

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS GERMINATIVAS  
NOS PACIENTES COM CRITÉRIO CLÍNICO PARA MELANOMA  
HEREDITÁRIO EM ACOMPANHAMENTO NO AMBULATÓRIO DE  
MELANOMA FAMILIAL DO NÚCLEO DE CÂNCER DE PELE DO  
A.C.CAMARGO CANCER CENTER: ASSOCIAÇÃO COM  
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

**BIANCA COSTA SOARES DE SÁ**

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

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra Dirce Maria Carraro**

**Co-Orientador: Dr João Pedreira Duprat Neto**

**São Paulo**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente\*

S676 Soares de Sá, Bianca Costa

**Investigação de variantes genéticas germinativas nos pacientes com critério clínico para melanoma hereditário em acompanhamento no ambulatório de melanoma familiar do núcleo de câncer de pele do A.C.Camargo Cancer Center: associação com características clínicas.**

Bianca Costa Soares de Sá – São Paulo 2020.

57p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. Melanoma/genética/Melanoma/genetics. 2. Hereditariedade/Hereditity. 3. Susceptibilidade a Doenças/Disease Susceptibility. 4. Neoplasias Cutâneas/Skin Neoplasms.

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

Gostaria de agradecer a todos que, de formas diversas, tornaram possível a realização desse projeto:

- À minha orientadora, Dra Dirce Maria Carraro. Obrigada por todos os seus ensinamentos, pela sua dedicação e por ter acreditado desde o início, coordenando de forma tão brilhante e sensata o nosso grupo multidisciplinar.
- Ao Dr João Duprat, diretor do Núcleo de Câncer de Pele e meu co-orientador. Obrigada por todas as oportunidades e pela confiança.
- À Luciana Facure Moredo, enfermeira de pesquisa do Núcleo de Câncer de Pele e, acima de tudo, minha grande amiga. Obrigada pelo seu trabalho sempre realizado com muita dedicação e esmero e pelo companheirismo nesses 10 anos de Ambulatório de Melanoma Familiar.
- À Dra Giovana Tardin Torrezan, pesquisadora do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do CIPE. Agradeço sua paciência em me ensinar tantos assuntos desafiadores, sua disposição e sua análise tão apurada de todos os dados do nosso projeto.
- Ao Departamento de Oncogenética pelo trabalho conjunto na orientação dos pacientes e pelos ensinamentos nesse processo.
- À Banca de Qualificação por todas as sugestões e orientações tão preciosas.
- A todos os amigos do Núcleo de Câncer de Pele por todos os anos de parceria.
- Ao Serviço de Estatística pelo empenho nas análises dos nossos dados.
- À Sra Suely Francisco do Ensino – Apoio ao aluno. Agradeço seu tempo dedicado com tanto carinho e paciência.
- Ao A.C.Camargo Cancer Center por sempre proporcionar oportunidades de aprendizado e crescimento profissional.
- Ao meu marido Newton e meus filhos Bruna, Gabriel e Thiago. Agradeço a compreensão nos momentos de minha ausência, o incentivo sempre presente e ao seu amor - tudo que mais preciso.
- Aos meus pais, Leila Maria e Antônio José. Obrigada mais uma vez por terem me trazido até aqui.
- Aos queridos pacientes do Ambulatório de Melanoma Familiar, razão de ser de todo esse projeto. Agradeço sua disponibilidade em participar, sua alegria em contribuir com o meu aprendizado e sua confiança.

## RESUMO

Soares de Sá BC. **Investigação de variantes genéticas germinativas nos pacientes com critério clínico para melanoma hereditário em acompanhamento no ambulatório de melanoma familiar do núcleo de câncer de pele do A.C.Camargo Cancer Center: associação com características clínicas.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

**Introdução:** Cerca de 5 a 10% de todos os melanomas ocorrem em famílias com predisposição hereditária. A Síndrome do Melanoma Familiar (SMF) é síndrome de câncer hereditário que confere predisposição ao melanoma cutâneo e caracteriza-se pela presença de múltiplos casos de melanoma na família ou múltiplos casos de melanoma no mesmo indivíduo, podendo estar associada a outras neoplasias como o carcinoma de pâncreas. Os genes de alta penetrância mais conhecidos, relacionados a SMF, são *CDKN2A* e *CDK4*. Ambos atuam no controle negativo do ciclo celular. As variantes patogênicas em *CDKN2A* correspondem a 10% das famílias com dois casos de melanoma e a 30 a 40% das famílias com 3 ou mais casos, apresentando associação com câncer de pâncreas. Na SMF a prevalência de variante em *CDK4* varia de 1 a 3%. Mais recentemente, variantes patogênicas em novos genes de alta penetrância foram identificadas contribuindo com a caracterização de diferentes vias de susceptibilidade ao melanoma, incluindo genes relacionados a diferenciação celular, resposta a dano do DNA e manutenção dos telômeros, como os genes *BAP1*, *POT1*, *ACD*, *TERF2IP* e *TERT*. São ainda de grande importância na determinação de risco para o melanoma cutâneo, variantes em genes de baixa a moderada penetrância relacionados a pigmentação da pele e diferenciação dos melanócitos como os genes *MC1R* e *MITF*. **Objetivos:** Identificar variantes germinativas em genes de alta e baixa a moderada penetrância associados a risco aumentado para melanoma em pacientes com critérios clínicos para a SMF, associando os achados às características clínicas dos pacientes. **Material e Métodos:** Seleção de pacientes com três ou mais melanomas (melanomas primários múltiplos – MPM) ou pacientes com diagnóstico de melanoma com dois ou mais casos de melanoma ou câncer de pâncreas em parentes de primeiro ou segundo grau (melanoma familiar – MF). O DNA genômico foi isolado a partir de sangue periférico ou saliva e realizado teste genético com painel customizado incluindo os genes *ACD*, *BAP1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *POT1*, *TERT*, *TERF2IP*, *MC1R* e *MITF*. Foi realizada análise dos dados clínicos dos pacientes e histopatológicos dos seus tumores além de comparação entre os diferentes grupos (MPM x MF) e comparação das frequências de variantes no gene *MC1R* com grupo controle.

**Resultados:** Foram incluídos 37 pacientes com média de idade ao diagnóstico de 40,1 anos, prevalência do fenótipo de pele clara (89,2%), cabelos e olhos claros (> 50% dos casos), além de grande número de pacientes com história de queimadura solar na infância (89,2%) e múltiplos nevos (> 75% com > 50 nevos). Total de 148 melanomas primários, com predomínio do tipo extensivo superficial (85,8%), localização mais frequente no tronco (52,7%) e maior prevalência de melanomas finos (96,7%). Foram encontrados dois pacientes (5,6%) com variantes patogênicas (P) e quatro (11,1%) com variantes de significado incerto (VUS), nos genes de alta penetrância estudados. As variantes P foram detectadas nos genes *CDKN2A* e *BAP1*. Variantes no gene *MC1R* foram encontradas em 33 casos (89,2%) com predomínio das variantes classificadas como RHC ou alelos R – variantes de moderada penetrância (51,4%). As variantes RHC, assim como as variantes *MC1R* de risco desconhecido (chamados alelos u), foram mais frequentes em nossa coorte quando comparados ao grupo controle. **Discussão:** A frequência de variantes patogênicas nos genes de alta penetrância estudados foi baixa, considerando-se os critérios utilizados para seleção dos probandos e do número de melanomas nos pacientes e seus familiares. Em algumas famílias, o risco aumentado para melanoma pode estar relacionado à presença dos alelos R ou dos alelos u de *MC1R*, combinação de duas variantes distintas de *MC1R* em alguns casos, associado muitas vezes a fenótipo e comportamento de risco. **Conclusão:** A baixa frequência de variantes nos genes de alta penetrância e a alta prevalência de variantes de *MC1R* encontradas em nossa coorte mostra a importância do genótipo de *MC1R* na determinação do risco de melanoma nas famílias brasileiras com critérios clínicos para a Síndrome do Melanoma Familiar.

**Descritores:** Melanoma/genética. Hereditariedade. Susceptibilidade a Doenças. Neoplasias Cutâneas

## ABSTRACT

Soares de Sá BC. [Germline genetic testing in patients with clinical criteria for hereditary melanoma from the familial melanoma outpatient clinic of the skin cancer Department of A.C.Camargo Cancer Center: correlation with clinical features]. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

**Introduction:** Approximately 5 to 10% of all melanoma cases occur in a familial context. Familial melanoma syndrome confers hereditary predisposition to cutaneous melanoma and other malignancies such as pancreatic carcinoma. It is characterized by families with multiple melanoma cases or individuals with multiple primary melanomas. *CDKN2A* and *CDK4* were the first and second high-penetrance melanoma gene identified, respectively, both acting in cell cycle regulation. In general, *CDKN2A* pathogenic variants are found in 10 % of melanoma-prone families with two melanoma cases and in 30 to 40% of families with 3 or more cases, being associated with pancreatic cancer. The prevalence of *CDK4* pathogenic variants varies from 1 to 3%. More recently, pathogenic variants in new high-penetrance genes have been identified, contributing to characterization of distinct melanoma susceptibility pathways, including genes related to cellular differentiation, response to DNA damage and maintenance of telomeres, such as *BAP1*, *POT1*, *ACD*, *TERF2IP* and *TERT*. Variants in low- to moderate-penetrance genes related to skin pigmentation and melanocytes differentiation, such as *MC1R* and *MITF*, are also of great importance in determining risk for cutaneous melanoma.

**Objectives:** To identify germline variants in high and low- to moderate-penetrance genes associated with increased risk for melanoma in patients with clinical criteria for familial melanoma syndrome, and to correlate the findings with clinical features of the patients.

**Material and Methods:** Patients diagnosed with three or more melanomas (multiple primary melanomas - MPM) or melanoma patients with two or more cases of melanoma or pancreatic cancer in first or second degree relatives (familial melanoma - FM). The genomic DNA was isolated from peripheral blood or saliva and genetic testing was performed using a panel including *ACD*, *BAP1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *POT1*, *TERT*, *TERF2IP*, *MC1R* and *MITF* genes. We analyzed patients' clinical features and tumors' histopathological characteristics, comparing these findings between the two groups (MPM x FM). In addition, we performed comparison of *MC1R* variants frequencies between the cohort and the control group. **Results:** Thirty seven

patients were included, with a mean age at diagnosis of 40.1 years, prevalence of the fair skin phenotype (89.2%), blond/red hair and light eyes (> 50%), history of childhood sunburn (89.2%) and multiple nevi (> 75% with > 50 nevi). A total of 148 primary melanomas were identified with a predominance of superficial spreading histological subtype (85.8%), location on the trunk (52.7%) and thin melanomas (96.7%). We identified two patients (5.6%) with pathogenic (P) variants and four patients (11.1%) with variants of uncertain significance (VUS) in the high-penetrance genes studied. The P variants were detected in *CDKN2A* and *BAP1* genes. *MC1R* variants were found in 33 cases (89.2%) with a predominance of RHC variants or R alleles – moderate-penetrance variants (51.4%). The RHC variants as well as the unknown risk variants (the so-called u alleles) were more frequent in our cohort when compared to the control group.

**Discussion:** The frequency of pathogenic variants in the high-penetrance genes studied was low, considering the proband selection criteria and the number of melanomas found in the patients and their families. In some families, the increased risk for melanoma may be related to the presence of the R alleles or the u alleles of *MC1R*, a combination of two distinct *MC1R* variants in some cases, both conditions often associated with phenotype and behavior of risk.

**Conclusion:** The low frequency of pathogenic variants in the high-penetrance genes and the high prevalence of *MC1R* variants found in our cohort show the importance of *MC1R* genotype in determining the risk of melanoma in the Brazilian melanoma-prone families.

**Keywords:** Melanoma/genetics. Heredity. Disease Susceptibility. Skin Neoplasms.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Heredograma dos probandos MH01 e MH02.....	27
<b>Figura 2</b>	Heredograma dos probandos MH03 e MH04.....	28
<b>Figura 3</b>	Heredogramas probandos MH05 e MH06.....	28
<b>Figura 4</b>	Heredograma dos probandos MH07 e MH08.....	29
<b>Figura 5</b>	Heredograma dos probandos MH09 e MH10.....	29
<b>Figura 6</b>	Heredograma do probando MH11 .....	30
<b>Figura 7</b>	Heredograma dos probandos MH12 e MH14.....	30
<b>Figura 8</b>	Heredograma do probando MH16 .....	31
<b>Figura 9</b>	Heredograma dos probandos MH15 e MH17.....	31
<b>Figura 10</b>	Heredograma do probando MH20 .....	32
<b>Figura 11</b>	Heredograma dos probandos MH18 e MH19.....	32
<b>Figura 12</b>	Heredograma dos probandos MH21 e MH22.....	33
<b>Figura 13</b>	Heredograma dos probandos MH23 e MH24.....	33
<b>Figura 14</b>	Heredograma probando MH28 .....	34
<b>Figura 15</b>	Heredograma dos probandos MH25 e MH26.....	34
<b>Figura 16</b>	Heredograma dos probandos MH27 e MH29.....	35



<b>Figura 17</b>	Heredograma dos probandos MH30 e MH31.....	35
<b>Figura 18</b>	Heredograma do probando MH32.....	36
<b>Figura 19</b>	Heredograma dos probandos MH33 e MH34.....	36
<b>Figura 20</b>	Heredograma dos probandos MH35 e MH36.....	37
<b>Figura 21</b>	Heredograma dos probandos MH37 e MH38.....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação e características fenotípicas dos 37 probandos .....	19
<b>Tabela 2</b>	Características histopatológicas dos 148 melanomas primários diagnosticados nos 37 probandos .....	20
<b>Tabela 3</b>	MF x MPM-Comparação das características fenotípicas, idade ao diagnóstico e características dos tumores .....	21
<b>Tabela 4</b>	Descrição das variantes P e VUS detectadas nos 36 probandos .....	22
<b>Tabela 5</b>	Descrição das variantes de <i>MC1R</i> nos 37 probandos .....	24
<b>Tabela 6</b>	Características fenotípicas dos probandos e classificação quanto às variantes de <i>MC1R</i> .....	25
<b>Tabela 7</b>	Variantes RHC de <i>MC1R</i> x cor dos cabelos nos 37 pacientes estudados	26
<b>Tabela 8</b>	Comparação das frequências das variantes de <i>MC1R</i> -coorte x grupo controle .....	26

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AbraOM</b>	Arquivo Brasileiro Online de Variantes
<b>ACD</b>	gene <i>adrenocortical dysplasia homologue</i>
<b>ACMG</b>	<i>American College of Medical Genetics</i>
<b><math>\alpha</math>-MSH</b>	<i><math>\alpha</math>-melanocyte-stimulating hormone</i>
<b>B</b>	variante benigna
<b>BAP1</b>	gene <i>BRCA-1-associated protein-1</i>
<b>BIMTs</b>	<i>BAP1-inactivated melanocytic tumors</i>
<b>CDK4</b>	gene <i>cyclin-dependent kinase 4</i>
<b>CDK4</b>	quinase dependente de ciclina
<b>CDKN2A</b>	gene <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>EDTA</b>	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>IC</b>	intervalo de confiança
<b>GIST</b>	tumor estromal gastrointestinal
<b>MC</b>	melanoma cutâneo
<b>MC1R</b>	gene <i>melanocortin-1 receptor</i>
<b>MC1R</b>	receptor de melanocortina-1
<b>MITF</b>	gene <i>microphthalmia-associated transcription fator</i>
<b>MDM2</b>	<i>murine double minute 2</i>
<b>MF</b>	história familiar de melanoma e/ou câncer de pâncreas
<b>MPM</b>	melanomas primários múltiplos sem história familiar
<b>OR</b>	<i>odds ratio</i>
<b>P</b>	variante patogênica
<b>PB</b>	variante provavelmente benigna
<b>PP</b>	variante provavelmente patogênica
<b>p16INK</b>	proteína p16
<b>p14ARF</b>	proteína p14
<b>POT1</b>	gene <i>protection of telomeres 1</i>
<b>RHC</b>	<i>red hair color</i>
<b>ROS</b>	espécies reativas de oxigênio

<b>RUV</b>	radiação ultravioleta
<b>SMF</b>	Síndrome do Melanoma Familiar
<b>SNA</b>	Síndrome dos Nevo Atípico
<b><i>TERF2IP</i></b>	gene <i>telomeric repeat binding factor 2, interacting protein</i>
<b><i>TERT</i></b>	gene <i>telomerase RT</i>
<b>VUS</b>	variante de significado incerto

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Melanoma Cutâneo .....	1
1.2	Síndrome do Melanoma Familiar .....	1
1.2.1	Genes de Alta Penetrância .....	2
1.2.2	Genes de Baixa a Moderada Penetrância.....	7
1.3	Seguimento dos Pacientes de Alto Risco.....	9
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
3.1	Objetivo Primário .....	11
3.2	Objetivos Secundários .....	11
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
4.1	CrITÉrios de Inclusão .....	12
4.2	Banco de Dados .....	12
4.3	Aconselhamento Genético .....	13
4.4	Coleta.....	13
4.5	Testes Genéticos .....	14
4.6	Análise Estatística.....	15
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## **ANEXOS**

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

**Anexo 2** Artigo publicado na revista BMC Cancer em 2019

## **APÊNDICE**

**Apêndice 1** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 MELANOMA CUTÂNEO**

O melanoma cutâneo (MC) resulta de interações complexas entre fatores genéticos e ambientais. A radiação ultravioleta (RUV) é o fator ambiental mais conhecido e sua ação na gênese dos melanomas está intimamente relacionada a fatores constitucionais como pele clara com dificuldade de bronzeamento e susceptibilidade a queimadura solar, cabelos ruivos e loiros, olhos claros e efélides múltiplas. Outro fator constitucional de risco é a presença de múltiplos nevos e nevo atípico, sendo a síndrome do nevo atípico (SNA) a característica fenotípica mais relevante (Silva et al. 2011). Porém, história familiar e pessoal de melanoma são os fatores de maior risco (Garbe et al. 1994; Holly et al. 1995; Bliss et al. 1995; Bränström et al. 2010).

O melanoma cutâneo desenvolve-se a partir da transformação maligna dos melanócitos determinada pelo acúmulo de mutações que promovem proliferação, invasão e capacidade de escape do sistema imune, processo chamado de melanomagênese (Meyle e Guldborg 2009; Ming et al. 2020). Estas mutações podem ser adquiridas aleatoriamente, situação que representa os chamados melanomas esporádicos. Porém a susceptibilidade ao melanoma pode ser determinada pela presença de variantes germinativas caracterizando o melanoma hereditário (Hansen et al. 2004; Meyle e Guldborg 2009; Ransohoff et. 2016). Nos casos hereditários, o melanoma cutâneo pode ser o câncer dominante na família, caracterizando a Síndrome do Melanoma Familiar (SMF) ou pode ser parte de síndrome distinta de câncer hereditário, como tumor secundário (Ransohoff et. 2016; Leachman et al. 2017; Toussi et al. 2020).

## **1.2 SÍNDROME DO MELANOMA FAMILIAL**

Estima-se que cerca de 5 a 10% de todos os melanomas ocorram em famílias com predisposição hereditária (Kannengiesser et al. 2009). A SMF é considerada uma síndrome clínica que confere predisposição ao melanoma, associado a outras neoplasias como o carcinoma de pâncreas e tumores do sistema nervoso central (Azizi et al. 1995; Vasen et al. 2000; Kannengiesser et al. 2003; Goldstein et al. 2006).

Em relação aos critérios clínicos, a SMF pode ser definida pela presença de dois ou mais casos de melanoma na família ou melanoma em associação com câncer de pâncreas (MF), em

parentes de primeiro ou segundo grau (na mesma ramificação); ou dois ou mais casos de melanoma no mesmo indivíduo (melanomas primários múltiplos - MPM). Em regiões onde a incidência do melanoma é caracterizada como moderada ou alta (acima de 10 casos novos para cada 100.000 habitantes), deve-se considerar famílias ou indivíduos com três ou mais melanomas. (Platz et al. 2000; Hansson et al. 2008; Leachman et al. 2009; Puig et al. 2016). No Brasil a incidência de melanoma tem grande diferença entre as diversas regiões, sendo as regiões sul e sudeste as de maior incidência, variando de 1.36 a 6.78 para 100.000 habitantes na região sudeste e de 3.53 a 10.05 para cada 100.000 habitantes na região sul, segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer-INCA para 2020 (Ministério da Saúde 2020).

### 1.2.1 Genes de Alta Penetrância

Os primeiros genes de alta penetrância descritos, relacionados a predisposição ao melanoma, foram *CDKN2A* e *CDK4*. O locus gênico *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) localizado no cromossomo 9p21 está envolvido em duas importantes vias de supressão tumoral: p53 e retinoblastoma (pRb), associadas a apoptose e senescência, respectivamente (Aoude et al. 2015a). Este locus codifica duas proteínas: p16INK, através dos exons 1 $\alpha$  2 e 3, e p14ARF, produto de um transcrito alternativo codificado através dos exons 1 $\beta$  2 e 3; ambas atuam na regulação negativa do ciclo celular (De Snoo e Hayward 2005). A proteína p16INK forma complexos binários com as ciclinas dependentes de quinase 4 e 6 (CDK4 e 6) inibindo a fosforilação de pRb e consequentemente a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Serrano et al. 1996). A proteína p14ARF participa da estabilização e ativação da via de p53 pela inibição de MDM2 (*murine double minute 2*), principal regulador negativo desta via (Zhang et al. 1998). A maioria das variantes germinativas em *CDKN2A* afeta a codificação de p16INK e, menos frequentemente, de ambas, p16INK e p14ARF (Bishop et al. 2000). A inativação isolada de p14ARF é muito rara e foi identificada em famílias com associação de melanoma cutâneo e tumor de sistema nervoso central (Azizi et al. 1995; Randerson-Moor et al. 2001; Goldstein et al. 2006; Sargen et al. 2016).

As variantes patogênicas em *CDKN2A* correspondem a 10% das famílias com dois casos de melanoma e a 30 a 40% das famílias com 3 ou mais casos, apresentando padrão de herança autossômica dominante (Aoude et al. 2015b). A penetrância das variantes patogênicas em *CDKN2A* varia de acordo com a localização geográfica e aumenta com a idade, sendo descrita como de 13% e 58% na Europa, 50% e 76% nos Estados Unidos e 32% e 91% na Austrália, aos 50 e 80 anos de idade, respectivamente (Bishop et al. 2002).



Famílias europeias e norte-americanas com variante patogênica detectada em *CDKN2A* mostraram aumento no risco de desenvolvimento de carcinoma de pâncreas (Goldstein et al. 2006). Nas famílias com história de melanoma, a idade ao diagnóstico do câncer de pâncreas ( $\leq 52$  anos) parece ter valor preditivo positivo de presença de variante patogênica em *CDKN2A* (De Unamuno et al. 2018). Potrony et al. em 2014, mostraram que famílias da Espanha com variante patogênica em *CDKN2A* também apresentam maior risco de câncer de pâncreas, principalmente as de origem caucasiana, associado a maior risco de câncer de pulmão e mama. Estudo prospectivo de pacientes da Suíça (Helgadottir et al. 2014), portadores da variante p.Arg112dup em *CDKN2A*, mostraram maior risco de carcinomas do pâncreas, pulmão, cabeça e pescoço e trato gastrointestinal, principalmente em fumantes, sugerindo que as variantes patogênicas em *CDKN2A* possam determinar maior sensibilidade aos componentes carcinogênicos do tabaco. O risco aumentado para diferentes tumores, além do melanoma cutâneo, visto em algumas famílias portadoras de variantes em *CDKN2A*, mas não em todas, sugere que diferentes fenótipos podem ser determinados por variantes germinativas específicas desse gene (Ming et al. 2020). A presença de variante germinativa em *CDKN2A* também está associada a idade precoce ao diagnóstico do melanoma cutâneo, múltiplos tumores primários, múltiplos membros da família acometidos, predomínio do subtipo histológico extensivo superficial nos tumores primários e maior prevalência de nevos atípicos (Goldstein et al. 2007; Van der Rhee et al. 2011). Porém, quanto a este último, estudos mostram que selecionar indivíduos para investigação genética apenas pela presença de múltiplos nevos, nevos atípicos ou fenótipo da síndrome do nevo atípico (SNA) não é adequado, uma vez que muitos pacientes que carregam variantes patogênicas em *CDKN2A* e muitos dos que desenvolvem melanoma, não apresentam tais características clínicas e a grande maioria dos pacientes com SNA não apresenta variantes germinativas em *CDKN2A* (Bishop et al. 2000; Celebi et al. 2005; Ipenburg et al. 2016).

Em estudo prévio de nosso grupo (de Avila et al. 2014) foram encontrados 13,5% (8/59) de portadores de variante patogênica em *CDKN2A* em pacientes com diagnóstico de melanoma que preenchem critérios para a SMF, sendo 7 com história familiar (MF) e 1 com melanoma múltiplo sem história familiar (MPM). Quando considerados os pacientes FM que apresentavam também múltiplos melanomas primários, a taxa de mutação foi de 36,4% (4/11). Apenas uma dessas oito famílias portadoras de variante em *CDKN2A* apresentou história de câncer de pâncreas em associação com câncer de mama (dado não publicado pois este diagnóstico foi realizado após finalização do estudo em questão). Estudos anteriores mostraram 4,5% (1/22) e 7% (2/29) de variantes patogênicas em *CDKN2A* em coortes do sudeste e sul do

Brasil, respectivamente, com pacientes selecionados através dos mesmos critérios que o nosso estudo em 2014 – famílias com 2 ou mais casos de melanoma ou melanoma em associação com câncer de pâncreas ou pacientes com 2 ou mais melanomas primários (Huber e Ramos 2006; Ashton-Prolla et al. 2008). Ainda em pacientes do sul do Brasil com critério para SMF, em 2013, Grazziotin et al. não encontraram nenhuma variante em *CDKN2A* em sua coorte de 33 pacientes.

A variante p.A148T de *CDKN2A*, atualmente classificada como variante benigna, mostrou-se de risco para melanoma cutâneo, principalmente em pacientes com múltiplos melanomas primários, em algumas populações (Deniak et al. 2005; Pastorino et al. 2008). Em seu estudo de 2008 Ashton-Prolla et al. encontraram esta variante em 13,3% dos pacientes (FM e MPM) e posteriormente, em 2011, Bakos et al. encontraram este alelo com mais frequência nos pacientes com melanoma quando comparados com grupo controle sem doença ( $p = 0.009$ ; OR 3.8; 1.4-10.5), sendo mais frequente nos pacientes com critério para SMF quando comparados aos pacientes com melanoma esporádico (21,4% x 10,1%;  $p=0.006$ ), mostrando a associação deste alelo com risco de melanoma cutâneo em pacientes do sul do Brasil, especialmente os de ancestralidade européia.

