



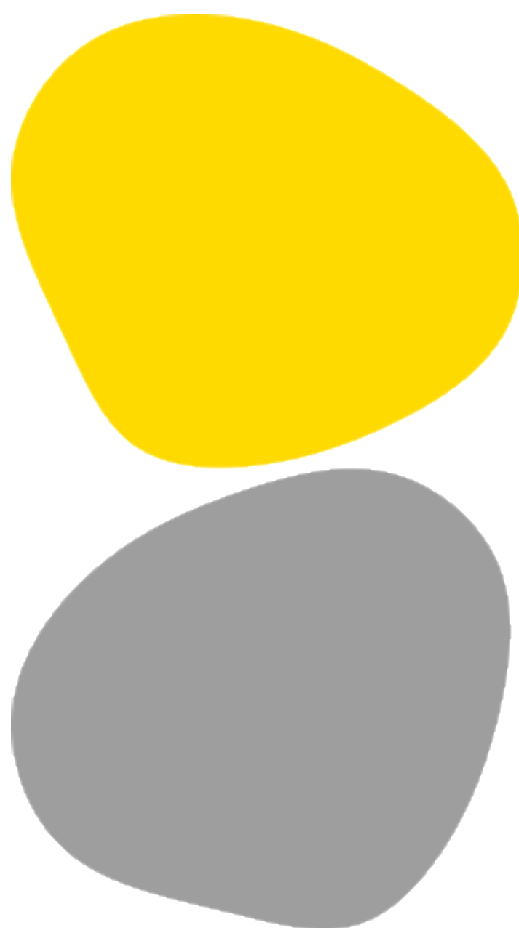
MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA

Algoritmo para Seleção das Plataformas de NGS para a Oncologia Clínica

Angélica Cristina Neto Ribeiro

09/2025



ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE

Algoritmo para Seleção das Plataformas de NGS para a Oncologia Clínica

Autor

Angélica Cristina Neto Ribeiro

Orientadores

Prof. Luís Cirnes, Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP); Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto (E2S|P.PORTO)

Prof. Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva, E2S|P.PORTO

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



Agradecimentos

Gostaria, primeiramente, de agradecer, de um modo geral, a todos os que, de alguma maneira, estiveram envolvidos no meu estágio e/ou na concretização desta tese.

Em especial, gostaria de agradecer às instituições i3S (Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto) e ao Ipatimup Diagnostics, por me terem proporcionado esta oportunidade de obter diversas experiências de aprendizagem, tanto através da plataforma científica Genomics (GenCore), como no grupo de investigação Cancer Metastasis.

Em particular, gostaria de agradecer, ao meu orientador deste projeto, Professor Luís Cirnes, por me ter integrado no Ipatimup Diagnostics, e pela sua orientação, que foi fundamental para a realização deste projeto. Agradeço também à Patrícia Domingues, por me ter auxiliado nos primeiros passos deste projeto.

Para além disso, gostaria de agradecer profundamente aos elementos da plataforma científica Genomics (GenCore), Ana Mafalda Rocha e ao Rob Mensink, pela partilha colossal de experiência e de conhecimentos de ambos, mas sobretudo, pelo carinho, paciência, apoio e dedicação demonstrados ao longo do meu percurso na instituição.

Gostaria também de agradecer à Joana Paredes e a todos os restantes elementos do grupo de investigação Cancer Metastasis, que, apesar da minha chegada inesperada, me acolheram com grande generosidade. Agradeço ainda todo o conhecimento transmitido num curto espaço de tempo e a oportunidade de conhecer de perto a dinâmica diária de um grupo de investigação.

Agradeço ainda à Professora Regina, pela orientação e paciência que teve comigo durante o desenvolvimento deste projeto.

Não poderia deixar de referir, que este projeto definitivamente não teria sido concretizado sem o apoio inabalável da minha família, que desde sempre foram os meus maiores pilares de força, motivação e amor. Agradeço-vos por me terem sempre acreditado em mim, e por me incentivarem sempre a seguir os meus sonhos, mesmo quando pareciam inalcançáveis.

Por fim, agradeço aos meus amigos que surgiram ao longo deste mestrado, especialmente na especialidade de Patologia Molecular. Em particular à Débora, Mariana e Filipa, por todos os momentos bons e desafios partilhados ao longo deste mestrado.



Resumo

Com os avanços das tecnologias de sequenciação de nova geração, surgiram plataformas cujas características influenciam a aplicação clínica em oncologia. Até ao momento, não existia nenhum algoritmo capaz de identificar as aplicações clínicas mais adequadas para cada plataforma, tanto em *targeted sequencing* como em sequenciação do exoma completo. O principal objetivo deste estudo exploratório foi desenvolver um algoritmo que apoie essa seleção.

Realizou-se uma pesquisa bibliográfica nas bases PubMed, Web of Science e Scopus, abrangendo artigos originais publicados entre 2019 e 2025. Foram analisados 239 artigos, permitindo determinar parâmetros de desempenho, como profundidade de cobertura, tipo e quantidade de amostra, comprimento de leitura, *Phred quality score*, limite de deteção, custo por amostra, tempo de resposta, e a capacidade de detetar diferentes variantes genéticas.

Observou-se que as plataformas *short-read* representam mais de 90% dos estudos clínicos, com elevada profundidade de cobertura. A sequenciação do exoma completo foi aplicada em situações específicas, enquanto o *targeted sequencing* predominou no diagnóstico clínico. As plataformas *long-read* destacaram-se na deteção de regiões complexas, com utilização clínica limitada.

Os resultados permitiram desenvolver um algoritmo que orienta a seleção da plataforma mais adequada para cada contexto clínico, promovendo uma aplicação mais eficiente das plataformas de sequenciação.

Palavras-chave: Sequenciação de Nucleotídeos em Larga Escala; Sequenciamento do Exoma; Testes Genéticos; Neoplasias; Algoritmos



Abstract

With advanced in next-generation sequencing technologies, platforms have emerged whose characteristics influence clinical application in oncology. Until now, there has been no algorithm capable of identifying the most appropriate clinical applications for each platform, both in targeted sequencing and whole exome sequencing. The main objective of this exploratory study was to develop an algorithm to support this selection.

