin HT, Choi Y La, Yun JW, Kim NKD, Kim SY, Jeon HJ, et al. Prevalence and detection of low-allele-fraction variants in clinical cancer samples. *Nat Commun*. 2017 Dec;8(1):1377.
186. Huang S-W, Chang S-H, Mu S-W, Jiang H-Y, Wang S-T, Kao J-K, et al. Imiquimod activates p53-dependent apoptosis in a human basal cell carcinoma cell line. *J Dermatol Sci*. 2016 Mar;81(3):182–91.
187. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2014 Dec;371(23):2189–99.
188. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015 Apr;348(6230):124–8.
189. Meléndez B, Van Campenhout C, Rorive S, Remmelink M, Salmon I, D’Haene N. Methods of measurement for tumor mutational burden in tumor tissue. *Transl Lung Cancer Res*. 2018 Dec;7(6):661-7.
190. Kim J, Kim B, Kang SY, Heo YJ, Park SH, Kim ST, et al. Tumor mutational burden determined by panel sequencing predicts survival after immunotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Front Oncol*. 2020 Mar 13;10:314.
191. Campesato LF, Barroso-Sousa R, Jimenez L, Correa BR, Sabbaga J, Hoff PM, et al. Comprehensive cancer-gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice. *Oncotarget*. 2015 Oct;6(33):34221–7.
192. Oh JH, Jang SJ, Kim J, Sohn I, Lee JY, Cho EJ, et al. Spontaneous mutations in the single TTN gene represent high tumor mutation burden. *npj Genomic Med*. 2020 Dec;5(1):1–11.
193. Tan H, Bao J, Zhou X. Genome-wide mutational spectra analysis reveals significant cancer-specific heterogeneity. *Sci Rep*. 2015 Jul;5(1):1–14.

194. Tate G, Kishimoto K, Mitsuya T. Biallelic alterations of the large tumor suppressor 1 (LATS1) gene in infiltrative, but not superficial, basal cell carcinomas in a Japanese patient with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Med Mol Morphol*. 2015 Sep;48(3):177–82.
195. Andersen YMF, Egeberg A, Balslev E, Jørgensen CLT, Szecsi PB, Stender S, et al. Filaggrin loss-of-function mutations, atopic dermatitis and risk of actinic keratosis: results from two cross-sectional studies. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 Jun;31(6):1038–43.
196. Liljedahl ER, Wahlberg K, Lidén C, Albin M, Broberg K. Genetic variants of filaggrin are associated with occupational dermal exposure and blood DNA alterations in hairdressers. *Sci Total Environ*. 2019 Feb;653:45–54.
197. Thyssen JP, Andersen YMF, Balslev E, Szecsi PB, Stender S, Kaae J, et al. Loss-of-function mutations in filaggrin gene and malignant melanoma: a case–control study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018 Feb;32(2):242–4.
198. Yunoki T, Tabuchi Y, Hirano T, Miwa S, Imura J, Hayashi A. Gene networks in basal cell carcinoma of the eyelid, analyzed using gene expression profiling. *Oncol Lett*. 2018 Nov;16(5):6729–34.
199. Wang K, Kan J, Yuen ST, Shi ST, Chu KM, Law S, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat Genet*. 2011 Dec;43(12):1219–23.
200. Zang ZJ, Cutcutache I, Poon SL, Zhang SL, Mcpherson JR, Tao J, et al. Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes. *Nat Genet*. 2012 May;44(5):570–4.
201. Hoang T, Ganesan AK, Hiyama D, Dayyani F. Gene mutations distinguishing gastric from colorectal and esophageal adenocarcinomas. *J Gastrointest Oncol*. 2020;11(1):45–54.
202. Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, et al. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet*. 2014 May;46(6):583–7.
203. Dyson NJ. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev*. 2016 Jul 1;30(13):1492–502.

204. Matissek SJ, Elsawa SF. GLI3: a mediator of genetic diseases, development and cancer. *Cell Commun Signal.* 2020 Apr 3;18(1):54.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP.



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **04/10/2016**, aprovaram a realização do projeto nº **2284/16** intitulado: **“Perfil genômico da síndrome do Xeroderma Pigmentoso no Brasil: avaliação de alterações germinativas e somáticas”**.

Pesquisador responsável: Dr. João Pedreira Duprat Neto

Aluno: Karina Miranda Santiago (Doutorado)

Para iniciar o projeto, é necessário aguardar a aprovação da CONEP para este primeiro centro.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 20 de outubro de 2016.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caires Serrano
2ª Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Carta de aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP.

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil genômico da síndrome do Xeroderma Pigmentoso no Brasil: avaliação de alterações germinativas e somáticas

Pesquisador: João Pedreira Duprat Neto

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

Versão: 2

CAAE: 60136616.8.0000.5432

Instituição Proponente: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: National Cancer Institute (NCI)

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.880.121

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 28 de Dezembro de 2016

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEP 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos- Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) No 466, de 12 de dezembro de 2012,e Res CNS 251/97 do Ministério da Saúde

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME DO PARTICIPANTE: _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE (RG): _____
CADASTRO DE PESSOAS FÍSICAS (CPF): _____
DATA NASCIMENTO: ____/____/____ SEXO : M F
TELEFONES: DDD (____) _____ / DDD (____) _____
ENDEREÇO: _____
Nº _____ COMPLEMENTO: _____ BAIRRO: _____
CIDADE: _____ CEP: _____
EMAIL: _____

2.RESPONSÁVEL LEGAL: _____
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE (RG): _____
CADASTRO DE PESSOAS FÍSICAS (CPF): _____
DATA NASCIMENTO: ____/____/____ SEXO : M F
TELEFONES: DDD (____) _____ / DDD (____) _____
ENDEREÇO: _____
Nº _____ COMPLEMENTO: _____ BAIRRO: _____
CIDADE: _____ CEP: _____
EMAIL: _____

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Perfil genômico da síndrome do Xeroderma Pigmentoso no Brasil: avaliação de alterações germinativas e somáticas

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Dr. João Pedreira Duprat Neto (Departamento de Oncologia Cutânea do A.C.Camargo Cancer Center)

3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:

- Karina Miranda Santiago (Departamento de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center)
- Dra. Maria Paula Curado (Departamento de Epidemiologia do A.C.Camargo Cancer Center)
- Dr. Alexandre André B. A. da Costa (Departamento de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center)
- Enf. Luciana Facure Moredo (Departamento de Oncologia Cutânea do A.C.Camargo Cancer Center)
- Dr. Antônio Hugo J. F. M. Campos (Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center)
- Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto (Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center)
- Dra. Maria Isabel A. de S. W. Achatz (Clinical Genetics Branch do Cancer do National Institute of Health, nos Estados Unidos da América)
- Dra. Sharon A. Savage (Divisão de Epidemiologia e Genética do Câncer do National Institute of Health, nos Estados Unidos da América)
- Dr. Carlos Frederico Martins Menck (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA:

3 anos

III - INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE

O(a) senhor(a) está sendo convidado (a) para participar de um projeto de pesquisa realizado no A.C.Camargo Cancer Center em colaboração com a Universidade de São Paulo e o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (National Institute of Health - NIH). O convite está sendo feito porque quando o(a) senhor(a) participou de um estudo prévio realizado nesta instituição, pelos mesmos pesquisadores do presente estudo, o(a) senhor(a) recebeu a informação de que possui alterações no DNA que são encontradas em quem tem o diagnóstico da síndrome do Xeroderma Pigmentoso ou em familiares de quem apresenta o diagnóstico.

O DNA é também conhecido como material genético e se apresenta na forma de um código que é responsável pelo desenvolvimento dos seres vivos e pela transmissão das suas características, por exemplo, a cor da pele. O DNA é organizado em diferentes partes (conhecidas como genes) e cada parte determina como nosso organismo deve funcionar. Temos em nosso DNA um conjunto de oito genes que trabalham para corrigir as agressões que a radiação ultravioleta (vinda do sol, por exemplo) provoca na pele e nos olhos. Quando algum desses oito genes sofre uma falha no seu código (também chamada de alteração ou mutação) ele passa a não funcionar corretamente. Como consequência, a pele não terá a capacidade de se recuperar sozinha das agressões causadas pela radiação ultravioleta e, como resultado, o risco de desenvolver câncer de pele aumenta.

Pessoas que nascem com essa falha são diagnosticadas como portadores da síndrome do Xeroderma Pigmentoso. Essa falha que a pessoa apresenta foi recebida do pai e da mãe e pode ser transmitida para seus filhos. A melhor forma de tratar esta doença é evitar radicalmente a exposição à radiação ultravioleta, principalmente a exposição ao sol.

Este documento fornece informações sobre o estudo para o qual você está sendo convidado a participar.

IV - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. OBJETIVOS DA PESQUISA

O principal objetivo da pesquisa é compreender melhor as causas dos sintomas da síndrome do Xeroderma Pigmentoso. Iremos verificar se existem no DNA outras alterações que possam explicar diferenças na gravidade da doença (número de câncer e tipos de câncer).

2. PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS

O(a) senhor(a) está sendo convidado a participar deste estudo e sua aceitação será formalizada pela assinatura deste documento. Após ler, compreender, esclarecer suas dúvidas e assinar este termo, o(a) senhor(a) estará permitindo que o Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center entregue para os pesquisadores deste estudo, uma pequena quantidade do seu material genético que foi anteriormente obtido e que ficou guardado. O material genético que estamos nos referindo foi obtido de uma amostra de seu sangue e/ou do excedente do seu tumor, que foi guardado em um freezer ou em um bloco de parafina.

Uma pequena quantidade de material genético obtida do seu material guardado neste Biobanco será enviada para o NIH, nos Estados Unidos, onde será avaliado por uma técnica conhecida como “sequenciamento do exoma”.

O estudo não terá custo e o(a) senhor(a) não receberá nenhum tipo de remuneração financeira pela participação.

Conforme as normas existentes no Brasil, o(a) senhor(a) tem os seguintes direitos, gratuitos, que são assegurados pelos pesquisadores:

- a) à proteção de sua privacidade e confidencialidade;
- b) às informações associadas ao seu material biológico humano utilizado nesta pesquisa;
- c) às informações obtidas durante a pesquisa a partir de seu material biológico humano utilizado;
- d) às informações genéticas obtidas durante a pesquisa a partir do seu material biológico humano utilizado, inclusive, aquelas que impliquem em riscos para doenças não preveníveis ou riscos familiares;
- e) ao aconselhamento genético, quando aplicável.

Caso o(a) senhor(a) tenha interesse em saber os resultados, porém não o pode fazer pessoalmente, pedimos que indique o nome de uma pessoa de sua confiança para recebê-lo mediante a apresentação de uma procuração:

Nome: _____ Grau de Parentesco: _____ Telefone: _____
() _____ Email: _____
Endereço: _____

3. DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

Os riscos que prevemos para esta pesquisa são relacionados à perda de sua privacidade e acesso indevido aos seus dados, inclusive àqueles relacionados às suas amostras que serão utilizadas. Entretanto, asseguramos que seus dados pessoais serão mantidos em sigilo, protegidos por meio do uso de códigos e somente os pesquisadores envolvidos nesse projeto terão acesso às informações.

4. BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

O maior benefício da pesquisa é permitir a identificação de alterações responsáveis pelos sintomas da síndrome e assim, proporcionar um conhecimento que te auxiliará em ações e decisões futuras.

A caracterização genética e clínica da síndrome possibilitará aos médicos e pesquisadores a melhor compreensão da doença e o futuro desenvolvimento de estratégias de diagnóstico mais eficazes.

5. CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe da pesquisa e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros.

6. DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que o(a) senhor(a) tem direito. Em caso de qualquer dano relacionado à pesquisa, direto ou indireto, imediato ou tardio, previsto ou não neste TCLE, o(a) senhor(a) receberá assistência integral e incondicional e terá direito à indenização, por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa. Ao assinar este formulário de consentimento o(a) senhor(a) não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

O presente ato de leitura e assinatura deste documento está sendo realizado durante o seu comparecimento em uma consulta de rotina na instituição com o Departamento de Oncogenética, Departamento de Oncologia Cutânea ou qualquer outra especialidade. Se, em algum momento, houver a necessidade de convocá-lo em dias e horas fora de suas consultas de rotinas na instituição, seus gastos com deslocamento e alimentação (assim como de seu acompanhante, se você necessitar de um) serão cobertos pela pesquisa.

7. ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo.

EM CASO DE DÚVIDA OU ESCLARECIMENTOS SOBRE O ESTUDO, entrar em contato com o médico Dr. João Pedreira Duprat Neto ou com a representante da equipe de pesquisadores Karina Miranda Santiago nos telefones (011) 2189-5000 ramal 5181 ou (011) 2189-5000 ramal 5136, respectivamente, de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

V - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

O Biobanco, local onde sua amostra e seu material genético está guardado, está registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com o número B-001. A CONEP é uma comissão do Conselho Nacional de Saúde (CNS) criada através da Resolução 196/96, com a função de implementar as normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Os dados fornecidos, coletados e obtidos neste protocolo de pesquisa, poderão ser utilizados em estudos futuros. Neste caso, entraremos em contato novamente com você para que possa receber a informação apropriada e autorizar esse(s) novo(s) estudo(s).

Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, o(a) senhor(a) terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de sua amostra, recebendo orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde:

a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa por em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

VI - QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dr. João Pedreira Duprat Neto - CRM 49571

Núcleo de Câncer de Pele A.C.Camargo Cancer Center

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 - Ambulatório Fernando Gentil, bloco A - São Paulo - 01509-010

Telefone para contato: (011) 2189-5000 ramal 5136

Representante da equipe de pesquisadores: Karina Miranda Santiago

Departamento de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 - 1º subsolo, bloco A - São Paulo - 01509-010

Telefone para contato: (011) 2189-5000 ramal 5181

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente - A.C.Camargo Cancer Center, em São Paulo, pelo telefone (11) 2189-5000, ramais 2069 ou 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas. O CEP é um colegiado interdisciplinar e independente, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos sujeitos em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos.

Na impossibilidade de contato com as referências acima, o(a) senhor(a) pode solicitar informações do estudo para a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) pelo telefone (61) 3315-2951 / fax (61) 3226-6453 / ou e-mail conep@saude.gov.br. A função da CONEP como uma comissão do Conselho Nacional de Saúde (CNS) criada através da Resolução 196/96, é implementar as normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O(a) senhor(a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu, _____,

na data de ____/____/____ declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente termo e

concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante

Assinatura do responsável pela pesquisa
Dr. João Pedreira Duprat Neto
CRM 49571

Apêndice 2 - Termo de Assentimento (TA).

TERMO DE ASSENTIMENTO (TA) - 0 a 12 anos *RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS*

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa que tem um nome grande e complicado, se chama “Perfil genômico da síndrome do Xeroderma Pigmentoso no Brasil: avaliação de alterações germinativas e somáticas”.

Queremos saber, com essa pesquisa, por qual motivo sua pele fica machucada quando você fica no sol e, porque você tem essas manchinhas, precisando às vezes ser retiradas por cirurgias.

Você só irá participar se seus pais ou responsáveis permitirem. Porém, você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, e não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita em São Paulo, no A.C.Camargo Cancer Center e nos Estados Unidos da América, no Instituto Nacional do Câncer.

Caso você aceite participar da pesquisa, vamos usar um material que foi retirado do seu sangue ou de um machucado que você teve na pele, e que já está guardado aqui no hospital. Portanto, você não precisa fazer um novo exame. Não dói.

Este estudo permite que os médicos possam ajudar outras crianças e adultos que possuem a mesma doença que você tem.

Não será necessário pagar para participar dessa pesquisa e nós não daremos a seus pais ou responsáveis dinheiro por sua participação.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos para outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser mostrados para médicos e pesquisadores, mas sem dizer que são seus, será segredo.

Quando terminarmos a pesquisa você e seu familiar poderão, se quiserem, receber os resultados.

Se você tiver alguma dúvida, você, seus pais ou seu responsável podem perguntar aos pesquisadores e médicos que estão te convidando para participar deste estudo através do telefone (11) 2189-5000, ramal 5181 ou 5136. Vocês poderão falar com o pesquisador Dr. João Pedreira Duprat Neto ou a representante da equipe de pesquisa Karina Miranda Santiago.

Eu, _____, nascido (a) em ____/____/____, entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer se eu participar dessa pesquisa. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Este documento tem uma página e foi entregue para mim em duas vias, ou seja, recebi duas folhas iguais. Uma via será guardada pelos pesquisadores e a outra ficará com os meus responsáveis. Eu concordo em participar da pesquisa na data de ____/____/____.

Assinatura do participante menor

Assinatura do responsável pela pesquisa
Dr. João Pedreira Duprat Neto CRM 49571

TERMO DE ASSENTIMENTO (TA) - 12 a 18 anos

RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa chamada “Perfil genômico da síndrome do Xeroderma Pigmentoso no Brasil: avaliação de alterações germinativas e somáticas”. Nesta pesquisa pretendemos entender melhor a doença que você tem, conhecida como síndrome do Xeroderma Pigmentoso. Faremos uma busca de alterações genéticas que podem ser responsáveis pelos sintomas desta doença.

A síndrome do Xeroderma Pigmentoso é uma doença rara, que passa dos pais para os filhos, e que deixa a pele e os olhos mais sensíveis à luz solar e a outras fontes de luz ultravioleta, aumentando o risco de ter câncer. A melhor forma de diminuir o risco é evitar a exposição às fontes de radiação ultravioleta.

Quando você teve um tumor de pele que foi operado no A.C.Camargo Cancer Center, o seu tumor foi guardado no hospital. Quando você participou de outro estudo sobre esta mesma síndrome, seu sangue foi coletado e também ficou guardado no hospital.

Após você aceitar participar dessa nova pesquisa, uma parte do DNA (material genético responsável pelo desenvolvimento dos seres vivos e pela transmissão das nossas características aos nossos familiares) será obtida do seu sangue e/ou seu tumor e será enviado para o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (NCI/NIH - EUA), onde será feito o teste genético.

Você não se expõe a riscos ao participar da pesquisa já que suas informações pessoais (nome, idade, onde mora) não serão mostradas para ninguém. No entanto, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você terá direito à indenização.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. A participação é gratuita, ou seja, nem você nem seu responsável precisa pagar nada, mas é importante saber também que você não será pago por ter participado. O ganho desta pesquisa, tanto para a instituição quanto para você será por ter mais profissionais da saúde com ainda mais conhecimento para te ajudar a enfrentar a doença que você e outras pessoas têm. Todas as suas dúvidas serão respondidas e você estará livre para participar ou não. O responsável por você poderá solicitar o cancelamento da sua participação neste estudo a qualquer momento. Caso você decida não participar, não se preocupe, pois você não será punido ou receberá um tratamento diferente.

O estudo pode levar até três anos para ser concluído. Quando terminar, os resultados estarão disponíveis para você e para o seu responsável. Estes resultados poderão ser mostrados em aulas e trabalhos, porém você não precisa se preocupar, pois os seus dados pessoais não serão revelados a ninguém. Também garantimos que seu DNA não será liberado para outro uso sem a sua permissão ou do seu responsável.

Este documento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador e a outra ficará com você.

Em caso de qualquer dúvida, você poderá consultar no A.C.Camargo Cancer Center o pesquisador responsável, Dr. João Pedreira Duprat Neto (Departamento de Oncogenética - Rua Professor Antônio Prudente, 211 - Complexo Ambulatorial Fernando Gentil - Bloco A - São Paulo - CEP 01509010 - telefone 11 2189-5000, ramal 5136) ou representante da equipe de pesquisa Karina Miranda Santiago (Departamento de Oncogenética - Rua Professor Antônio Prudente, 211 - 1º subsolo - Bloco A - São Paulo - CEP 01509010 - telefone 11 2189-5000, ramal 5181). Caso não obtenha respostas, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (telefone 11 2189-5000, ramais 2069 ou 5020).

Eu, _____, nascido (a) em ____/____/____ portador (a) do RG _____ e do CPF _____, na data de ____/____/____ recebi o termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler. Fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa.

Assinatura do participante menor

Assinatura do responsável pela pesquisa
Dr. João Pedreira Duprat Neto CRM 49571

Apêndice 3 - Pannel de Genes para Sequenciamento de Nova Geração.

Gene alvo	Posição genômica	Cobertura estimada (%)	Estimativa de bases não cobertas devido regiões de repetições
<i>ACD</i>	chr16:67691414-67694713	77,5	0
<i>ANK2</i>	chr4:113739264-114304896	100	0
<i>ANKMY1</i>	chr2:241418838-241508626	99	113
<i>APC</i>	chr5:112043194-112181936	99,5	58
<i>ARID1A</i>	chr1:27022523-27108595	100	0
<i>ATR</i>	chr3:142168076-142297668	98,9	137
<i>BLM</i>	chr15:91260557-91358859	99,5	26
<i>BRAF</i>	chr7:140419126-140624564	100	0
<i>BRCA1</i>	chr17:41196311-41277500	94,5	376
<i>BRCA2</i>	chr13:32889610-32973825	98	221
<i>C7</i>	chr5:40909353-40983041	98,2	95
<i>CASP8</i>	chr2:202098165-202152434	98,5	97
<i>CCND3</i>	chr6:41902670-42018095	97,2	145
<i>CDKN1A</i>	chr6:36644276-36655116	100	0
<i>CDKN2A</i>	chr9:21967750-21995300	100	0
<i>CLPTMIL</i>	chr5:1317858-1345214	99,5	0
<i>CRNKL1</i>	chr20:20015011-20036691	100	0
<i>CSMD1</i>	chr8:2792874-4852494	100	0
<i>CSMD2</i>	chr1:33979608-34631445	99,2	134
<i>CSMD3</i>	chr8:113235156-114449328	99,9	11
<i>CTNNB1</i>	chr3:41236327-41301587	99	59
<i>DCC</i>	chr18:49866541-51057784	97,3	120
<i>DNAH11</i>	chr7:21582832-21941457	98,1	286
<i>DPCR1</i> (<i>MUCL3</i>)	chr6:30908748-30921998	100	0
<i>DPP10</i>	chr2:115199875-116603328	98,3	170
<i>DYRK1A</i>	chr21:38738091-38889753	98	190
<i>E2F3</i>	chr6:20402397-20493941	100	0
<i>ERBB2</i>	chr17:37844166-37886679	95,1	488
<i>FBXW7</i>	chr4:153242409-153457253	100	0
<i>FGFR4</i>	chr5:176513886-176525145	100	0
<i>FLG</i>	chr1:152274650-152297722	100	0
<i>GLI1</i>	chr12:57853901-57866045	100	0
<i>GLI2</i>	chr2:121493178-121750229	100	0
<i>GLI3</i>	chr7:42000547-42277476	100	0
<i>GLIS1</i>	chr1:53971909-54199877	100	0
<i>GLIS2</i>	chr16:4364761-4389598	100	0
<i>GLRA3</i>	chr4:175558064-175750465	99	97
<i>GPR139</i>	chr16:20042806-20085239	100	0
<i>GRIN2A</i>	chr16:9852375-10276611	100	0
<i>GSK3B</i>	chr3:119540169-119813264	99,5	35
<i>HERC2</i>	chr15:28356185-28567309	98,4	285