O gene *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*), está localizado no cromossomo 12q13 e codifica proteína quinase 4 (CDK4) que atua na fase G1 do ciclo celular, como descrito acima. Foram descritas 3 variantes até o momento (p.R24C, p.R24H e p.R24L), todas afetando o códon 24, o que determina alteração do sítio de ligação de p16INK, com redução da inibição da atividade de CDK4 (Puntervall et al. 2013; Bottillo et al. 2018). Neste caso, *CDK4* atua como oncogene, pois a quinase CDK4 deixa de ser controlada por p16INK e a célula adquire ganho proliferativo. Variantes patogênicas no gene *CDK4* apresentam padrão de herança autossômica dominante e conferem alto risco à doença, sendo descrita penetrância de 74,2% aos 50 anos de idade (Pho et al. 2006; Puntervoll et al. 2013). Na SMF a prevalência de variante em *CDK4* varia de 1 a 3% e até o momento apenas 19 famílias foram descritas com variante patogênica neste gene (Goldenstein et al. 2006; Pho et al. 2006; Bottillo et al. 2018). As variantes patogênicas em *CDK4* determinam fenótipo semelhante ao encontrado nas variantes em *CDKN2A*: idade precoce ao diagnóstico, múltiplos melanomas primários, múltiplos membros da família afetados, predomínio do subtipo histológico extensivo superficial e presença de nevos atípicos (Puntervoll et al. 2013). Em nosso estudo, citado acima, não identificamos nenhuma variante patogênica em *CDK4* nos 59 pacientes estudados (de Avila et al. 2014). Ashton-Prolla et al. em 2008 e Grazziotin et al. em 2013 também não encontraram variantes em *CDK4* em suas coortes de 29 e 33 pacientes, respectivamente.

Com o advento de novas tecnologias de sequenciamento genômico, que favoreceu o uso de painéis gênicos em testes genéticos para pacientes suspeitos de síndromes de câncer hereditário, variantes patogênicas em novos genes começaram a ser identificadas contribuindo com a caracterização de diferentes vias de susceptibilidade ao melanoma, incluindo genes relacionados a diferenciação celular, resposta a dano do DNA e manutenção dos telômeros (Aoude et al. 2015b).

O gene *BAP1* (*BRCA-1-associated protein-1*) localizado no cromossomo 3p21 atua como supressor de tumor. *BAP1* é uma deubiquitilase que participa de complexo multi-protético regulador de vias primordiais no controle do ciclo celular, diferenciação celular, apoptose e resposta a dano do DNA (*deoxyribonucleic acid*) (Carbone et al. 2013; Wang et al. 2016). A partir de 2011 foi caracterizada síndrome de câncer hereditário relacionada ao gene *BAP1*, onde suas variantes patogênicas apresentam padrão de herança autossômica dominante e conferem aumento de susceptibilidade para o desenvolvimento de diversas neoplasias, incluindo melanoma uveal, mesotelioma, melanoma cutâneo, carcinoma renal, além de outros tumores como colangiocarcinoma e carcinoma basocelular da pele (Testa et al. 2011; Aoude et al. 2013; Murali et al. 2013; Popova et al. 2013; De La Fouchardiere et al. 2015). É descrito que aproximadamente 70% dos indivíduos com variante patogênica no gene *BAP1* irão desenvolver pelo menos uma neoplasia maligna durante a vida, porém o espectro completo de neoplasias relacionado a estas variantes ainda não é completamente conhecido (Carbone et al. 2013; Potrony et al. 2015).

A principal manifestação cutânea dos pacientes portadores de variantes patogênicas em *BAP1* são os tumores cutâneos spitzóides atípicos denominados BIMTs (*BAP1*-inactivated melanocytic tumors) que aparecem em mais de 75 % dos casos e, quando múltiplos, na grande maioria das vezes, antecedem o aparecimento das neoplasias malignas, sendo considerados marcadores de presença de variante germinativa neste gene (Carbone et al. 2012; Haugh et al. 2017; Elder et al. 2018; Zhang et al. 2019). O reconhecimento adequado destas lesões por dermatologistas e patologistas é de extrema importância para a seleção apropriada de pacientes a serem investigados geneticamente, uma vez que variantes patogênicas neste gene determinam alto risco para diversas neoplasias.

Mais recentemente genes envolvidos na manutenção dos telômeros foram identificados como associados a aumento de risco para melanoma cutâneo apresentando alta penetrância. Estes genes fazem parte de complexo protéico denominado *shelterin* que, juntamente com a enzima telomerase, mantêm a estabilidade genômica e a integridade cromossômica impedindo a degradação, a fusão e a recombinação atípica dos telômeros, evitando que os mesmos sejam

erroneamente reconhecidos como quebras deletérias do DNA e regulando suas regiões de replicação (Flynn e Zou 2010; O'Sullivan et al. 2010; Aoude et al. 2015b). Estudo recente identificou associação entre comprimento aumentado dos telômeros e risco de melanoma cutâneo além de homeostase alterada dos telômeros nestes tumores, mostrando o seu papel na melanomagenese (Rachakonda et al. 2018).

O gene *POT1* (*protection of telomeres 1*) codifica uma das proteínas que participa do complexo *shelterin*. Recentemente foram identificadas variantes patogênicas em *POT1* em famílias com múltiplos casos de melanoma na Austrália, Reino Unido e Holanda, assim como algumas variantes raras em famílias da Itália e Estados Unidos (Robles-Espinoza et al. 2014, Shi et al. 2014; Wilson et al. 2017). Variantes neste gene estão relacionadas a idade precoce ao diagnóstico e múltiplos melanomas primários (Aoude et al. 2015b). Foram identificados alguns casos de câncer de mama, carcinoma pulmonar de pequenas células, carcinoma renal, além de carcinoma e bócio tireoidianos em associação aos casos de melanoma em famílias com variante no gene *POT1* (Robles-Espinoza et al. 2014, Wilson et al. 2017; Potrony et al. 2019). Em 2019, Wong et al. descreveram uma nova variante em *POT1* (p.I78T) encontrada em 3 famílias de origem judaica com múltiplos casos de melanoma em associação com linfoma cutâneo, leucemia e carcinoma da tireóide.

Os genes *ACD* (*adrenocortical dysplasia homologue*) e *TERF2IP* (*telomeric repeat binding factor 2, interacting protein*) codificam outras duas proteínas do complexo *shelterin* e variantes nesses *loci* também foram associadas com melanoma hereditário em famílias da Austrália e Dinamarca e relacionadas a idade precoce ao diagnóstico e múltiplos melanomas primários nos indivíduos acometidos (Aoude et al. 2014). Foram descritos vários outros tumores em associação ao melanoma cutâneo nas famílias afetadas, como câncer de mama, pulmão, colo uterino, cólon, intestino delgado, ovário e linfoma de células B, sugerindo que essas variantes predisõem a amplo espectro de neoplasias (Aoude et al. 2014).

O gene *TERT* (*telomerase RT*) codifica uma subunidade catalítica da telomerase, enzima que atua na manutenção do comprimento dos telômeros. A regulação alterada da telomerase contribui para a aquisição de potencial ilimitado de replicação visto nas células neoplásicas (Read et al. 2016). Variantes somáticas no promotor de *TERT* foram descritas em diversas neoplasias, incluindo melanomas (Vinagre et al. 2013). Recentemente foi descrita variante germinativa no promotor de *TERT* em duas famílias, uma da Alemanha e uma do Reino Unido, ambas com múltiplos casos de melanoma e idade precoce ao aparecimento da doença (Horn et al. 2013; Harland et al. 2016).

Os genes de alta penetrância *CDKN2A* e *CDK4*, em associação com os genes recentemente descritos na SMF, incluindo *BAP1*, *POT1*, *ACD*, *TERF2IP* e *TERT*, são responsáveis por até 40% dos casos de predisposição hereditária ao melanoma em famílias de alto risco (Goldstein et al. 2007; Potrony et al. 2015), a depender do critério clínico utilizado na seleção das famílias. Este fato sugere que nos outros 60% de famílias com múltiplos casos de melanoma possa existir mecanismo poligênico de herança incluindo múltiplos alelos de baixo a moderado risco ou modificadores genéticos, características fenotípicas e hábitos de risco compartilhados entre os membros de uma mesma família, assim como outras variantes em genes de alta penetrância ainda desconhecidas (Read et al. 2016; Levin e Mæhle 2017).

### 1.2.2 Genes de Baixa a Moderada Penetrância

O gene *MC1R* (*melanocortin-1 receptor*) é um dos principais genes de baixa a moderada penetrância relacionado ao melanoma cutâneo. Este gene codifica uma proteína G receptor transmembrana para o hormônio  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -*melanocyte-stimulating hormone*) envolvida na regulação da produção dos dois tipos de melanina que determinam a pigmentação da pele: feomelanina (pigmento amarelo/vermelho) e eumelanina (pigmento preto/marrom) (Garcia-Borron et al. 2005). O processo de produção de melanina pelos melanócitos é chamado de melanogênese. A pele humana contém uma mistura dos tipos de melanina – feomelanina, eumelanina clara e eumelanina escura – e a razão das mesmas determina a pigmentação visível (Cichorek et al. 2013). A radiação ultravioleta (RUV) tem potencial carcinogênico determinado por ação mutagênica direta através da alteração na estrutura do DNA, assim como por dano indireto induzido pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Nasti e Timares 2015). A melanina tem como função a absorção e dispersão da RUV, evitando dano direto na estrutura do DNA, além da varredura de radicais livres e redução da oxidação, lembrando que o estresse oxidativo contribui para a instabilidade genética e o melanoma é um tumor caracterizado pela presença de estresse oxidativo (Swope e Abdel-Malek 2018). Comparativamente, a eumelanina apresenta melhores propriedades de fotoproteção, maior resistência à degradação e maior capacidade de redução da oxidação, já a feomelanina apresenta efeito pró-oxidante com a produção de ROS, além de efeito indireto negativo no sistema imune (Cichorek et al. 2013; Nasti e Timares 2015; Swope e Abdel-Malek 2018). O gene *MC1R* é responsável pela regulação da melanogênese durante a exposição à RUV e, portanto, tem papel fundamental na pigmentação e na determinação de risco para o desenvolvimento de melanoma cutâneo, uma vez que seu mau funcionamento inibe a produção de eumelanina, compromete a capacidade de

reparo de DNA e a atividade anti-oxidativa dos melanócitos, além de aumentar o risco de mutações causadas pela RUV (Palmer et al. 2000; Pho et al. 2006; Swope e Abdel-Malek 2018).

O gene *MC1R* é altamente polimórfico e já foram descritos mais de 200 alelos variantes (Ainger et al. 2017). As variantes denominadas *red hair color* (RHC) ou alelos R estão associadas a maior risco para o desenvolvimento de melanoma pois apresentam perda de função do receptor com aumento da síntese de feomelanina e redução da síntese de eumelanina, determinando o fenótipo de pele clara, múltiplas efélides e fotossensibilidade, além dos cabelos ruivos (Palmer et al. 2000; Ainger et al. 2017; Tagliabue et al. 2018). É descrito que 34% dos pacientes com melanoma apresentam variantes RHC de *MC1R* (Swope e Abdel-Malek 2018). As variantes não-RHC ou alelos r determinam redução da função do receptor e conferem menor risco para o desenvolvimento de melanoma (Wendt et al. 2016; Potjer et al. 2019). Estudos relatam maior risco de melanoma conforme aumento do número de variantes de *MC1R* (alelos R e r) em portadores de variante patogênica em *CDKN2A* na SMF, além de associação com idade precoce ao diagnóstico, principalmente nos pacientes com melanomas múltiplos. (Van Der Velden et al 2001; Chaudru et al. 2005; Goldstein et al. 2005; Raimondi et al. 2008). Outros estudos sugerem que o gene *MC1R* participa da gênese do melanoma não apenas pela síntese de melanina mas pelo efeito direto na transformação dos melanócitos, uma vez que algumas variantes foram também associadas a maior risco da doença em pacientes de pele com fototipo mais alto e independentemente de outras características fenotípicas de risco ou exposição solar (Palmer et al. 2000; Matichard et al. 2004, Wendt et al. 2016). Este dado pode ser explicado, em parte, pelo fato de *MC1R* (receptor de melanocortina-1) estar presente em diversas células além dos melanócitos, incluindo células do sistema imune, o que sugere sua participação na imunidade inata e adquirida (Nasti e Timares 2015).

O gene *MITF* (*microphthalmia-associated transcription fator*) codifica fator de transcrição que regula o desenvolvimento, a diferenciação, a sobrevivência e a proliferação dos melanócitos normais além de ter papel crucial no controle da proliferação, migração e invasão das células do melanoma cutâneo (Koludrovic e Davidson 2013; Read et al. 2016). Foi descrita variante germinativa (p.E318K) em diversas famílias com múltiplos melanomas, cujos portadores teriam risco aumentado de desenvolver melanoma cutâneo e carcinoma de células renais (Bertolotto et al. 2011; Yokoyama et al. 2011). Co-segregação foi observada em alguns, mas não em todos os familiares, mostrando tratar-se de uma variante de penetrância moderada, semelhante ao *MC1R* (Yokoyama et al. 2011). Esta mesma variante foi associada com fenótipo específico de olhos diferentes da cor azul, número aumentado de nevos e presença de múltiplos melanomas primários (Sturm et al. 2014). Um estudo mais recente confirma a associação desta

variante com risco aumentado de melanoma e tumor renal, maior número de nevos além da presença de nevos atípicos (Ciccarese et al. 2020).

### **1.3 SEGUIMENTO DOS PACIENTES DE ALTO RISCO**

Segundo Kefford et al. (1999) e Måsbäck et al. (2002), em indivíduos com história familiar de melanoma o risco de desenvolvimento da doença aumenta de 30 a 70 vezes quando comparado com a população geral. Desta forma, membros de famílias de alto risco devem ser alocados em programas de vigilância e prevenção, essencial para diminuir os riscos de desenvolvimento de melanoma cutâneo e possibilitar o diagnóstico precoce, melhorando o prognóstico e a sobrevida dos pacientes (Markovic et al. 2007). Fotografias seriadas do corpo e seguimento dos nevos através de dermatoscopia digital têm contribuição significativa neste processo, tanto para a indicação mais precisa das lesões a serem excisadas, quanto para o diagnóstico precoce de melanomas (Sá et al. 2018). Segundo Psaty et al. (2010), membros de famílias de alto risco devem ser examinados por dermatologista a cada 3 a 12 meses, da adolescência até que os nevos estejam estáveis e, a partir de então, anualmente. Recomenda-se, inclusive, o seguimento daqueles que façam parte de famílias com resultado negativo para variantes germinativas, presumindo que possa haver outras variantes, ainda desconhecidas, envolvidas no processo dessa doença.

É de extrema importância uma anamnese criteriosa para a identificação de famílias portadoras da SMF, incluindo dados de história pessoal e familiar de melanoma e outros tipos de câncer, idade ao diagnóstico e exames comprobatórios dos tumores. Torna-se possível, assim, a confecção de heredograma que deve ser revisado anualmente (Hansson et al. 2008). Importante também é o fato que membros de famílias com critérios para a SMF podem apresentar outras neoplasias associadas como câncer de pâncreas, mesotelioma, melanoma uveal, entre outros, a depender da variante genética envolvida.

Com a finalidade de prevenção, vigilância e detecção precoce do melanoma em pacientes de alto risco, foi criado em junho de 2010 o Ambulatório de Melanoma Familiar do Núcleo de Câncer de Pele do A.C.Camargo Cancer Center. Até o momento foram incluídas mais de 300 famílias com critérios para a SMF (Sá et al. 2018).

## 2 JUSTIFICATIVA

A pesquisa de variantes genéticas tem papel fundamental no seguimento, aconselhamento e na conduta relacionada às famílias de alto risco, além de auxiliar no entendimento da patogênese dos melanomas nos indivíduos acometidos.

Cerca de até 85% dos pacientes com critérios clínicos para a SMF (MF ou MPM) são negativos para variantes em *CDKN2A* e *CDK4* (De Ávila et al. 2014), sendo de extrema relevância a triagem de variantes genéticas em outros genes de alta penetrância relacionados a SMF, descritos mais recentemente, em conjunto com a pesquisa de variantes de baixo a moderado risco.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Identificar variantes germinativas em genes de alta e baixa a moderada penetrância, potencialmente associados a risco aumentado para melanoma cutâneo, em pacientes com critérios clínicos para a SMF.

#### 3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1 Identificar os pacientes com critérios clínicos para a SMF (MF e MPM) em acompanhamento no Ambulatório de Melanoma Familiar do Núcleo de Câncer de Pele do A.C.Camargo Cancer Center.
- 2 Rastrear variantes patogênicas/potencialmente patogênicas e variantes de significado clínico incerto nos genes *ACD*, *BAP1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *POT1*, *TERT*, *TERF2IP* e as variantes de *MC1R* e *MITF*, nestes pacientes.
- 3 Correlacionar as características genéticas e fenotípicas dos pacientes e características histopatológicas dos seus melanomas primários.
- 4 Descrever outros tumores encontrados nos probandos e seus familiares e sua possível relação causal com as variantes genéticas identificadas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Melanoma Familiar do Núcleo de Câncer de Pele do A.C.Camargo Cancer Center, entre os anos de 2016 e 2019. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antônio Prudente – A.C.Camargo Cancer Center (Anexo 1).

### 4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Indivíduos com 3 ou mais melanomas primários (MPM).
- Pacientes com diagnóstico de melanoma com ao menos 2 melanomas primários e/ou câncer de pâncreas (MF) diagnosticados entre parentes de primeiro ou segundo grau (no mesmo lado da família). Ou pacientes com melanoma múltiplo e ao menos um caso de melanoma ou câncer de pâncreas na família (somatória de 3 tumores, no mínimo).
- Pacientes com comprovantes dos seus tumores e dos tumores de seus familiares. Sendo considerados como comprovantes os laudos de exame anatomopatológico dos tumores, relatório médico ou atestado de óbito.
- Pacientes que tenham assinado o termo de consentimento (Apêndice 1) e concordem em participar da pesquisa.

### 4.2 BANCO DE DADOS

O banco de dados foi elaborado em Planilha Excel contendo os seguintes dados dos pacientes selecionados:

- Características demográficas e de fenótipo
  - a. Gênero
  - b. Idade ao diagnóstico
  - c. Cor dos olhos e dos cabelos
  - d. Fototipo de acordo com a classificação de Fitzpatrick (I- IV)
  - e. Número total de nevos
  - f. Presença do fenótipo de síndrome do nevo atípico (SNA) de acordo com o sistema de pontuação dos critérios de Newton et al. (1993) (pontuação  $\geq 3$ ).

- g. Densidade de efélides no antebraço e tronco superior/ombros - gradação variando de 0 a 100 em intervalos de 20, onde 0= sem efélides 20/40= baixa densidade, e 60/80/100= alta densidade) (Mc Lean e Gallagher 1995).
- História de queimadura solar – infância/adolescência e idade adulta.
- Características específicas dos melanomas primários
  - a. local anatômico (cabeça e pescoço, tronco, membros superiores e membros inferiores)
  - b. subtipo histológico (extensivo superficial, nodular, lentiginoso, spitzóide, não classificável)
  - c. espessura de Breslow (em milímetros)
  - d. presença ou não de nevo associado
- Estadiamento clínico.
- Número total de melanomas dos probandos.
- História oncológica (outros cânceres não-melanoma) dos probandos
- História familiar de melanoma e cânceres não-melanoma (câncer de pâncreas, tumor de SNC, tireóide, mama, pulmão, tumor renal e outros).

Foram elaborados heredogramas de todos os probandos, incluindo ao menos 3 gerações.

### **4.3 ACONSELHAMENTO GENÉTICO**

Todos os pacientes envolvidos no projeto estão em acompanhamento de rotina no Ambulatório de Melanoma Familiar desta instituição e são atendidos em consulta a cada 6 ou 12 meses. Nestas consultas há grande troca de informações e esclarecimento de dúvidas relacionadas à pesquisa genética. Após a finalização do estudo, os pacientes serão convocados para consulta específica em conjunto com o Departamento de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center e receberão aconselhamento genético diante dos resultados encontrados.

### **4.4 COLETA**

Foi realizada coleta de 12 ml de sangue periférico de cada paciente em dois tubos EDTA com anticoagulante ou coleta de saliva com kit Oragene•DNA OG-500 (DNAgenotek), e o material foi enviado para o laboratório de macromoléculas vinculado ao Biobanco do

A.C.Camargo Cancer Center e mantido a 4°C até o momento da purificação de DNA (máximo 5 dias).

O DNA genômico foi isolado a partir de leucócitos de sangue periférico e extraído usando o *Puregene® Blood Kit DNA Isolation (Life Science, SP, Brasil)*, de acordo com métodos de rotina do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center. O DNA de saliva foi extraído no equipamento QIA Symphony com o kit DNA Mini Kit, de acordo com métodos de rotina do Biobanco. Três microgramas de DNA de cada amostra foram enviados para o Laboratório de Genômica e Biologia Molecular – Centro Internacional de Pesquisa do A. C. Camargo Cancer Center. O excedente está armazenado no Biobanco para estudos científicos futuros.

#### 4.5 TESTES GENÉTICOS

Os testes genéticos foram realizados no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular através de sequenciamento paralelo massivo. Foi gerado painel customizado que compreende os principais genes de predisposição ao melanoma, 7 genes de alta penetrância: *ACD*, *BAP1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *POT1*, *TERT*, *TERF2IP* e 2 genes de baixa a moderada penetrância: *MITF* e *MC1R*. Neste painel, para a maioria dos genes, a região codificadora está 100% coberta no sequenciamento, exceto para o gene *TERT*, cuja cobertura é de 99,02% (35 pb não estão cobertas). Além disso, incluímos uma pequena região do promotor de *TERT* (chr5:1295151-1295171, à 57pb no sítio de início de transcrição) onde também foi descrita variante associada à melanoma familiar.

O sequenciamento paralelo das amostras foi feito através de PCR multiplex dos genes selecionados (painel desenhado através da ferramenta AmpliSeq - Life Technologies). A preparação das bibliotecas das amostras foi realizada individualmente, utilizando o Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Life Technologies), segundo as instruções do fabricante. Todas as amostras foram sequenciadas na plataforma Ion Proton (Life Technologies), visando obter uma cobertura mínima de 30X para as bases alvo.

As análises de bioinformática e a interpretação das variantes encontradas no sequenciamento do painel de genes foram realizadas seguindo os protocolos adotados no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular. A ferramenta Torrent Variant Caller (ThermoScientific) foi utilizada para realizar o alinhamento e as chamadas variantes. As variantes identificadas foram anotadas e filtradas no software VarSeq (Golden Helix). Foram selecionadas as variantes com os seguintes critérios de qualidade: cobertura da base  $\geq 50X$  e frequência do alelo variante  $\geq 0,25$ . As variantes detectadas foram avaliadas quanto à sua

classificação em bancos de dados de classificação clínica de variantes (ClinVar, LOVD) e de frequência alélica populacional (gnomAD 1000G, ESP e ABraOM). A ferramenta Varsome foi utilizada para avaliação da classificação ACMG automática dessa ferramenta e verificação dos escores de patogenicidade de preditores *in silico* disponíveis gratuitamente (geralmente DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, LIST-S2, MutationTaster, MutationAssessor, PrimateAI, REVEL, SIFT, BayesDel\_addAF, DANN, M-CAP e MVP). As variantes dos genes de alta penetrância foram classificadas, segundo os critérios sugeridos pelo *American College of Medical Genetics* (ACMG), em patogênicas (P), provavelmente patogênicas (PP), benignas (B), provavelmente benignas (PB) ou variantes de significado incerto (VUS) (Richards et al. 2015).

As variantes no gene *MC1R* foram classificadas de acordo com sua associação com o fenótipo de cabelos ruivos e risco de desenvolvimento de melanoma (Hu et al. 2014):

- Variantes R ou RHC (*red hair color*): variantes associadas com cor de cabelo ruivo e mais de 2X de aumento de risco para melanoma (p.86\_87insA, p.D84E, p.R142H, p.R151C, p.R160W e p.D294H);
- Variantes r ou não-RHC: variantes não associadas com cor de cabelo ruivo e aumento de risco 1-2X para melanoma (p.V60L, p.V92M, p.I155T e p.R163Q);
- Variantes u: variante com risco desconhecido para melanoma.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise descritiva das variáveis com as distribuições de frequência absoluta (n) e relativa (%) para as variáveis qualitativas e as principais medidas resumo, como média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo, para as variáveis quantitativas.

Na avaliação da associação entre variáveis qualitativas foi utilizado o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando apropriado. Para comparar os grupos (MF e MPM) e os tipos de variantes de *MC1R* em relação à distribuição de variáveis quantitativas foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Foi realizada comparação das frequências das diferentes variantes de *MC1R* encontradas na nossa coorte com grupo controle através de análise de regressão logística simples com obtenção de *odds ratio* (OR) com intervalos de confiança (ICs) de 95%. O grupo controle utilizado foi o banco do Arquivo Brasileiro Online de Variantes (AbraOM) que representa uma coorte de idosos brasileiros (acima de 60 anos de idade) com ampla fenotipagem, baseada no

censo do estudo SABE (Saúde, Bem Estar e Envelhecimento) iniciado em 1999, com dados da cidade de São Paulo. Como aproximadamente 10% da população brasileira vive na região metropolitana de São Paulo, esta é considerada uma amostra representativa da população nacional. Inclui 609 indivíduos, 216 homens e 393 mulheres, sendo 517 autodeclarados brancos, 156 negros (111 pardos e 45 pretos), 12 amarelos, 2 indígenas, 40 autodeclarados como “outros” e 52 sem definição (Naslavsky et al. 2017).

O nível de significância adotado foi de 5% e as análises estatísticas foram realizadas por meio do software IBM SPSS versão 25.

## 5 RESULTADOS

Foram levantadas informações clínicas em 38 pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Melanoma Familiar do Núcleo de Câncer de Pele do A.C.Camargo Cancer Center e selecionados 37 pacientes (MH1 a MH38), tendo sido excluído o probando MH13 por não apresentar evidências comprobatórias do diagnóstico dos tumores pessoais e dos familiares. O probando MH31, apesar de apresentar apenas um familiar de primeiro grau com melanoma foi incluído no estudo pois, o mesmo apresenta além do melanoma cutâneo, tumor renal e GIST (tumor estromal gastrointestinal) e múltiplos carcinomas da pele e seus irmãos gêmeos, melanoma e tumor renal (Figura 17).

Destes 37 probandos 18 são do sexo masculino e 19 do sexo feminino. A idade ao diagnóstico do tumor primário variou de 15 a 69 anos (média = 40,1 anos). Encontramos prevalência dos fototipos I e II (89,2%), olhos claros – azuis ou verdes (54%) e cabelos claros – ruivos ou loiros (59,4%). Queimadura solar na infância foi relatada em 89,2% dos casos e alta densidade de efélides em dorso foi encontrada em 73% dos probandos. Aproximadamente 50% dos casos apresentava contagem total de nevos maior que 100, sendo que 40% dos probandos preencheram critério para a SNA.

Os pacientes foram estadiados de acordo com o seu melanoma mais espesso. Apenas 1 paciente encontrava-se no estágio III e 2 no estágio II, 32 pacientes no estágio I e 2 pacientes estágio 0 (melanoma *in situ*). Os 37 probandos apresentaram o total de 148 melanomas primários, com predomínio do tipo extensivo superficial (85,8%), localização mais frequente no tronco (52,7%) e maior prevalência de melanomas *in situ* e finos – até 1.0mm de espessura (96,7%). Nevo associado ao tumor foi encontrado em 50,7% dos casos sendo que em 16,9% dos tumores esta informação não estava disponível.