A literature search was conducted in the PubMed, Web of Science, and Scopus databases, covering original articles published between 2019 and 2025. A total of 239 articles were analysed, allowing the determination of performance parameters such as coverage depth, sample type and quantity, read length, Phred quality score, detection limit, cost per sample, turnaround time, and the ability to detect different genetic variants.

It was observed that short-read platforms represent more than 90% of clinical studies, with high coverage depth. Whole exome sequencing was applied in specific situations, while targeted sequencing predominated in clinical diagnosis. Long-read platforms stood out in the detection of complex regions, with limited clinical use.

The results enabled the development of an algorithm that guides the selection of the most appropriate platform for each clinical context, promoting a more efficient application of sequencing platforms.

Keywords: High-Throughput Nucleotide Sequencing; Exome Sequencing; Genetic Techniques; Neoplasms; Algorithms



Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Breve História da Sequenciação.....	1
1.2.	Sequenciação de Nova Geração (NGS)	3
1.2.1.	Etapas da Sequenciação Massiva Paralela.....	4
1.3.	Plataformas de NGS.....	8
1.3.1.	Thermo Fisher Scientific – Ion Torrent.....	9
1.3.2.	Illumina®	10
1.3.3.	Element Bioscience – AVITI™	12
1.3.4.	MGI Tech Co., Ltd – DNBSEQ™	14
1.3.5.	Pacific Biosciences – PacBio	15
1.3.6.	Oxford Nanopore Technologies – Nanopore.....	16
1.4.	NGS na Oncologia Clínica	18
1.4.1.	<i>Targeted Sequencing</i>.....	19
1.4.2.	Sequenciação de Exoma Completo (WES)	20
2.	Objetivos.....	21
3.	Material e Métodos.....	22
3.1.	Seleção dos parâmetros das plataformas de NGS.....	22
3.2.	Delineamento do Estudo.....	24
3.3.	Seleção e Análise da informação das plataformas de NGS.....	25
4.	Resultados.....	27
4.1.	<i>Targeted Sequencing</i>.....	27
4.1.1.	Desempenho das plataformas NGS.....	27
4.1.2.	Deteção de Variantes.....	32
4.2.	Sequenciação do Exoma Completo (WES).....	34
4.3.	Proposta de Algoritmo para a utilização das plataformas de NGS.....	36
5.	Discussão.....	38
6.	Conclusões	47
	Referências Bibliográficas.....	48



Lista de Abreviaturas

cDNA- Ácido desoxirribonucleico complementar
cPAS- *Combinatorial probe-anchor synthesis*
CNV- Variação do número de cópias
dNTP- Trifosfato de desoxinucleotídeo
ddNTP- Trifosfato didesoxinucleotídeo
DNA- Ácido desoxirribonucleico
DNB- *Deoxyribonucleic acid nanoball*
dsDNA- Ácido desoxirribonucleico de dupla cadeia
FFPE - *Formalin-fixed paraffin-embedded*
Indels- Inserções-deleções
IQR- Intervalo interquartil
NGS- Sequenciação de nova geração
Q score- *Phred quality score*
pb- Pares de bases
PCR- *Polymerase chain reaction*
PE- *Paired-end*
RCA- *Rolling circle amplification*
SBS- Sequenciação por síntese
SBB- Sequenciação por ligação
SE- *Single-end*
SMTR- *Single-molecule, real-time sequencing technology*
SNV- Variantes de nucleótido único
ssDNA- DNA de cadeia simples
TMB- *Tumor mutational burden*
WES- Sequenciação do exoma completo

1. Introdução

1.1. Breve História da Sequenciação

A identificação do DNA (ácido desoxirribonucleico) teve início em 1928, através das experiências de Frederick Griffith, que demonstraram o fenómeno da transformação bacteriana ao observar que uma estirpe não virulenta de *Streptococcus pneumoniae* adquiria virulência quando exposta a extratos de estirpes virulentas inativadas pelo calor. No entanto, só em 1944, Oswald Avery e os seus colaboradores demonstraram que a substância transformadora era o DNA, comprovando-o como a macromolécula responsável pelo armazenamento da informação genética. (1–4) Contudo, a estrutura tridimensional do DNA só foi esclarecida em 1953 por Watson e Crick, a partir dos dados cristalográficos produzidos por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins. (5–7)

A determinação da estrutura do DNA permitiu compreender o funcionamento do material genético e impulsionou o desenvolvimento de diversas técnicas de biologia molecular, entre as quais se destaca o PCR (*Polymerase chain reaction*), desenvolvido em 1983 por Kary Mullis. Esta técnica, baseada em ciclos repetidos de temperatura controlada, permite a replicação de um segmento de DNA através de ciclos sucessivos que promovem a amplificação exponencial da sequência-alvo, num curto espaço de tempo. A introdução do PCR possibilitou avanços significativos, nomeadamente na sequenciação de DNA. (8) Esta técnica permite determinar a ordem exata das bases azotadas ao longo de um segmento de DNA, através de metodologias laboratoriais que possibilitam identificar a sequência nucleotídica amplificada. (1,9,10)

No entanto, somente na década de 70 é que foi possível determinar uma sequência de nucleótidos de DNA, através do método conhecido como sequenciação de Maxam-Gilbert. Neste método, o DNA é marcado nas extremidades com substâncias radioativas e, em seguida, submetido à clivagem parcial do DNA através da utilização de diferentes agentes químicos, consoante a especificidade da base azotada. Através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida, os fragmentos de DNA são discriminados pelo seu tamanho, sendo visualizada a sua separação (Figura 1). (11–13)

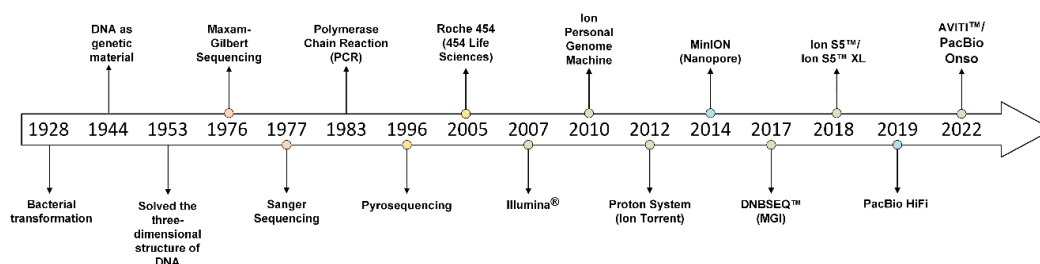


Figura 1: Breve história da sequenciação.