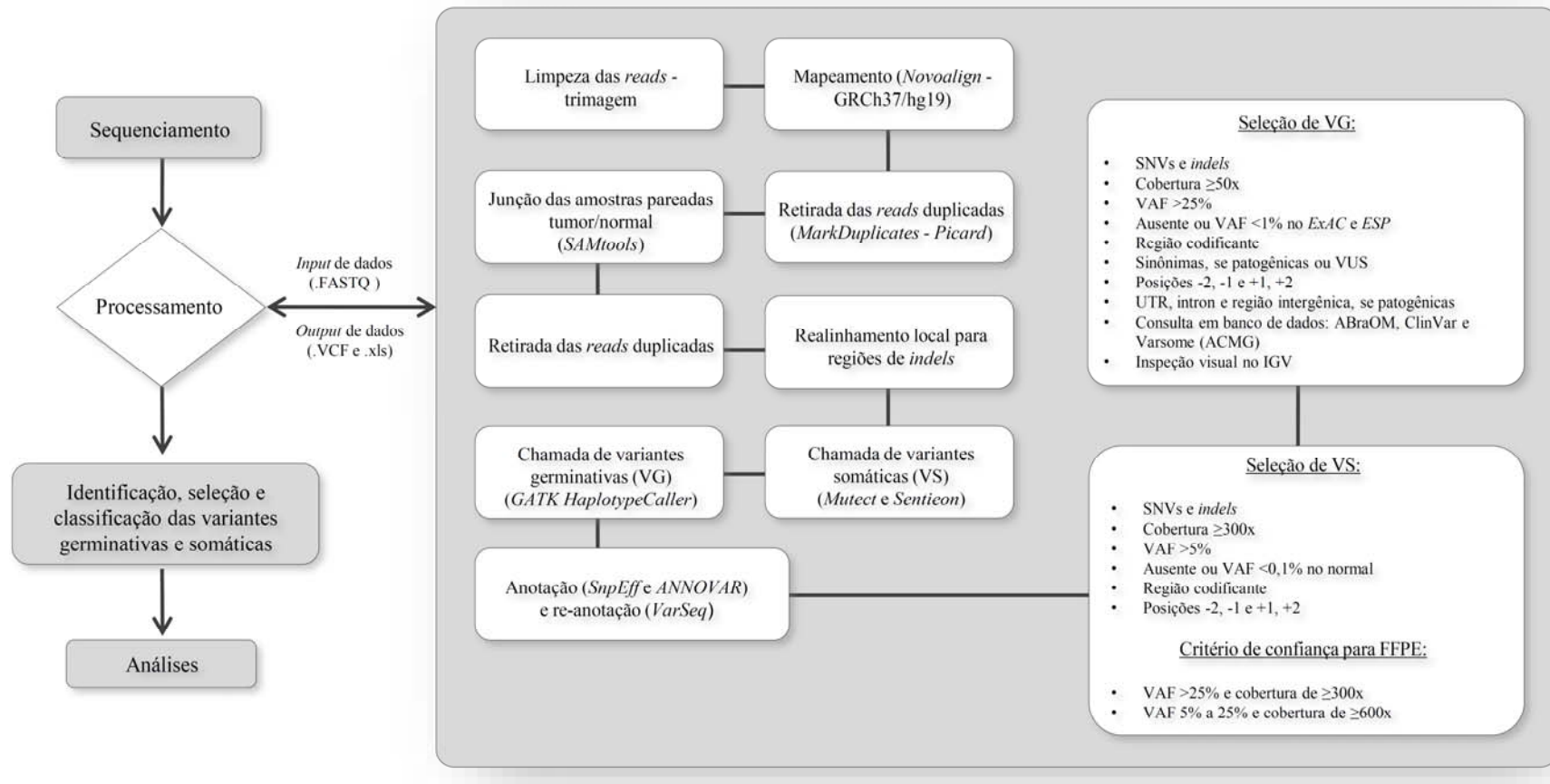
Cont/ Apêndice 3

Gene alvo	Posição genômica	Cobertura estimada (%)	Estimativa de bases não cobertas devido regiões de repetições
<i>HRAS</i>	chr11:532241-537287	100	0
<i>INTS1</i>	chr7:1509912-1545510	98,2	171
<i>ITIH2</i>	chr10:7745231-7791483	100	0
<i>KCNT2</i>	chr1:196194908-196578355	100	0
<i>KDR</i>	chr4:55944643-55991756	100	0
<i>KNSTRN</i>	chr15:40674921-40686447	96,5	128
<i>KRAS</i>	chr12:25357722-25403870	98,8	82
<i>LATS1</i>	chr6:149979288-150039392	98,6	118
<i>LATS2</i>	chr13:21547170-21635686	100	0
<i>MLH1</i>	chr3:37034822-37107380	96,8	124
<i>MYCN</i>	chr2:16080685-16087129	100	0
<i>MYH1</i>	chr17:10395623-10421898	100	0
<i>MYH9</i>	chr22:36677326-36784063	98,4	145
<i>NEBL</i>	chr10:21068901-21463116	100	0
<i>NLGN1</i>	chr3:173114073-174004434	100	0
<i>NOTCH1</i>	chr9:139388895-139440314	100	0
<i>NOTCH2</i>	chr1:120454175-120612240	100	0
<i>NPAP1</i>	chr15:24920540-24928593	96	166
<i>NRAS</i>	chr1:115247089-115259515	100	0
<i>OR4N2</i>	chr14:20187173-20296531	100	0
<i>OR5M3</i>	chr11:56236963-56238014	100	0
<i>OTOA</i>	chr16:21689830-21772050	97,4	190
<i>OXA1L</i>	chr14:23235730-23241007	97,1	33
<i>PADI6</i>	chr1:17698690-17728195	100	0
<i>PCDHB2</i>	chr5:140474226-140476962	100	0
<i>PCDHB3</i>	chr5:140480233-140483406	100	0
<i>PCDHGA1</i>	chr5:140710251-140892546	100	0
<i>PCDHGB3</i>	chr5:140749830-140752376	100	0
<i>PIK3CA</i>	chr3:178865901-178957881	100	0
<i>PMS2</i>	chr7:6012869-6048756	95,7	167
<i>POLE</i>	chr12:133200347-133263951	97,8	364
<i>POM121L12</i>	chr7:53103348-53104617	100	0
<i>PPIAL4G</i>	chr1:143767143-143767881	92,9	0
<i>PPP1R3A</i>	chr7:113516831-113715975	100	0
<i>PPP6C</i>	chr9:127908851-127952218	100	0
<i>PREX2</i>	chr8:68864352-69149265	99,3	82
<i>PRKACG</i>	chr9:71627468-71629039	100	0
<i>PRKAG1</i>	chr12:49396056-49412980	94,3	258
<i>PRKARIA</i>	chr17:66507920-66547460	100	0
<i>PRKAR1B</i>	chr7:588833-767307	100	0
<i>PRKCI</i>	chr3:169940152-170023769	99,4	36
<i>PTCH1</i>	chr9:98205261-98279339	97,8	354

Cont/ Apêndice 3

Gene alvo	Posição genômica	Cobertura estimada (%)	Estimativa de bases não cobertas devido regiões de repetições
<i>PTCH2</i>	chr1:45285515-45308735	100	0
<i>PTPN14</i>	chr1:214522038-214725792	96,4	606
<i>PTPRD</i>	chr9:8314245-10612755	100	0
<i>RAC1</i>	chr7:6414153-6443608	100	0
<i>RB1</i>	chr13:48877886-49056122	100	0
<i>RGS22</i>	chr8:100973163-101143496	94,7	256
<i>RIOK1</i>	chr6:7389728-7418270	100	0
<i>RPA1</i>	chr17:1732995-1803376	100	0
<i>RPL22</i>	chr1:6241328-6269449	100	0
<i>SHH</i>	chr7:155592679-155604967	100	0
<i>SLC27A5</i>	chr19:58990878-59023780	76,5	1663
<i>SMARCB1</i>	chr22:24129149-24176703	100	0
<i>SMO</i>	chr7:128828712-128853386	100	0
<i>SRC</i>	chr20:35973087-36034453	100	0
<i>STAT5B</i>	chr17:40351185-40428735	98,3	104
<i>STEAP4</i>	chr7:87905743-87936206	96,7	187
<i>STK19</i>	chr6:31938867-31950598	100	0
<i>STK36</i>	chr2:219536748-219567439	100	0
<i>SUFU</i>	chr10:104263743-104393292	100	0
<i>SULT1C3</i>	chr2:108863650-108881807	100	0
<i>TGM3</i>	chr20:2276631-2321724	100	0
<i>TMEM132B</i>	chr12:125671347-126146917	99,4	82
<i>TMEM132D</i>	chr12:129556269-130388211	100	0
<i>TMEM222</i>	chr1:27648650-27662891	100	0
<i>TNFAIP2</i>	chr14:103589778-103603776	100	0
<i>TOP2A</i>	chr17:38544767-38574202	100	0
<i>TP53</i>	chr17:7565096-7590856	86,5	509
<i>TTN</i>	chr2:179390715-179695529	100	0
<i>TYR</i>	chr11:88910619-89028927	99,9	3
<i>UGT2B10</i>	chr4:69681710-69696914	100	0
<i>YAP1</i>	chr11:101981191-102104154	100	0

Apêndice 4 - Pipeline para identificação, seleção e classificação de variantes



Legenda: (VS) Variante Somática. (VG) Variante Germinativa. (SNVs) Variantes de nucleotídeo único (do inglês, *Single Nucleotide Variant*). (VAF) Frequência alélica da variante (do inglês, *Variant Allele Fraction*). (VUS) Variantes de significado incerto (do inglês, *Variant of Uncertain Significance*). (IGV) programa *Integrative Genomics Viewer*. (FFPE) Tecido de tumor armazenado em parafina (do inglês, *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*).

Apêndice 5 - Participantes e características das amostras excluídas do estudo.

ID do participante	Gene XP	Origem da amostra de DNA	ID da amostra de DNA	Tumor			Topografia	Histologia	Tumor e normal separado ³	N. cortes/ Espessura ⁴	Principal motivo da exclusão
				Tempo em bloco ¹	Tamanho (cm) ²	Idade					
XPSPAC01F0 (7000-1001)	XPV	TU parafina	XB00029	74	1,2x0,5x0,3	41	Pele mandibular	CBC nodular	Sim	25/5	Integridade indeterminada do DNA
		Leucócito	XB00001	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Exclusão do par e alteração na metodologia do estudo
XPSPAC02F0 (7002-1001)	XPV	TU parafina	XB00030	230	0,4x0,3x0,2	41	Pele glabella	CBC nodular	Não	16/5	Rendimento do DNA de 50ng
		TU parafina	XB00031	99	1,4x0,6x0,4	52	Pele retro auricular	CBC nodular	Sim	10/5	Rendimento do DNA de 10ng
XPSPAC03F0 (7003-1001)	XPC	TU parafina	NA	150	3,0x2,0x1,3	19	Conjuntiva bulbar (olho)	CEC vegetante bem diferenciado	Sim	20/5	Alteração no desenho do estudo: DNA não extraído
		TU parafina [#]	XB00033	94	1,2x0,6x0,6	23	Pele submandibular	CBC nodular	Sim	12/5	Rendimento do DNA de 20ng
		TU parafina [#]	XB00034	94	1,0x0,5x0,5	23	Pele sobrancelha	CBC micronodular e esclerodermiforme	Sim	12/5	Rendimento do DNA de 10ng
		TU parafina [#]	XB00035	94	2,4x1,3x0,6	23	Pele mento	CBC micronodular e esclerodermiforme	Não	24/5	Rendimento do DNA de 50ng
		TU parafina [#]	XB00037	94	1,1x0,6x0,6	23	Pele mento	CBC micronodular, esclerodermiforme e ulcerado	Sim	12/5	Rendimento do DNA de 10ng
		TU parafina [#]	XB00038	94	1,4x0,7x0,6	23	Pele malar	CBC nodular	Sim	10/5	Rendimento do DNA de 0ng
		TU parafina [#]	XB00040	94	2,2x2,0x0,7	23	Pele mento	CBC micronodular e ulcerado	Não	22/5	Sequenciamento não gerou dado
		TU parafina [#]	XB00042	94	1,0x0,4x0,6	23	Pele frontal	CBC micronodular	Sim	12/5	Rendimento do DNA de 10ng
		TU parafina [#]	XB00043	94	1,0x0,5x0,4	23	Pele supercílio	CBC micronodular	Sim	12/5	Rendimento do DNA de 10ng
XPSPAC04F0 (7004-1001)	XPV	TU parafina	XB00044	151	1,2x0,8x0,6	45	Pele lombar	Melanoma superficial Clark III Breslow 0.4	Sim	4/10	Rendimento do DNA de 30ng
XPSPAC05F0 (7005-1001)	XPC	TU parafina	NA	170	0,8x0,6	13	Mucosa jugal (boca)	Tumor de colisão (CBC/CEC)	Sim	11/5	Alteração no desenho do estudo: DNA não extraído
		TU parafina	XB00049	140	0,4x0,3x0,2	16	Pele de antebraço	Melanoma superficial Clark IV Breslow 1.55	Não	1/10	Rendimento do DNA de 0ng
		TU parafina [#]	XB00051	87	0,3x0,2x0,1	20	Pele nasal	CBC nodular	Não	12/5	Rendimento do DNA de 10ng
		TU parafina [#]	XB00052	87	0,3x0,2x0,1	20	Pele frontal	CBC nodular	Não	12/5	Rendimento do DNA de 10ng
		TU parafina [#]	XB00053	87	1,2x0,8x0,2	20	Pele mandibular	CBC nodular	Sim	10/5	Rendimento do DNA de 0ng
		TU parafina [#]	XB00054	87	0,6x0,3x0,2	20	Pele sobrancelha	CBC nodular	Sim	12/5	Rendimento do DNA de 20ng
		TU parafina	XB00055	51	2,0x1,5	23	Pele malar	CBC nodular	Não	20/5	Rendimento do DNA de 30ng
XPSPAC07F0 (7006-1001)	XPC	TU parafina	XB00056	49	0,3x0,2	11	Pele pálpebra	CBC nodular	Sim	17/5	Rendimento do DNA de 30ng e genótipo duplicado
		Saliva	XB00006	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Exclusão do par e alteração na metodologia do estudo