As principais características clínicas dos pacientes e histopatológicas dos seus tumores estão detalhadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente, com os dados das características mais prevalentes em negrito.

Como descrito na Tabela 1, 26 pacientes (70,3%) foram classificados como MF (história familiar de melanoma e/ou câncer de pâncreas) e 11 pacientes (29,7%) como MPM (melanomas primários múltiplos sem história familiar).

No grupo MF (26 probandos), 3 pacientes apresentavam história familiar de câncer de pâncreas, 6 pacientes com familiares com melanoma múltiplo 12 pacientes com mais de 1

familiar com história de melanoma e 21 probandos apresentavam também múltiplos melanomas primários (Tabela 1 – MF+MPM), sendo 11 com 2 melanomas e 10 com 3 ou mais melanomas. Outros tumores encontrados nos probandos do grupo MF foram câncer de pele não melanoma (7/26), tireóide (3/26), mama (2/26), tumor renal (1/26) e próstata (1/26). Outros tumores relatados nos familiares dos probandos deste grupo foram mama (6), câncer de pele não melanoma (5), pulmão (4), mieloma (3), tumor renal (3), cólon (3), linfoma (2) e tireóide (2).

Nos pacientes MPM (11 probandos), 5 apresentavam 3 melanomas primários, 4 pacientes com 4 melanomas primários e 2 pacientes com 5 ou mais melanomas. Os probandos do grupo MPM apresentaram também câncer de pele não melanoma em 36,4% dos casos (4/11). Outros tumores relatados nos familiares dos probandos deste grupo foram: mama (4), câncer de pele não melanoma (2), pulmão (1), mesotelioma (1), tumor gástrico (1), cólon (1), linfoma (1), tireóide (1) e próstata (1).

Os pacientes do grupo MPM apresentaram média de idade ao diagnóstico mais precoce quando comparados ao grupo MF (35,6 anos x 43,5 anos) e maior mediana do número total de nevos (145 x 74). Dados relacionados à localização do tumor foram diferentes nos dois grupos: a incidência dos melanomas em cabeça e pescoço e no tronco foi maior no grupo MPM e a incidência dos tumores em membros, tanto superiores quanto inferiores, foi maior no grupo MF. Estes dados foram estatisticamente significativos como mostra a Tabela 3 (dados em negrito). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos MPM e MF em relação às outras características fenotípicas dos probandos ou outras características histopatológicas dos tumores (Tabela 3).



**Tabela 1** – Classificação e características fenotípicas dos 37 probandos.

Variáveis		N (%)
SMF	MF	26 (70.3)
	MPM	11 (29.7)
	MF + MPM	21 (56.8%)
Fototipo	I/II	<b>33 (89.2)</b>
	III/IV	4 (10.8)
Cor dos olhos	azul	5 (13.5)
	verde	15 (40.5)
	castanho/ preto	17 (46.0)
Cor dos cabelos	ruivo	5 (13.5)
	loiro	17 (45.9)
	castanho	15 (40.6)
Queimadura solar	infância /adolescência adulto	<b>33 (89.2)</b> 22 (59.5)
Densidade de efélides Ombros	∅	0 (0.0)
	baixa	10 (27.0)
	alta	<b>27 (73.0)</b>
Contagem total de nevos	< 50	9 (24.3)
	50-100	10 (27.0)
	> 100	18 (48.6)
SNA	sim	<b>15 (40.5)</b>
	não	22 (59.5)

SMF = Síndrome do melanoma familiar; MF = história pessoal e familiar de melanoma e ou câncer de pâncreas; MPM = história pessoal de múltiplos melanomas primários (3 ou mais) sem história familiar de melanoma ou câncer de pâncreas; MF + MPM = história familiar de melanoma e ou câncer de pâncreas + história pessoal de múltiplos melanomas primários (2 ou mais); SNA = síndrome do nevo atípico

**Tabela 2** - Características histopatológicas dos 148 melanomas primários diagnosticados nos 37 probandos

Variáveis	Número	(%)
<b>Espessura de breslow</b>		
<i>In situ</i>	<b>76</b>	<b>51.4</b>
≤ 1.0mm	<b>67</b>	<b>45.3</b>
>1.0mm	5	3.4
<b>Sítio anatômico</b>		
cabeça/ pescoço	6	4.1
<b>tronco</b>	<b>78</b>	<b>52.7</b>
membros superiores	23	15.5
membros inferiores	41	27.7
<b>Tipo histológico</b>		
<b>extensivo superficial</b>	<b>127</b>	<b>85.8</b>
Nodular	1	0.7
Lentiginoso	4	2.7
<i>Spitzóide</i>	1	0.7
Não classificável/ desconhecido	16	10.8
<b>Nevo Associado</b>		
<b>Sim</b>	<b>75</b>	<b>50.7</b>
Não	48	32.4
Sem informação	25	16.9

**Tabela 3** – MF x MPM - Comparação das características fenotípicas, idade ao diagnóstico e características dos tumores

	MF	MPM	P
<b>Idade ao diagnóstico (anos)</b>			
média	43,5	35,6	<b>0.047</b>
<b>Nº total de nevos</b>			
mediana	74	145	<b>0.04</b>
(min-máx)	(4-348)	(23-334)	
	n(%)	n(%)	P
<b>Fototipo</b>			
I/II	22(84.6)	11(100)	0.296
III/IV	4(15.4)	0	
<b>Cor dos olhos</b>			
azul./verde	15(57.7)	5(45.5)	0.748
castanho/preto	11(42.3)	6(54.5)	
<b>Cor dos cabelos</b>			
ruivo/loiro	16(61.5)	6(54.5)	0.728
castanho/preto	10(38.5)	5(45.5)	
<b>Efélides ombros</b>			
baixa	7(26.9)	3(27.3)	1.00
alta	19(73.1)	8(72.7)	
<b>QS infância</b>			
sim	22 (84.6)	11 (100)	0.296
não	4(15.4)	0	
<b>QS adulto</b>			
sim	13(50.0)	9(81.8)	0.141
não	13(50.0)	2(72.7)	
<b>SNA</b>			
sim	8(30.8)	7(63.6)	0.08
não	18(69.2)	4(36.4)	
<b>Gradação nevos</b>			
≤ 100	16(61.5)	3(27.3)	0.122
> 100	10(38.5)	8(72.7)	
<b>Tumor</b>	n(%)	n(%)	P
<b>Espessura</b>			
In situ	57(53.8)	19(45.2)	0.56
≤ 1mm	46(43.4)	21(50.0)	
> 1mm	3(2.8)	2(4.8)	
<b>Subtipo histológico</b>			
Extensivo superficial	90(94.7)	37(97.4)	1.0
Nodular	1(1.1)	0(0)	
Lentigo maligno	1(1.1)	0(0)	
Acral lentiginoso	2(2.1)	1(2.6)	
Outros	1(1.1)	0(0)	
<b>Nevo associado</b>			
sim	52(58.4)	23(67.6)	0.46
não	37(41.6)	11(32.4)	
<b>Localização</b>			
Cabeça e pescoço	3(2.8)	3(7.1)	<b>0.04</b>
Tronco	50(47.2)	28(66.7)	
Membros superiores	18(17.0)	5(11.9)	
Membros inferiores	35(33.0)	6(14.3)	

MF = história pessoal e familiar de melanoma e ou câncer de pâncreas; MPM = história pessoal de múltiplos melanomas primários sem história familiar de melanoma ou câncer de pâncreas; N° = número; min-máx = valor mínimo e máximo da variável estudada; QS = queimadura solar

Em relação à análise genética, na coorte de 37 pacientes, foram considerados para os cálculos de prevalência de variantes nos genes de alta penetrância estudados, os 36 pacientes que apresentavam três ou mais melanomas primários ou ao menos três melanomas diagnosticados na família, incluindo os melanomas do probando ou melanoma e câncer de pâncreas na família, com somatória mínima de 3 tumores (o probando MH31 foi excluído apenas nestas análises). Cinco probandos apresentaram variantes genéticas potencialmente relevantes nos genes de alta penetrância avaliados. Dois deles apresentaram variantes patogênicas (P) (5,6% 2/36) e quatro apresentaram variantes de significado incerto (VUS) (11,1%, 4/36). As variantes P foram detectadas nos genes *CDKN2A* e *BAP1*. Em relação às VUS, duas foram detectadas no gene *ACD*, uma no gene *POT1* e uma no gene *TERT*. Em um dos pacientes foram detectadas duas variantes, uma P em *CDKN2A* e uma VUS em *ACD*. A descrição e as características das variantes identificadas estão apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4** - Descrição das variantes P e VUS detectadas nos 36 probandos.

Paciente	Gene	Tipo variante	RefSeq (NM)	Códon alterado	Aminoácido alterado	dbSNP	MAF (gnomAD/ABraOM)	Classificação ClinVar	Classificação Varsome	Predição <i>in silico</i> * Predição benigna (b) / predição patogênica (p)	Classificação final (ACMG#)
MH11	<i>CDKN2A</i>	missense	NM_000077.4	c.71G>C	p.Arg24Pro	rs104894097	0,0000169 / nd	P (6) / PP (1)	P	8 b / 4 p	P
MH11	<i>ACD</i>	missense	NM_001082486.1	c.1513G>A	p.Glu505Lys	nd	nd	nd	PB	11 b / 1 p	VUS
MH16	<i>POT1</i>	missense	NM_015450.2	c.318T>G	p.Phe106Leu	nd	nd	nd	VUS	2 b / 11 p	VUS
MH20	<i>BAP1</i>	deleção frameshift	NM_004656.3	c.1265delG	p.Gly422Glufs*8	nd	nd	nd	P	0 b / 1 p	P
MH28	<i>TERT</i>	deleção inframe	NM_198253.2	c.1323_1325delGGA	p.Glu441del	rs377639087	0,00164 / 0,003295	Conflitante: B/PB (9); VUS (2)	VUS	1 b / 0 p	VUS
MH32	<i>ACD</i>	missense	NM_001082486.1	c.1220C>T	p.Ser407Leu	rs374925782	0,000072 / 0,001642	VUS	PB	8 b / 4 p	VUS

nd = não descrita; MAF = *minor allele frequency* – frequência alélica da variante; P = patogênica; PP = provavelmente patogênica; PB = provavelmente benigna; VUS = variante de significado clínico incerto

\*Preditores *in silico* de patogenicidade disponíveis na ferramenta Varsome (DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, LIST-S2, MutationTaster, MutationAssessor, PrimateAI, REVEL, SIFT, BayesDel\_addAF, DANN, M-CAP e MVP)

#Classificação final baseada nos critérios ACMG.

Quanto aos genes de baixa a moderada penetrância, 33 dos 37 probandos (89,2%) apresentaram ao menos uma variante no gene *MC1R*, mas nenhuma variante genética no gene *MITF* foi encontrada.

Em relação às variantes de *MC1R*, dezenove pacientes (51,4%) apresentaram os alelos R ou variantes descritas como RHC (R151C, R160W, D84E, D294H e R142H), sendo R151C (27%) e R160W (18,9%) as mais frequentes. Dezesesseis pacientes (43,2%) apresentaram os alelos r ou variantes não-RHC (V60L, V92M, I155T e R163Q), sendo V60L o mais frequente (24,3%). Apenas 6 pacientes (16,2%) apresentaram variantes de risco desconhecido descritas como alelos “u” (Q23\*, T272M, S83L, I264V e G89R) e 4 pacientes não apresentaram

nenhuma variante neste gene (10,8%). As variantes de *MC1R* encontradas em nossa coorte estão detalhadas na Tabela 5. Em 9 pacientes foram encontradas 2 variantes distintas em *MC1R* e os mesmos foram classificados como R/R, R/r, R/u, r/r, r/u ou u/u, de acordo com a combinação de alelos. Outros dois pacientes foram também classificados como r/r mas por apresentarem uma única variante em homozigose. Todos os outros pacientes apresentaram as variantes de *MC1R* em heterozigose. Os pacientes com apenas 1 variante em heterozigose foram caracterizados como R/0, r/0 ou u/0 e os pacientes *wild-type* como 0/0. Estes dados, juntamente com as principais características fenotípicas relacionadas a este gene, estão descritos na Tabela 6.

Tabela 5 – Descrição das variantes de *MC1R* nos 37 probandos

Paciente	Idade ao Diagnóstico	Grupo	Variantes
			gene <i>MC1R</i> (R, r, u)
MH01	36	MF	c.67C>T; p.(Gln23Ter) <sup>HT</sup> (u)
MH02	54	MF	c.67C>T; p.(Gln23Ter) <sup>HT</sup> (u)
MH03	35	MF	c.274G>A; p.(Val92Met) <sup>HT</sup> (r)
MH04	25	MPM	c.451C>T; p.(Arg151Cys) <sup>HT</sup> (R)
MH05	48	MPM	c.178G>T; p.(Val60Leu) <sup>HT</sup> (r)
MH06	49	MF	c.451C>T; p.(Arg151Cys) <sup>HT</sup> (R)
MH07	59	MPM	NEG
MH08	56	MF	c.880G>C; p.(Asp294His) <sup>HT</sup> (R)
MH09	54	MF	c.178G>T; p.(Val60Leu) <sup>HT</sup> (r)
MH10	30	MF	c.252C>A; p.(Asp84Glu) <sup>HT</sup> (R)
MH11	30	MF	c.478C>T; p.(Arg160Trp) <sup>HT</sup> (R)
MH12	33	MPM	c.178G>T; p.(Val60Leu) <sup>HT</sup> (r)
MH14	25	MPM	c.478C>T; p.(Arg160Trp) <sup>HT</sup> (R)
MH15	48	MPM	NEG
MH16	37	MF	c.451C>T; p.(Arg151Cys) <sup>HT</sup> (R)
MH17	38	MF	c.248C>T; p.(Ser83Leu) <sup>HT</sup> (u)
MH18	33	MF	NEG
MH19	37	MF	c.178G>T; p.(Val60Leu) <sup>HT</sup> (r)
MH20	27	MPM	c.790A>G; p.(Ile264Val) <sup>HT</sup> (u)
MH21	40	MPM	NEG
MH22	64	MF	c.478C>T; p.(Arg160Trp) <sup>HT</sup> (R)
MH23	58	MF	c.478C>T; p.(Arg160Trp) <sup>HT</sup> (R)
MH24	15	MF	c.451C>T; p.(Arg151Cys) <sup>HT</sup> (R)
MH25	69	MF	c.478C>T; p.(Arg160Trp) <sup>HT</sup> (R)
MH26	30	MF	c.464T>C; p.(Ile155Thr) <sup>HT</sup> (r)
MH27	51	MF	c.451C>T; p.(Arg151Cys) <sup>HT</sup> (R)
MH28	55	MF	c.451C>T; p.(Arg151Cys) <sup>HT</sup> (R)
MH29	33	MF	c.478C>T; p.(Arg160Trp) <sup>HT</sup> (R)
MH30	39	MF	c.425G>A; p.(Arg142His) <sup>HT</sup> (R)
MH31	54	MF	c.451C>T; p.(Arg151Cys) <sup>HT</sup> (R)
MH32	44	MF	c.451C>T; p.(Arg151Cys) <sup>HT</sup> (R)
MH33	40	MF	c.274G>A; p.(Val92Met) <sup>HT</sup> (r)
MH34	41	MPM	c.451C>T; p.(Arg151Cys) <sup>HT</sup> (R)
MH35	41	MPM	c.425G>A; p.(Arg142His) <sup>HT</sup> (R)
MH36	42	MF	c.178G>T; p.(Val60Leu) <sup>HT</sup> (r)
MH37	47	MF	c.451C>T; p.(Arg151Cys) <sup>HT</sup> (R)
MH38	27	MPM	c.488G>A; p.(Arg163Gln) <sup>HT</sup> (r)
			c.178G>T; p.(Val60Leu) <sup>HT</sup> (r)
			c.265G>C; p.(Gly89Arg) <sup>HT</sup> (u)

MF = história pessoal e familiar de melanoma e ou câncer de pâncreas; MPM = história pessoal de múltiplos melanomas primários sem história familiar de melanoma ou câncer de pâncreas; R = variante RHC; r = variante não RHC; u = variante com risco desconhecido; NEG = nenhuma variante de *MC1R* encontrada

**Tabela 6** - Características fenotípicas dos 37 probandos e classificação quanto às variantes de *MC1R*

Paciente	n° M	S	Fototipo	Olhos claros	Cabelos ruivos ou loiros	Alta densidade efélicas OMBROS	QS infância	QS adulto	n° QS	Variantes <i>MC1R</i>
MH01	19	M	II	SIM	SIM	SIM	X	SIM	1-5	u/0
MH02	3	M	IV	X	X	X	SIM	X	1-5	r/u
MH03	1	F	II	SIM	SIM	SIM	SIM	X	1-5	r/r *
MH04	3	M	II	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	>10	R/r
MH05	3	F	II	X	X	SIM	SIM	X	1-5	r/0
MH06	2	F	II	SIM	SIM	SIM	SIM	X	1-5	R/0
MH07	4	M	I	SIM	SIM	X	SIM	SIM	>10	0/0
MH08	4	F	II	SIM	SIM	SIM	SIM	X	6-10	R/r
MH09	1	M	I	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	>10	R/0
MH10	1	M	II	X	X	SIM	X	X	0	R/0
MH11	2	F	II	X	X	SIM	SIM	SIM	>10	r/0
MH12	4	M	II	X	X	X	SIM	SIM	6-10	r/0
MH14	3	M	II	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	>10	R/0
MH15	3	M	II	X	X	SIM	SIM	SIM	>10	0/0
MH16	6	F	II	X	SIM	SIM	SIM	X	1-5	R/u
MH17	2	M	II	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	6-10	0/0
MH18	3	M	II	X	SIM	X	SIM	SIM	>10	r/u
MH19	2	F	III	X	X	X	X	X	0	0/0
MH20	3	F	II	X	X	X	SIM	X	6-10	R/0
MH21	4	M	II	X	X	SIM	SIM	SIM	6-10	r/0
MH22	2	M	III	X	X	X	SIM	SIM	>10	R/0
MH23	6	M	II	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	>10	R/0
MH24	6	F	II	SIM	SIM	SIM	SIM	X	1-5	R/r
MH25	2	F	II	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	>10	R/0
MH26	5	F	II	SIM	SIM	SIM	SIM	X	1-5	R/0
MH27	2	F	II	SIM	X	SIM	SIM	X	>10	R/0
MH28	2	F	III	X	X	SIM	X	X	0	u/0
MH29	23	F	II	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	6-10	R/R
MH30	2	F	II	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	>10	r/r*
MH31	1	M	I	SIM	X	SIM	SIM	SIM	>10	R/0
MH32	2	F	II	X	SIM	X	SIM	X	6-10	r/0
MH33	4	M	I	SIM	SIM	SIM	SIM	X	6-10	R/0
MH34	5	F	II	X	SIM	SIM	SIM	SIM	6-10	R/r
MH35	6	M	II	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	>10	R/0
MH36	1	F	II	X	X	X	SIM	SIM	>10	r/0
MH37	2	F	II	X	X	X	SIM	SIM	6-10	r/0
MH38	4	M	I	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	>10	r/u

n° M = número de melanomas primários; S = sexo; X = característica ausente; QS = queimadura solar; n° QS - número estimado de queimaduras solares durante a vida; R = variante RHC; r = variante não RHC; u = variante com risco desconhecido; 0 = nenhuma variante encontrada; \* = variante em homozigose.

Em nosso estudo foi observada associação da variante R151C (variante RHC) com cabelos ruivos e loiros ( $p=0,006$ ), onde 80% dos pacientes ruivos apresentaram esta variante e 100% dos pacientes com esta variante eram ruivos ou loiros (Tabela 7).

Não encontramos diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos MF e MPM em relação às diferentes variantes de *MC1R*. Não foram encontradas outras associações entre as variantes isoladas ou combinadas de *MC1R* e sexo, idade ao diagnóstico, outras características fenotípicas, número de melanomas primários ou características histopatológicas do tumor primário.

**Tabela 7** - Variantes RHC de *MC1R* x cor dos cabelos nos 37 pacientes estudados.

VARIANTES RHC <i>MC1R</i>								
	R151C	R151C + R142H	R160W	D84E	D294H	sem variante RHC		
<b>Cor dos cabelos</b>							total	<b>significância</b>  <i>p</i> = 0.006
<b>RUIVO</b>	3 (60%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	5 (100%)	
<b>LOIRO</b>	6 (35,3%)	0 (0%)	2 (11,8%)	1 (5,9%)	1 (5,9%)	7 (41,2%)	17 (100%)	
<b>CASTANHO/PRETO</b>	0 (0%)	0 (0%)	5 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (66,7%)	15 (100%)	
<b>total</b>	9 (24,3%)	1 (2,7%)	7 (18,9%)	1 (2,7%)	1 (2,7%)	18 (48,6%)	37 (100%)	

Os dados da comparação das frequências das diferentes variantes de *MC1R* encontradas na nossa coorte e o grupo controle estão detalhados na Tabela 8. Foi observado importante incremento da frequência de variantes RHC ou alelos R na nossa coorte em relação ao grupo controle (O.R. 5.19, 95% C.I. 2.97-9.12,  $p < 0.001$ ). As variantes R151C (O.R. 7.29, 95 % C.I. 3.26-16.31,  $p < 0.001$ ) e R160W (O.R. 4.75, 95 % C.I. 2.00-11.28,  $p < 0.001$ ) foram as mais importantes. Não houve diferença quando analisadas as variantes não-RHC ou alelos r encontradas em nosso grupo de pacientes, mas as variantes de risco desconhecido (alelos u) encontradas, quando agrupadas, foram significativamente mais frequentes na nossa coorte (O.R. 13.86, 95 % C.I. 3.64-52.77,  $p < 0.001$ ).

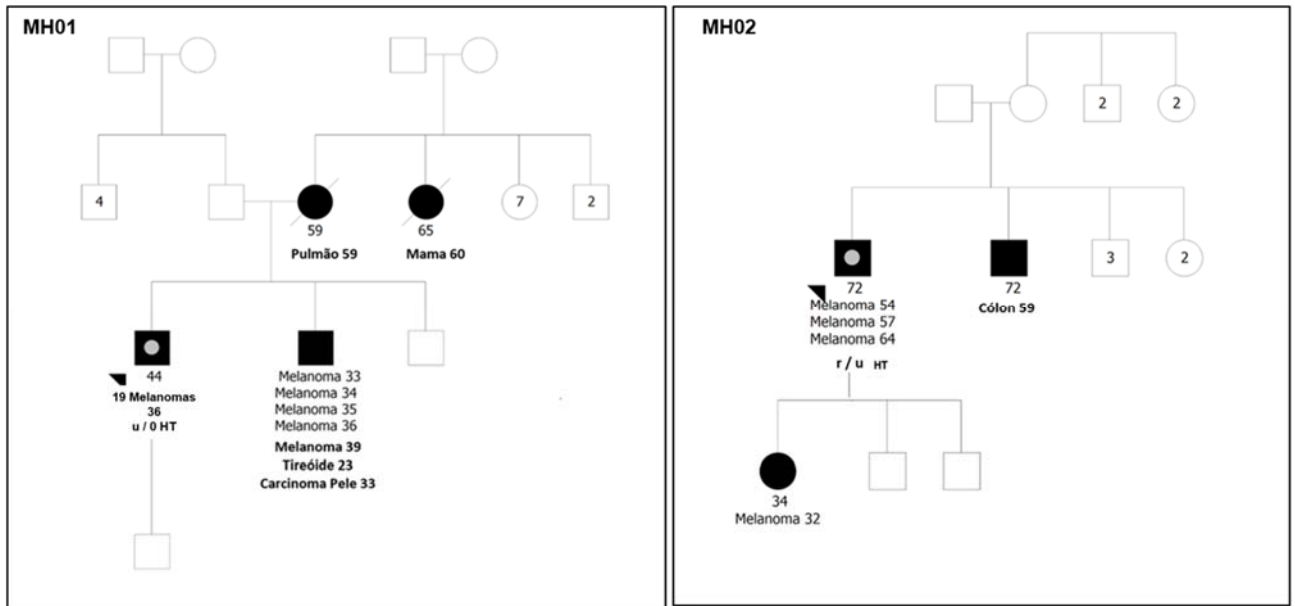
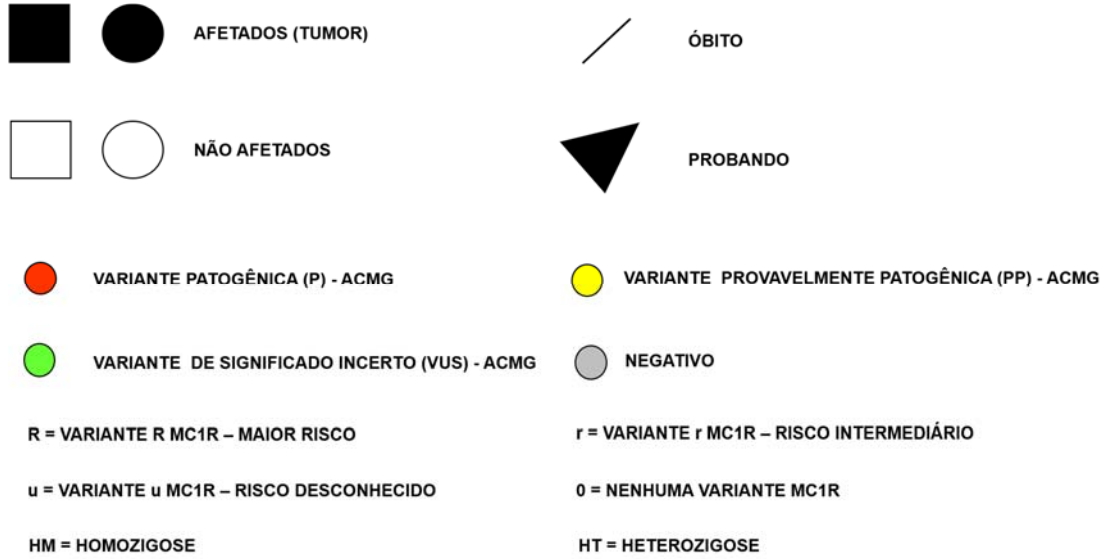
**Tabela 8** – Comparação das frequências das variantes de *MC1R* – coorte x grupo controle.