A sequenciação de Sanger, desenvolvida por Frederick Sanger, é uma técnica fundamental para a determinação da sequência de nucleótidos num fragmento de DNA. (7,14) O método baseia-se na síntese de fragmentos de DNA, cuja extensão é interrompida aleatoriamente pelos trifosfatos didesoxinucleotídeos (ddNTP), designados por nucleotídeos terminadores. (7,13,14) Essa interrupção aleatória gera fragmentos de diferentes comprimentos, cuja análise permite determinar sequencialmente a sequência completa de nucleótidos com elevada precisão por base. (7,9,15,16)

A sequenciação de Sanger continua atualmente a ser considerada o *gold standard* para a sequenciação de DNA. No entanto, tal como acontece com outras metodologias laboratoriais, esta também apresenta limitações, sendo a principal o baixo rendimento, o que a torna pouco prática para a sequenciação de genes inteiros. Esta limitação decorre do facto de a técnica apenas permitir sequenciar um único alvo por reação, o que implica que a obtenção da sequência completa tenha de ser feita fragmento a fragmento. Para cobrir toda a sequência codificante, é necessária a amplificação de múltiplos fragmentos por PCR, o que aumenta significativamente a complexidade do processo à medida que o número de fragmentos aumenta. Adicionalmente, cada alvo tem de ser submetido individualmente à eletroforese capilar. (2,16–18) Apesar disso, a técnica continua a ser amplamente utilizada, nomeadamente para a validação de mutações detetadas por outras metodologias, para a análise de mutações-alvo em estudos de segregação familiar e por permanecer como um método rápido e económico. (17)

A pirosequenciação consiste num método de sequenciação por síntese que se baseia na deteção de sinais luminosos causados pela incorporação de nucleótidos durante a síntese do DNA. (7,19–21) A polimerase, direcionada por um primer, adiciona nucleótidos complementares à sequência molde, libertando moléculas de pirofosfato a cada incorporação. A quantidade de pirofosfato libertada é proporcional ao número de nucleótidos incorporados, de modo que sequências contínuas de nucleótidos geram sinais proporcionais ao número de bases incorporadas. A análise destes sinais possibilita determinar sequencialmente a sequência de nucleótidos. (7,21) Os principais avanços conseguidos por esta metodologia foram a redução da quantidade de reagentes necessários para a sequenciação, e um maior rendimento, bem como a capacidade de realizar sequenciação em larga escala, comparativamente com a sequenciação de Sanger. Esta inovação permitiu ampliar significativamente as possibilidades de aplicação genómica, com redução dos custos, sendo uma das primeiras tecnologias, além da sequenciação de Sanger, com capacidade para realizar a sequenciação completa do genoma humano. (22,23) Contudo, esta técnica apresenta algumas desvantagens, como a redução do comprimento de leitura, normalmente entre 40 e 60 pares de bases (pb), comparativamente com a sequenciação de



Sanger. (7) Além disso, nucleótidos idênticos consecutivos geram um sinal proporcional ao número de nucleótidos repetidos, o que pode comprometer a precisão da sequenciação em regiões homopoliméricas, isto é, regiões constituídas por repetições consecutivas do mesmo nucleótido. Todavia, um desenho adequado de primers e/ou outros ensaios complementares permite contornar essa dificuldade. (7,24)

Apesar das limitações da pirosequenciação, o sequenciador da Roche 454, lançado em 2005 por Jonathan Rothberg, representou um avanço significativo ao introduzir esta abordagem de alto rendimento. (7,9,22) Esta tecnologia marcou o início da sequenciação de nova geração (NGS), distinguindo-se das metodologias anteriores pela inovação técnica. Embora tenha sido descontinuado em meados de 2010, (25) o sequenciador Roche 454 consolidou-se como um ponto de viragem na história da sequenciação, perspetivando um caminho para o desenvolvimento e implementação massiva das plataformas de sequenciação. (7,9)

1.2. Sequenciação de Nova Geração (NGS)

A NGS, também conhecida como sequenciação de segunda geração, sequenciação de alto rendimento ou sequenciação massiva paralela, foi amplamente aceite e incorporada em numerosos laboratórios clínicos de diagnóstico molecular bem como na área da investigação. (1,7) A NGS determina simultaneamente a sequência de bases azotadas de milhões de fragmentos de DNA ou cDNA (DNA complementar) por execução, proporcionando um elevado rendimento e rapidez, a um custo reduzido por base, (2,9,18,26) em contraste com a sequenciação de Sanger, que só sequencia um fragmento de cada vez. (17) Assim, é possível a realização da sequenciação através de *targeted sequencing* para determinadas patologias, sequenciação de exoma e sequenciação de genoma. (27,28) Por conseguinte, possui uma elevada aplicabilidade em diversos ramos, como no rastreio pré-natal não invasivo; rastreio e diagnóstico genético pré-implantatório; doenças genéticas raras; deteção de microrganismos patogénicos e metagenómica, e mutações em genes associados ao desenvolvimento de neoplasias. (15,26) Diversas plataformas de NGS estão acessíveis comercialmente e empregam distintas químicas de sequenciação para gerarem dados de sequenciação, cada uma com características particulares do produtor que fornece o equipamento. As plataformas atuais utilizam o mesmo princípio de sequenciação, porém variam na metodologia para produzirem e detetarem os sinais da sequenciação (Figura 2). (7)