Cont/ Apêndice 5

ID do participante	Gene XP	Origem da amostra de DNA	ID da amostra de DNA	Tumor			Idade	Topografia	Histologia	Tumor e normal separado ³	N. cortes/ Espessura ⁴	Principal motivo da exclusão
				Tempo em bloco ¹	Tamanho (cm) ²							
XPSPAC07F1 (7006-2002) Familiar assintomático	<i>XPC*</i>	Saliva	XB00007	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Alteração no desenho do estudo
XPSPAC07F2 (7006-2001) Familiar assintomático	<i>XPC*</i>	Saliva	XB00008	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Alteração no desenho do estudo
XPSPAC10F0 (7007-1001)	<i>XPC</i>	TU parafina	na	203	2,0x0,8	22	Conjuntiva bulbar (olho)	CBC nodular	Sim	10/5	10/5	Alteração no desenho do estudo: DNA não extraído
		TU parafina	XB00057	152	1,4x0,7	26	Pele antebraço	Melanoma superficial Clark II Breslow 0.28	Sim	10/5	10/5	Rendimento do DNA de 0ng
		TU parafina	XB00058	151	0,4x0,3x0,2	26	Pele nasal	CBC nodular	Não	18/5	18/5	Rendimento do DNA de 50ng
		TU parafina [#]	XB00059	136	0,8	27	Pele mandibular	CBC nodular	Sim	11/5	11/5	Rendimento do DNA de 0ng
		TU parafina [#]	XB00060	136	0,5	27	Pele mandibular	CBC nodular	Sim	15/5	15/5	Rendimento do DNA de 10ng
		TU parafina [#]	XB00061	136	2,0	27	Pele mento	CBC nodular	Sim	10/5	10/5	Rendimento do DNA de 10ng
		TU parafina [#]	XB00062	136	0,4	27	Pele frontal	CBC nodular	Sim	10/5	10/5	Rendimento do DNA de 0ng
		Leucócito	XB00009	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Exclusão do par e alteração na metodologia do estudo
XPSPAC10F1 (7007-1002)		TU parafina	XB00063	151	0,3x0,2	20	Pele nasal	CBC nodular e esclerodermiforme	Sim	11/5	11/5	Rendimento do DNA de 30ng
XPSPAC10F2 (7007-1003)	<i>XPC</i>	Saliva	XB00011	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Alteração no desenho do estudo
XPSPAC10F3 (7007-1004)	<i>XPC</i>	Saliva	XB00012	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Alteração no desenho do estudo
XPSPAC10F4 (7007-2002) Familiar assintomático	<i>XPC*</i>	Saliva	XB00013	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Alteração no desenho do estudo
XPSPAC11F0 (7008-1001)	<i>XPV</i>	TU parafina	XB00065	124	0,3x0,2x0,1	28	Pele nasal	CBC nodular	Não	16/5	16/5	Rendimento do DNA de 10ng
		Leucócito	XB00014	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Exclusão do par e alteração na metodologia do estudo
XPSPAC13F0 (7009-1001)	<i>XPC</i>	Leucócito	XB00015	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Alteração no desenho do estudo
XPSPAC13F1 (7009-1002)	<i>XPC</i>	Leucócito	XB00016	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Alteração no desenho do estudo
XPSPAC13F2 (7009-1003) Familiar assintomático	<i>XPC*</i>	Leucócito	XB00017	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Alteração no desenho do estudo
XPSPAC13F3 (7009-2002) Familiar assintomático	<i>XPC*</i>	Leucócito	XB00018	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Alteração no desenho do estudo

Cont/ Apêndice 5

ID do participante	Gene XP	Origem da amostra de DNA	ID da amostra de DNA	Tumor		Idade	Topografia	Histologia	Tumor e normal separado ³	N. cortes/ Espessura ⁴	Principal motivo da exclusão
				Tempo em bloco ¹	Tamanho (cm) ²						
XPSPAC16F0 (7010-1001)	XPC	TU parafina	XB00066	151	0,5x0,3x0,2	31	Pele pescoço	CBC nodular	Sim	12/5	Rendimento do DNA de 30ng
		TU parafina	na	74	0,3x0,3	38	Língua	CEC moderadamente diferenciado	Não	12/5	Alteração no desenho do estudo: DNA não extraído
		Fresco	XB00026	20	NA	39	Língua (recidiva)	CEC invasivo bem diferenciado	Sim **	NA	Alteração no desenho do estudo
		Leucócito	XB00019	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Exclusão do par e alteração na metodologia do estudo
XPSPAC27F0 (7011-1001)	XPC	TU parafina	XB00067	98	0,2x0,3	20	Pele pré auricular	CBC nodular	Não	22/5	Rendimento do DNA de 10ng
		Leucócito	XB00020	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Exclusão do par e alteração na metodologia do estudo
XPSPAC32F0 (7012-1001)	XPC	TU parafina [#]	XB00068	22	0,3x0,2	14	Pele pré auricular	CBC nodular superficial	Sim	15/5	Integridade indeterminada e genótipo duplicado
		TU parafina [#]	XB00070	22	0,2	14	Pele malar	CBC nodular	Sim	15/5	Rendimento do DNA de 40ng
		TU parafina [#]	XB00073	22	0,2x0,2	14	Pele sulco nasogeniano	CBC nodular	Não	15/5	Integridade indeterminada
XPSPAC32F1 (7012-1002)	XPC	Leucócito	XB00022	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Alteração no desenho do estudo
XPSPAC32F2 (7012-2002) Familiar assintomático	XPC*	Leucócito	XB00023	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Alteração no desenho do estudo
XPSPAC32F3 (7012-2001) Familiar assintomático	XPC*	Leucócito	XB00024	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Alteração no desenho do estudo

Legenda: (ID) Identificação. (*) Carreador heterozigoto da variante. (TU) Tumor. ([#]) Tumores sincrônicos. (NA) Não se aplica. (¹) Tempo em meses que o tecido tumoral ficou armazenado em bloco de parafina, compreendendo o período entre a data da cirurgia até a data de extração do DNA. (²) Tamanho da lesão, em centímetros, conforme informação que consta em laudo patológico – não corresponde ao tamanho da lesão macrodissecada. (³) Separação macroscópica do tecido tumoral e normal por macrodissecções (raspagem manual da lâmina). (⁴) Número de cortes dos blocos de parafina que foram direcionados à extração de DNA e espessura dos cortes em micrômetros. (**) Porcentagem de tumor determinada e com valor atribuído de 100%.

Apêndice 6 - Variantes germinativas classificadas como provavelmente benigna, identificadas nos pacientes XP-C e XP-V.

Paciente (amostra)	Gene	Identificador no dbSNP	c.(HGVS)	p.(HGVS)	ClinVar*	Varsome - ACMG*	Frequência populacional AbraOM	Frequência populacional total <i>gnomAD Exomes</i> (populações com frequência máxima >0,01)
XPSPAC02F0 (XB00002)	<i>POLE</i>	rs5745068	NM_006231.3:c.6494G>A	p.(Arg2165His)	Benigna/Provavelmente benigna	Benigna	0.006568	0.00589 (0.0141 Sul da Ásia e 0.0118 Judia Ashkenazi)
	<i>NPAPI</i>	rs150300590	NM_018958.3:c.3028G>A	p.(Gly1010Arg)	não consta	Provavelmente benigna	0.001642	0.00319 (0.0119 Finlandesa)
	<i>DPP10</i>	rs114821649	NM_001178037.2:c.15G>T	p.(Glu5Asp)	não consta	Provavelmente benigna	0.003284	0.0104 (0.0271 Finlandesa e 0.0161 Europeia não-Finlandesa)
	<i>ANK2</i>	rs200628845	NM_001148.6:c.5240C>G	p.(Pro1747Arg)	Conflitante (Provavelmente benigna/VUS)	Benigna	não consta	0.00034
XPSPAC03F0 (XB00003)	<i>FLG</i>	rs150427834	NM_002016.2:c.8692G>C	p.(Glu2898Gln)	não consta	Provavelmente benigna	0.005833	0.00211 (0.0278 Africana)
	<i>FLG</i>	rs72698904	NM_002016.2:c.2414C>T	p.(Ser805Phe)	não consta	Provavelmente benigna	0.002463	0.00334 (0.014 Finlandesa)
	<i>FLG</i>	rs13376095	NM_002016.2:c.1494G>C	p.(Glu498Asp)	não consta	Benigna	0.007389	0.00198 (0.0267 Africana)
	<i>CSMD2</i>	rs187099966	NM_052896.4:c.9946G>A	p.(Val3316Met)	não consta	Provavelmente benigna	não consta	0.0015 (0.0149 Finlandesa)
	<i>GLIS1</i>	rs142735388	NM_147193.2:c.1289C>T	p.(Pro430Leu)	não consta	Provavelmente benigna	0.002463	0.00378
	<i>GRIN2A</i>	rs142670870	NM_001134407.3:c.3535T>G	p.(Ser1179Ala)	Conflitante (Provavelmente benigna/VUS)	Benigna	não consta	0.0000358
	<i>TTN</i>	rs72646823	NM_001267550.2:c.55553A>G	p.(Lys18518Arg)	Conflitante (Benigna/Provavelmente benigna/VUS)	Benigna	0.004105	0.00162 (0.017 Judeu Ashkenazi)
	<i>TTN</i>	rs72650029	NM_001267550.2:c.32350C>G	p.(Leu10784Val)	Conflitante (Benigna/VUS)	Benigna	0.008210	0.00207 (0.0118 Africana e 0.0171 Judeu Ashkenazi)
	<i>TTN</i>	rs72648964	NM_001267550.2:c.21173G>A	p.(Gly7058Asp)	Benigna/Provavelmente benigna	Benigna	0.006568	0.0018 (0.0169 Judeu Ashkenazi)
	<i>PPP1R3A</i>	rs145687954	NM_002711.4:c.2482C>G	p.(Pro828Ala)	não consta	Provavelmente benigna	0.002463	0.00047
	<i>DNAH11</i>	rs145239537	NM_001277115.2:c.7765G>A	p.(Val2589Ile)	Conflitante (Benigna/Provavelmente benigna/VUS)	Provavelmente benigna	0.002463	0.000557
XPSPAC04F0 (XB00004)	<i>GLIS1</i>	rs111547294	NM_147193.2:c.527G>A	p.(Gly176Asp)	não consta	Provavelmente benigna	0.006568	0.000676
	<i>MYH1</i>	rs149572767	NM_005963.4:c.5708T>A	p.(Ile1903Asn)	não consta	Provavelmente benigna	0.004105	0.00173 (0.011 Judeu Ashkenazi)
	<i>TTN</i>	rs146983095	NM_001267550.2:c.17888A>G	p.(Glu5963Gly)	Conflitante (Benigna/Provavelmente benigna/VUS)	Benigna	0.004105	0.00622 (0.0114 Europeia não-Finlandesa)