Variante	Risco	Estudo (37 pacientes)			ABraOM (609 indivíduos)			Estatística		
		HZ	HT	Freq Alel	HZ	HT	Freq Alel	OR	95% IC	<i>p</i> value
p.D84E	R	0	1	1,4%	0	2	0,2%	10,53	0,94-117,91	0,056
p.R142H	R	0	1	1,4%	0	1	0,1%	21,06	1,30-341,17	0,032
p.R151C	R	0	9	12,2%	0	26	2,1%	7,29	3,26-16,31	< 0,001
p.R160W	R	0	7	9,5%	1	29	2,5%	4,75	2,00-11,28	< 0,001
p.D294H	R	0	2	2,7%	0	21	1,7%	2,01	0,46-8,77	0,355
<b>Total R</b>		<b>0</b>	<b>20</b>	<b>27,0%</b>	<b>1</b>	<b>79</b>	<b>6,7%</b>	<b>5,20</b>	<b>2,97-9,10</b>	<b>&lt; 0,001</b>
p.V60L	r	1	8	13,5%	5	107	9,6%	2,79	0,69-2,79	0,357
p.V92M	r	1	2	5,4%	1	46	3,9%	3,88	0,47-3,88	0,574
p.I155T	r	0	1	1,4%	0	7	0,6%	19,18	0,28-19,18	0,435
p.R163Q	r	0	1	1,4%	10	84	8,5%	1,14	0,02-1,14	0,067
<b>Total r</b>		<b>2</b>	<b>12</b>	<b>21,6%</b>	<b>16</b>	<b>244</b>	<b>22,7%</b>	<b>0,94</b>	<b>0,53-1,66</b>	<b>0,836</b>
p.Q23X	u	0	2	2,7%	0	2	0,2%	17,33	2,4-124,84	0,005
p.G89R	u	0	1	1,4%	0	1	0,1%	17,33	1,07-279,95	0,045
p.I264V	u	0	1	1,4%	0	2	0,2%	8,66	0,78-96,71	0,079
<b>Total u</b>		<b>0</b>	<b>4</b>	<b>5,4%</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0,4%</b>	<b>13,86</b>	<b>3,64-52,77</b>	<b>&lt; 0,001</b>

HZ – homozigose; HT- heterozigose; Freq Alel – frequência do alelo; OR – odds ratio; IC – intervalo de confiança



A seguir estão retratados os heredogramas dos 37 probandos (Figuras 1 a 21) com as seguintes legendas:



**Figura 1** – Heredograma dos probandos MH01 e MH02

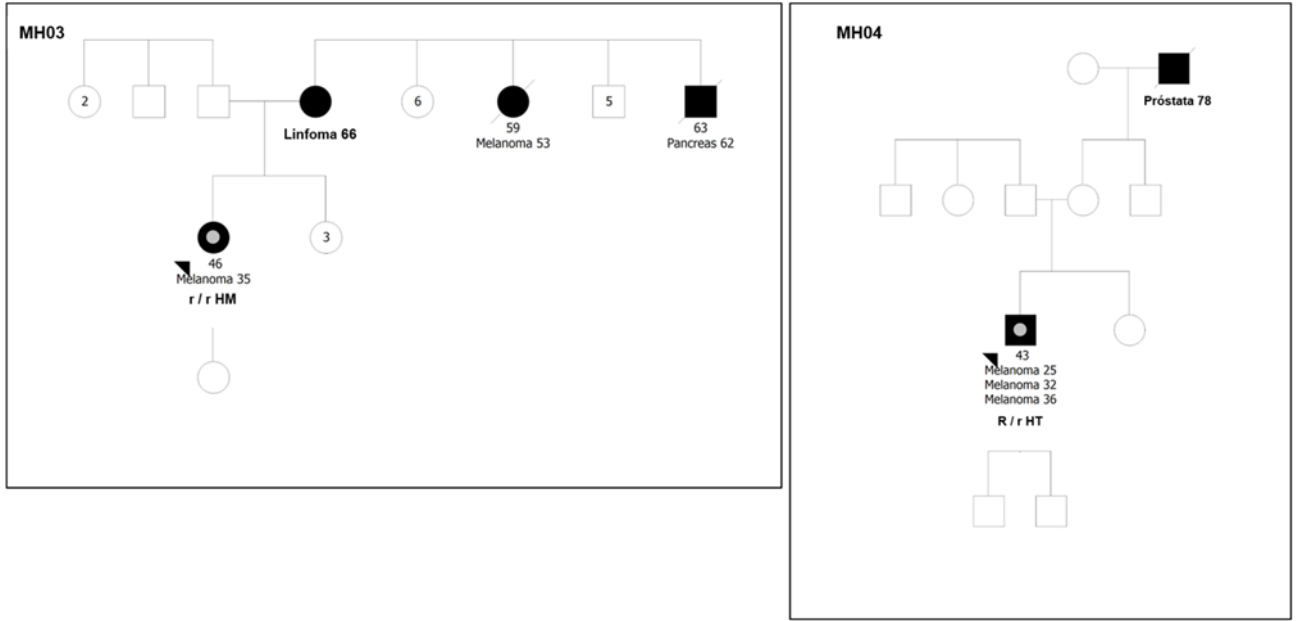


Figura 2 – Heredograma dos probandos MH03 e MH04.