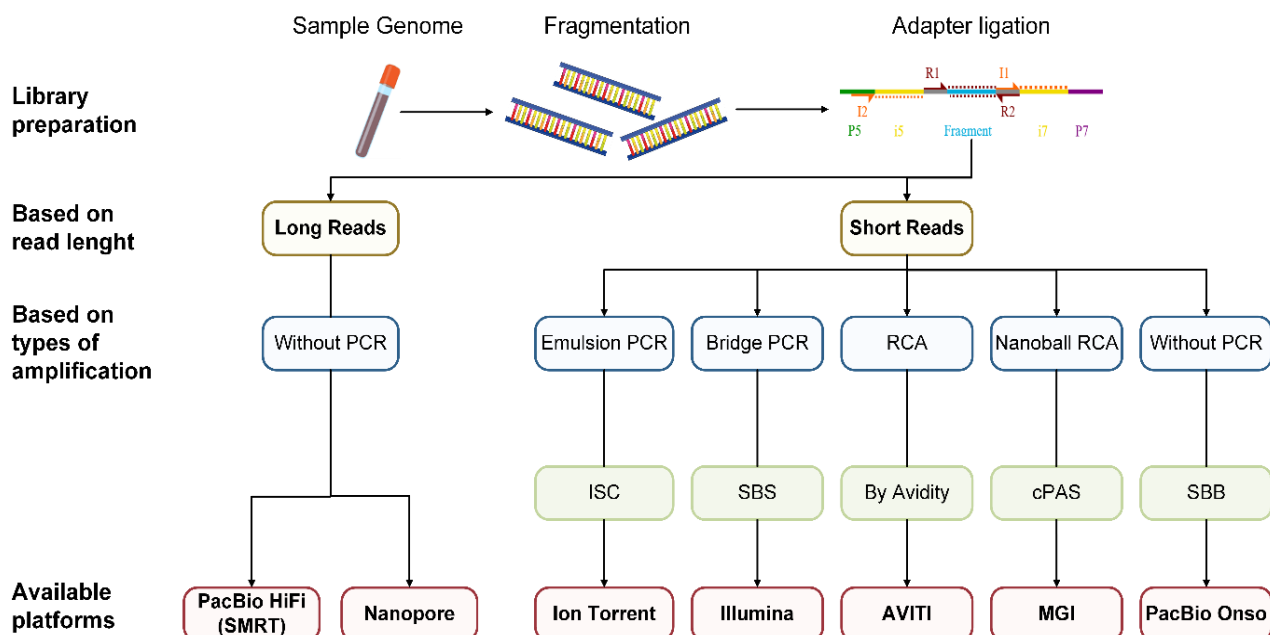


Figura 2: Visão geral das diferentes etapas do NGS realizado por várias tecnologias em diferentes plataformas. Legenda: cPAS – Combinatorial probe-anchor synthesis, ISC – Ion semiconductor chips, PCR – Polymerase chain reaction, RCA – Rolling circle amplification, SBB – Sequenciação por ligação; SBS – Sequenciação por síntese; SMRT – single-molecule, real-time sequencing technology (Adaptado) (29)

1.2.1. Etapas da Sequenciação Massiva Paralela

Todas as plataformas de NGS seguem as mesmas etapas que abrange a preparação das bibliotecas de NGS; enriquecimento do alvo; sequenciação e análise bioinformática. (13) Na primeira etapa, a partir dos ácidos nucleicos procede-se à preparação das bibliotecas de sequenciação, na qual o conceito “biblioteca” refere-se a um conjunto de DNA ou cDNA que foi adaptado para ser compatível com a plataforma de sequenciação selecionada. (7,13) Consiste na fragmentação do DNA ou cDNA para o tamanho desejado, normalmente entre 100 e 800 pb, consoante os ácidos nucleicos alvo, da plataforma de NGS, dos adaptadores utilizados, e se será utilizado a sequenciação *single-end* (SE) ou *paired-end* (PE). Importa referir que esta etapa nem sempre é obrigatória. (7,13,30) Na sequenciação SE, cada fragmento de PCR é sequenciado na íntegra partir de uma extremidade, de modo a resultar num quadro de leitura por fragmento. Em contraste, com a sequenciação PE, cada fragmento de PCR é sequenciado em ambas as extremidades, resultando em dois quadros de leitura por fragmento. A sequenciação SE é de menor custo e apropriada para análise de expressão diferencial, enquanto a sequenciação PE é mais adequada para estudos de isoformas genéticas e *splicing* alternativo, pois exigem um melhor alinhamento. (13)

Esta fragmentação do DNA ou cDNA pode ser efetuada através de métodos físicos (ultrassons), enzimáticos (DNA I ou outra enzimas de restrição; transposase) e físico-químicos (calor e catiões metálicos divalentes), sendo o método enzimático o mais comum. (7,13) O tamanho dos fragmentos de



DNA obtidos depende do tempo de incubação e da temperatura, o que permite personalizar a etapa de fragmentação, de modo que os fragmentos mais curtos e longos apresentam vantagens distintas. Nos fragmentos de menor tamanho, é mais provável que ambas as extremidades se encaixem dentro de um exão, que geralmente é o foco de interesse, ao passo que fragmentos de maior tamanho (longos) tendem a ter uma extremidade a terminar num intrão e outra no exão, o que favorece uma cobertura mais uniforme. (7) Concomitantemente ao processo de fragmentação, ocorre também o processo de reparação do DNA e a adição de uma cauda de poly(A). Isto deve-se ao fato de que, durante a fragmentação, são formadas extremidades nos fragmentos com nucleótidos aleatórios expostos, sendo a etapa de reparação final responsável por produzir fragmentos de DNA com extremidades definidas, incluindo a adição de uma cauda de poly(A) que é inserida na extremidade 3' em ambos os lados do DNA de cadeia dupla (dsDNA), de forma a complementar o adaptador que possui uma timina na extremidade 3'. (7,13)

A ligação de adaptadores aos fragmentos de DNA é realizada através de ação enzimática, como pela DNA ligase. Os adaptadores são oligonucleotídeos sintetizados que atuam como uma interface entre o DNA da amostra e a plataforma de sequenciação. (7) Um adaptador consiste numa sequência de ligação complementar do DNA da amostra à plataforma de sequenciação, que inclui: i) uma sequência de ligação, que é complementar aos fragmentos de oligonucleótidos ligados à plataforma de sequenciação; ii) uma sequência de leitura, onde ocorre a iniciação da reação de sequenciação; iii) uma sequência de índice da amostra (um código de barras de identificação da amostra), que é uma sequência curta exclusiva para cada amostra do lote (7); e iv) os *unique molecular identifiers*, que são sequências de 10 a 15 nucleótidos que funcionam como um "código de barras molecular", que permite identificar cada fragmento de DNA com um identificador único antes da amplificação. Após a amplificação, as leituras sequenciadas que são alinhadas à mesma região com *unique molecular identifiers* idênticos são consideradas clones de um único fragmento de DNA original, enquanto fragmentos com *unique molecular identifiers* distintos alinhados a essa região são considerados provenientes de moléculas originais de DNA diferentes, permitindo assim a sequenciação de uma mistura de bibliotecas na mesma reação. Uma vez que a amplificação do DNA pode diferir entre regiões, a contagem de leituras de sequenciação com qualidade inferior pode não se refletir na verdadeira distribuição do DNA na amostra. Entretanto, utilizando os *unique molecular identifiers*, pode ser determinado a quantidade total de fragmentos únicos de DNA na amostra. (7,31) Além do facto de que a sequenciação de múltiplas amostras em simultâneo poderia ser realizada de maneira simples e segura, resultando numa diminuição considerável dos custos de sequenciação e num aumento do rendimento da amostra. (31) Após esta etapa, procede-se à