Cont/ Apêndice 6

Paciente (amostra)	Gene	Identificador no dbSNP	c.(HGVS)	p.(HGVS)	ClinVar*	Varsome - ACMG*	Frequência populacional AbraOM	Frequência populacional total gnomAD Exomes (populações com frequência máxima >0,01)
XPSPAC04F0 (XB000004)	RGS22	rs141562773	NM_015668.5:c.1663T>A	p.(Cys555Ser)	não consta	Provavelmente benigna	0.002463	0.000164
	FLG	rs149855516	NM_002016.2:c.2589G>T	p.(Arg863Ser)	não consta	Provavelmente benigna	0.000831	0.000223
	LATS2	rs149434310	NM_014572.3:c.3037G>A	p.(Asp1013Asn)	não consta	Provavelmente benigna	0.000821	0.00134 (0.0194 Africana)
XPSPAC05F0 (XB000005)	LATS2	rs61745905	NM_014572.3:c.2556C>G	p.(Asp852Glu)	não consta	Provavelmente benigna	0.000821	0.00139 (0.0201 Africana)
	RBI	rs4151539	NM_000321.2:c.1574C>G	p.(Ala525Gly)	Benigna/Provavelmente benigna	Benigna	0.001642	0.00153 (0.0194 Africana)
	DNAH11	rs201261243	NM_001277115.2:c.2486G>A	p.(Arg829His)	Conflitante (Provavelmente benigna/VUS)	Provavelmente benigna	não consta	0.000398
XPSPAC10F1 (XB000010)	FLG	rs146433981	NM_002016.2:c.4550A>C	p.(Tyr1517Ser)	não consta	Provavelmente benigna	0.006568	0.00109 (0.0144 Africana)
	FLG	rs150525217	NM_002016.2:c.3604G>A	p.(Gly1202Arg)	não consta	Provavelmente benigna	0.006568	0.00103 (0.0144 Africana)
	ARID1A	rs1430351844	NM_006015.6:c.1645C>T	p.(Pro549Ser)	não consta	Provavelmente benigna	não consta	não consta
	CLPTMIL	rs376590693	NM_030782.5:c.62T>C	p.(Val21Ala)	não consta	Provavelmente benigna	não consta	0.0000432
	DNAH11	rs182389910	NM_001277115.2:c.11233G>A	p.(Glu3745Lys)	Conflitante (Benigna/Provavelmente benigna/VUS)	Benigna	0.004926	0.00569 (0.0323 Latina)
	PTCH1	rs115556836	NM_001083602.2:c.1985C>T	p.(Thr662Met)	Benigna/Provavelmente benigna	Benigna	0.001642	0.00159 (0.0221 Africana)
XPSPAC32F0 (XB000021)	PTCH2	rs201618166	NM_003738.5:c.2932G>A	p.(Val978Ile)	não consta	Provavelmente benigna	não consta	0.000016
	NPAP1	rs34391654	NM_018958.3:c.479T>G	p.(Val160Gly)	não consta	Provavelmente benigna	0.006568	0.00254 (0.0285 Africana)
	CRNKL1	rs77988877	NM_016652.5:c.358C>A	p.(Gln120Lys)	não consta	Provavelmente benigna	0.008210	0.0015 (0.0202 Africana)
	CSMD3	rs61759499	NM_198123.2:c.9623A>T	p.(Asn3208Ile)	não consta	Provavelmente benigna	0.003284	0.0048 (0.0124 Sul da Ásia)
	PTPRD	rs143674254	NM_002839.4:c.3030G>C	p.(Gln1010His)	não consta	Benigna	0.012315	0.00852 (0.0605 Latina)

Legenda: (*) As ferramentas que forneceram as informações apresentadas são frequentemente atualizadas – os dados apresentados foram obtidos de acesso realizado em março de 2020.

Apêndice 7 - Variantes germinativas classificadas como benigna, identificadas nos pacientes XP-C e XP-V.

Paciente (amostra)	Gene	Identificador no dbSNP	c.(HGVS)	p.(HGVS)	ClinVar*	Varsome - ACMG*	Frequência populacional AbraOM	Frequência populacional total gnomAD Exomes (populações com frequência máxima >0,01)
XPSPAC05F0 (XB00005)	NOTCH1	rs111309246	NM_017617.5:c.6991G>A	p.(Ala2331Thr)	Benigna	Benigna	0.004926	0.00133 (0.0189 Africana)
XPSPAC10F1 (XB00010)	NOTCH1	rs116317506	NM_017617.5:c.6454G>C	p.(Gly2152Arg)	Benigna	Benigna	0.000821	0.00111 (0.0157 Africana)

Legenda: (*) As ferramentas que forneceram as informações apresentadas são frequentemente atualizadas – os dados apresentados foram obtidos de acesso realizado em março de 2020

.

Apêndice 8 - Variantes somáticas identificadas nos tumores dos pacientes XP-C e XP-V.

ID do paciente_Tipo de tumor_ID do tumor	Coordenada genômica	Ref/Alt	Gene	NM referência	Efeito	VAF	Cobertura da posição genômica	HGVS c.	HGVS p.	SIFT	Polyphen2	Mutation Taster	FATHMM MKL	PROVEAN
XPSPAC02F0 Gástrico Frozen	13:49033886	G/T	<i>RBI</i>	NM_000321.2	LoF	0.054	351	c.2023G>T	p.Glu675Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC02F0 Gástrico Frozen	7:42004899	G/T	<i>GLI3</i>	NM_000168.5	Mis	0.052	477	c.3772C>A	p.Leu1258Ile	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:27023760	C/T	<i>ARID1A</i>	NM_006015.4	Mis	0.429	865	c.866C>T	p.Pro289Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:27058015	C/T	<i>ARID1A</i>	NM_006015.4	LoF	0.373	847	c.1723C>T	p.Gln575Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:27099840	C/T	<i>ARID1A</i>	NM_006015.4	Mis	0.419	859	c.3719C>T	p.Pro1240Leu	D	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:27101424	C/T	<i>ARID1A</i>	NM_006015.4	Mis	0.392	536	c.4706C>T	p.Pro1569Leu	D	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:27648845	C/T	<i>TMEM222</i>	NM_032125.2	Mis	0.336	815	c.157C>T	p.Pro53Ser	D	PoD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:27648846	C/T	<i>TMEM222</i>	NM_032125.2	Mis	0.333	817	c.158C>T	p.Pro53Leu	D	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:34008457	C/T	<i>CSMD2</i>	NM_001281956.1	Mis	0.377	591	c.9140G>A	p.Arg3047Gln	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:34083137	C/T	<i>CSMD2</i>	NM_001281956.1	Mis	0.368	787	c.5908G>A	p.Val1970Met	D	ProD	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:34312555	C/A	<i>CSMD2</i>	NM_001281956.1	Mis	0.397	685	c.963G>T	p.Lys321Asn	T	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:34312571	G/A	<i>CSMD2</i>	NM_001281956.1	Mis	0.39	631	c.947C>T	p.Pro316Leu	T	PoD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:34383803	G/A	<i>CSMD2</i>	NM_001281956.1	Mis	0.347	684	c.812C>T	p.Thr271Ile	T	PoD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:115256528	T/A	<i>NRAS</i>	NM_002524.4	Mis	0.338	805	c.183A>T	p.Gln61His	D	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:120539626	G/A	<i>NOTCH2</i>	NM_024408.3	Mis	0.353	527	c.745C>T	p.Leu249Phe	T	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:120548045	G/A	<i>NOTCH2</i>	NM_024408.3	Mis	0.37	881	c.322C>T	p.Pro108Ser	T	ProD	T	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:152275808	C/T	<i>FLG</i>	NM_002016.1	Mis	0.366	749	c.11554G>A	p.Gly3852Arg	D	PoD	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:152277751	C/T	<i>FLG</i>	NM_002016.1	Mis	0.335	538	c.9611G>A	p.Gly3204Glu	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:152277752	C/T	<i>FLG</i>	NM_002016.1	Mis	0.327	544	c.9610G>A	p.Gly3204Arg	D	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:152283757	C/T	<i>FLG</i>	NM_002016.1	Mis	0.38	847	c.3605G>A	p.Gly1202Glu	T	ProD	T	T	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:152286754	C/T	<i>FLG</i>	NM_002016.1	Mis	0.429	807	c.608G>A	p.Arg203Lys	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:196311291	G/A	<i>KCNT2</i>	NM_198503.3	Mis	0.307	612	c.1471C>T	p.His491Tyr	D	PoD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	1:196392206	G/A	<i>KCNT2</i>	NM_198503.3	Mis	0.369	648	c.1159C>T	p.Arg387Cys	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:116101408	C/T	<i>DPP10</i>	NM_001321905.1	Mis	0.386	456	c.242C>T	p.Ser81Leu	T	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:116101464	G/A	<i>DPP10</i>	NM_001321905.1	Mis	0.443	499	c.298G>A	p.Asp100Asn	T	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:121554996	C/T	<i>GLI2</i>	NM_005270.4	Mis	0.407	863	c.100C>T	p.Pro34Ser	D	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:121554997	C/T	<i>GLI2</i>	NM_005270.4	Mis	0.41	863	c.101C>T	p.Pro34Leu	D	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:121748159	C/T	<i>GLI2</i>	NM_005270.4	Mis	0.365	820	c.4669C>T	p.Pro1557Ser	T	PoD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179396514	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.375	849	c.104828G>A	p.Arg34943Gln	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179400072	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.425	862	c.101270G>A	p.Ser33757Asn	T	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179412596	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.401	853	c.93757G>A	p.Glu31253Lys	T	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179415805	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.327	690	c.91453G>A	p.Gly30485Arg	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179416888	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.436	793	c.90739G>A	p.Asp30247Asn	T	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179423274	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.295	781	c.86912G>A	p.Gly28971Glu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179423275	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.292	781	c.86911G>A	p.Gly28971Arg	D	ProD	D	D	D