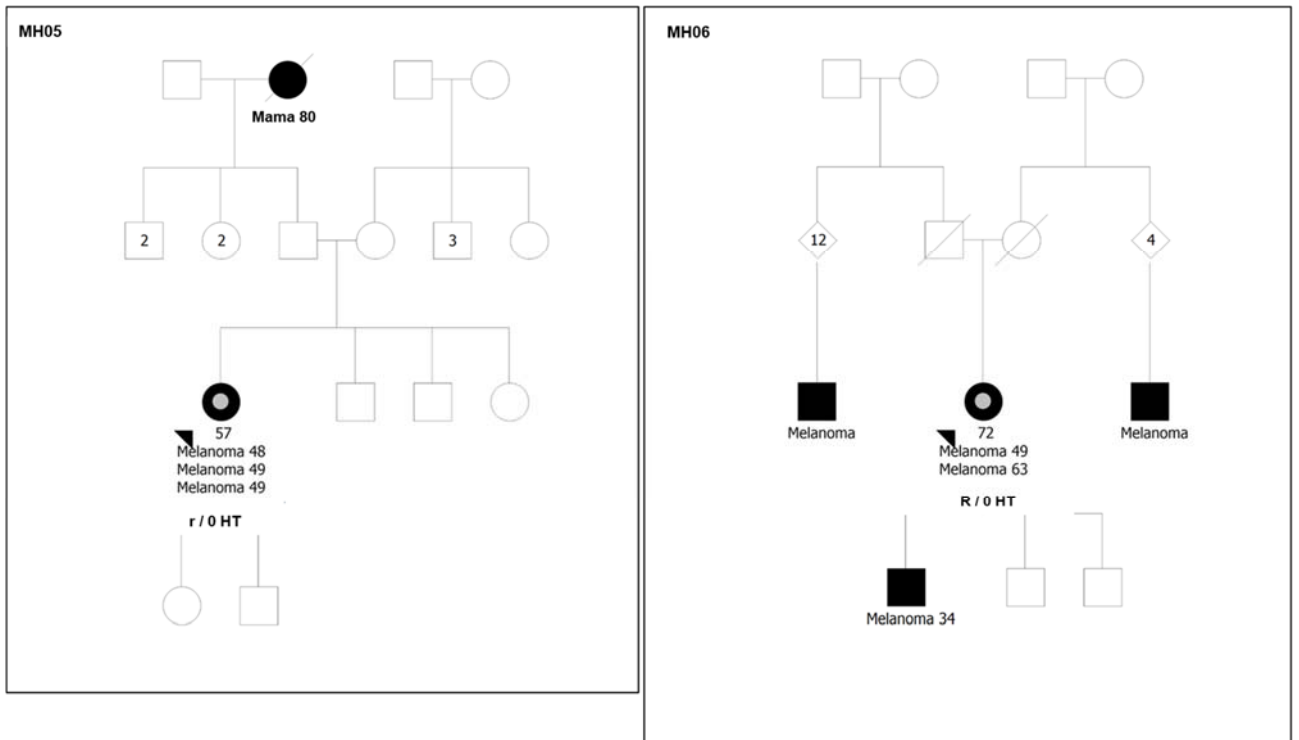


Figura 3 – Heredogramas probandos MH05 e MH06

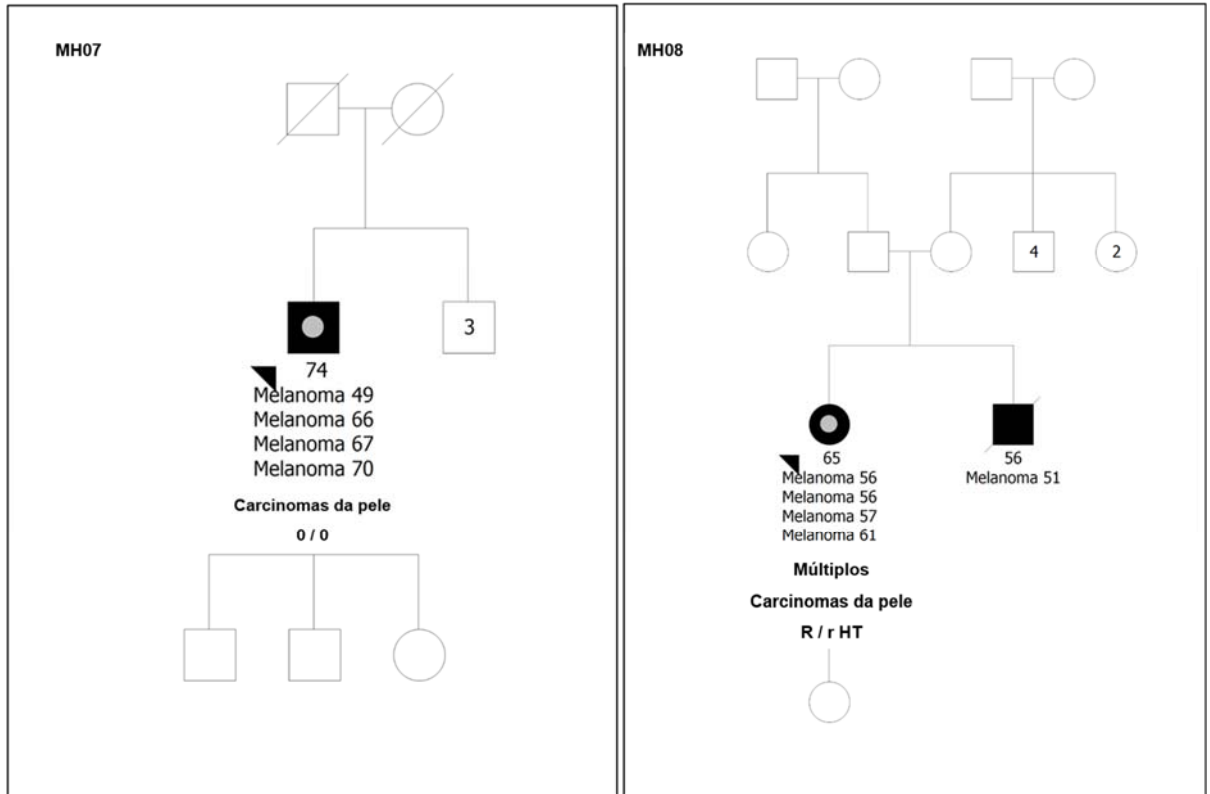


Figura 4 – Heredograma dos probandos MH07 e MH08

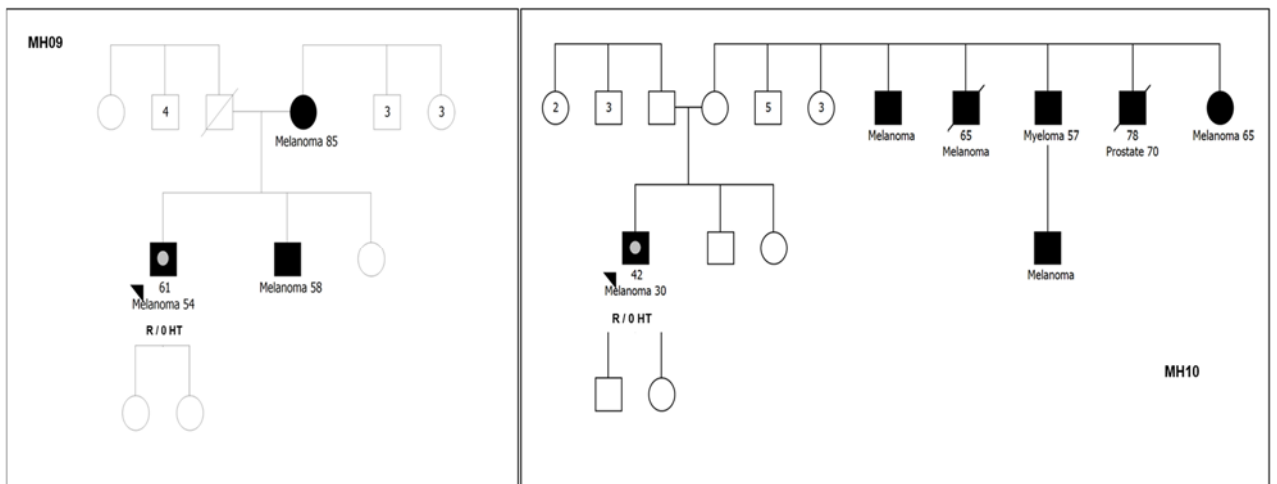


Figura 5 – Heredograma dos probandos MH09 e MH10

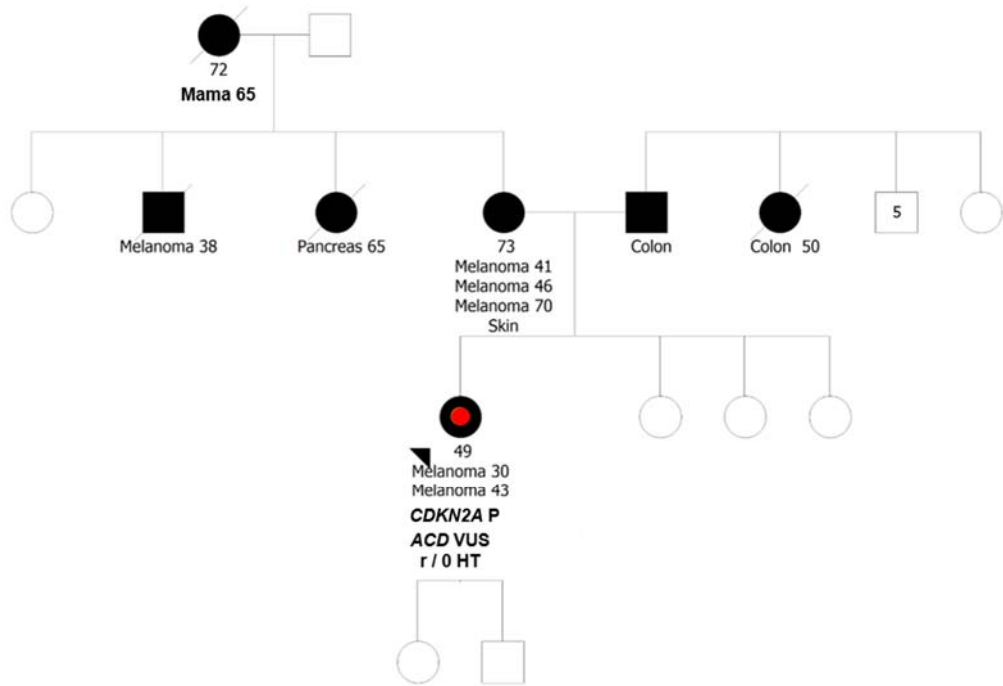


Figura 6 – Heredograma do probando MH11

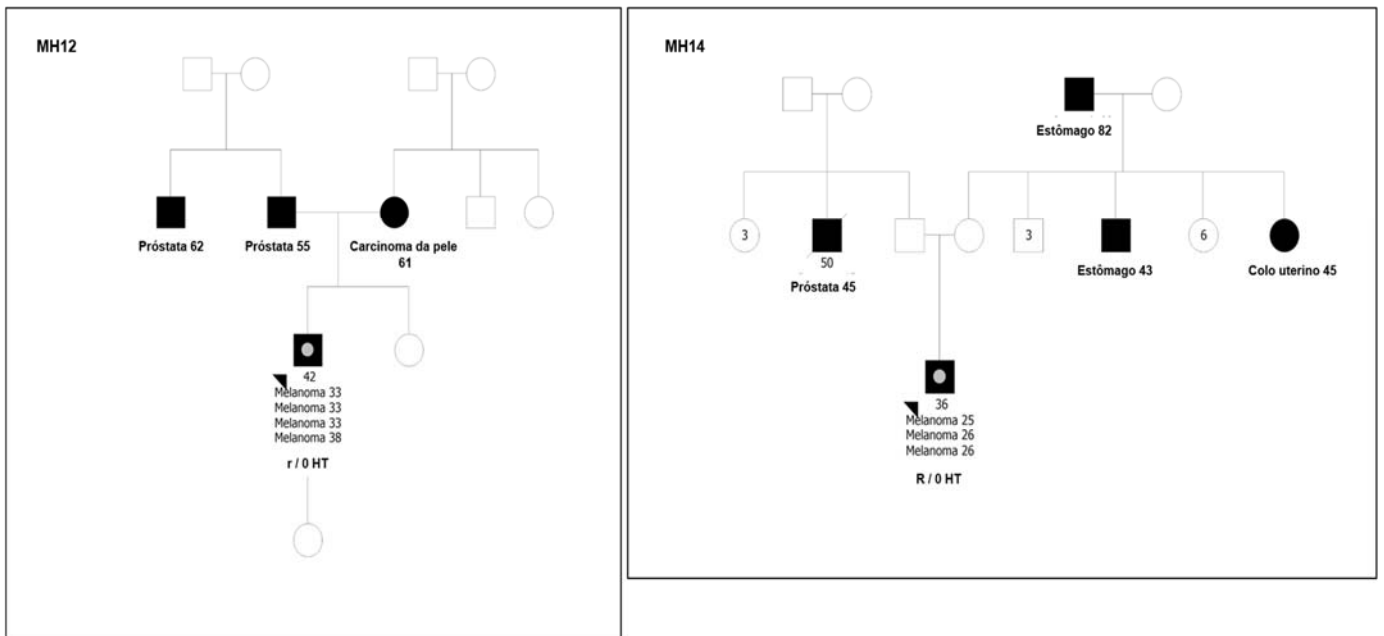


Figura 7 – Heredograma dos probandos MH12 e MH14

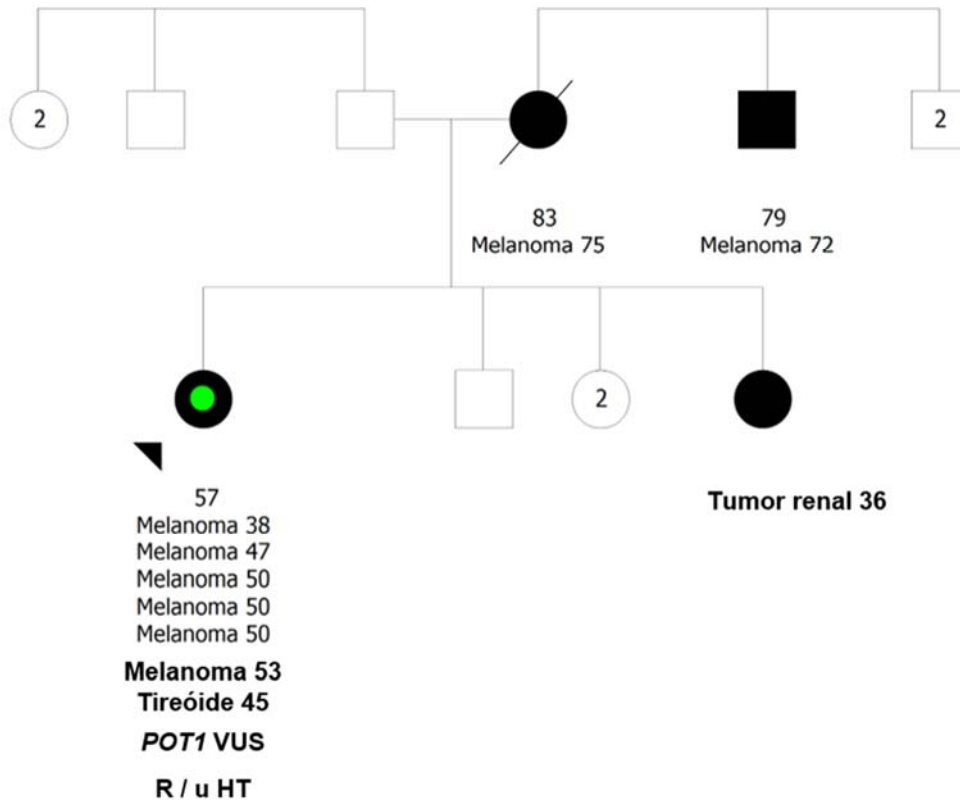


Figura 8 – Heredograma do probando MH16

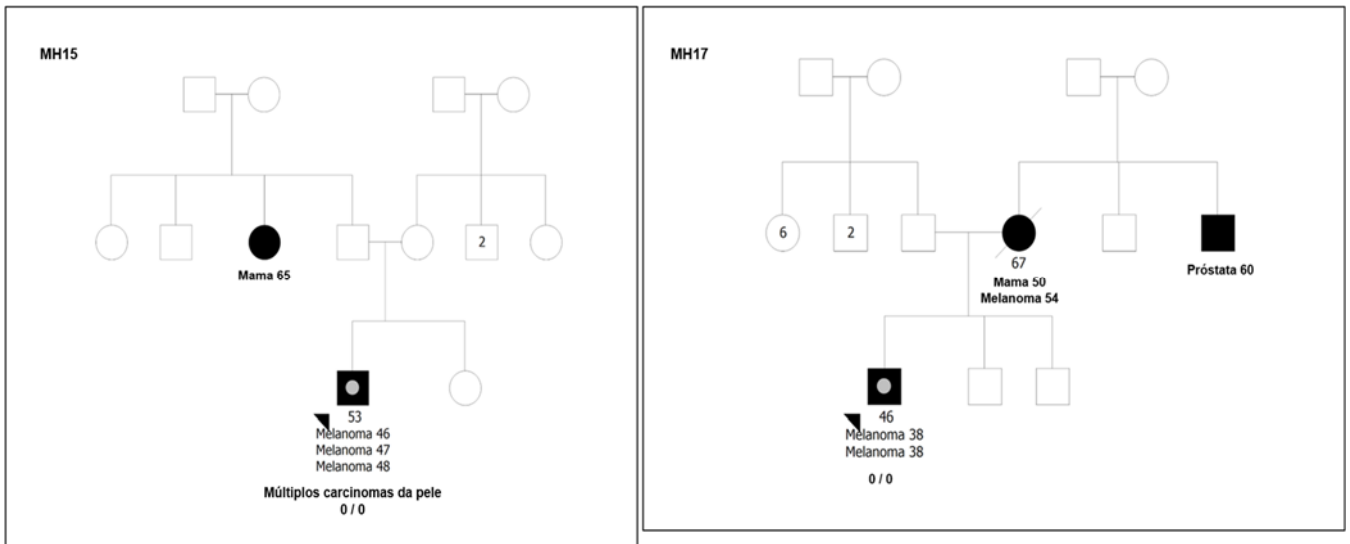


Figura 9 – Heredograma dos probandos MH15 e MH17

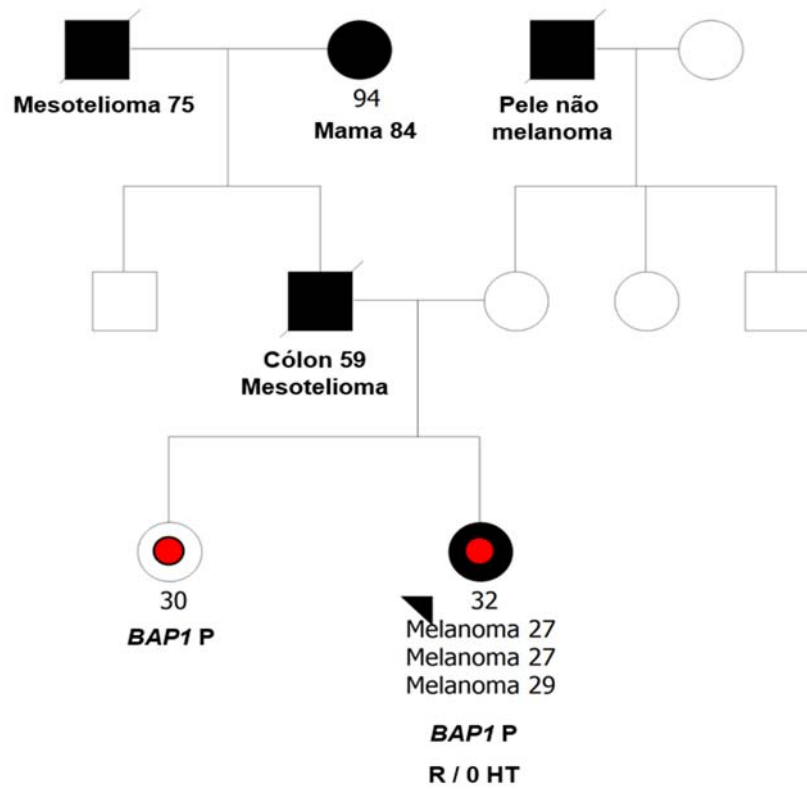


Figura 10 – Heredograma do probando MH20

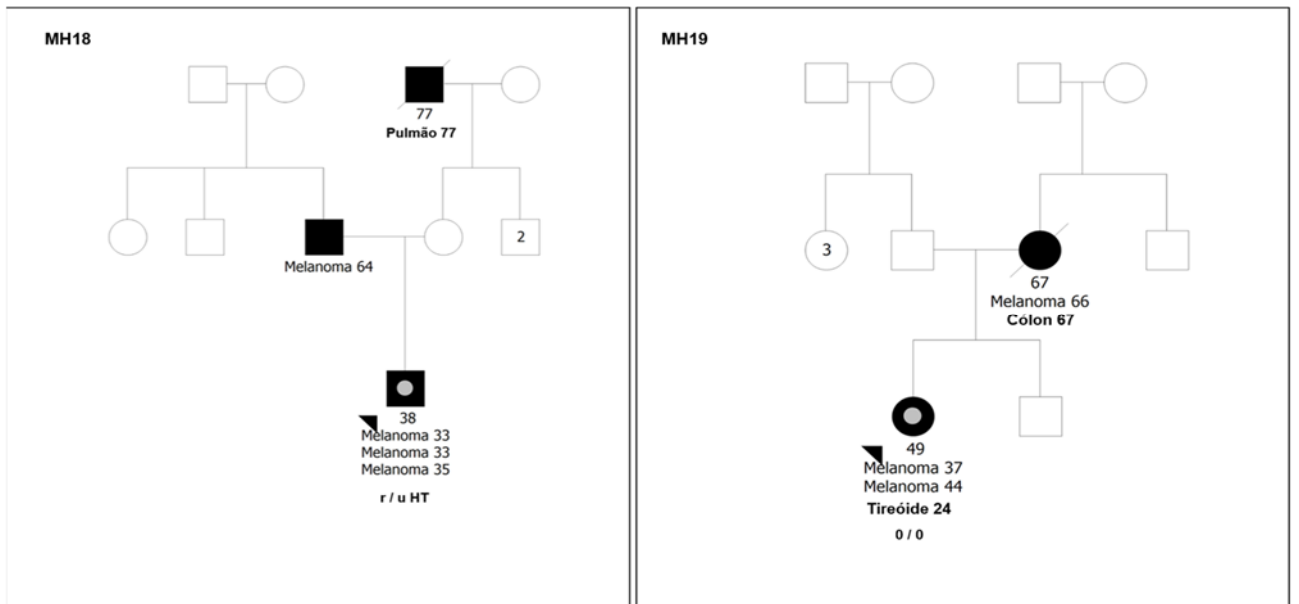


Figura 11 – Heredograma dos probandos MH18 e MH19

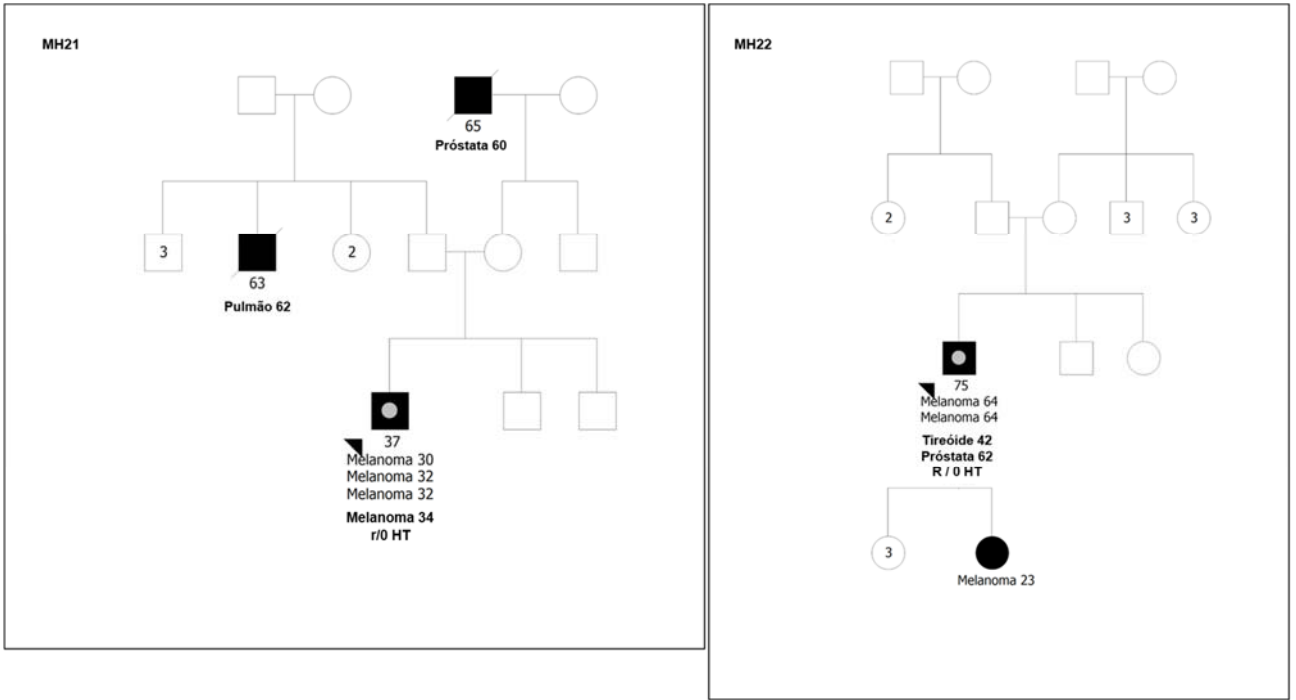


Figura 12 – Heredograma dos probandos MH21 e MH22

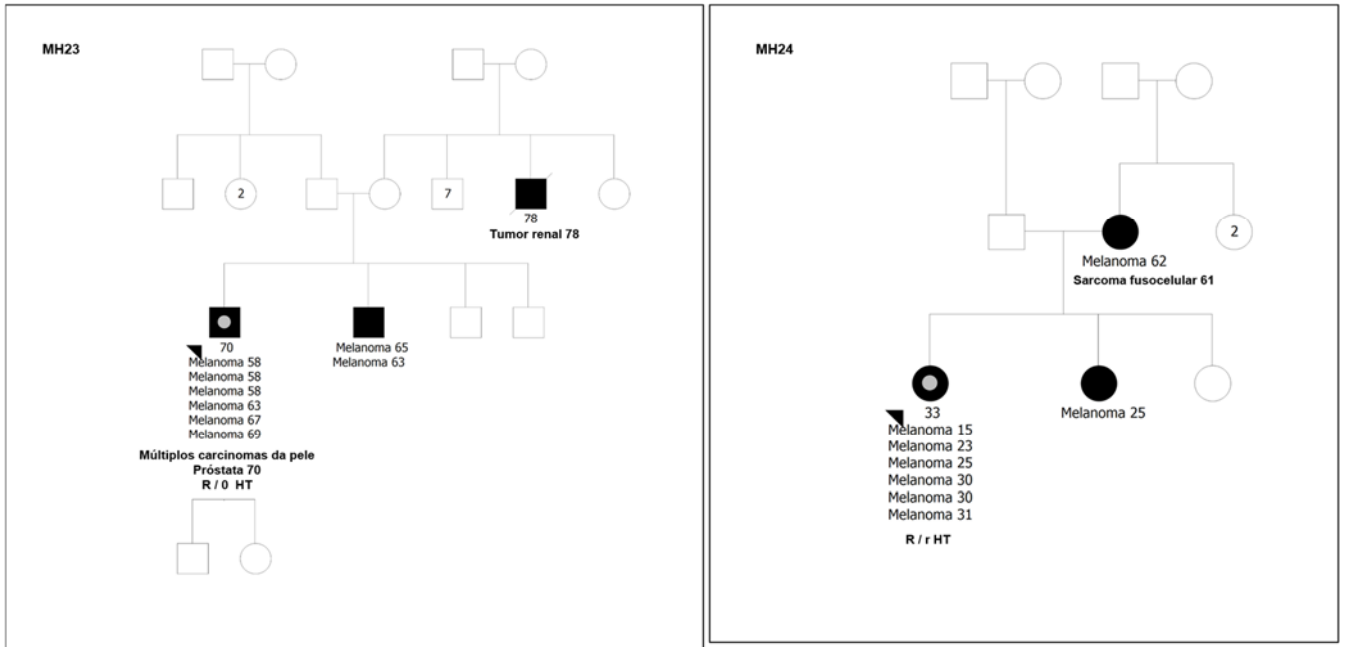


Figura 13 – Heredograma dos probandos MH23 e MH24

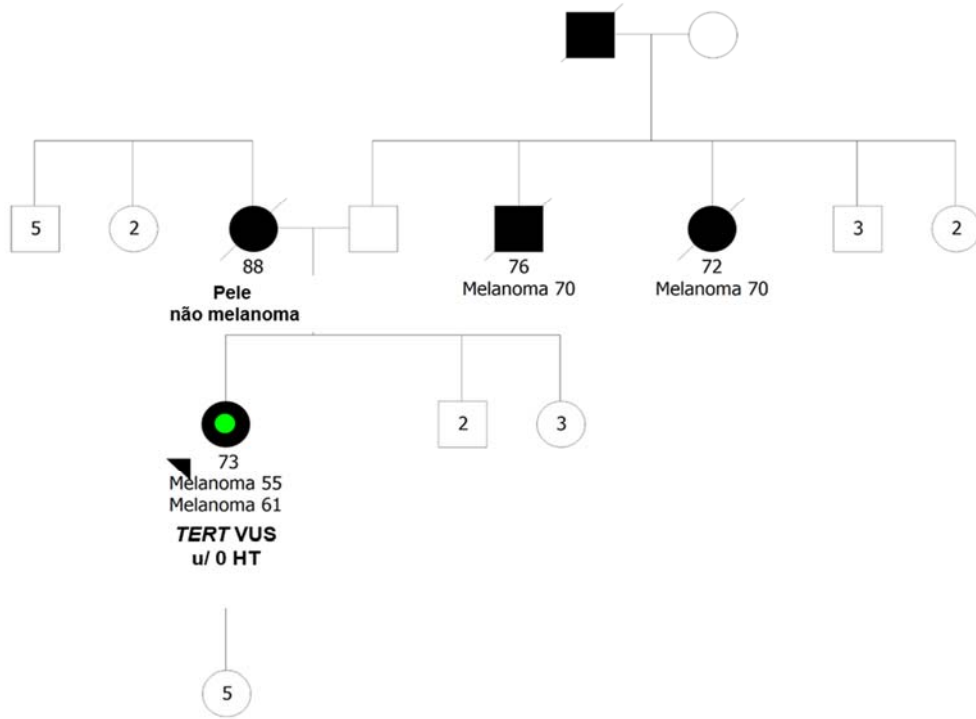


Figura 14 – Heredograma probando MH28

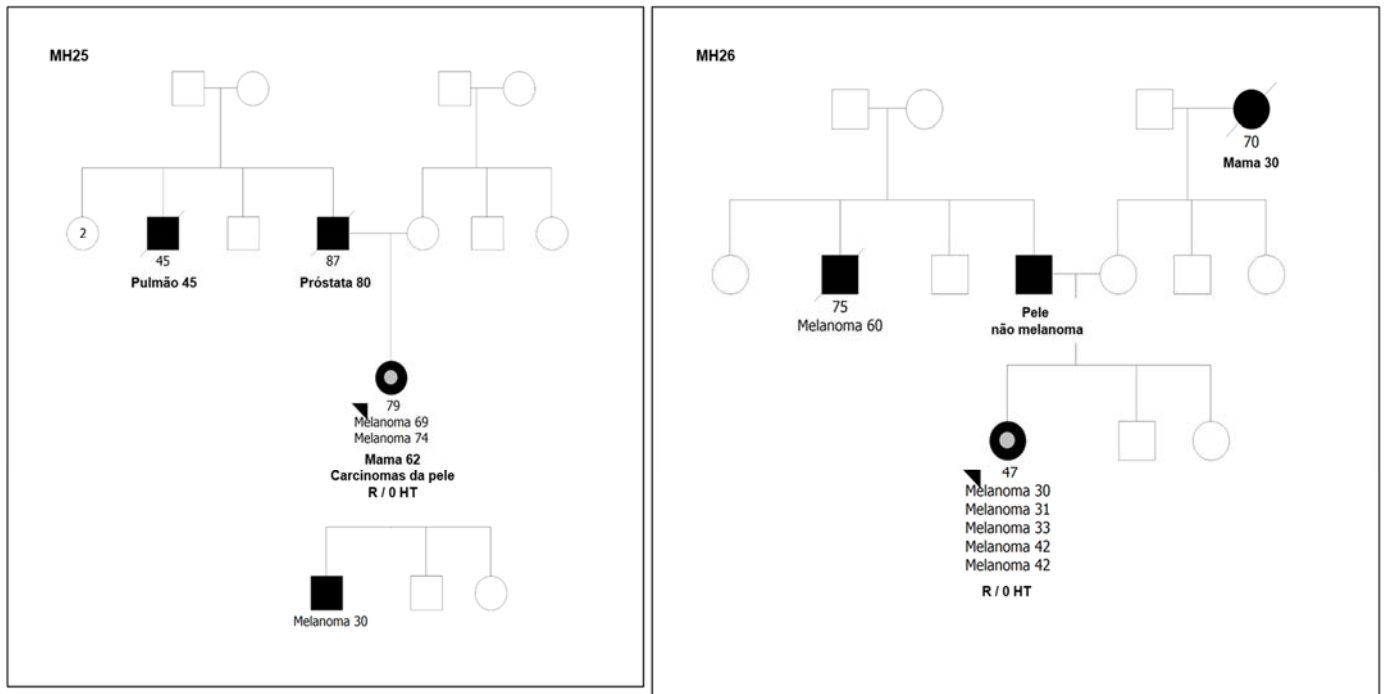


Figura 15 – Heredograma dos probandos MH25 e MH26



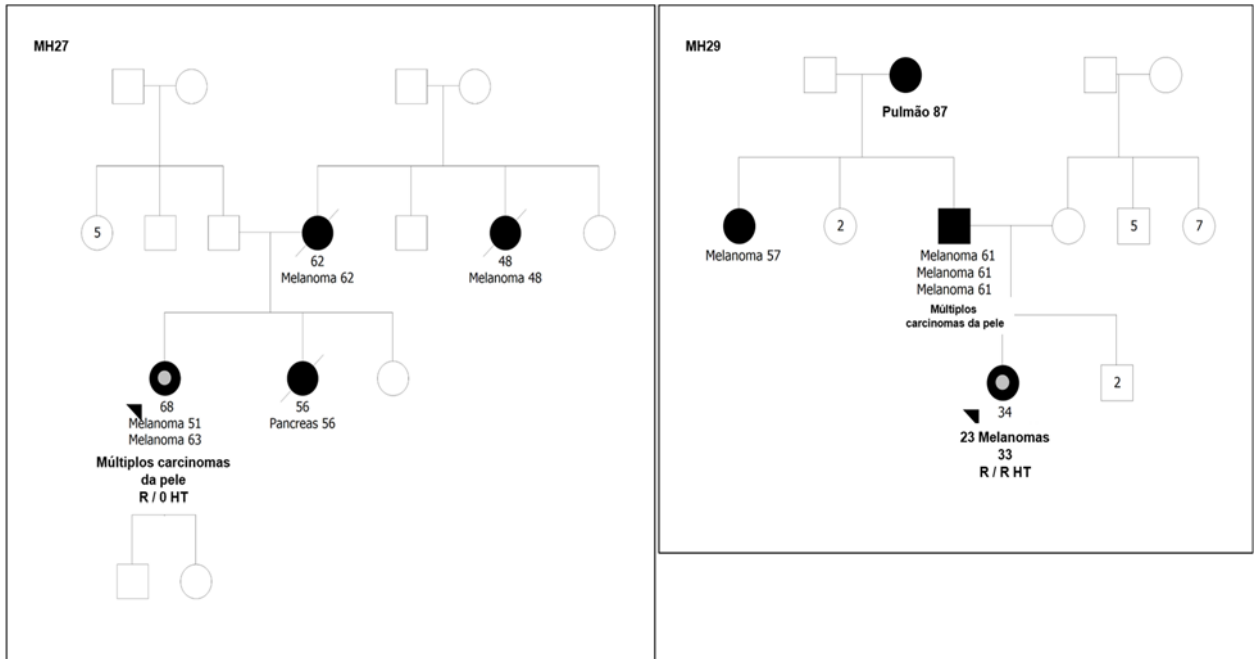


Figura 16 – Heredograma dos probandos MH27 e MH29

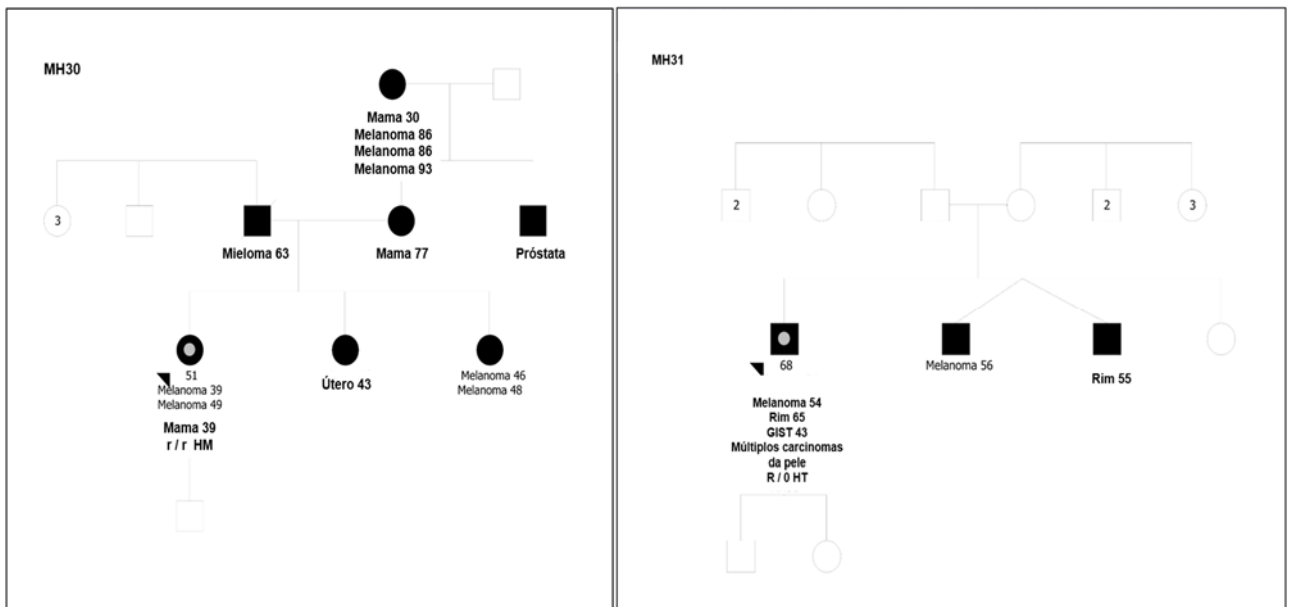


Figura 17 – Heredograma dos probandos MH30 e MH31

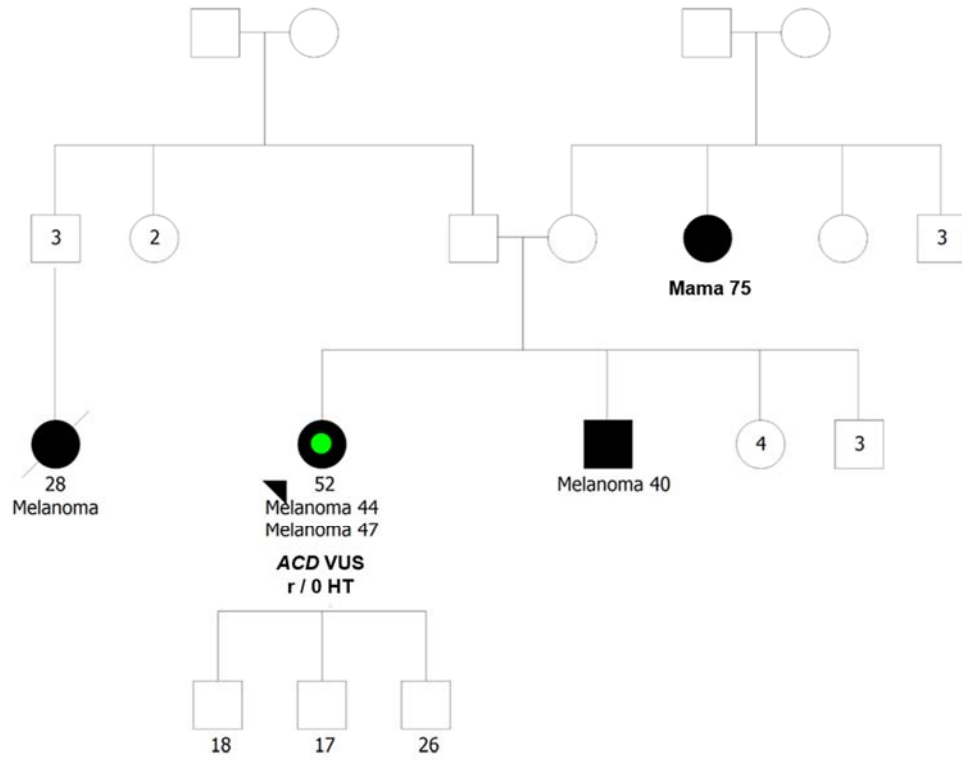


Figura 18 – Heredograma do probando MH32

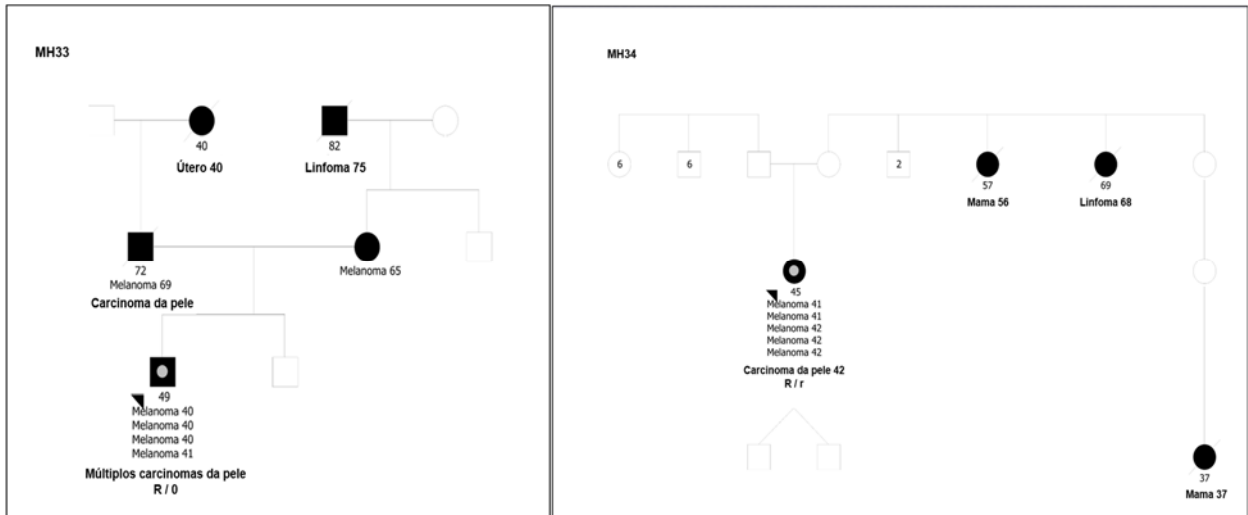
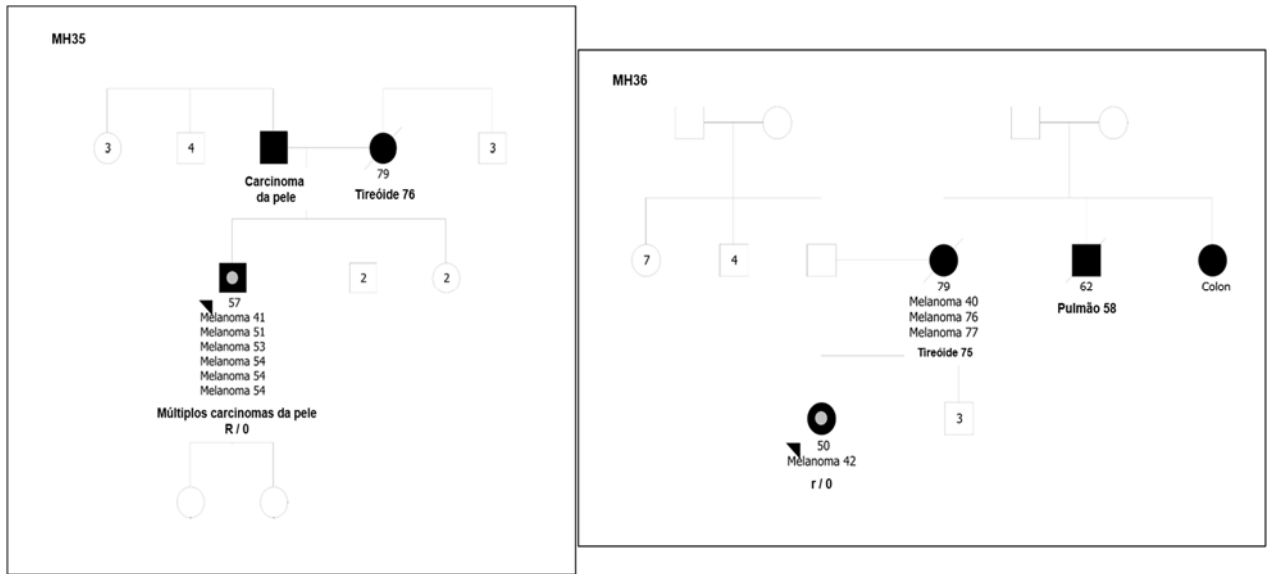
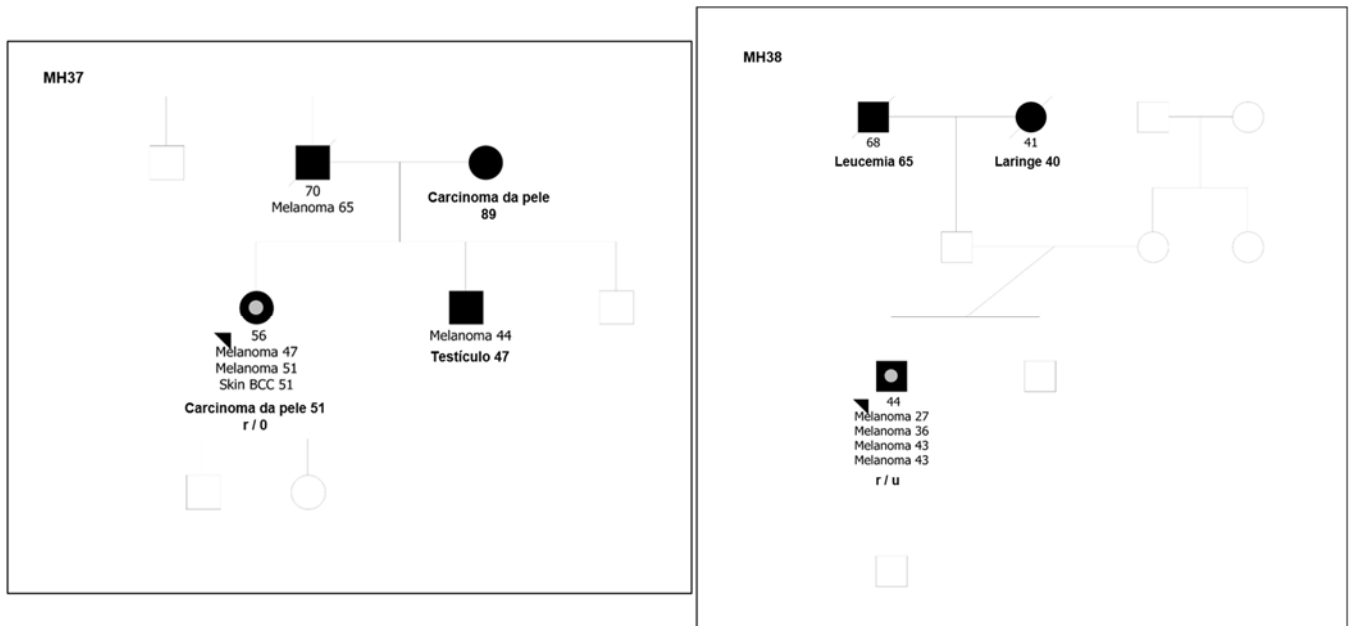


Figura 19 – Heredograma dos probandos MH33 e MH34



**Figura 20** – Heredograma dos probandos MH35 e MH36



**Figura 21** – Heredograma dos probandos MH37 e MH38

## 6 DISCUSSÃO

Foram estudados 37 pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo e critério clínico para melanoma hereditário. Os probandos foram caracterizados de acordo com seu fenótipo de pigmentação, aspectos do tumor primário, história familiar e pessoal de câncer e pesquisa de variantes dos principais genes de susceptibilidade ao melanoma.