amplificação por PCR utilizando primers complementares aos adaptadores, contudo este procedimento pode variar dependendo da plataforma de NGS. (13) Em seguida, segue-se o enriquecimento de região dirigida, uma vez que a atual capacidade de sequenciar um genoma inteiro num curto período de tempo, o custo envolvido e o poder analítico necessário, como o tempo computacional e o de interpretação clínica, ainda são excessivamente elevados para uso clínico de rotina. Sendo assim, a maioria dos ensaios de NGS recorre à análise de exoma e/ou *targeted sequencing* de genes específicos, na qual abrange apenas um conjunto de genes clinicamente relevantes para o estudo. (7,13) Este processo de enriquecimento, refere-se ao método de pré-sequenciação utilizado para enriquecer regiões de interesse do DNA genómico, permitindo a sequenciação posterior. (7)

Distinguem-se duas abordagens principais para a obtenção do DNA da área de interesse: uma baseada na amplificação por *amplicons* e outra na captura híbrida (hibridização com sequências complementares). O enriquecimento por *amplicons*, utilizada principalmente pela plataforma Ion Torrent, é frequentemente combinado com a etapa de preparação da biblioteca. (7,13,30,32) Por outro lado, a captura híbrida é a abordagem mais adotada pela maioria das restantes plataformas de NGS. No entanto, a escolha da abordagem depende do tamanho da região-alvo e da quantidade de DNA disponível na amostra clínica. (7) A técnica de enriquecimento por *amplicons* conhecida como a extensão de SE é uma técnica comum de enriquecimento por *amplicons* que utiliza DNA ligado ao adaptador de SE como base para iniciar o processo. O processo de amplificação utiliza um conjunto de primers que contém um primer universal direcionado para o local de ligação do primer no adaptador e diversos primers específicos para o gene/região, além do *unique molecular identifier* exclusivo do modelo original. Após uma amplificação inicial com primers específicos de genes ou regiões, em conjunto com um primer universal para o adaptador, realiza-se uma segunda amplificação com um novo conjunto de primers universais para completar a molécula de DNA da biblioteca, conferindo-lhe adaptadores em ambas as extremidades com o fragmento de interesse no centro. (7) Esta amplificação baseada em primers produz uma elevada especificidade do alvo, uma vez que os fragmentos correspondem apenas às regiões captadas por estes primers específicos de genes/regiões, sendo por isso preferencialmente utilizada no enriquecimento de regiões mais pequenas. (7,13) Entretanto, um ensaio que envolva amplificação por *amplicons* está sujeito ao viés da amplificação, uma limitação reconhecida deste tipo de abordagem, que pode reduzir a complexidade da biblioteca e comprometer a deteção de variantes de baixa frequência. (7) Embora o *unique molecular identifier* contribui para mitigar este problema, ao permitir a identificação do modelo original do DNA amplificado, a quantidade de modelos originais únicos depende, em grande parte, do material inicial e do número de ciclos de amplificação. Ainda assim, com um *design* de painel apropriado,

este método revela-se robusto e eficiente na preparação de bibliotecas de NGS de elevada qualidade. (7) Este método é vantajoso para amostras com quantidade limitada de DNA, representando assim uma vantagem significativa, uma vez que as amostras clínicas de rotina usualmente apresentam uma elevada variação na quantidade e na qualidade do DNA. Além disso, o enriquecimento do alvo baseado em amplificação por PCR também apresenta um tempo de resposta mais curto em comparação com a captura híbrida. (7) Uma outra abordagem para o enriquecimento da região alvo é através da captura híbrida onde são usadas sondas *reporter* (por exemplo: sequências de oligonucleotídeos biotinilados) para serem complementares às sequências de interesse que são fixadas a uma superfície sólida ou a *microbeads*. As amostras de DNA que apresentem as sequências detetadas pelas sondas *reporter* irão hibridar à superfície sólida/*microbeads*, e essas superfícies ou *microbeads* carregadas podem ser isoladas por métodos físicos, como a filtração ou por separação magnética. O DNA alvo é então eluído na superfície fixa após a remoção do DNA não-alvo (purificação). (7) O enriquecimento por captura híbrida é geralmente aplicado para grandes regiões genómicas, como o genoma ou exoma completo, uma vez que a quantidade elevada de primers de amplificação necessários para estas aplicações é excessiva para uma multiplexação eficiente. (7,33) Além disso, representa também uma vantagem na análise da variação do número de cópias (CNVs), uma vez que o procedimento não insere um viés de amplificação por meio da PCR durante o enriquecimento do alvo, reduzindo a taxa de erro de sequenciação devido à incompatibilidade da amplificação. (7) A principal desvantagem dos métodos de captura híbrida é a quantidade mínima elevada que pode chegar até 500 ng da biblioteca para a realização da captura híbrida, (7,34) o que pode representar um desafio na sequenciação de amostras clínicas com material limitado. Além disso, estes métodos apresentam menos especificidade ao alvo em comparação com os métodos baseados em PCR e um tempo de resposta mais longo, variando entre 16 a 72 horas (Tabela 1). (7,35)

Tabela 1: Vantagens e limitações do enriquecimento da região alvo através de amplificação por *amplicons* e captura híbrida.