Cont/ Apêndice 8

ID do paciente_Tipo de tumor_ID do tumor	Coordenada genômica	Ref/Alt	Gene	NM referência	Efeito	VAF	Cobertura da posição genômica	HGVS c.	HGVS p.	SIFT	Polyphen2	Mutation Taster	FATHMM MKL	PROVEAN
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179431298	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.344	761	c.79561G>A	p.Gly26521Arg	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179432168	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.406	709	c.78691G>A	p.Asp26231Asn	D	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179433419	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.375	807	c.77440G>A	p.Asp25814Asn	T	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179444342	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.44	759	c.67582G>A	p.Glu22528Lys	T	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179456070	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.4	838	c.60382G>A	p.Glu20128Lys	T	PoD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179470419	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.339	534	c.53603G>A	p.Arg17868Lys	T	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179472320	G/A	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.371	746	c.53095C>T	p.Arg17699Cys	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179494065	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	LoF	0.378	702	c.44387G>A	p.Trp14796Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179504437	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.39	696	c.40865G>A	p.Gly13622Glu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179539101	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.37	586	c.34648G>A	p.Glu11550Lys	T	ProD	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179542387	G/A	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.395	801	c.34252C>T	p.Leu11418Phe	T	B	D	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179582871	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.377	589	c.24862G>A	p.Asp8288Asn	T	B	D	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179590617	G/A	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.371	684	c.20432C>T	p.Ser6811Phe	T	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179594636	A/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	LoF	0.385	567	c.18344T>A	p.Leu6115Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179596940	C/T	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.414	749	c.16756G>A	p.Glu5586Lys	T	B	D	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179606066	G/A	<i>TTN</i>	NM_001267550.2	Mis	0.432	767	c.11894C>T	p.Pro3965Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179612423	C/T	<i>TTN</i>	NM_133379.4	Mis	0.4	603	c.14704G>A	p.Glu4902Lys	D	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179614349	C/T	<i>TTN</i>	NM_133379.4	Mis	0.398	674	c.12778G>A	p.Glu4260Lys	D	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179638294	C/T	<i>TTN</i>	NM_133379.4	Mis	0.376	742	c.7489G>A	p.Gly2497Ser	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179639189	C/T	<i>TTN</i>	NM_133379.4	Mis	0.356	393	c.6802G>A	p.Glu2268Lys	T	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179640568	C/T	<i>TTN</i>	NM_133379.4	Mis	0.357	730	c.6023G>A	p.Gly2008Asp	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	2:179666865	C/T	<i>TTN</i>	NM_133379.4	Mis	0.387	631	c.295G>A	p.Ala99Thr	T	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	4:55971048	C/T	<i>KDR</i>	NM_002253.2	LoF	0.339	545	c.1749G>A	p.Trp583Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC03F0 CBC XB00032	4:55972940	C/T	<i>KDR</i>	NM_002253.2	Mis	0.41	560	c.1450G>A	p.Glu484Lys	T	B	T	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	4:114195680	A/C	<i>ANK2</i>	NM_001148.4	Mis	0.409	673	c.1558A>C	p.Met520Leu	D	ProD	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	4:114238943	C/T	<i>ANK2</i>	NM_001148.4	Mis	0.378	651	c.2774C>T	p.Ser925Leu	T	B	T	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	4:114267087	G/A	<i>ANK2</i>	NM_001148.4	Mis	0.379	663	c.4280G>A	p.Arg1427Gln	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	4:153245348	G/A	<i>FBXW7</i>	NM_033632.3	LoF	0.081	899	c.1843C>T	p.Gln615Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC03F0 CBC XB00032	4:175598257	C/T	<i>GLRA3</i>	NM_006529.3	Mis	0.4	625	c.899G>A	p.Ser300Asn	D	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	5:40931237	C/T	<i>C7</i>	NM_000587.3	Mis	0.448	453	c.134C>T	p.Thr451Ile	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	5:40931239	C/T	<i>C7</i>	NM_000587.3	LoF	0.37	433	c.136C>T	p.Gln46Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC03F0 CBC XB00032	5:112174926	C/T	<i>APC</i>	NM_000038.5	Mis	0.364	845	c.3635C>T	p.Ser1212Phe	D	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	5:140481797	G/A	<i>PCDHB3</i>	NM_018937.4	Mis	0.385	715	c.1564G>A	p.Glu522Lys	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	5:140711857	G/A	<i>PCDHGA1</i>	NM_018912.2	Mis	0.354	686	c.1606G>A	p.Asp536Asn	D	ProD	T	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	6:30917568	G/A	<i>DPCR1</i>	NM_080870.3	Mis	0.366	874	c.1327G>A	p.Glu443Lys	NA	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	6:30917872	G/A	<i>DPCR1</i>	NM_080870.3	Mis	0.304	860	c.1631G>A	p.Arg544Lys	NA	B	T	T	N

Cont/ Apêndice 8

ID do paciente_Tipo de tumor_ID do tumor	Coordenada genômica	Ref/Alt	Gene	NM referência	Efeito	VAF	Cobertura da posição genômica	HGVS c.	HGVS p.	SIFT	Polyphen2	Mutation Taster	FATHMM MKL	PROVEAN
XPSPAC03F0 CBC XB00032	6:150023132	G/A	LATS1	NM 004690.3	Mis	0.33	819	c.131C>T	p.Pro44Leu	T	ProD	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	6:150023133	G/A	LATS1	NM 004690.3	Mis	0.33	822	c.130C>T	p.Pro44Ser	T	PoD	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	7:1515682	G/A	INTS1	NM 001080453.2	Mis	0.422	491	c.5404C>T	p.Leu1802Phe	T	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	7:1523761	G/A	INTS1	NM 001080453.2	Mis	0.394	807	c.3307C>T	p.Leu1103Phe	D	ProD	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	7:1536892	G/A	INTS1	NM 001080453.2	Mis	0.396	800	c.1484C>T	p.Ser495Leu	T	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	7:21631079	C/T	DNAH11	NM 001277115.1	Mis	0.357	488	c.2551C>T	p.Pro851Ser	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	7:21723448	G/A	DNAH11	NM 001277115.1	Mis	0.408	663	c.5507G>A	p.Arg1836Gln	T	B	T	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	7:21912965	G/A	DNAH11	NM 001277115.1	Mis	0.429	609	c.12041G>A	p.Arg4014Lys	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	7:113519288	G/A	PPP1R3A	NM 002711.3	Mis	0.415	667	c.1859C>T	p.Ser620Leu	D	B	T	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	7:113519478	C/T	PPP1R3A	NM 002711.3	Mis	0.414	667	c.1669G>A	p.Ala557Thr	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	7:113519519	C/T	PPP1R3A	NM 002711.3	Mis	0.406	681	c.1628G>A	p.Arg543Lys	D	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	7:155604758	G/A	SHH	NM 000193.3	Mis	0.423	794	c.59C>T	p.Ser20Leu	T	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	8:3046419	G/A	CSMD1	NM 033225.5	Mis	0.413	819	c.5513C>T	p.Ser1838Leu	T	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	8:3047505	G/A	CSMD1	NM 033225.5	Mis	0.405	771	c.5327C>T	p.Ser1776Phe	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	8:101054094	G/A	RGS22	NM 015668.4	Mis	0.373	692	c.1874C>T	p.Thr625Ile	T	B	T	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	8:113347669	G/A	CSMD3	NM 198123.1	LoF	0.399	774	c.7054C>T	p.Gln2352Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC03F0 CBC XB00032	8:114110984	C/T	CSMD3	NM 198123.1	LoF	0.331	517	c.917+1G>A	NA	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC03F0 CBC XB00032	8:114110985	C/T	CSMD3	NM 198123.1	LoF	0.331	517	c.917G>A	p.Trp306Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC03F0 CBC XB00032	8:114290821	C/T	CSMD3	NM 198123.1	Mis	0.427	405	c.514G>A	p.Glu172Lys	T	PoD	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:8486130	G/A	PTPRD	NM 002839.3	Mis	0.371	782	c.2687C>T	p.Ser896Leu	T	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:21994146	C/T	CDKN2A	NM 058195.3	Mis	0.307	807	c.185G>A	p.Arg62Lys	D	B	D	T	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:71628197	C/T	PRKACG	NM 002732.3	Mis	0.364	773	c.812G>A	p.Arg271Gln	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:71628735	C/T	PRKACG	NM 002732.3	Mis	0.422	850	c.274G>A	p.Glu92Lys	D	ProD	T	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:98231235	G/A	PTCH1	NM 000264.3	Mis	0.315	845	c.2048C>T	p.Ser683Phe	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:98231290	G/A	PTCH1	NM 000264.3	Mis	0.419	867	c.1993C>T	p.Arg665Cys	D	PoD	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:98239121	G/A	PTCH1	NM 000264.3	Mis	0.431	897	c.1522C>T	p.Leu508Phe	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:127951862	G/A	PPP6C	NM 001123355.1	Mis	0.314	721	c.136C>T	p.Leu46Phe	D	B	T	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:139391439	G/A	NOTCH1	NM 017617.4	Mis	0.327	649	c.6752C>T	p.Ala2251Val	T	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:139391472	G/A	NOTCH1	NM 017617.4	Mis	0.382	577	c.6719C>T	p.Thr2240Ile	T	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:139401299	G/A	NOTCH1	NM 017617.4	Mis	0.327	771	c.3770C>T	p.Pro1257Leu	D	PoD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:139401300	G/A	NOTCH1	NM 017617.4	Mis	0.322	776	c.3769C>T	p.Pro1257Ser	T	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	9:139401423	C/A	NOTCH1	NM 017617.4	Mis	0.377	552	c.3646G>T	p.Val1216Leu	T	PoD	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	10:7751043	G/A	ITIH2	NM 002216.2	Mis	0.369	585	c.251G>A	p.Arg84Gln	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	10:21108411	G/A	NEBL	NM 006393.2	Mis	0.355	667	c.1997C>T	p.Pro666Leu	D	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	10:21108412	G/A	NEBL	NM 006393.2	Mis	0.357	665	c.1996C>T	p.Pro666Ser	T	PoD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	11:533552	C/G	HRAS	NM 005343.3	Mis	0.056	900	c.351G>C	p.Lys117Asn	D	PoD	D	D	D

Cont/ Apêndice 8

ID do paciente_Tipo de tumor_ID do tumor	Coordenada genômica	Ref/Alt	Gene	NM referência	Efeito	VAF	Cobertura da posição genômica	HGVS c.	HGVS p.	SIFT	Polyphen2	Mutation Taster	FATHMM MKL	PROVEAN
XPSPAC03F0 CBC XB00032	11:56237291	G/A	<i>OR5M3</i>	NM 001004742.2	Mis	0.426	450	c.683C>T	p.Ser228Leu	D	ProD	T	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	11:101985044	C/T	<i>YAP1</i>	NM 001282101.1	Mis	0.441	901	c.491C>T	p.Ser164Phe	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	12:129569150	G/A	<i>TMEM132D</i>	NM 133448.2	Mis	0.395	588	c.1541C>T	p.Pro514Leu	T	B	T	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	12:130184521	C/T	<i>TMEM132D</i>	NM 133448.2	Mis	0.394	721	c.802G>A	p.Gly268Arg	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	12:133215780	G/A	<i>POLE</i>	NM 006231.3	Mis	0.361	811	c.5483C>T	p.Pro1828Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	12:133215781	G/A	<i>POLE</i>	NM 006231.3	Mis	0.358	823	c.5482C>T	p.Pro1828Ser	T	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	12:133220511	G/A	<i>POLE</i>	NM 006231.3	Mis	0.425	874	c.4202C>T	p.Ser1401Leu	D	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	12:133256236	G/A	<i>POLE</i>	NM 006231.3	Mis	0.343	652	c.425C>T	p.Pro142Leu	D	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	12:133256237	G/A	<i>POLE</i>	NM 006231.3	Mis	0.345	644	c.424C>T	p.Pro142Ser	T	B	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	13:32953992	C/T	<i>BRCA2</i>	NM 000059.3	Mis	0.393	614	c.9059C>T	p.Ser3020Phe	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	14:20296225	G/A	<i>OR4N2</i>	NM 001004723.2	Mis	0.267	760	c.618G>A	p.Met206Ile	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	16:9858269	G/T	<i>GRIN2A</i>	NM 000833.4	Mis	0.428	663	c.3132C>A	p.His1044Gln	T	B	T	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	17:7573930	G/A	<i>TP53</i>	NM 000546.5	Mis	0.335	387	c.1097C>T	p.Ser366Phe	T	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	17:7578217	G/A	<i>TP53</i>	NM 000546.5	Mis	0.357	832	c.632C>T	p.Thr211Ile	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	17:10400478	C/T	<i>MYH1</i>	NM 005963.3	Mis	0.422	448	c.4564G>A	p.Glu1522Lys	D	PoD	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	17:10417340	G/A	<i>MYH1</i>	NM 005963.3	Mis	0.456	752	c.635C>T	p.Ser212Phe	D	B	T	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	17:41246274	G/A	<i>BRCA1</i>	NM 007294.3	Mis	0.409	818	c.1274C>T	p.Ser425Phe	D	ProD	T	T	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	17:41256239	G/A	<i>BRCA1</i>	NM 007294.3	Mis	0.352	671	c.341C>T	p.Ser114Phe	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	20:2290836	C/T	<i>TGM3</i>	NM 003245.3	Mis	0.407	859	c.194C>T	p.Ser65Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	20:36031771	G/A	<i>SRC</i>	NM 198291.2	Mis	0.446	836	c.1600G>A	p.Glu534Lys	D	B	D	D	N
XPSPAC03F0 CBC XB00032	21:38845030	C/T	<i>DYRK1A</i>	NM 001396.4	Mis	0.326	791	c.55C>T	p.Pro19Ser	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00032	21:38845031	C/T	<i>DYRK1A</i>	NM 001396.4	Mis	0.331	792	c.56C>T	p.Pro19Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00039	1:27089500	C/T	<i>ARID1A</i>	NM 006015.4	Mis	0.273	322	c.2456C>T	p.Pro819Leu	D	PoD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00039	1:45288167	G/A	<i>PTCH2</i>	NM 003738.4	Mis	0.343	327	c.3532C>T	p.Pro1178Ser	T	B	D	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00039	1:152275558	G/A	<i>FLG</i>	NM 002016.1	Mis	0.833	305	c.11804C>T	p.Ser3935Leu	D	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00039	1:152282192	C/T	<i>FLG</i>	NM 002016.1	Mis	0.411	392	c.5170G>A	p.Gly1724Arg	T	ProD	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00039	1:152284816	C/T	<i>FLG</i>	NM 002016.1	Mis	0.432	366	c.2546G>A	p.Arg849Lys	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00039	1:152284885	C/T	<i>FLG</i>	NM 002016.1	Mis	0.379	346	c.2477G>A	p.Arg826Gln	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00039	1:152285384	G/A	<i>FLG</i>	NM 002016.1	Mis	0.341	370	c.1978C>T	p.Pro660Ser	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00039	1:152285642	C/T	<i>FLG</i>	NM 002016.1	Mis	0.435	460	c.1720G>A	p.Glu574Lys	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00039	1:214557402	G/A	<i>PTPN14</i>	NM 005401.4	Mis	0.353	454	c.1796C>T	p.Thr599Ile	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00039	1:214585062	G/A	<i>PTPN14</i>	NM 005401.4	LoF	0.827	393	c.475C>T	p.Gln159Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC03F0 CBC XB00039	3:169998081	C/T	<i>PRKCI</i>	NM 002740.5	Mis	0.387	306	c.772C>T	p.Arg258Trp	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00039	6:30919414	C/T	<i>DPKRI</i>	NM 080870.3	Mis	0.321	325	c.3173C>T	p.Ser1058Phe	NA	ProD	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00039	7:6026694	G/A	<i>PMS2</i>	NM 000535.6	Mis	0.311	334	c.1702C>T	p.Pro568Ser	T	B	T	T	N
XPSPAC03F0 CBC XB00039	13:21549196	G/A	<i>LATS2</i>	NM 014572.2	Mis	0.376	322	c.3080C>T	p.Ser1027Leu	T	B	T	D	N