Nossos pacientes apresentam idade mais precoce ao diagnóstico do primeiro melanoma (média de 40,1 anos) do que a população geral, maior prevalência de melanomas finos (96,7%) considerados os melanomas abaixo de 1,0mm de espessura, incluindo melanomas *in situ*, predomínio do subtipo histológico extensivo superficial (85,8%) e grande número de pacientes com história de queimadura solar na infância (89,2%), como descrito em outros estudos que caracterizaram pacientes com critérios para SMF (Aguilera et al. 2014; Márquez-Rodas et al. 2015). Os pacientes apenas com melanoma múltiplo sem história familiar de melanoma (MPM) apresentaram média de idade ao diagnóstico do primeiro melanoma significativamente mais baixa do que os probandos com história familiar de melanoma (MF) mas não foram encontrados dados na literatura que corroborem ou justifiquem este resultado.

A frequência de variantes patogênicas nos genes de alta penetrância estudados foi baixa (5,6% - 2/36 - total; 4% para o grupo MF -1/25 e 9,1% para o grupo MPM - 1/11), considerando-se os critérios utilizados para seleção dos probandos estudados e do número de melanomas encontrados nos mesmos e nas famílias. Evidências na literatura mostram que quanto maior o número de melanomas na família e quanto maior o número de tumores primários no paciente, maior a chance de encontro de variante germinativa em genes de alta penetrância (Goldstein et al. 2007; Bruno et al. 2016; Pellegrini et al. 2017; Huerta et al. 2018). Em consonância com essas observações, o estudo prévio do nosso grupo (de Avila et al. 2014), citado anteriormente, que considerou dois casos de melanoma na família (MF) ou história pessoal de no mínimo dois melanomas primários (MPM), a prevalência de variantes patogênicas em *CDKN2A* foi de 13,5% (8/59), sendo 18,4% (7/38) nos pacientes FM e 4,7% (1/21) nos pacientes MPM. Quando o critério clínico considerado foi pacientes FM com múltiplos melanoma primários, a prevalência de variantes patogênicas aumentou para 36,4% (4/11). No estudo atual nós estabelecemos critérios clínicos mais restritivos para a seleção dos pacientes de pelo menos 3 melanomas na família (ou associação de melanoma e câncer de pâncreas) ou 3 melanomas primários. Para nossa surpresa, a frequência de variantes P no gene

*CDKN2A* foi expressivamente mais baixa (2,8% 1/36) passando para 5,6% (2/36) quando consideramos os demais genes do painel. Outra diferença encontrada entre os pacientes do estudo atual em relação ao estudo anterior foi a presença de determinadas características fenotípicas. Na coorte atual tivemos prevalência de olhos e cabelos claros (54% e 59,4%, respectivamente) e pacientes com múltiplos nevos (> 50) em 75,4% dos casos. Na coorte do estudo de 2014 foram encontrados olhos e cabelos escuros em 52 % dos casos e 58% dos pacientes apresentavam menos de 50 nevos (Moredo et al. in press). A frequência de variantes patogênicas em genes de alta penetrância encontrada no estudo atual está mais próxima do descrito na coorte do sul em 2008 (7%; 2/29) assim como as características fenotípicas dos pacientes, exceto pela presença do fenótipo de SNA, que não foi visto naquele estudo (Ashton-Prolla et al. 2008) e foi encontrado em mais de 40% dos pacientes da nossa coorte.

O probando que apresentou a variante P em *CDKN2A* (MH11), também apresentou uma das VUS em *ACD* e variante não-RHC de *MC1R* (r/0). Esse probando apresenta pele clara, história de queimadura solar na infância e idade adulta, número total de nevos < 100, sem o fenótipo de SNA, história pessoal de melanoma múltiplo, diagnóstico em idade precoce (30 anos), mãe com melanoma múltiplo, tio materno com melanoma, tia materna com câncer de pâncreas, além de história familiar de câncer de mama e cólon (Figura 6). A variante p.Glu505Lys do gene *ACD* é uma variante não descrita no ClinVar e é classificada como provavelmente benigna pelo Varsome, apresentando conflito entre os preditores *in silico* de patogenicidade, mas com a maioria indicando benignidade (11 de 12 preditores). Trata-se de família que caracteriza muito bem o fenótipo descrito para as variantes patogênicas no gene *CDKN2A* com idade precoce ao diagnóstico, múltiplos melanomas primários, múltiplos familiares acometidos por melanoma e associação com câncer de pâncreas (Goldstein et al. 2007; Hansson et al. 2008)

O probando portador da variante patogênica no gene *BAP1* (MH20) apresenta múltiplos nevos, pele clara e história de queimadura solar na infância além de múltiplos melanomas (3 tumores) diagnosticados em idade precoce. Não apresenta história familiar de melanoma, mas apresenta 2 familiares com história de mesotelioma (Figura 10). Neste probando foram diagnosticados tumores cutâneos spitzóides atípicos denominados BIMTs (*BAP1*-inactivated melanocytic tumors) e que são considerados marcadores clínicos de variante germinativa no gene *BAP1*. A descrição detalhada dos aspectos clínicos, dermatoscópicos, da microscopia confocal e histopatológicos das lesões cutâneas (melanoma e BIMTs), além dos aspectos genéticos, foram publicados recentemente (Soares de Sá et al. 2019 – Anexo 2). A irmã deste probando, ainda assintomática, também é portadora da variante no gene *BAP1*. Neste probando

também foi detectada variante RHC de *MC1R* (R/0). Nesse paciente, apesar da ausência do fenótipo de múltiplas efélides e cabelos ruivos, a presença da variante RHC de *MC1R* pode ter contribuído para seu risco aumentado para melanoma associado à presença de variante patogênica em *BAP1* (Wendt et al. 2016).

O outro caso em que foi encontrada VUS em *ACD* (MH32) apresenta história pessoal de melanoma múltiplo e história familiar de melanoma e câncer de mama (Figura 16) e variante não-RHC de *MC1R* (r/0), além de pele e cabelos claros e história de queimadura solar na infância. A variante p.Ser407Leu do gene *ACD* é classificada como de significado incerto pelo ClinVar e como provavelmente benigna pelo Varsome, apresentando conflito entre os preditores *in silico* de patogenicidade, mas com a maioria indicando benignidade (8 de 12 preditores).

O caso que apresentou a VUS em *TERT* (MH28) apresenta apenas grande densidade de efélides sem outras características fenotípicas de risco, história pessoal de melanoma múltiplo e bócio colóide da tireóide além de história familiar de melanoma com múltiplos familiares acometidos e câncer de pele não melanoma (Figura 14). Foi identificada variante de risco desconhecido de *MC1R* (u/0). A variante p p.Glu441del do gene *TERT* apresenta classificações conflitantes no ClinVar, com 8 laboratórios a classificando como provavelmente benigna ou benigna e 2 laboratórios como VUS, que mencionam resultados conflitantes de patogenicidade em estudos funcionais. A classificação da variante pela ferramenta Varsome é de provavelmente benigna e somente um preditor *in silico* está disponível, classificando a variante como benigna.

O probando onde foi encontrada VUS em *POT1* (MH16) apresenta pele e cabelos claros, história de queimadura solar na infância, história pessoal de 6 melanomas primários e câncer de tireóide, além de história familiar de melanoma (Figura 8). A variante p.Phe106Leu do gene *POT1* não está descrita no ClinVar e é classificada como VUS pelo Varsome, apresentando conflito entre os preditores *in silico*, mas com a maioria indicando patogenicidade (11 de 13 preditores). A variante está localizada no domínio de ligação ao DNA 1 (OB1), domínio no qual outras variantes *missense* patogênicas foram descritas (Shen et al. 2020). Estudos recentes identificaram variantes no gene *POT1* em famílias de alto risco para melanoma em associação com câncer de tireóide, como visto neste caso (Wilson et al. 2017; Potrony et al. 2019). Este paciente foi detectado com 2 variantes distintas de *MC1R* (R/u). É descrito que pacientes com duas variantes de *MC1R* apresentam risco aumentado para melanoma cutâneo quando comparados com pacientes com apenas uma variante (Demenais et al. 2010) e este risco é duas vezes maior quando comparado com pacientes *wild-type* (0/0) (Wendt et al. 2016).

Muitos casos negativos para os genes de alta penetrância estudados apresentam múltiplos melanomas primários no probando e algumas vezes também nos familiares, sendo famílias de grande interesse para aprofundamento do estudo genético com possível ampliação do painel de genes de acordo com outros tumores encontrados na família ou estudos de exoma. É possível que em algumas destas famílias o risco aumentado para melanoma possa estar relacionado ao genótipo de *MC1R*.

Nossa coorte apresentou alta prevalência de variantes no gene *MC1R* (89,4% total – 92,3% no grupo MF e 81,8% no grupo MPM), sendo R151C (alelo R) e V60L (alelo r) as variantes mais frequentes (27% e 24,3%, respectivamente). Estudo recente mostrou que pacientes que apresentam qualquer variante de *MC1R* possuem risco 60% maior para melanoma cutâneo quando comparados a pacientes *wild-type* (Tagliabue et al. 2018). Mais de 50% dos pacientes eram portadores de variantes RHC do gene *MC1R*, sendo que 9 pacientes apresentaram 2 variantes distintas, o que determina ainda maior risco para melanoma. A frequência de variantes RHC na nossa coorte foi significativamente maior quando comparado à do grupo controle e a variante R151C mostrou associação com a presença de cabelos claros (ruivos e loiros) dados que corroboram a alta prevalência dos alelos R em pacientes com melanoma e sua participação na determinação de fenótipo de risco (Williams et al. 2011; Swope e Abdel-Malek 2018).

O probando MH29 apresenta múltiplos melanomas primários, diagnósticos em idade precoce, múltiplos familiares acometidos e familiar de primeiro grau também com melanoma múltiplo (Figura 16). Do total de 23 melanomas 20 foram diagnosticados como melanomas *in situ* e 3 melanomas finos. Paciente apresenta fenótipo de risco (pele clara, cabelos ruivos e múltiplas efélides) além de múltiplos nevos (> 300), SNA e história de queimadura solar na infância e idade adulta. Nesse caso não foi detectado nenhuma variante nos genes de alta penetrância estudados, mas esse probando apresenta duas variantes RHC do gene *MC1R* (*R/R*), o que poderia, em parte, explicar seu alto risco para melanoma. É descrito que pacientes ruivos que expressam duas variantes RHC de *MC1R* representam 1 a 2 % da população mundial, mas 16% de todos os pacientes com melanoma (Swope e Abdel-Malek 2018). Em 2019, Duffy et al. descreveram que variantes de *MC1R* e o número de nevos apresentam sinergismo na determinação de risco para melanoma e o genótipo R/R combinado à presença de múltiplos nevos caracteriza perfil de pacientes de muito alto risco. Neste caso, se o genótipo R/R for hereditário, poderia justificar os múltiplos casos de melanoma na família (Potrony et al. 2015).

O probando MH01 (Figura 1) apresenta múltiplos melanomas primários, o primeiro diagnosticado antes dos 40 anos. Do total de 19 melanomas 14 foram diagnosticados como *in*

*situ*, 4 melanomas finos ( $\leq 1,0\text{mm}$ ) e apenas 1 melanoma espesso ( $> 1,0\text{mm}$ ). Apresenta pele clara, cabelos loiros, olhos verdes, alta densidade de efélides, queimaduras solares na infância e adolescência e múltiplos nevos ( $> 200$ ) com fenótipo da SNA. Seu irmão também apresenta múltiplos melanomas além de carcinoma da pele e da tireóide. O probando não apresenta variante em nenhum dos genes de alta penetrância estudados. Diferentemente do probando MH29, o probando MH01 apresenta apenas uma variante de risco desconhecido de *MC1R* (u/0 – variante p.Gln23Ter). Apesar de apresentar risco desconhecido, a variante p.(Gln23Ter) é uma variante de perda de função. Variantes de perda de função em *MC1R* já foram associadas a risco de múltiplos melanomas primários (de Torre et al. 2010). Ainda, este grupo de variantes (alelos u) também mostrou maior prevalência em nossa coorte quando comparada ao grupo controle, podendo caracterizar grupo de pacientes de alto risco em nossa população.

Os nossos dados mostram que variantes de *MC1R* podem ter papel relevante no risco de melanoma em pacientes com fenótipo de risco, com grande exposição solar associado a outros fatores de risco como múltiplos nevos, múltiplos melanomas primários e história familiar de melanoma, como visto em estudo prévio de coorte do sul do Brasil (Grazziotin et al. 2013).

A principal limitação do nosso estudo foi o pequeno número da amostra que muitas vezes não conferiu poder estatístico para as análises de comparação entre os grupos estudados (FM x MPM) e para a avaliação completa dos dados de *MC1R* e as características fenotípicas dos probandos. O tamanho da amostra foi determinado pelo financiamento disponível para o estudo.

Serão necessários estudos futuros com o objetivo de alcançar um melhor entendimento da interação das diferentes variantes de *MC1R* com outros fatores, genéticos e ambientais, na determinação de risco de melanoma entre as famílias brasileiras com critérios clínicos para melanoma hereditário.



## 7 CONCLUSÕES

Este estudo foi composto por uma coorte de 37 pacientes com critérios clínicos para a SMF, 36 deles selecionados através de parâmetros mais rigorosos como três ou mais melanomas diagnosticados na família (ou associação de melanoma e câncer de pâncreas) ou três ou mais melanomas primários no mesmo indivíduo.

Utilizando painel multigênico contendo 7 genes de alta penetrância para a predisposição hereditária ao melanoma detectamos taxa de mutação de 5,6% (2/36 nos genes *CDKN2A* e *BAP1*), considerada baixa, apesar dos critérios mais restritivos adotados para a seleção dos pacientes. As duas variantes patogênicas encontradas foram vistas em famílias que caracterizam muito bem o fenótipo de cada uma dessas variantes.

Em relação aos genes de baixa a moderada penetrância, detectamos grande número de pacientes com variantes no gene *MC1R*, alguns deles com duas variantes distintas, além de número significativo de variantes RHC ou alelos R. As variantes RHC, assim como as variantes de risco desconhecido (alelos u), foram mais frequentes na nossa coorte quando comparadas ao grupo controle. Foi encontrada associação da variante R151C, classificada como variante RHC, com presença de cabelos loiros ou ruivos. Não foram encontradas outras associações das variantes de *MC1R*, isoladas ou agrupadas, com outras características fenotípicas dos probandos. Não foi detectada variante genética no gene *MITF*.

A idade ao diagnóstico do tumor primário nos pacientes foi mais baixa do que é descrito para os melanomas esporádicos com prevalência do fenótipo de pele clara e cabelos e olhos claros, além de grande número de pacientes com história de queimadura solar na infância, alta densidade de efélides e múltiplos nevos.

Em relação aos tumores primários, foi encontrado maior frequência de melanomas do tipo extensivo superficial e melanomas finos, sendo mais da metade dos casos com nevo associado. O tronco foi a localização mais frequente dos tumores.

Os tumores não melanoma mais frequentemente encontrados nos probandos foram carcinoma da pele (pacientes MF e MPM), além de tireóide e mama (apenas nos pacientes MF). Os tumores mais frequentemente encontrados nos familiares foram carcinoma de mama, da pele, pulmão, cólon, tireóide e mieloma múltiplo. Verificamos associação de tumor de pâncreas com a variante patogênica no gene *CDKN2A*, mesotelioma com a variante patogênica em *BAP1* e carcinoma de tireóide com a VUS no gene *POT1*.

A baixa frequência de variantes nos genes de alta penetrância e a alta prevalência de variantes no gene *MC1R* encontradas em nossa coorte demonstra a importância do genótipo de *MC1R* na determinação do risco de melanoma em nossa população. Nossos achados demonstram que, em parte, o risco aumentado destas famílias pode estar relacionado à presença dos alelos R ou dos alelos u de *MC1R*, combinação de duas variantes distintas de *MC1R* em alguns casos, associado muitas vezes a fenótipo e comportamento de risco.

## 8 REFERÊNCIAS

Aguilera P, Malvehy J, Carrera C, Palou J, Puig-Butillé JA, Alòs L, et al. Clinical and Histopathological Characteristics between Familial and Sporadic Melanoma in Barcelona, Spain. *J Clin Exp Dermatol Res*. 2014 Sep;5(5):231.

Ainger SA, Jagirdar K, Lee KJ, Soyer HP, Sturm RA. Skin pigmentation genetics for the clinic. *Dermatology*. 2017;233(1):1-15.

Aoude LG, Wadt K, Bojesen A, Crüger D, Borg A, Trent JM, et al. A BAP1 mutation in a Danish family predisposes to uveal melanoma and other cancers. *PLoS One*. 2013 Aug 19;8(8):e72144.

Aoude LG, Pritchard AL, Robles-Espinoza CD, Wadt K, Harland M, Choi J, et al. Nonsense mutations in the shelterin complex genes ACD and TERF2IP in familial melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Dec 13;107(2):dju408.

Aoude LG, Gartside M, Johansson P, Palmer JM, Symmons J, Martin NG, et al. Prevalence of Germline BAP1, CDKN2A, and CDK4 Mutations in an Australian Population-Based Sample of Cutaneous Melanoma Cases. *Twin Res Hum Genet*. 2015a Apr;18(2):126-33.

Aoude LG, Wadt KA, Pritchard AL, Hayward NK. Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015b;28:148-60.

Ashton-Prolla P, Bakos L, Junqueira G Jr, Giugliani R, Azevedo SJ, Hogg D. Clinical and molecular characterization of patients at risk for hereditary melanoma in southern Brazil. *J Invest Dermatol*. 2008 Feb;128(2):421-5.

Azizi E, Friedman J, Pavlotsky F, Iscovich J, Bornstein A, Shafir R, et al. Familial cutaneous malignant melanoma and tumors of the nervous system: a hereditary cancer syndrome. *Cancer*. 1995 Nov 1;76(9):1571-8.

Bakos RM, Besch R, Zoratto GG, Godinho JM, Mazzotti NG, Ruzicka T, et al. The CDKN2A p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. *Exp Dermatol*. 2011 Nov;20(11):890-3.

Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, Strub T, de Lichy M, Bille K, et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature*. 2011 Oct 19;480(7375):94-8.

Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Paillerets B, et al. Melanoma Genetics Consortium. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Jun 19;94(12):894-903.

Bishop JA, Wachsmuth RC, Harland M, Bataille V, Pinney E, MacK P, et al. Genotype/phenotype and penetrance studies in melanoma families with germline CDKN2A mutations. *J Invest Dermatol*. 2000 Jan;114(1):28-33.

Bliss JM, Ford D, Swerdlow AJ, Armstrong BK, Cristofolini M, Elwood JM, et al. Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer*. 1995 Aug 9;62(4):367-76.

Borg A, Sandberg T, Nilsson K, Johannsson O, Klinker M, Måsbäck A, et al. High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Aug 2;92(15):1260-6.

Bränström R, Chang YM, Kasparian N, Affleck P, Tibben A, Aspinwall LG, et al. Melanoma risk factors, perceived threat and intentional tanning: an international online survey. *Eur J Cancer Prev*. 2010 May;19(3):216-26.

Bruno W, Pastorino L, Ghiorzo P, Andreotti V, Martinuzzi C, Menin C, et al. Multiple primary melanomas (MPMs) and criteria for genetic assessment: MultiMEL, a multicenter study of the Italian Melanoma Intergroup. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Feb;74(2):325-32.

Bottillo I, La Starza R, Radio FC, Molica C, Pedace L, Pierini T, et al. A novel germline mutation in CDK4 codon 24 associated to familial melanoma. *Clin Genet*. 2018 Apr;93(4):934-935.

Carbone M, Ferris LK, Baumann F, Napolitano A, Lum CA, Flores EG, et al. BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MBAITs. *J Transl Med*. 2012 Aug 30;10:179.

Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa JR, Gaudino G. BAP1 and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013 Mar;13(3):153-9.

Celebi JT, Ward KM, Wanner M, Polsky D, Kopf AW. Evaluation of germline CDKN2A, ARF, CDK4, PTEN, and BRAF alterations in atypical mole syndrome. *Clin Exp Dermatol*. 2005 Jan;30(1):68-70.

Chaudru V, Laud K, Avril MF, Minière A, Chompret A, Bressac-de Paillerets B, et al. Melanocortin-1 receptor (MC1R) gene variants and dysplastic nevi modify penetrance of CDKN2A mutations in French melanoma-prone pedigrees. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2005;14:2384-90.

Ciccarese G, Dalmaso B, Bruno W, Queirolo P, Pastorino L, Andreotti V, et al. Clinical, pathological and dermoscopic phenotype of MITF p.E318K carrier cutaneous melanoma patients. *J Transl Med*. 2020 Feb 13;18(1):78.

Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013 Feb;30(1):30-41.

de Ávila AL, Krepischi AC, Moredo LF, Aguiar TF, da Silva FC, de Sá BC, et al. Germline CDKN2A mutations in Brazilian patients of hereditary cutaneous melanoma. *Fam Cancer*. 2014 Dec;13(4):645-9.

de la Fouchardière A, Cabaret O, Savin L, Combemale P, Schvartz H, Penet C, et al. Germline BAP1 mutations predispose also to multiple basal cell carcinomas. *Clin Genet*. 2015 Sep;88(3):273-7.

de Torre C, Garcia-Casado Z, Martínez-Escribano JA, Botella-Estrada R, Bañuls J, Oliver V, et al. Influence of loss of function MC1R variants in genetic susceptibility of familial melanoma in Spain. *Melanoma Res*. 2010 Aug;20(4):342-8.

de Snoo FA, Hayward NK. Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. *Cancer Lett*. 2005 Dec 18;230(2):153-86.

De Unamuno B, García-Casado Z, Bañuls J, Requena C, Lopez-Guerrero JA, Nagore E. CDKN2A germline alterations in melanoma patients with personal or familial history of pancreatic cancer. *Melanoma Res.* 2018 Jun;28(3):246-249.

Debniak T, Scott RJ, Huzarski T, Byrski T, Rozmiarek A, Debniak B, Załuga E, Maleszka R, Kładny J, Górski B, Cybulski C, Gronwald J, Kurzawski G, Lubinski J. CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer Res.* 2005 Feb 1;65(3):835-9.

Deménais F, Mohamdi H, Chaudru V, Goldstein AM, Newton Bishop JA, Bishop DT, et al; Melanoma Genetics Consortium. Association of MC1R variants and host phenotypes with melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenoMEL study. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Oct 20;102(20):1568-83.

Duffy DL, Lee KJ, Jagirdar K, Pflugfelder A, Stark MS, McMeniman EK, et al. High naevus count and MC1R red hair alleles contribute synergistically to increased melanoma risk. *Br J Dermatol.* 2019 Nov;181(5):1009-16.

Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R, editors. WHO classification of skin tumors. 4<sup>th</sup> ed. Lyon: IARC; 2018.

Flynn RL, Zou L. Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2010 Aug;45(4):266-75.

Garbe C, Büttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Krüger S, et al. Associated factors in the prevalence of more than 50 common melanocytic nevi, atypical melanocytic nevi, and actinic lentigines: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol.* 1994 May;102(5):700-5.

García-Borrón JC, Sánchez-Laorden BL, Jiménez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res.* 2005 Dec;18(6):393-410.

Goldstein AM, Landi MT, Tsang S, Fraser MC, Munroe DJ, Tucker MA. Association of MC1R variants and risk of melanoma in melanoma-prone families with CDKN2A mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers.* 2005;14:2208-12.

Goldstein AM, Chan M, Harland M, Gillanders EM, Hayward NK, Avril MF, et al. Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL). High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res.* 2006;66:9818-28.

Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F, Bishop DT et al. Melanoma Study Group; Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL). Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet.* 2007 Feb;44(2):99-106.

Grazziotin TC, Rey MC, Bica CG, Pinto LA, Bonamigo RR, Puig-Butille JA, et al. Genetic variations of patients with familial or multiple melanoma in Southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013 Feb;27(2):e179-85.

Hansen CB, Wadge LM, Lowstuter K, Boucher K, Leachman SA. Clinical germline genetic testing for melanoma. *Lancet Oncol.* 2004 May;5(5):314-9.

Hansson J. Familial melanoma. *Surg Clin North Am.* 2008; 88:897-916,viii.

Harland M, Petljak M, Robles-Espinoza CD, Ding Z, Gruis NA, van Doorn R, et al. Germline TERT promoter mutations are rare in familial melanoma. *Fam Cancer.* 2016 Jan;15(1):139-44.

Haugh AM, Njauw CN, Bublely JA, Verzi AE, Zhang B, Kudalkar E, et al. Genotypic and phenotypic features of BAP1 cancer syndrome: a report of 8 new families and review of cases in the literature. *JAMA Dermatol.* 2017 Oct 1;153(10):999-1006.

Helgadottir H, Höiom V, Jönsson G, Tuominen R, Ingvar C, Borg A, et al. High risk of tobacco-related cancers in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Med Genet.* 2014 Aug;51(8):545-52.

Holly EA, Aston DA, Cress RD, Ahn DK, Kristiansen JJ. Cutaneous melanoma in women. II. Phenotypic characteristics and other host-related factors. *Am J Epidemiol.* 1995;141:934-42.

Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science.* 2013 Feb 22;339(6122):959-61.

Hu HH, Benfodda M, Dumaz N, Gazal S, Descamps V, Bourillon A, et al. A large French case-control study emphasizes the role of rare Mc1R variants in melanoma risk. *Biomed Res Int.* 2014;2014:925716.

Huber J, Ramos ES. The P48T germline mutation and polymorphism in the CDKN2A gene of patients with melanoma. *Braz J Med Biol Res.* 2006 Feb;39(2):237-41.

Huerta C, Garcia-Casado Z, Bañuls J, Moragon M, Oliver V, Unamuno B, et al. Characteristics of Familial Melanoma in Valencia, Spain, Based on the Presence of CDKN2A Mutations and MC1R Variants. *Acta Derm Venereol.* 2018 Apr 27;98(5):512-516.

Ipenburg NA, Gruis NA, Bergman W, van Kester MS. The absence of multiple atypical nevi in germline CDKN2A mutations: Comment on "Hereditary melanoma: Update on syndromes and management: Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome". *J Am Acad Dermatol.* 2016 Oct;75(4):e157.

Kannengiesser C, Avril MF, Spatz A, Laud K, Lenoir GM, Bressac-de-Paillerets B. CDKN2A as a uveal and cutaneous melanoma susceptibility gene. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:265-8.

Kannengiesser C, Brookes S, del Arroyo AG, Pham D, Bombled J, Barrois M, et al; French Hereditary Melanoma Study Group., Peters G, Bressac-de-Paillerets B. Functional, structural, and genetic evaluation of 20 CDKN2A germ line mutations identified in melanoma-prone families or patients. *Hum Mutat.* 2009 Apr;30(4):564-74.

Kefford RF, Newton Bishop JA, Bergman W, Tucker MA. Counseling and DNA testing for individuals perceived to be genetically predisposed to melanoma - a consensus statement of the Melanoma Genetics Consortium. *J Clin Oncol.* 1999;17:3245-51.

Koludrovic D, Davidson I. MITF, the Janus transcription factor of melanoma. *Future Oncol.* 2013 Feb;9(2):235-44.

Leachman SA, Carucci J, Kohlmann W, Banks KC, Asgari MM, Bergman W, et al. Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2009 Oct;61(4):677.