	Vantagens	Limitações
Amplificação por <i>amplicons</i>	Elevada especificidade do alvo Baixa quantidade de entrada de DNA Menor tempo de resposta	Propenso ao viés de amplificação Número limitado de alvos
Captura híbrida	Número ilimitado de alvos Não insere viés de amplificação Menor taxa de erro de sequenciação	Elevada quantidade de entrada de DNA Menor especificidade do alvo Tempo de resposta mais longo



A fase seguinte é a sequenciação propriamente dita que varia de acordo com a plataforma de sequenciação. (7) Atualmente, existem diversas empresas que disponibilizam plataformas de sequenciação, cada uma baseada numa metodologia específica. Compreender as vantagens e limitações de cada plataforma é fundamental para que os profissionais interpretem corretamente os resultados obtidos. (1,7) Após a sequenciação, temos os dados e a necessidade da análise bioinformática, que envolve o uso da ciência da computação, matemática, estatística, física, e fundamentos de engenharia para adquirir, armazenar, organizar, arquivar, analisar e interpretar os dados biológicos obtidos. Esta análise é realizada através de ferramentas de *software*, que variam consoante a plataforma de sequenciação, com o objetivo de resolver problemas biológicos complexos, e melhorar a nossa compreensão prática dos mecanismos de diversas patologias, a partir do grande volume de dados gerados. (36–39) A NGS tem como principal vantagem a capacidade de sequenciar vários alvos numa reação, ao contrário da sequenciação de Sanger, que ocorre num alvo por reação, proporcionando assim uma maior sensibilidade para a deteção de variantes raras. (18,40) No entanto, assim como todas as metodologias de sequenciação, a NGS apresenta como limitação comum a todas as plataformas, a geração de grandes volumes de dados que requerem processos rigorosos de filtragem e controlo de qualidade, para eliminar variantes de baixa confiança, como artefactos e ruído, e para distinguir alterações com significado clínico. Para tal, é essencial o uso de ferramentas bioinformáticas e a interpretação de resultados por profissionais com conhecimentos especializados em análise bioinformática e de dados, fundamentados no contexto clínico e de acordo com *guidelines* internacionais. (18)

1.3. Plataformas de NGS

As plataformas de NGS, podem ser classificadas com base em diferentes critérios, incluindo a tecnologia utilizada, o método de amplificação ou o comprimento de leitura. Entre estas, a distinção baseada no comprimento de leitura é particularmente relevante, dividindo-se em plataformas de sequenciação *short-read*, que correspondem à sequenciação de segunda geração, e em plataformas de sequenciação *long-read*, designadas como sequenciação de terceira geração. As plataformas de sequenciação *short-read*, atualmente as mais comuns, centram-se na sequenciação de um elevado número de pares de nucleótidos num curto período de tempo, recorrendo a leituras curtas entre 100 e 600 pb. Esta abordagem é particularmente eficaz na compreensão de fenótipos complexos, bem como em estudos sobre alterações germinativas e somáticas, deteção de variantes, e sequenciação de exoma. Em contrapartida, a sequenciação *long-read* tem como objetivo sequenciar fragmentos de DNA



significativamente mais longos até 900 quilobases. Esta capacidade é essencial para a resolução de regiões mais complexas, nomeadamente na identificação de variantes estruturais, análise de metilação, haplotipagem, entre outros. (18,41–43)

Entre as plataformas de sequenciação (Figura 2), incluem-se as plataformas *short-read*, Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific), Illumina®, AVITI™ (Element Bioscience), DNBSEQ Technology (MGI Tech), PacBio – Onso system (Pacific Biosciences), e as plataformas capazes de sequenciação *long-read*, como PacBio – Vega e a Revio long-read system e Nanopore (Oxford Nanopore Technologies), que não se limitam apenas à sequenciação *long-read*, podendo também realizar sequenciação *short-read*.

1.3.1. Thermo Fisher Scientific – Ion Torrent

A plataforma Ion Torrent é uma tecnologia de alto rendimento baseada em chips semicondutores de iões. (2,44) O sequenciador Ion Personal Genome Machine foi introduzido em 2010, seguido pelo Proton System em 2012. Posteriormente, em 2018 foi lançado o S5/S5XL, com a principal diferença que o S5 é mais simples de operar, apresentando um tempo de execução de apenas de 24 horas, quando combinado com o kit de preparação da biblioteca Ion Chef. (44–46) O princípio do Ion Torrent, consiste na utilização de um chip semiconductor para detetar sinais elétricos, (7,47) permitindo a conversão de sequências de nucleótidos diretamente num sinal digital, (18) sem a necessidade de produtos químicos ou equipamentos óticos, pois baseia-se numa simples reação química, através da medição do pH. (18,47,48) Os fragmentos de DNA são inicialmente ligados a adaptadores, e em seguida capturados por *microbeads* revestidas com sequências complementares e que, posteriormente, são amplificados por PCR em emulsão. (2,7,18) Ao elaborar uma emulsão de água e óleo, as *microbeads* atuam como microcâmaras de reação. Em condições adequadas, cada *microbead* conterá um fragmento de DNA, e a amplificação clonal ocorrerá no interior da *microbead*, resultando na cobertura da *microbead* com DNA clonal, (7) permitindo que milhões de *microbeads* tenham múltiplas cópias de uma sequência de DNA. (18) A solução com as *microbeads* amplificadas é então colocada no chip de sequenciação, que possui numerosos micropoços na superfície de sequenciação, sendo que apenas uma *microbead* entra num micropoço, na qual as *microbeads* amplificadas com DNA são incubadas em micropoços onde ocorre a sequenciação. (7,18) Na tecnologia do Ion Torrent, dentro de cada micropoço do chip de sequenciação contém uma *microbead*, na qual ocorre as alterações de pH da solução durante os ciclos de sequenciação. (7,13) Os nucleótidos são incorporados sequencialmente por uma polimerase. Sempre que um trifosfato de desoxinucleotídeo (dNTP) é incorporado no DNA, a polimerase adiciona uma base, e um ião H⁺ é libertado, provocando uma alteração no pH da solução envolvente, tornando a reação equimolar ao



nucleótido incorporado. (2,7,44,49) Da mesma forma que, para sequências de nucleótidos idênticos, o sinal é criado proporcionalmente ao número de nucleótidos. (7,18,44) A alteração do pH gera um pico de tensão positiva, detetado por um sensor que monitoriza a variação do pH. Este sinal químico é convertido em informação digital por meio de sinais elétricos proporcionais ao número de nucleótidos incorporados, registados pelo chip semicondutor. (2,12) A principal vantagem desta plataforma é a simplicidade da química de sequenciação e a capacidade de processar amostras em quantidades muito reduzidas. Além disso, apresenta compatibilidade de chips semicondutores entre os equipamentos Ion Personal Genome Machine, Proton System e o Ion GeneStudio S5, permitindo a otimização do fluxo de trabalho de acordo com as necessidades de rendimento. (21) Contudo, a desvantagem significativa desta metodologia é a maior taxa de erro em determinadas regiões específicas, nomeadamente em regiões de homopolímeros presentes em algumas sequências. À medida que o comprimento do homopolímero aumenta, a intensidade do sinal também se eleva, o que pode exceder a sensibilidade do detetor, dificultando a determinação precisa do número de bases. (7,12,21)