Cont/ Apêndice 8

ID do paciente_Tipo de tumor_ID do tumor	Coordenada genômica	Ref/Alt	Gene	NM referência	Efeito	VAF	Cobertura da posição genômica	HGVS c.	HGVS p.	SIFT	Polyphen2	Mutation Taster	FATHMM MKL	PROVEAN
XPSPAC03F0 CBC XB00039	17:7577539	G/A	<i>TP53</i>	NM 000546.5	Mis	0.296	371	c.742C>T	p.Arg248Trp	D	ProD	D	D	D
XPSPAC03F0 CBC XB00039	17:7578263	G/A	<i>TP53</i>	NM 000546.5	LoF	0.324	413	c.586C>T	p.Arg196Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC04F0 CBC XB00048	1:120491727	C/A	<i>NOTCH2</i>	NM 024408.3	Mis	0.363	386	c.2502G>T	p.Leu834Phe	D	PoD	D	D	D
XPSPAC04F0 CBC XB00048	2:179396358	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	Mis	0.307	306	c.104984G>A	p.Gly34995Glu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC04F0 CBC XB00048	2:179454624	T/C	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	Mis	0.358	302	c.61828A>G	p.Lys20610Glu	T	B	D	D	N
XPSPAC04F0 CBC XB00048	2:202131282	C/G	<i>CASP8</i>	NM 001228.4	Mis	0.267	323	c.73C>G	p.Leu25Val	D	ProD	D	D	D
XPSPAC04F0 CBC XB00048	6:150001077	T/A	<i>LATS1</i>	NM 004690.3	LoF	0.314	344	c.2527A>T	p.Lys843Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC04F0 CBC XB00048	6:150001079	A/T	<i>LATS1</i>	NM 004690.3	Mis	0.317	344	c.2525T>A	p.Ile842Asn	D	ProD	D	D	D
XPSPAC04F0 CBC XB00048	6:150004355	C/A	<i>LATS1</i>	NM 004690.3	LoF	0.332	374	c.1870G>T	p.Glu624Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC04F0 CBC XB00048	6:150004998	C/A	<i>LATS1</i>	NM 004690.3	Mis	0.38	314	c.1227G>T	p.Met409Ile	D	B	D	D	N
XPSPAC04F0 CBC XB00048	7:21939044	C/A	<i>DNAH11</i>	NM 001277115.1	Mis	0.405	317	c.13140C>A	p.Phe4380Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC04F0 CBC XB00048	22:36702523	C/A	<i>MYH9</i>	NM 002473.5	Mis	0.354	325	c.1974G>T	p.Met658Ile	D	ProD	D	D	D
XPSPAC04F0 CBC XB00048	1:17707603	C/G	<i>PADI6</i>	NM 207421.4	Mis	0.326	436	c.497C>G	p.Ala166Gly	NA	B	NA	T	NA
XPSPAC04F0 CBC XB00048	7:21827137	G/A	<i>DNAH11</i>	NM 001277115.1	Mis	0.453	342	c.9860G>A	p.Arg3287Gln	T	ProD	D	D	D
XPSPAC05F0 CBC XB00050	1:27105854	C/T	<i>ARID1A</i>	NM 006015.4	Mis	0.307	401	c.5465C>T	p.Pro1822Leu	T	ProD	D	D	D
XPSPAC05F0 CBC XB00050	1:45293855	G/A	<i>PTCH2</i>	NM 003738.4	Mis	0.361	319	c.1718C>T	p.Ser573Phe	T	PoD	D	D	N
XPSPAC05F0 CBC XB00050	1:45294730	G/A	<i>PTCH2</i>	NM 003738.4	Mis	0.335	344	c.1388C>T	p.Ala463Val	D	PoD	D	D	D
XPSPAC05F0 CBC XB00050	1:45297439	G/A	<i>PTCH2</i>	NM 003738.4	Mis	0.395	334	c.556C>T	p.Leu186Phe	D	PoD	D	D	N
XPSPAC05F0 CBC XB00050	1:120508138	G/A	<i>NOTCH2</i>	NM 024408.3	Mis	0.33	400	c.1619C>T	p.Pro540Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC05F0 CBC XB00050	1:214557847	G/A	<i>PTPN14</i>	NM 005401.4	LoF	0.321	353	c.1351C>T	p.Gln451Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC05F0 CBC XB00050	2:179396358	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	Mis	0.324	309	c.104984G>A	p.Gly34995Glu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC05F0 CBC XB00050	2:179399704	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	Mis	0.35	300	c.101638G>A	p.Glu33880Lys	D	ProD	D	D	D
XPSPAC05F0 CBC XB00050	2:179404288	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	Mis	0.341	302	c.98504G>A	p.Arg32835Lys	T	B	D	D	N
XPSPAC05F0 CBC XB00050	2:179424765	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	LoF	0.285	319	c.86094G>A	p.Trp28698Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC05F0 CBC XB00050	2:179424766	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	LoF	0.286	318	c.86093G>A	p.Trp28698Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC05F0 CBC XB00050	2:179469607	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	Mis	0.372	302	c.54209G>A	p.Arg18070Lys	T	ProD	D	D	N
XPSPAC05F0 CBC XB00050	3:169953053	C/T	<i>PRKCI</i>	NM 002740.5	Mis	0.396	396	c.137C>T	p.Ser46Phe	T	B	D	D	D
XPSPAC05F0 CBC XB00050	3:173996839	G/A	<i>NLGN1</i>	NM 014932.3	Mis	0.341	308	c.1048G>A	p.Ala350Thr	D	PoD	D	D	D
XPSPAC05F0 CBC XB00050	3:173998345	G/A	<i>NLGN1</i>	NM 014932.3	LoF	0.277	311	c.1724G>A	p.Trp575Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC05F0 CBC XB00050	5:112175502	C/T	<i>APC</i>	NM 000038.5	Mis	0.301	345	c.4211C>T	p.Ser1404Phe	D	ProD	D	D	D
XPSPAC05F0 CBC XB00050	6:30917625	G/A	<i>DPCR1</i>	NM 080870.3	Mis	0.336	377	c.1384G>A	p.Glu462Lys	NA	B	T	T	N
XPSPAC05F0 CBC XB00050	6:30918964	C/T	<i>DPCR1</i>	NM 080870.3	Mis	0.266	342	c.2723C>T	p.Pro908Leu	NA	ProD	T	T	N
XPSPAC05F0 CBC XB00050	6:36652233	C/T	<i>CDKN1A</i>	NM 001291549.1	Mis	0.309	369	c.457C>T	p.Leu153Phe	T	B	T	T	N
XPSPAC05F0 CBC XB00050	9:98229542	C/A	<i>PTCH1</i>	NM 000264.3	Mis	0.405	574	c.2416G>T	p.Val806Phe	D	ProD	D	D	D
XPSPAC05F0 CBC XB00050	9:98229650	G/A	<i>PTCH1</i>	NM 000264.3	LoF	0.367	485	c.2308C>T	p.Arg770Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC05F0 CBC XB00050	9:98231106	G/A	<i>PTCH1</i>	NM 000264.3	Mis	0.379	541	c.2177C>T	p.Pro726Leu	T	B	D	D	D