Leachman SA, Lucero OM, Sampson JE, Cassidy P, Bruno W, Queirolo P, et al. Identification, genetic testing, and management of hereditary melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2017 Mar;36(1):77-90.

Levin T, Mæhle L. Uptake of genetic counseling, genetic testing and surveillance in hereditary malignant melanoma (CDKN2A) in Norway. *Fam Cancer.* 2017 Apr;16(2):257-65.

Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, et al; Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2007 Mar;82(3):364-80.

Márquez-Rodas I, Martín González M, Nagore E, Gómez-Fernández C, Avilés-Izquierdo JA, Maldonado-Seral C, et al; Spanish Multidisciplinary Group of Melanoma (GEM). Frequency and characteristics of familial melanoma in Spain: the FAM-GEM-1 Study. *PLoS One.* 2015 Apr 13;10(4):e0124239.

Måsbäck A, Olsson H, Westerdahl J, Sandberg T, Borg A, Jonsson N, et al. Clinical and histopathological features of malignant melanoma in germline CDKN2A mutation families. *Melanoma Res.* 2002 Dec;12(6):549-57.

Matichard E, Verpillat P, Meziani R, Gérard B, Descamps V, Legroux E, et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants may increase the risk of melanoma in France independently of clinical risk factors and UV exposure. *J Med Genet.* 2004 Feb;41(2):e13.

McLean DI, Gallagher RP. "Sunburn" freckles, café-au-lait macules, and other pigmented lesions of schoolchildren: the Vancouver Mole Study. *J Am Acad Dermatol.* 1995;32:565-70.

Meyle KD, Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet.* 2009 Oct;126(4):499-510.

Ming Z, Lim SY, Rizos H. Genetic Alterations in the INK4a/ARF Locus: Effects on Melanoma Development and Progression. *Biomolecules.* 2020 Oct 15;10(10):E1447.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa/2020 incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2020.

Moredo LF, Soares de Sá BC, de Ávila ALR, Landman G and Duprat JP. Familial melanoma syndrome - phenotypic characterization and comparison with sporadic melanoma and healthy individuals – A Brazilian study. *Cancer Reports and Reviews* (in press).

Murali R, Wiesner T, Scolyer RA. Tumours associated with BAP1 mutations. *Pathology*. 2013 Feb;45(2):116-26.

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.

Nasti TH, Timares L. MC1R, eumelanin and pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochem Photobiol*. 2015 Jan-Feb;91(1):188-200.

Newton JA, Bataille V, Griffiths K, Squire JM, Sasieni P, Cuzick J, et al. How common is the atypical mole syndrome phenotype in apparently sporadic melanoma? *J Am Acad Dermatol*. 1993;29:989-96.

O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Mar;11(3):171-81.

Palmer JS, Duffy DL, Box NF, Aitken JF, O'Gorman LE, Green AC, et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet*. 2000 Jan;66(1):176-86.

Psaty EL, Scope A, Halpern AC, Marghoob AA. Defining the patient at high risk for melanoma. *Int J Dermatol* 2010; 49:362-76.

Pastorino L, Bonelli L, Ghiorzo P, Queirolo P, Battistuzzi L, Balleari E, et al. CDKN2A mutations and MC1R variants in Italian patients with single or multiple primary melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008 Dec;21(6):700-9.

Pellegrini C, Maturo MG, Martorelli C, Suppa M, Antonini A, Kostaki D, et al. Characterization of melanoma susceptibility genes in high-risk patients from Central Italy. *Melanoma Res.* 2017 Jun;27(3):258-267.

Pho L, Grossman D, Leachman SA. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. *Curr Opin Oncol.* 2006;18:173-9.

Platz A, Ringborg U, Hansson J. Hereditary cutaneous melanoma. *Semin Cancer Biol.* 2000 Aug;10(4):319-26.

Popova T, Hebert L, Jacquemin V, Gad S, Caux-Moncoutier V, Dubois-d'Enghien C, et al. Germline BAP1 mutations predispose to renal cell carcinomas. *Am J Hum Genet.* 2013 Jun 6;92(6):974-80.

Potjer TP, Bollen S, Grimbergen AJEM, van Doorn R, Gruis NA, van Asperen CJ, et al; Dutch Working Group for Clinical Oncogenetics. Multigene panel sequencing of established and candidate melanoma susceptibility genes in a large cohort of Dutch non-CDKN2A/CDK4 melanoma families. *Int J Cancer.* 2019 May 15;144(10):2453-64.

Potrony M, Puig-Butillé JA, Aguilera P, Badenas C, Carrera C, Malveyh J, et al. Increased prevalence of lung, breast, and pancreatic cancers in addition to melanoma risk in families bearing the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A mutation: implications for genetic counseling. *J Am Acad Dermatol.* 2014 Nov;71(5):888-95.

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 Sep;3(15):210.

Potrony M, Puig-Butille JA, Ribera-Sola M, Iyer V, Robles-Espinoza CD, Aguilera P, et al. POT1 germline mutations but not TERT promoter mutations are implicated in melanoma susceptibility in a large cohort of Spanish melanoma families. *Br J Dermatol.* 2019 Jul;181(1):105-113.

Psaty EL, Scope A, Halpern AC, Marghoob AA. Defining the patient at high risk for melanoma. *Int J Dermatol.* 2010;49:362-76.

Puig S, Potrony M, Cuellar F, Puig-Butille JA, Carrera C, Aguilera P, et al. Characterization of individuals at high risk of developing melanoma in Latin America: bases for genetic counseling in melanoma. *Genet Med*. 2016 Jul;18(7):727-36.

Puntervoll HE, Yang XR, Vetti HH, Bachmann IM, Avril MF, Benfodda M, et al. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. *J Med Genet*. 2013 Apr;50(4):264-70.

Rachakonda S, Kong H, Srinivas N, Garcia-Casado Z, Requena C, Fallah M, et al. Telomere length, telomerase reverse transcriptase promoter mutations, and melanoma risk. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018 Nov;57(11):564-572.

Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P, et al. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2008;122:2753-60.

Randerson-Moor JA, Harland M, Williams S, Cuthbert-Heavens D, Sheridan E, Aveyard J, et al. A germline deletion of p14(ARF) but not CDKN2A in a melanoma-neural system tumour syndrome family. *Hum Mol Genet*. 2001 Jan 1;10(1):55-62.

Ransohoff KJ, Jaju PD, Tang JY, Carbone M, Leachman S, Sarin KY. Familial skin cancer syndromes: Increased melanoma risk. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Mar;74(3):423-34; quiz 435-6.

Read J, Wadt KA, Hayward NK. Melanoma genetics. *J Med Genet*. 2016;53:1-14.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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 May;17(5):405-24.

Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ, Aoude LG, Quesada V, Ding Z, et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nat Genet*. 2014 May;46(5):478-81.

Sá BCS, Moredo LF, Gomes EE, de Araújo ESS, Duprat JP. Hereditary Melanoma: Brazilian study of five-years monitoring in a cancer referral center: probands phenotypic characterization and primary tumors pathological features. *An Bras Dermatol*. 2018 Jun;93(3): 337- 40.

Sargen MR, Merrill SL, Chu EY, Nathanson KL. CDKN2A mutations with p14 loss predisposing to multiple nerve sheath tumours, melanoma, dysplastic naevi and internal malignancies: a case series and review of the literature. *Br J Dermatol*. 2016 Oct;175(4):785-9.

Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*. 1996 Apr 5;85(1):27-37.

Shen E, Xiu J, Lopez GY, Bentley R, Jalali A, Heimberger AB, et al. *POT1* mutation spectrum in tumour types commonly diagnosed among *POT1*-associated hereditary cancer syndrome families. *J Med Genet*. 2020 Oct;57(10):664-670.

Shi J, Yang XR, Ballew B, Rotunno M, Calista D, Fargnoli MC, et al; NCI DCEG Cancer Sequencing Working Group; NCI DCEG Cancer Genomics Research Laboratory; French Familial Melanoma Study Group. Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. *Nat Genet*. 2014 May;46(5):482-6.

Silva JH, Sá BC, Avila AL, Landman G, Duprat Neto JP. Atypical mole syndrome and dysplastic nevi: identification of populations at risk for developing melanoma - review article. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66:493-9.

Soares de Sá BC, de Macedo MP, Torrezan GT, Braga JCT, Fidalgo F, Moredo LF, et al. BAP1 tumor predisposition syndrome case report: pathological and clinical aspects of BAP1-inactivated melanocytic tumors (BIMTs), including dermoscopy and confocal microscopy. *BMC Cancer*. 2019 Nov 9;19(1):1077.

Sturm RA, Fox C, McClenahan P, Jagirdar K, Ibarrola-Villava M, Banan P, et al. Phenotypic characterization of nevus and tumor patterns in MITF E318K mutation carrier melanoma patients. *J Invest Dermatol*. 2014 Jan;134(1):141-9.

Swope VB, Abdel-Malek ZA. MC1R: Front and Center in the Bright Side of Dark Eumelanin and DNA Repair. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 8;19(9):2667.

Tagliabue E, Gandini S, Bellocco R, Maisonneuve P, Newton-Bishop J, Polsky D, et al. MC1R variants as melanoma risk factors independent of at-risk phenotypic characteristics: a pooled analysis from the M-SKIP project. *Cancer Manag Res*. 2018 May 14;10:1143-1154.

Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet.* 2011 Aug 28;43(10):1022-5.

Toussi A, Mans N, Welborn J, Kiuru M. Germline mutations predisposing to melanoma. *J Cutan Pathol.* 2020 Jul;47(7):606-616.

Van der Rhee JJ, Krijnen P, Gruis NA, de Snoo FA, Vasen HFA, Putter H, et al. Clinical and histologic characteristics of malignant melanoma in families with a germline mutation in CDKN2A. *J Am Acad Dermatol.* 2011 Aug;65(2):281-288.

Van der Velden PA, Sandkuijl LA, Bergman W, Pavel S, van Mourik L, Frants RR, et al. Melanocortin-1 receptor variant R151C modifies melanoma risk in Dutch families with melanoma. *Am J Hum Genet.* 2001;69:774-9.

Vasen HF, Gruis NA, Frants RR, van Der Velden PA, Hille ET, Bergman W. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer.* 2000;87:809-11.

Vinagre J, Almeida A, Pópulo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun.* 2013;4:2185.

Wang A, Papneja A, Hycza M, Al-Habeeb A, Ghazarian D. Gene of the month: BAP1. *J Clin Pathol.* 2016 Sep;69(9):750-3.

Wendt J, Rauscher S, Burgstaller-Muehlbacher S, Fae I, Fischer G, Pehamberger H, et al. Human Determinants and the Role of Melanocortin-1 Receptor Variants in Melanoma Risk Independent of UV Radiation Exposure. *JAMA Dermatol.* 2016 Jul 1;152(7):776-82.

Wilson TL, Hattangady N, Lerario AM, Williams C, Koeppe E, Quinonez S, et al. A new POT1 germline mutation-expanding the spectrum of POT1-associated cancers. *Fam Cancer.* 2017 Oct;16(4):561-566.

Williams PF, Olsen CM, Hayward NK, Whiteman DC. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden. *Int J Cancer.* 2011 Oct 1;129(7):1730-40.

Wong K, Robles-Espinoza CD, Rodriguez D, Rudat SS, Puig S, Potrony M, et al. Association of the POT1 Germline Missense Variant p.I78T With Familial Melanoma. *JAMA Dermatol.* 2019 May 1;155(5):604-609.

Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature.* 2011 Nov 13;480(7375):99-103.

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell.* 1998 Mar 20;92(6):725-34.

Zhang AJ, Rush PS, Tsao H, Duncan LM. BRCA1-associated protein (BAP1)-inactivated melanocytic tumors. *J Cutan Pathol.* 2019 Dec;46(12):965-972.

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



A.C. Camargo  
Cancer Center

Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP

São Paulo, 05 de dezembro de 2016.

À  
**Dra. Dirce Maria Carraro**  
Aluna: Bianca Costa Soares de Sá

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2076/15

“Investigação de mutações genéticas nos pacientes com critério clínico para melanoma hereditário em acompanhamento no Ambulatório de Melanoma Familiar do Núcleo de Câncer de Pele do AC Camargo Cancer Center - Associação com características clínicas”.

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 **22/11/2016**, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Mudança do projeto de Departamental para Doutorado da aluna Bianca Costa Soares de Sá, em documento datado de 20 de outubro de 2016;
- Emenda ao projeto, datado de outubro de 2016.

Atenciosamente,

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



CASE REPORT

Open Access

# *BAP1* tumor predisposition syndrome case report: pathological and clinical aspects of *BAP1*-inactivated melanocytic tumors (BIMTs), including dermoscopy and confocal microscopy



Bianca Costa Soares de Sá<sup>1</sup>, Mariana Petaccia de Macedo<sup>2</sup>, Giovana Tardin Torrezan<sup>3,4</sup>, Juliana Casagrande Tavoloni Braga<sup>1</sup>, Felipe Fidalgo<sup>3</sup>, Luciana Facure Moredo<sup>1</sup>, Rute Lellis<sup>2</sup>, João Pereira Duprat<sup>1</sup> and Dirce Maria Carraro<sup>3,4\*</sup> 

## Abstract

**Background:** *BRCA1* associated-protein 1 (*BAP1*) tumor predisposition syndrome is associated with an increased risk for malignant mesotheliomas, uveal and cutaneous melanomas, renal cell carcinomas, and singular cutaneous lesions. The latter are referred to as *BAP1*-inactivated melanocytic tumors (BIMTs). When multiple BIMTs manifest, they are considered potential markers of germline *BAP1* mutations.

**Case presentation:** Here, we report a novel pathogenic *BAP1* germline variant in a family with a history of BIMTs, cutaneous melanomas, and mesotheliomas. We also describe singular pathological aspects of the patient's BIMT lesions and their correlation with dermoscopic and reflectance confocal microscopy findings.

**Conclusions:** This knowledge is crucial for the recognition of BIMTs by dermatologists and pathologists, allowing the determination of appropriate management for high-risk patients, such as genetic investigations and screening for potentially aggressive tumors.

**Keywords:** BIMT, *BAP1*, Hereditary cancer syndromes, Dermoscopy, Confocal microscopy

## Background

*BRCA1* associated-protein 1 (*BAP1*) tumor predisposition syndrome (*BAP1*-TPDS) is associated with the onset of cutaneous melanocytic tumors, malignant mesotheliomas, uveal and cutaneous melanomas, renal cell carcinomas, and potentially other internal malignancies [1–3].

Germline *BAP1* mutations are inherited in an autosomal dominant pattern. The main cutaneous manifestation in patients with *BAP1*-TPDS is progressive development of distinct melanocytic lesions after the first decade of life [2]. Clinically, the lesions are skin-colored to reddish-brown papules which range in diameter from 2 to 10 mm. The number of lesions vary from 5 to 50 [4]. These lesions were first reported as atypical Spitz tumors (AST), but were later considered to be a subgroup of ASTs which carry *BRAF* mutations and exhibit loss of *BAP1* expression [5]. These lesions were formerly named Wiesner Nevus, BAPoma, nevoid melanoma-like melanocytic proliferations (NEMMPs) [6] or melanocytic *BAP1*-mutated atypical intradermal tumors (MBAITs) [1]. More recently, the fourth edition of the World Health Organization (WHO) Classification

\* Correspondence: [dirce.carraro@cccamargo.org.br](mailto:dirce.carraro@cccamargo.org.br)

<sup>3</sup>Laboratory of Genomics and Molecular Biology, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Taguá, 440, São Paulo, SP CEP: 0508-010, Brazil

<sup>4</sup>National Institute of Science and Technology in Oncogenomics and Therapeutic Innovation, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Professor Antonio Prudente, 211 Liberdade, , Rua Taguá, 400, São Paulo, SP CEP: 01509-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



of Skin Tumors uses the term, *BAP1*-inactivated melanocytic tumors (BIMTs) [7]. BIMTs are estimated to occur in 75% of patients with *BAP1*-TPDS and they commonly emerge earlier than other *BAP1*-associated tumors [8]. Some authors have suggested that genetic testing for *BAP1* germline mutations should be considered for patients with two or more BIMTs [9].

To date, BIMTs have yet to be characterized by confocal microscopy, and only a few studies have described their dermoscopic aspects [8, 10, 11]. Here, we report our comprehensive characterization of the clinical and genetic traits of a *BAP1* mutation carrier. In addition, pathologic, dermoscopic, confocal, and genetic descriptions of the patient's cutaneous tumors are reported.

### Case presentation

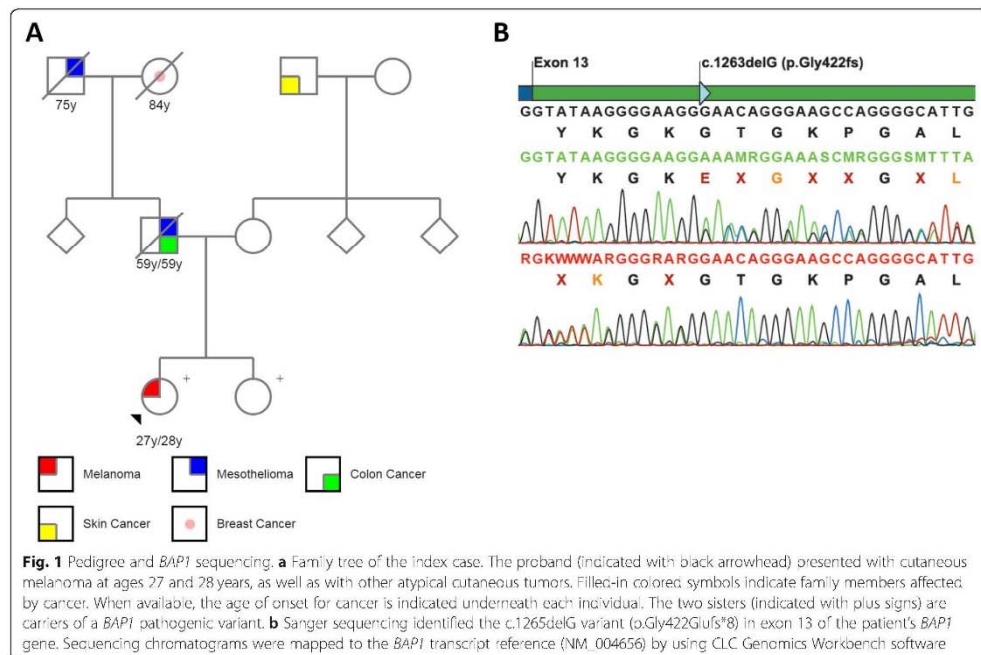
A 27-year-old female was diagnosed with atypical cutaneous tumors and three melanomas. A physical examination showed Fitzpatrick type II skin, brown eyes, brown hair, and multiple melanocytic nevi, including multiple clinically intra-dermal nevi. The patient reported a positive history of sunburn during childhood. A detailed family history further revealed that the patient's father was diagnosed with colon adenocarcinoma and peritoneal mesothelioma, her paternal grandfather was diagnosed with lung mesothelioma, and her paternal grandmother was diagnosed with breast cancer.

The complete pedigree for the patient is represented in Fig. 1a. The patient was referred for whole body photography and digital dermoscopic follow-up of her melanocytic lesions. Genetic testing was also recommended due to her personal history of multiple melanomas and her strong family history of mesothelioma. Finally, her cutaneous tumors were submitted for hotspot mutation analysis of seven oncogenes and immunohistochemistry (IHC) to detect *BAP1* expression.

### Digital Dermoscopy

A digital dermoscopy study of the patient's melanocytic lesions was performed by two dermatologists with expertise in dermoscopy (BCCS, JCTB). FotoFinder Dermoscope® (Medicam 800 HD, TeachScreen Software, Bad Birnbach, Germany) provided a straightforward allocation and follow-up of each lesion at 20× magnification. Subsequent follow-up examinations were scheduled at intervals of 3, 6, and 12 months.

A total of 146 melanocytic lesions were selected for digital follow-up and all suspicious lesions were excised. A subset of the lesions were flat-pigmented and exhibited a reticular pattern by dermoscopy. There were also many dome-shaped lesions which exhibited a globular or globular-homogeneous pattern. Suspicious lesions referred for excision included those which presented peripheral,

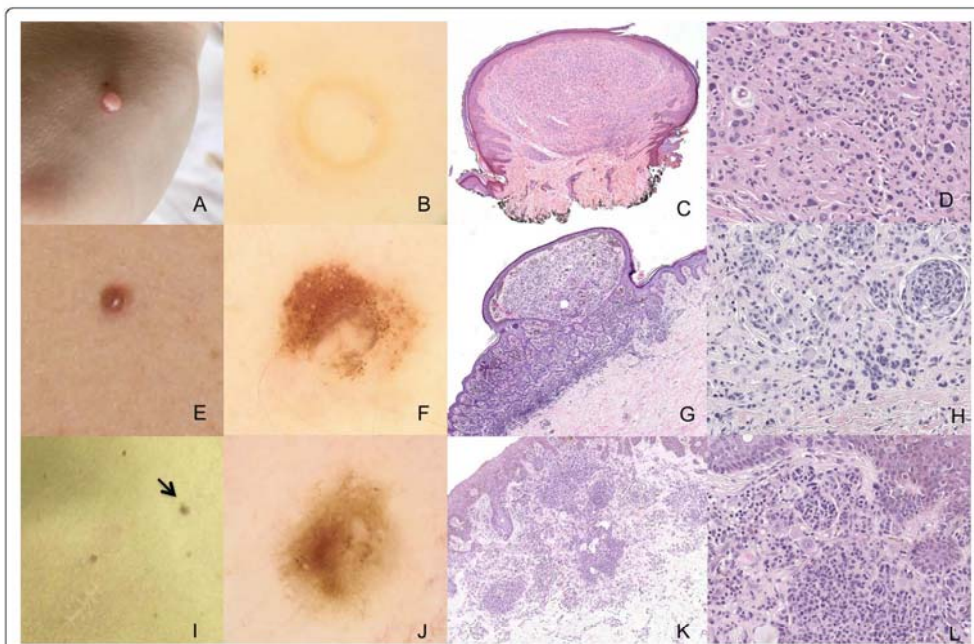


irregularly distributed brown globules and those with irregular pigmentation. Dermoscopy aspects of the BIMT lesions are detailed in Figs. 2b, f, 3b, and in Table 1.

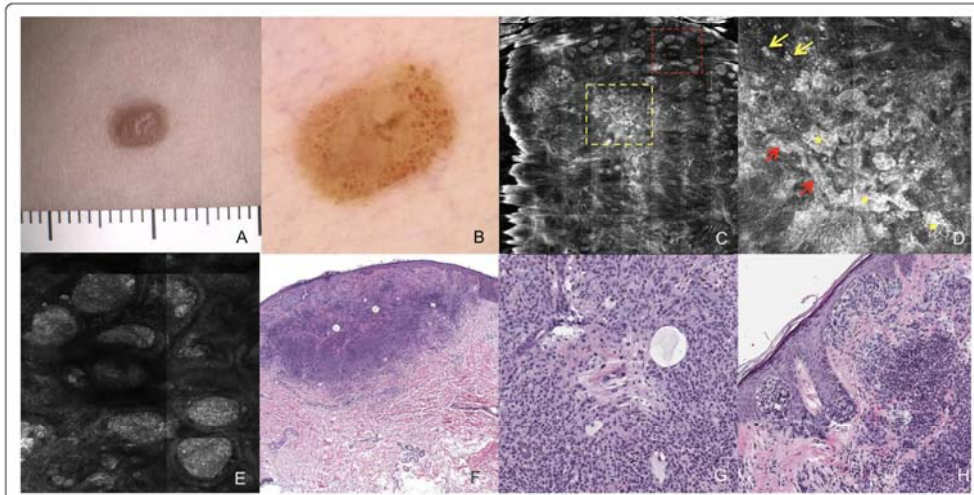
#### Reflectance confocal microscopy (RCM)

RCM images were acquired with a near-infrared reflectance confocal laser scanning microscope (Vivascope 1500<sup>®</sup>; Lucid

Inc., Rochester, NY, USA). Confocal image acquisition included a minimum of three mosaics (Vivablock<sup>®</sup>), each with an area of  $8 \times 8 \text{ mm}^2$ , at three different depth levels: intra-epidermal, dermal-epidermal junction (DEJ), and superficial dermis. A series of high-resolution images (both capture and stack images) were also obtained at different levels from the skin surface down to the papillary dermis.



**Fig. 2** Clinical, dermoscopic, and pathologic characterizations of the skin tumors examined. For A-D, the BIMT examined was located on the back of the patient's hand. **a** Clinical image of a skin-colored, raised tumor. **b** Dermoscopy image (20x magnification) shows a hypopigmented structureless area and discrete linear vessels at the periphery of the tumor. **c** Histology shows an intradermal, symmetrical, and well-delineated nodular melanocytic proliferation (hematoxylin & eosin (H&E), 20x) with no pigmentation. **d** At a higher magnification (200x), histology shows the lesion presents as a large, isolated group of atypical eosinophilic epithelioid cells with enlarged nuclei and abundant pink cytoplasm intermingled with smaller mature melanocytic cells (H&E). No mitosis or necrosis is observed. Clear and vacuolated cells represent adipocyte metaplasia. These findings are compatible with a diagnosis of BIMT. Loss of BAP1 expression and BRAF V600E positivity were detected in the melanocytes by IHC (data not shown). For E-H, the BIMT examined was located on the back torso of the patient. **e** Clinical image of a reddish-brown, dome-shaped papule. **f** Dermoscopy image (20x magnification) shows a central, hypopigmented structureless area surrounded by clustered brown irregular globules which vary in shape and size. **g** Histology shows a melanocytic lesion with typical junctional nests and a predominant intradermal, well-delineated nodular melanocytic proliferation. Moderate pigmentation and adipocyte metaplasia are also observed (H&E, 20x magnification). **h** At higher magnification, histology of the intradermal component (H&E, 200x magnification) shows large epithelioid cells intermingled with smaller mature melanocytic cells, compatible with a BIMT. IHC demonstrated a loss of BAP1 expression in the large cells (data not shown). Next generation sequencing additionally revealed the presence of a *BRAF* gene mutation (p.V600E). For I-L, the melanoma examined was located on the front torso of the patient. **i** Clinical image of a flat pigmented lesion (indicated with black arrow). **j** Dermoscopy image (20x magnification) shows a peripheral fine reticular network, a central brown homogenous area, irregularly distributed brown globules, and a small depigmented area. **k** Histology shows a compound, asymmetrical melanocytic lesion. The junctional component is characterized mostly by the spread of single atypical cells with upward migration, while the intradermal component includes both aggregated and diffuse cells with foci of adipocyte metaplasia (H&E, 20x magnification). **l** At higher magnification (H&E, 200x), the intradermal component is found to be composed of a large population of isolated eosinophilic epithelioid cells intermingled with smaller mature melanocytic cells. The junctional component presents a predominant lentiginous spread of large atypical epithelioid cells with pagetoid migration. The lesion is classified as an in situ melanoma associated with a background of BIMT. Sequencing further revealed this lesion as being *BRAF* wild-type



**Fig. 3** Atypical Skin Lesion – Correlations between Clinical, Dermoscopy, Pathology, and Confocal Microscopy Observations. **a** Clinical image of a brown, dome-shaped lesion. **b** Dermoscopy image (20x magnification) shows irregular pigmentation within a central light brown structureless area that is surrounded by clustered brown globules. **c** A RCM mosaic image ( $4 \times 4 \text{ mm}^2$ ) at the level of the DEJ shows disorganized architecture with focal loss of rete ridge meshwork. Heterogeneous brightness (marked with a yellow dashed square) and a clod pattern at the periphery (marked with a red dashed square) are also observed. **d** A RCM mosaic image ( $1 \times 1 \text{ mm}^2$ ) of the area inside the yellow dashed square in C at the level of the DEJ shows clusters of cells with nonhomogeneous morphologic features and reflectivity (indicated with yellow asterisks). Dendritic cells enlarged in the interpapillary spaces (indicated with red arrows) and round nucleated cells (indicated with yellow arrows) are also present. **e** An individual RCM image ( $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ ) of the area within the red dashed square in C at the level of the DEJ shows dense and regular nests at the periphery of the lesion. **f** Histology shows a compound, symmetrical melanocytic proliferation (H&E, 20x magnification) with benign melanocytic nests of varied sizes at the dermal-epidermal junction at the periphery of the lesion. These findings correspond to the RCM finding of a clod pattern (indicated with a red dashed square). In the center of the lesion, nest formation is reduced, corresponding to the heterogeneous brightness observed with RCM (indicated with a yellow dashed square, Fig. 3c). **g** A higher magnification (200x) image of the intradermal component (H&E) shows that the lesion includes a few isolated large epithelioid cells which are intermingled with an abundance of smaller mature melanocytic cells and foci of adipocyte metaplasia and cystic spaces. The large cells correspond to the round nucleated cells observed with RCM (indicated with yellow arrows, Fig. 3d). **h** The junctional component is composed of irregular large nests of typical melanocytes (H&E, 200x magnification). The diagnosis is compatible with BIMT. Sequencing additionally revealed this lesion harbors a *BRAF* gene mutation (p.V600E)

RCM was performed on two melanocytic lesions, both of which exhibited similar clinical and dermoscopic characteristics: brown dome-shaped lesions with a hypopigmented structureless area surrounded by clustered brown irregular globules which varied in shape and size. One of the lesions is shown in Fig. 3 and its RCM features are summarized in Table 1.