1.3.2. Illumina®

A plataforma Illumina® baseia-se na geração de *clusters* ou amplificação por PCR em ponte, e na sequenciação em síntese com a utilização de nucleótidos reversíveis com deteção fluorescente. (2,7,13,18,48) Inicialmente, as moléculas de DNA são fragmentadas até aproximadamente 500 pb, sendo depois ligados adaptadores apropriados a cada extremidade. Estes adaptadores funcionam como substratos para reações de amplificação sucessivas numa *flow cell*. (18,50,51) Após a ligação aos adaptadores em ambas as extremidades, os fragmentos de DNA são desnaturados, e os fragmentos de ssDNA (DNA de cadeia simples) são fixados numa lâmina de reação com uma superfície sólida transparente denominada de *flow cell*. (50) Uma *flow cell* consiste numa lâmina de vidro com 2 a 8 canais, os quais contêm sequências de oligonucleótidos espaçadas e complementares às sequências de ligação dos adaptadores (P5/P7), podendo produzir entre 80 e 100 milhões de *clusters* numa única *flow cell*. (7,18,47,52) Com uma adequada concentração e distribuição da biblioteca de DNA, quando uma biblioteca de DNA é introduzida numa *flow cell*, a microfluídica distribui-o uniformemente por toda a superfície de reação, e cada molécula de DNA com o adaptador ligado fixa-se à superfície da *flow cell*, através da hibridação dos adaptadores do fragmento de DNA (P5/P7) com as sequências de oligonucleótidos que estão na superfície da *flow cell*. Quando ocorre a hibridização, uma polimerase sintetiza um complemento do fragmento hibridizado, e após a formação do dsDNA, este é desnaturado para eliminar o fragmento original de DNA. Em seguida, ocorre a amplificação em ponte, através da



interação dos fragmentos com sequências de oligonucleótidos não hibridizadas na superfície da *flow cell*, seguida pela amplificação clonal realizada pelas polimerases, que sintetizam a cadeia complementar, originando fragmentos de dsDNA. Por fim, a ponte é desnaturada, formando dois ssDNA, e o processo é repetido. (7,48,53) Este processo é frequentemente referido como geração de *clusters*, sendo um *cluster* um agrupamento clonal do DNA molde fixado à superfície de uma *flow cell*. Cada *cluster* origina-se a partir de um único fragmento de DNA que é amplificado clonalmente através da amplificação em ponte, até formar aproximadamente 1000 cópias do DNA molde após 30 ciclos, as quais serão posteriormente utilizadas como modelos para a reação de sequenciação, com cada *cluster* a produzir apenas uma leitura de sequenciação. (7,54) Durante a etapa de sequenciação por síntese, são utilizados dNTPs modificados, marcados com um fluorocromo e ligados a um terminador reversível que bloqueia a extensão do grupo hidroxilo 3' do DNA. Cada dNTP é marcado com um fluorocromo, e todos estão presentes durante cada ciclo de sequenciação, garantindo que apenas um nucleótido seja incorporado pela polimerase em cada cadeia sintetizada. O nucleótido complementar marcado irá ligar-se ao DNA molde, mas o terminador reversível impede a incorporação de mais de que um nucleótido por ciclo, e os restantes nucleótidos não incorporados são removidos. (1,2,7,48) Os *clusters* de DNA marcados são então excitados por um laser, resultando na emissão de um sinal fluorescente com comprimento de onda específico para cada nucleótido adicionado. Os sinais óticos são detetados por um dispositivo de carga acoplada (CCD), e o *software* apropriado regista e converte os sinais numa sequência de nucleotídeos. (1,2,18) Por fim, o terminal reversível marcado com um fluorocromo é clivado, permitindo a incorporação do nucleótido seguinte no ciclo subsequente. (2,7,18) Esses ciclos de incorporação de nucleótidos e remoção dos grupos de bloqueio prosseguem até que seja alcançado o comprimento desejado ou o limite de comprimento de leitura. (2,7,18) O comprimento de onda de emissão, juntamente com a intensidade do sinal, determina o processo bioinformático de *variant calling*, que consiste na identificação de variantes através da comparação entre as sequências de DNA alinhadas e uma sequência de referência. Para um determinado *cluster*, todos os fragmentos idênticos são lidos simultaneamente, e centenas de *clusters* são sequenciados num processo massivamente paralelo, produzindo milhões de leituras que representam todos os fragmentos. (2,7,50) Além disso, são realizados ciclos para inverter o fragmento, utilizando o adaptador PE (P5 a P7), para que a sequenciação possa ser executada novamente na direção oposta, conhecido como sequenciação PE. (7,18) Esta sequenciação final emparelhada bidirecional constitui uma funcionalidade relevante da plataforma Illumina® permitindo aumentar a precisão na leitura, e melhorar a deteção de rearranjos (inserções, deleções e inversões), sequências repetitivas, fusões de genes e novas transcrições. (7,49)