Cont/ Apêndice 8

ID do paciente_Tipo de tumor_ID do tumor	Coordenada genômica	Ref/Alt	Gene	NM referência	Efeito	VAF	Cobertura da posição genômica	HGVS c.	HGVS p.	SIFT	Polyphen2	Mutation Taster	FATHMM MKL	PROVEAN
XPSPAC05F0 CBC XB000050	9:98238341	G/A	<i>PTCH1</i>	NM 000264.3	Mis	0.349	470	c.1703C>T	p.Pro568Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC05F0 CBC XB000050	10:104268985	C/T	<i>SUFU</i>	NM 016169.3	Mis	0.324	414	c.242C>T	p.Ser81Phe	D	B	D	D	N
XPSPAC05F0 CBC XB000050	13:32912247	C/T	<i>BRCA2</i>	NM 000059.3	Mis	0.292	308	c.3755C>T	p.Ser1252Phe	D	B	T	T	D
XPSPAC05F0 CBC XB000050	15:91333978	C/T	<i>BLM</i>	NM 000057.3	LoF	0.275	305	c.2923C>T	p.Gln975Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC05F0 CBC XB000050	17:7578550	G/A	<i>TP53</i>	NM 000546.5	Mis	0.352	383	c.380C>T	p.Ser127Phe	D	ProD	D	D	D
XPSPAC05F0 CBC XB000050	1:17721574	C/T	<i>PADI6</i>	NM 207421.4	Mis	0.42	370	c.1465C>T	p.Pro489Ser	NA	ProD	NA	D	NA
XPSPAC05F0 CBC XB000050	6:30918963	C/T	<i>DPCR1</i>	NM 080870.3	Mis	0.284	486	c.2722C>T	p.Pro908Ser	NA	ProD	T	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB000069	1:152285188	G/A	<i>FLG</i>	NM 002016.1	Mis	0.194	657	c.2174C>T	p.Thr725Ile	T	B	T	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB000069	1:214625164	G/A	<i>PTPN14</i>	NM 005401.4	LoF	0.261	791	c.328C>T	p.Gln110Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC32F0 CBC XB000069	2:16082374	C/T	<i>MYCN</i>	NM 005378.5	Mis	0.264	516	c.188C>T	p.Pro63Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB000069	2:179411756	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	Mis	0.253	575	c.94496G>A	p.Arg31499Lys	T	ProD	D	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB000069	3:142257418	G/A	<i>ATR</i>	NM 001184.3	Mis	0.173	602	c.3631C>T	p.Leu1211Phe	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB000069	5:112173828	C/T	<i>APC</i>	NM 000038.5	Mis	0.226	667	c.2537C>T	p.Ser846Phe	D	PoD	D	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB000069	7:21934529	G/A	<i>DNAH11</i>	NM 001277115.1	Mis	0.263	475	c.12961G>A	p.Glu4321Lys	D	PoD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB000069	13:32914451	C/T	<i>BRCA2</i>	NM 000059.3	LoF	0.207	643	c.5959C>T	p.Gln1987Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC32F0 CBC XB000069	17:37866080	C/T	<i>ERBB2</i>	NM 004448.3	Mis	0.247	667	c.589C>T	p.Pro197Ser	T	B	D	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB000069	17:37866081	C/T	<i>ERBB2</i>	NM 004448.3	Mis	0.246	672	c.590C>T	p.Pro197Leu	D	B	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB000069	17:38556609	G/A	<i>TOP2A</i>	NM 001067.3	Mis	0.221	757	c.2852C>T	p.Pro951Leu	D	B	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB000071	1:152278714	C/T	<i>FLG</i>	NM 002016.1	Mis	0.33	814	c.8648G>A	p.Arg2883Lys	T	B	T	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB000071	1:152279003	G/A	<i>FLG</i>	NM 002016.1	Mis	0.33	885	c.8359C>T	p.Arg2787Cys	D	B	T	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB000071	1:152285066	C/T	<i>FLG</i>	NM 002016.1	Mis	0.335	911	c.2296G>A	p.Gly766Arg	T	B	T	T	D
XPSPAC32F0 CBC XB000071	2:179433994	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	LoF	0.267	918	c.76865G>A	p.Trp25622Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC32F0 CBC XB000071	2:179440037	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	Mis	0.249	897	c.70822G>A	p.Val23608Met	D	ProD	D	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB000071	2:179466234	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	Mis	0.309	889	c.55490G>A	p.Arg18497Lys	T	B	T	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB000071	2:179587584	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	Mis	0.261	886	c.22042G>A	p.Gly7348Arg	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB000071	2:179596585	C/T	<i>TTN</i>	NM 001267550.2	Mis	0.302	905	c.17017G>A	p.Asp5673Asn	T	B	D	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB000071	2:179612842	G/A	<i>TTN</i>	NM 133379.4	Mis	0.259	895	c.14285C>T	p.Ser4762Phe	T	B	D	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB000071	2:179635171	C/T	<i>TTN</i>	NM 133379.4	Mis	0.232	792	c.8348G>A	p.Arg2783Lys	T	B	T	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB000071	3:142280112	G/A	<i>ATR</i>	NM 001184.3	Mis	0.257	907	c.1322C>T	p.Ser441Phe	T	B	T	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB000071	4:55948737	G/A	<i>KDR</i>	NM 002253.2	Mis	0.246	853	c.3728C>T	p.Pro1243Leu	T	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB000071	4:55962473	G/A	<i>KDR</i>	NM 002253.2	Mis	0.27	858	c.2651C>T	p.Ser884Phe	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB000071	4:114254262	G/A	<i>ANK2</i>	NM 001148.4	Mis	0.256	883	c.3277G>A	p.Glu1093Lys	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB000071	4:114278492	G/A	<i>ANK2</i>	NM 001148.4	Mis	0.255	929	c.8718G>A	p.Met2906Ile	T	B	T	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB000071	4:175580319	C/T	<i>GLRA3</i>	NM 006529.3	LoF	0.216	636	c.957G>A	p.Trp319Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC32F0 CBC XB000071	4:175580320	C/T	<i>GLRA3</i>	NM 006529.3	LoF	0.218	629	c.956G>A	p.Trp319Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC32F0 CBC XB000071	5:1320797	G/A	<i>CLPTMIL</i>	NM 030782.4	Mis	0.241	725	c.1466C>T	p.Pro489Leu	D	ProD	D	D	D

Cont/ Apêndice 8

ID do paciente_Tipo de tumor_ID do tumor	Coordenada genômica	Ref/Alt	Gene	NM referência	Efeito	VAF	Cobertura da posição genômica	HGVS c.	HGVS p.	SIFT	Polyphen2	Mutation Taster	FATHMM MKL	PROVEAN
XPSPAC32F0 CBC XB00071	5:40976851	G/A	C7	NM 000587.3	LoF	0.282	882	c.2075-1G>A	NA	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC32F0 CBC XB00071	5:112154790	C/T	APC	NM 000038.5	Mis	0.241	896	c.1061C>T	p.Pro354Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00071	5:140481666	G/A	PCDHB3	NM 018937.4	Mis	0.283	665	c.1433G>A	p.Arg478Lys	T	B	T	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB00071	5:140482361	G/A	PCDHB3	NM 018937.4	Mis	0.266	541	c.2128G>A	p.Ala710Thr	D	B	T	T	D
XPSPAC32F0 CBC XB00071	6:150023019	G/A	LATS1	NM 004690.3	LoF	0.271	927	c.244C>T	p.Arg82Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC32F0 CBC XB00071	7:1519199	G/A	INTS1	NM 001080453.2	Mis	0.278	319	c.4196C>T	p.Pro1399Leu	T	B	T	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB00071	7:1519200	G/A	INTS1	NM 001080453.2	Mis	0.276	315	c.4195C>T	p.Pro1399Ser	T	B	T	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB00071	7:6426892	C/T	RAC1	NM 018890.3	Mis	0.139	835	c.85C>T	p.Pro29Ser	D	PoD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00071	7:6426893	C/T	RAC1	NM 018890.3	Mis	0.131	835	c.86C>T	p.Pro29Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00071	7:21721168	C/T	DNAH11	NM 001277115.1	Mis	0.294	561	c.5333C>T	p.Ser1778Phe	D	PoD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00071	7:128846398	C/T	SMO	NM 005631.4	Mis	0.248	763	c.1234C>T	p.Leu412Phe	T	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00071	9:98209294	G/A	PTCH1	NM 000264.3	Mis	0.329	913	c.4244C>T	p.Pro1415Leu	D	ProD	D	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB00071	9:139390786	G/A	NOTCH1	NM 017617.4	Mis	0.267	610	c.7405C>T	p.Pro2469Ser	T	PoD	D	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB00071	9:139391908	G/A	NOTCH1	NM 017617.4	Mis	0.228	694	c.6283C>T	p.Arg2095Cys	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00071	12:129559218	C/T	TMEM132D	NM 133448.2	LoF	0.294	879	c.2502G>A	p.Trp834Ter	NA	NA	D	T	NA
XPSPAC32F0 CBC XB00071	12:133202759	G/A	POLE	NM 006231.3	Mis	0.249	869	c.6475C>T	p.Arg2159Cys	D	B	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00071	18:50592432	G/A	DCC	NM 005215.3	Mis	0.274	825	c.1157G>A	p.Arg386Gln	T	B	D	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB00071	22:36708219	G/A	MYH9	NM 002473.5	Mis	0.073	675	c.1603C>T	p.Pro535Ser	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00071	20:20033169	G/A	CRNKL1	NM 016652.5	Mis	0.256	905	c.301C>T	p.His101Tyr	D	PoD	D	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB00072	1:17715305	G/A	PADI6	NM 207421.4	Mis	0.17	606	c.892G>A	p.Val298Met	NA	ProD	NA	D	NA
XPSPAC32F0 CBC XB00072	1:120458194	G/A	NOTCH2	NM 024408.3	Mis	0.171	656	c.7151C>T	p.Pro2384Leu	T	ProD	D	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB00072	1:120491722	G/A	NOTCH2	NM 024408.3	Mis	0.094	662	c.2507C>T	p.Pro836Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	1:152286205	G/A	FLG	NM 002016.1	Mis	0.165	654	c.1157C>T	p.Ser386Phe	D	ProD	T	T	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	1:214557885	G/A	PTPN14	NM 005401.4	Mis	0.171	610	c.1313C>T	p.Ser438Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	2:179400748	C/T	TTN	NM 001267550.2	Mis	0.128	602	c.100726G>A	p.Gly33576Arg	T	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	2:179403498	C/T	TTN	NM 001267550.2	Mis	0.137	627	c.99058G>A	p.Glu33020Lys	T	PoD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	2:179403499	C/T	TTN	NM 001267550.2	LoF	0.137	628	c.99057G>A	p.Trp33019Ter	NA	NA	D	D	NA
XPSPAC32F0 CBC XB00072	2:179423271	C/T	TTN	NM 001267550.2	Mis	0.17	671	c.86915G>A	p.Ser28972Asn	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	2:179424995	C/T	TTN	NM 001267550.2	Mis	0.166	718	c.85864G>A	p.Glu28622Lys	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	2:179431418	C/T	TTN	NM 001267550.2	Mis	0.158	632	c.79441G>A	p.Ala26481Thr	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	2:179441692	C/T	TTN	NM 001267550.2	Mis	0.152	678	c.69370G>A	p.Glu23124Lys	T	PoD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	2:179454870	C/T	TTN	NM 001267550.2	Mis	0.148	705	c.61582G>A	p.Asp20528Asn	T	B	D	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB00072	2:179500879	C/T	TTN	NM 001267550.2	Mis	0.146	637	c.41419G>A	p.Glu13807Lys	D	PoD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	2:179501193	C/T	TTN	NM 001267550.2	Mis	0.126	627	c.41261G>A	p.Gly13754Asp	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	2:179501194	C/T	TTN	NM 001267550.2	Mis	0.127	630	c.41260G>A	p.Gly13754Ser	T	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	4:114288817	C/T	ANK2	NM 001148.4	Mis	0.116	654	c.11128C>T	p.Pro3710Ser	D	ProD	D	D	D

Cont/ Apêndice 8

ID do paciente_Tipo de tumor_ID do tumor	Coordenada genômica	Ref/Alt	Gene	NM referência	Efeito	VOF	Cobertura da posição genômica	HGVS c.	HGVS p.	SIFT	Polyphen2	Mutation Taster	FATHMM MKL	PROVEAN
XPSPAC32F0 CBC XB00072	4:114288818	C/T	ANK2	NM 001148.4	Mis	0.117	653	c.11129C>T	p.Pro3710Leu	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	5:112155038	C/T	APC	NM 000038.5	Mis	0.125	607	c.1309C>T	p.Pro437Ser	D	B	D	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB00072	5:112155039	C/T	APC	NM 000038.5	Mis	0.125	601	c.1310C>T	p.Pro437Leu	D	B	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	5:112174995	C/T	APC	NM 000038.5	Mis	0.134	648	c.3704C>T	p.Ser1235Phe	D	PoD	D	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB00072	6:30918072	G/A	DPCR1	NM 080870.3	Mis	0.112	730	c.1831G>A	p.Ala611Thr	NA	B	T	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB00072	6:30919725	G/A	DPCR1	NM 080870.3	Mis	0.131	680	c.3484G>A	p.Val1162Ile	NA	PoD	T	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB00072	6:30920880	C/T	DPCR1	NM 080870.3	Mis	0.155	656	c.4168C>T	p.Pro1390Ser	NA	PoD	T	T	N
XPSPAC32F0 CBC XB00072	6:150004339	G/A	LATS1	NM 004690.3	Mis	0.137	714	c.1886C>T	p.Ser629Phe	D	ProD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	7:1513285	C/G	INTS1	NM 001080453.2	Mis	0.135	615	c.5874G>C	p.Lys1958Asn	D	PoD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	13:32900697	C/T	BRCA2	NM 000059.3	Mis	0.102	637	c.578C>T	p.Ser193Phe	D	ProD	D	D	N
XPSPAC32F0 CBC XB00072	15:28369277	G/A	HERC2	NM 004667.5	Mis	0.153	630	c.13094C>T	p.Pro4365Leu	D	PoD	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	15:28493739	A/G	HERC2	NM 004667.5	Mis	0.128	615	c.3194T>C	p.Leu1065Pro	D	B	D	D	D
XPSPAC32F0 CBC XB00072	17:41243835	G/A	BRCA1	NM 007294.3	Mis	0.123	642	c.3713C>T	p.Pro1238Leu	D	B	T	T	N

Legenda: (Ref/Alt) Nucleotídeo referência e nucleotídeo alterado; (VOF) Frequência alélica da variante; (Mis) *Missense*; (LoF) Perda de função; (PoD) Possivelmente deletéria; (ProD) Provavelmente deletéria; (B) Benigna; (D) Deletéria; (T) Tolerada; (N) Neutra; (NA) Não se aplica.