RCM images revealed a disorganized architecture at the center of the lesion. This architecture was characterized by an atypical honeycomb pattern in the epidermis and moderate DEJ architectural disarray (e.g., areas exhibiting partial loss of normal DEJ structure), corresponding to a central hypopigmented structureless area on dermoscopy. At the level of the DEJ, clusters of cells exhibiting nonhomogeneous morphologic features and reflectivity were observed. In addition, dendritic cells were found to enlarge the interpapillary spaces in a meshwork pattern, with isolated round nucleated cells

also present (Fig. 3c and d). At the periphery, dense and regular nests of cells with similar morphologic features and reflectivity were observed (Fig. 3e). These nests corresponded with unevenly distributed brown globules observed on dermoscopy.

#### Histopathology

A histopathology review of the excised lesions was performed by two dermatopathologists (MPM, RL). IHC was performed for selected lesions with a BAP1 antibody (clone C-4; 1:50 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) in an automated IHC platform (Ventana BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA), according to the manufacturer's instructions.

Typical melanocytic nevi which were excised exhibited characteristics of atypical epithelioid neoplasms. Intradermal proliferation of large epithelioid melanocytes with ample eosinophilic cytoplasm and prominent

**Table 1** Characteristics of the BIMT lesions identified

Lesion	Clinical observations	Dermoscopic features	RCM findings	Pathology
Lesion 1 (Fig. 2a-d)	Skin-colored, dome-shaped tumor	Structureless hypopigmented area; linear vessels at periphery	–	Junctional component: None Dermal component: Large atypical epithelioid cells (top) Mature melanocytes (bottom) Adipocyte metaplasia (focal) Lack of pigmentation Lack of inflammation
Lesion 2 (Fig. 2e-h)	Reddish-brown papule	Central structureless, light brown area; Irregular eccentric globules	–	Junctional component: Few nests of typical melanocytes Dermal component: Large atypical epithelioid cells (top) Mature melanocytes (bottom) Adipocyte metaplasia (focal) Moderate pigmentation Lack of inflammation
Lesion 3 (Fig. 3)	Brown papule	Clustered brown globules (periphery); irregular pigmentation within a central light brown structureless area	Dense and regular dermal nests (periphery); Sparse, isolated round nucleated cells at dermal-epidermal junction; Nonhomogeneous dermal nests (center)	Junctional component: Irregular large nests of typical melanocytes (periphery). Center lacking nest formation. Dermal component: Large atypical epithelioid cells (top) Mature melanocytes (bottom). Adipocyte metaplasia (focal) Lack of pigmentation Lack of inflammation

nucleoli were observed. In addition, these lesions were found to be composed of different proportions of a second population of small mature-appearing melanocytic cells resembling common intradermal nevi [Fig. 2c, d, g, h, k, and l, Fig. 3f-h]. IHC detected negative expression of BAP1 in the large epithelioid cells, while the mature-appearing melanocytes were BAP1-positive. Additional findings included focal vacuolization of cells resembling clear cells or small cystic spaces, consistent with adipocytic metaplasia [12] (Fig. 2d, g, k, Fig. 3g). Furthermore, although epithelioid cells were present, other morphologic features of Spitz Nevus, such as Kamino bodies,

clefts, epidermal hyperplasia, and spindle-shaped melanocytes, were not identified.

Except for one lesion with an exclusively intradermal component (Fig. 2, C and D), the other lesions (Figs. 2g, h, and 3H) exhibited a benign junctional melanocytic component and intradermal findings typical of BIMTs. One of the lesions showed more accentuated proliferation of atypical melanocytes in the epidermis. The latter were characterized by an asymmetric distribution of epithelioid cells with large nucleoli and pronounced upward migration (Fig. 2k and l). However, despite exhibiting an intradermal BIMT component, this lesion was

considered to have an associated in situ melanoma (Fig. 2k and l).

Histopathological aspects of the BIMT lesions identified are summarized in Table 1.

#### Somatic mutation analysis

Genomic DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor tissues by using a QIAamp DNA FFPE Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Targeted next generation sequencing (NGS) was subsequently performed with an Ion Proton platform and a custom Ion Ampliseq™ Panel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The latter covers hotspot regions of seven genes which are frequently mutated in solid tumors (e.g., *BRAF*, *EGFR*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *NRAS*, and *ROS1*). Mapping of sequencing reads and variant calling were performed with Torrent Suite Browser and Torrent Variant Caller (TVC) software (Thermo Fisher Scientific). Somatic mutations were defined as variant alleles present in more than 2% of reads, with a minimum coverage depth of  $100 \times$ .

Somatic mutations were investigated in six cutaneous lesions (Figs. 2 and 3). The *BRAF* V600E variant was identified in five of these lesions. However, no known hotspot oncogenic mutations were identified among the other six genes evaluated.

#### Germline genetic testing

The entire coding region of *BAP1* and eight other melanoma predisposition genes (*ACD*, *CDKN2A*, *CDK4*, *MC1R*, *MITE*, *POT1*, *TERF2IP*, and *TERT*) were analyzed by using a custom Ion Ampliseq™ Panel (Thermo Fisher Scientific). Briefly, genomic DNA was obtained from leukocytes and then subjected to a library preparation protocol described by the Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0. The resulting DNA was sequenced with the Ion Proton Platform (Thermo Fisher Scientific). Variant calling files were generated by TVC 5.0–13 software and variant prioritization was performed with VarSeq software (Golden Helix, Bozeman, MT, USA). To identify rare and possibly damaging germline variants, we selected coding or splice site variants presenting coverage > 20, variant allele frequency > 30%, and minor allele frequency < 0.01 in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) and Online Archive of Brazilian Mutations (ABraOM) databases.

In NGS-genetic testing, a heterozygous frameshift germline deletion in exon 13 was detected in the *BAP1* gene (c.1265delG; p.Gly422Glufs\*8) (Fig. 1b). This deletion was not previously reported in the population databases we searched (ExAC, ABraOM, and ClinVar). Furthermore, based on phenotypic evidence and the patient's family history of cancer, we classified the variant p.Gly422Glufs\*8 as pathogenic according to recommendations of the American College of Medical Genetics (ACMG) [13]. It was further confirmed that the patient's sister carries the same

*BAP1* germline mutation, yet she had not received any prior tumor diagnosis (Fig. 1a).

#### Discussion and conclusions

Here, we report a patient carrying a *BAP1* mutation who presented with multiple primary melanomas at a young age, multiple nevi, and BIMTs. In addition, two of her family members were diagnosed with mesothelioma. The comprehensive clinical, pathological, and molecular description of this case provides a valuable characterization of this rare tumor predisposing syndrome. Furthermore, the present case provides an opportunity to investigate whether dermoscopy and confocal microscopy are useful in differentiating BIMTs from other melanocytic tumors.

Recently, a multicenter study conducted by the International Dermoscopy Society described clinical and dermoscopic features of BIMTs [11]. The most frequent clinical aspect reported was pink dome-shaped papules, followed by brown papules. In the present case, three of the BIMTs examined manifested these two clinical aspects. The dermoscopic features of the present BIMT lesions also included hypopigmented structureless areas and irregular eccentric globules. This pattern was significantly more frequent among the lesions harboring a *BAP1* germline mutation, and this finding is consistent with the observations of Yelamos and collaborators [11]. However, the dermoscopic aspects of the present case differ from those of intradermal nevi which usually include a globular or globular-homogenous pattern with symmetrically distributed clustered globules and regular pigmentation [14].

RCM detected various subsurface skin features at the center of our patient's BIMT lesions which are common to malignant melanocytic tumors (Fig. 3c and d). The features observed at the cellular level included: atypical melanocytic cells, disarrayed architecture of the DEJ, and nonhomogeneous clusters in regard to morphologic features and reflectivity. The presence of a sharp border cut-off and dense regular nests at the periphery of these lesions are findings that potentially differentiate BIMTs from melanomas [15, 16]. However, a differential diagnosis between BIMTs and melanomas may represent a diagnostic pitfall for dermatologists. Thus, additional cases need to be characterized in order to distinguish BIMTs from other melanocytic tumors with RCM.

Typically, BIMTs are microscopically described as intra-dermal tumors containing a dual population of large epithelioid melanocytes with cytologic atypia and pleomorphic nuclei resembling spitzoid neoplasms or rhabdoid cells [1] and a population of mature benign appearing nevoid cells. For both of these populations, mitotic activity is absent. The lesions described in the present case are consistent with these previously described characteristics of BIMTs. We also observed in the present case, as shown in previous

BIMT reports [12, 17, 18], that some degree of junctional melanocytic component is associated with intradermal findings. For example, Garfield et al. [18] found that the presence of a junctional component is more common in a germline setting of BAP1 loss, rather than in a somatic setting. Thus, the new proposed WHO nomenclature of BIMT is more consistent with recent findings, with the previous nomenclature, MBAIT, drawing attention to an intradermal component. The latter could lead to a misdiagnosis by excluding lesions with junctional activity, thereby delaying screening for hereditary *BAP1*-TPDS. As described by Piris and collaborators in 2015 [17], there appears to be two histological patterns for BIMTs: a single dominant nodular pattern of epithelioid cells (Fig. 2c and d) or a dermal-nevus-like proliferation with variable numbers of epithelioid cells. Congenital onset may also be suspected if only a few of the latter nests are observed.

One of the lesions described in the present study was characterized by a striking atypical intraepidermal component with large atypical cells and pagetoid migration, consistent with a diagnosis of in situ melanoma (Fig. 2k-l). Melanomas arising in a background of a BIMT lesion are rare [12, 17]. However, the latter may indicate that BIMTs have the potential to undergo a malignant transformation. Further discussion is needed regarding the lack of pathological criteria regarding degree of junctional proliferation and/or atypia allowed in a BIMT before classifying it as an in situ melanoma.

The presence of a *BRAF* mutation in BIMT lesions is of great importance since this feature, in combination with loss of BAP1 expression, defines a distinct subset of epithelioid melanocytic tumors [4]. In only one of the lesions examined in the present study was the V600E *BRAF* mutation not detected (which was the BIMT with an in situ melanoma component). Considering that *BRAF* mutations are a common finding (90%) in BIMTs [4] and they are predicted to be maintained in tumor progression [19], we hypothesize that occasional *BRAF* negativity described in BIMTs (as demonstrated in the present case) may be due to a representation issue whereby a small proportion of large epithelioid cells is present amongst a predominance of mature-appearing cells.

The presence of vacuolated cells resembling adipocytes in BIMTs has previously been described [12, 20]. In the present study, vacuolated clear cells were observed in some of the lesions examined (Figs. 2d, k, and 3g). In the literature, these vacuolated cells have been referred to as adipocytic metaplasia. In the present study, the morphologic and IHC analyses performed demonstrate that these large cells have a vacuolated clear cell cytoplasm, a low nucleus/cytoplasm ratio, and strong positivity for Melan-A. Thus, they may correspond to clear cell melanocytes, which encompass both balloon cells and sebocyte-like cells [21]. Further analysis of clear cell

melanocytes has suggested that their morphological characteristics may represent alterations in degeneration/senescence pathways which affect melanogenesis. Consequently, these melanocytes may be more likely to correspond to clear cells than adipocytic/sebocyte cells [21]. Therefore, we propose that it may be more accurate to refer to these cells as clear cells, rather than adipocytic metaplasia.

Unfortunately, we did not have access to pathology specimens from the patient's relatives who were affected by mesothelioma to further review the subtypes present and to perform additional tests. We hypothesize that their specimens would correspond to epithelioid mesotheliomas, since these are commonly described for lesions associated with BAP1 loss [22].

In conclusion, we have reported a novel pathogenic *BAP1* germline variant present in a family affected by BIMTs, cutaneous melanomas, and mesotheliomas. In addition, we have described pathological aspects of the patient's BIMTs and their correlation with dermoscopic findings associated with confocal features. These findings further characterize the clinical and pathological features of BIMTs, and will potentially facilitate early recognition of *BAP1* - TPDS by dermatologists and pathologists. As a result, determination of appropriate management for high-risk patients, such as genetic investigations and screenings for potentially aggressive tumors, can be achieved.

#### Abbreviations

ABraOM: Online Archive of Brazilian Mutations; ACMG: American College of Medical Genetics; AST: Atypical spitz tumor; BAP1: BRCA1 associated-protein 1; *BAP1*-TPDS: *BAP1* tumor predisposition syndrome; BIMT: *BAP1*-inactivated melanocytic tumor; DEJ: Dermal-epidermal junction; ExAC: Exome Aggregation Consortium; FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded; H&E: Hematoxylin & eosin; IHC: Immunohistochemistry; MBAIT: *BAP1*-mutated atypical intradermal tumor; NEMMP: Nevoid melanoma-like melanocytic proliferation; NGS: Next generation sequencing; RCM: Reflectance confocal microscopy; TVC: Torrent variant caller; WHO: World Health Organization

#### Acknowledgements

We acknowledge the patient and her sister for participating in this study and the A.C. Camargo Biobank for sample processing.

#### Authors' contributions

BCSS, MPM, GTT, and JCTB wrote the manuscript. MPM, GTT, LFM, and JCTB created the figures. BCSS, MPM, GTT, JCTB, LFM, DMC, and JDN edited and commented on the manuscript. BCSS and JCTB analyzed and interpreted patient data regarding dermoscopy images. JCTB analyzed and interpreted patient data regarding confocal microscopy images. MPM and RL analyzed and interpreted patient data regarding histology. GTT, FF, and DMC analyzed and interpreted patient data regarding somatic mutation analysis and germline genetic testing. All of the authors read and approved the final manuscript.

#### Funding

This research was funded by a grant received from FUNADERSP - *Fundo de Apoio à Dermatologia de São Paulo* (28/2015 - BCSS) for performing germline analysis, FAPESP - *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (2013/23277-8 - DMC and 2014/509443-1 - DMC and GTT), CNPq - *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (465682/2014-6 - DMC and GTT), and CAPES - *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (88887.136405/2017-00 - DMC and GTT) for performing somatic analysis. Funding bodies were not involved in the

design of the study, in the collection, analysis, and interpretation of the data, or in the writing of the manuscript.

#### Availability of data and materials

All data are available within this manuscript.

#### Ethics approval and consent to participate

The present report has been approved by the Ethics Committee of our institution (2076/15). Written consent forms were obtained from both the patient and her sister.

#### Consent for publication

Written consent forms were obtained from both the patient and her sister.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup>Skin Cancer Department, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Professor Antonio Prudente, 211 Liberdade, São Paulo, SP CEP: 01509-900, Brazil. <sup>2</sup>Department of Pathology, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Professor Antonio Prudente, 211 Liberdade, São Paulo, SP CEP: 01509-900, Brazil. <sup>3</sup>Laboratory of Genomics and Molecular Biology, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Taguá, 440, São Paulo, SP CEP: 05008-010, Brazil. <sup>4</sup>National Institute of Science and Technology in Oncogenomics and Therapeutic Innovation, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Professor Antonio Prudente, 211 Liberdade, Rua Taguá, 400, São Paulo, SP CEP: 01509-900, Brazil.

Received: 14 February 2019 Accepted: 9 October 2019

Published online: 09 November 2019

#### References

- Carbone M, Ferris LK, Baumann F, Napolitano A, Lum CA, Flores EG, et al. BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MIBAITs. *J Transl Med*. 2012;10:179.
- Star P, Goodwin A, Kapoor R, Conway RM, Long GV, Scolyer RA, et al. Germline BAP1-positive patients: the dilemmas of cancer surveillance and a proposed interdisciplinary consensus monitoring strategy. *Eur J Cancer*. 2018;92:48–53.
- Walpole S, Pritchard AL, Cebulla CM, Pilarski R, Stautberg M, Davidoff FH, et al. Comprehensive study of the clinical phenotype of Germline BAP1 variant-carrying families worldwide. *J Natl Cancer Inst*. 2018 Dec 1;110(12):1328–41.
- Wiesner T, Obenaus AC, Murali R, Fried I, Griewank KG, Ulz P, et al. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet*. 2011;43:1018–21.
- Wiesner T, Murali R, Fried I, Ceroni L, Busam K, Kutzner H, et al. A distinct subset of atypical Spitz tumors is characterized by BRAF mutation and loss of BAP1 expression. *Am J Surg Pathol*. 2012;36:818–30.
- Njauw CN, Kim I, Piris A, Gabree M, Taylor M, Lane AM, et al. Germline BAP1 inactivation is preferentially associated with metastatic ocular melanoma and cutaneous-ocular melanoma families. *PLoS One*. 2012;7:e35295.
- Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R, editors. WHO classification of skin tumors. 4th ed. Lyon: IARC; 2018.
- Haugh AM, Njauw CN, Bublej JA, Verzi AE, Zhang B, Kudalkar E, et al. Genotypic and phenotypic features of BAP1 Cancer syndrome: a report of 8 new families and review of cases in the literature. *JAMA Dermatol*. 2017;153:999–1006.
- Zhang AJ, Rush PS, Tsao H, Duncan LM. BRCA1-associated protein (BAP1)-inactivated melanocytic tumors. *J Cutan Pathol*. 2019;24:1–8.
- Moawad S, Reigneau M, de la Fouchardière A, Soufir N, Schmutz JL, Granel-Brocard F, et al. Clinical, dermoscopic, histological and molecular analysis of BAP1-inactivated melanocytic naevus/tumour in two familial cases of BAP1 syndrome. *Br J Dermatol*. 2018 Oct;179(4):973–5.
- Yélamos O, Navarrete-Dechent C, Marchetti MA, Rogers T, Apalla Z, Bahadoran P, et al. Clinical and dermoscopic features of cutaneous BAP1-inactivated melanocytic tumors: results of multicenter case-control study by the International Dermoscopy society. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Jun;80(6):1585–93.
- Marušić Z, Buljan M, Busam KJ. Histomorphologic spectrum of BAP1 negative melanocytic neoplasms in a family with BAP1-associated cancer susceptibility syndrome. *J Cutan Pathol*. 2015;42:406–12.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. And ACMG laboratory quality assurance committee. 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;17:405–24.
- Zalaudek I, Manzo M, Savarese I, Docino G, Ferrara G, Argenziano G. The morphologic universe of melanocytic nevi. *Semin Cutan Med Surg*. 2009;28:149–56.
- Pellacani G, Cesinaro AM, Seidenari S. Reflectance-mode confocal microscopy of pigmented skin lesions—improvement in melanoma diagnostic specificity. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:979–85.
- Tavoloni Braga JC, de Paula Ramos Castro R, Moraes Pinto Blumetti TC, Rocha Mendes FB, Arêas de Souza Lima Beltrame Ferreira J, Rezza GG. Opening a window into living tissue: Histopathologic features of confocal microscopic findings in skin tumors. *Dermatol Clin*. 2016; 34:377–394.
- Piris A, Mihm MC Jr, Hoang MP. BAP1 and BRAFV600E expression in benign and malignant melanocytic proliferations. *Hum Pathol*. 2015;46:239–45.
- Garfield EM, Walton KE, Quan VL, VandenBoom T, Zhang B, Kong BY, Isales MC, Panah E, et al. Histomorphologic spectrum of germline-related and sporadic BAP1-inactivated melanocytic tumors. *J Am Acad Dermatol*. 2018 Sep;79(3):525–34.
- Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *N Engl J Med*. 2015; 373:1926–36.
- Murali R, Wiesner T, Scolyer RA. Tumours associated with BAP1 mutations. *Pathology*. 2013;45:116–26.
- Kazlouskaya V, Guo Y, Maia-Cohen S, Mones J. Clear-cell melanocytic lesions with balloon-cell and sebocyte-like melanocytes: a unifying concept. *Am J Dermatopathol*. 2014;36:380–6.
- McGregor SM, Dunning R, Hyjek E, Vignesswaran W, Husain AN, Krausz T. BAP1 facilitates diagnostic objectivity, classification, and prognostication in malignant pleural mesothelioma. *Hum Pathol*. 2015 Nov;46(11):1670–8.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)





## Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

(Resolução CNS nº466/12)

### Dados de identificação do sujeito de pesquisa:

Nome do Paciente:.....

Sexo: ( ) M ( ) F

Data de Nascimento: ...../...../.....

Telefone:.....

**Título da pesquisa:** “Investigação de mutações genéticas nos pacientes com critério clínico para melanoma hereditário em acompanhamento no ambulatório de melanoma familiar do Núcleo de Câncer de Pele do A C Camargo Cancer Center – Associação com características clínicas”

### Pesquisador Responsável: Dra Bianca Costa Soares de Sá

Prezado senhor (a):

Estamos convidando-a (o) a participar de um projeto de pesquisa sobre a genética do melanoma (melanoma é um câncer de pele que na maior parte das vezes surge como uma pinta). A sua participação é voluntária e a recusa em participar não o prejudicará em nada e não mudará seu acompanhamento e o seu tratamento no A.C.Camargo Cancer Center.

### O que é o Melanoma Familiar ou Hereditário?

Melanoma familiar é o nome utilizado para caracterizar um grupo de pessoas com risco mais alto de desenvolver o melanoma do que a população em geral. Conseguimos caracterizar este grupo de risco alto quando identificamos que um indivíduo teve 2 melanomas ou mais e/ou quando há 2 ou mais familiares com a doença, do mesmo lado da família. Existem outros 2 tipos de câncer que podem estar relacionados ao melanoma

familiar são, o câncer de pâncreas e o de Sistema Nervoso Central (cabeça).

Aqui estão alguns exemplos de famílias de alto risco:

- 1) A sua mãe e o seu tio materno tiveram melanoma.
- 2) O Sr teve dois melanomas.
- 3) O Sr teve um melanoma e seu pai teve um câncer de pâncreas.

### **O que é mutação genética?**

Mutação genética é qualquer mudança que ocorra na sequência original de um gene e que pode alterar o funcionamento deste gene, e, a partir daí, provocar várias mudanças capazes de influenciar inúmeros processos no nosso organismo.

### **Objetivo da pesquisa:**

Pretendemos investigar as mutações genéticas que podem estar relacionadas ao surgimento do melanoma nos indivíduos que foram diagnosticados com a doença e preenchem os critérios clínicos para melanoma hereditário.

### **Como será feita a pesquisa?**

Se Sr(a) concordar em participar do estudo, o Sr(a) será orientado pela equipe do Ambulatório de Melanoma Familiar do Núcleo de Câncer de Pele sobre o teste genético de maneira mais detalhada, e, depois, coletar aproximadamente 10 ml de sangue no laboratório do A.C.Camargo. **O procedimento pode ser feito também através de coleta de saliva, em um coletor específico.**

Esta amostra **(sangue ou saliva)** será processada e, então será extraído o DNA dos linfócitos (células brancas do sangue). Esta amostra de DNA, então, passará pelo processo de análise.

Em seguida (quando as análises estiverem finalizadas) o Sr(a) será encaminhado para a Oncogenética, onde receberá o resultado do teste e um aconselhamento genético.

**Riscos:**

De modo geral não há riscos à sua saúde neste projeto. Você pode sentir dor no momento da picada da agulha para coleta de sangue, além disso o local pode, eventualmente, ficar roxo por alguns dias.

É possível que o Sr(a). sinta algum desconforto psicológico caso seu teste genético seja positivo (resultado que o Sr(a) terá juntamente com a equipe da Oncogenética). Caso isso aconteça, e o Sr(a). concorde, os responsáveis pela pesquisa o encaminharão para uma consulta no ambulatório de psicologia.

**Confidencialidade:**

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais. Você não será identificado e os dados desta pesquisa serão manipulados apenas pelos pesquisadores envolvidos; no entanto, há um risco mínimo de perda de confidencialidade.

Sua identidade será mantida em sigilo quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em congresso, por exemplo. Não há compensação financeira relacionada à sua participação, logo ela é voluntária.

Vale ressaltar que o senhor(a) tem plena liberdade de recusar a participar da pesquisa sem que essa decisão mude o seu tratamento neste serviço, podendo retirar seu consentimento a qualquer momento.

As amostras coletadas serão processadas e armazenadas pelo Banco de Macromoléculas do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, e o excedente não utilizado por este projeto de pesquisa poderá ser utilizado em outros projetos no futuro, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

É importante esclarecer que para fins deste projeto nenhum outro membro da sua família terá o sangue **ou saliva** coletado para a realização da investigação genética **neste momento.**

**Gostaríamos de saber se o Sr(a) autoriza o uso do material que sobrar em outro projeto futuro, após aprovação do Comitê de Ética da instituição.**

**Sim, autorizo o uso em outros projetos e caso haja alguma descoberta que possa me beneficiar gostaria de ser comunicado e orientado.**

**Não, não autorizo o uso em outros projetos sem uma nova autorização minha.**

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, você poderá entrar em contato com a Dra. Bianca ou Enf Luciana (tel: 2189-5000 ramal 4590). Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – A.C.Camargo Cancer Center/SP 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.”

Eu, \_\_\_\_\_ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, participar desta pesquisa.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito de pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Testemunha