A metodologia de sequenciação da Illumina® permite a obtenção de dados de sequências de DNA com um rendimento substancialmente elevado e a um custo reduzido. (43,48) No entanto, assim como qualquer plataforma, a tecnologia Illumina® também apresenta limitações, nomeadamente a ocorrência de sobrecarga de *clusters* sobrepostos durante o carregamento das amostras, o que compromete a qualidade da sequenciação. (2) Uma das limitações mais críticas prende-se com a possibilidade de ocorrer uma falta de sincronia na reação de síntese de um *cluster* individual. Esta situação pode ser causada pela remoção incompleta do terminal removível de um dNTP após a deteção do sinal fluorescente, impedindo a ligação do nucleótido no ciclo seguinte. Como consequência, o nucleótido anterior pode ser detetado novamente, emitindo um sinal de fluorescência que difere do sinal síncrono dos restantes nucleótidos, o que compromete a geração de uma sequência de consenso precisa. Esta falha limita o número de ciclos que podem ser realizados, afetando negativamente o comprimento de leitura e a qualidade dos dados obtidos. (2,18)

1.3.3. Element Bioscience – AVITI™

O princípio do AVITI™ baseia-se na sequenciação por avides, que corresponde à força total resultante de múltiplas interações de ligação não covalentes individuais. Em sistemas biológicos, como anticorpos ou recetores, esta força resulta da ligação simultânea de vários locais a um antigénio ou ligante. A avides é influenciada pela afinidade de cada interação individual, pelo número de locais de ligação disponíveis (valência) e pela organização estrutural dos componentes. Esta ligação simultânea aumenta tanto a estabilidade como o tempo de permanência do ligante no alvo. (55–57)

Esta metodologia consiste na hibridização de uma biblioteca de DNA, a qual pode ser preparada recorrendo aos diferentes conjuntos de reagentes para preparação de bibliotecas fornecidos pela Element Biosciences. A hibridização ocorre nos primers de superfície que revestem a *flow cell*, a qual possui uma química de superfície de baixa afinidade de ligação. Através de um adaptador, as extremidades da biblioteca são unidas, permitindo a circularização da biblioteca de DNA. Em seguida, a polimerase liga-se à biblioteca e aos primers, formando longas cópias de DNA da biblioteca original, possibilitando a *Rolling circle amplification* (RCA), que copia o DNA molde e o enrola numa *polony* fortemente ligada. (55,58–60) Assim, as cópias clonais de fragmentos de DNA que foram criadas por meio de RCA, produzem aproximadamente 1 mil milhão de *polonies* na superfície da *flow cell*. Em seguida, as *polonies* são hibridizadas com primers de sequenciação específicos de leitura. (55,59,61) Na química da sequenciação por avides, ocorre primeiramente a ligação das *polonies* e das aviditas. A avidita é um polímero marcado com fluorocromos, possuindo quatro braços de nucleótidos idênticos anexados. A



solução envolvente contém uma combinação de quatro tipos de aviditas diferentes, onde cada tipo de avidita corresponde a um nucleótido específico. Uma polimerase projetada para esse propósito, é hibridizada à extremidade 3' livre do primer de sequenciação e de um braço da avidita de nucleotídeos, sem incorporação ou extensão, formando-se um complexo polimerase-polímero-nucleótido. Isto acontece da mesma maneira nos restantes braços da avidita, ligando-se em diversas regiões de sequenciação hibridizadas por primers numa *polony*, criando-se assim um complexo ultraestável para a captação de imagens. E a avidita correta para cada *polony* é escolhida através da polimerase por meio da discriminação de bases. (55,60) Durante a fase de lavagem das aviditas, são removidas as avidites que não se ligaram às *polonies*, garantindo que apenas as avidites ligadas permaneçam estáveis. (55,61) A deteção das bases é realizada através dos quatro tipos de avidites, adenina, timina, citosina e guanina, gerando sinais fluorescentes captados nos quatro canais óticos do equipamento AVITI™. (58,61) Os *buffers* removem as avidites ligadas, e em seguida, a polimerase projetada incorpora um nucleótido bloqueado e não marcado, sintetizando os primers hibridizados base a base. Por fim, os grupos de bloqueio são removidos e convertidos em grupos hidroxila 3', permitindo que o próximo ciclo comece no primer. Este processo é repetido durante aproximadamente 600 ciclos. (55,61)

A sequenciação por avides, apresenta diversas vantagens, como a capacidade de separação e de otimização, independentemente das etapas de incorporação controlada e da identificação dos nucleotídeos para alcançar uma maior precisão de *variant calling*, enquanto diminui a concentração de reagentes-chave para a escala nanomolar. (55) Além disso, a metodologia RCA apresenta algumas vantagens, como a simplificação do fluxo de trabalho e a eliminação da possibilidade de interação entre os fragmentos de DNA na solução durante o processo de amplificação. No entanto, a vantagem fundamental desta metodologia de amplificação é que, se um erro acontecer durante a amplificação, esse erro será aleatório, prevenindo a disseminação de erros em todas as cópias, o que melhora consideravelmente a qualidade dos dados. (55,58,61) Em oposição aos métodos de amplificação baseados em PCR, a amplificação por RCA replica exclusivamente o DNA molde original, enrolando cada cópia numa *polony* fortemente ligada, composta por múltiplas cópias da biblioteca em proximidade. Para além de proporcionar uma amplificação de elevada fidelidade, o RCA elimina duplicações óticas e artefatos de salto de índice induzidos pela amplificação. (58) Apesar da implementação atual da sequenciação baseado em avides alcançar uma elevada precisão e uma ampla aplicabilidade, existem ainda várias possibilidades de otimização a serem exploradas, como tempos de ciclo mais curtos e densidades mais elevadas, que ainda estão em fase de desenvolvimento. (55)



1.3.4. MGI Tech Co., Ltd – DNBSEQ™

A MGI Tech Co., Ltd., subsidiada pela Complete Genomics, foi fundada em 2013, contudo só em 2017 é que iniciou a comercialização da série DNBSEQ™, (62) que apresenta uma metodologia inovadora baseada em *deoxyribonucleic acid nanoball* (DNB) com uma química de sequenciação chamada *Combinatorial probe-anchor synthesis* (cPAS). (63–66) Primeiramente, procede-se à preparação das bibliotecas, recorrendo aos diferentes conjuntos de reagentes fornecidos pela MGI Tech Co., Ltd., durante a qual o dsDNA é fragmentado e as sequências adaptadoras são ligadas às suas extremidades. Posteriormente, os fragmentos são desnaturados para formarem ssDNA. Em seguida, adiciona-se um oligonucleótido *splint*, um oligonucleótido que atua como uma ponte (*splint*), hibridando em duas moléculas de ácidos nucleicos diferentes, permitindo a sua ligação por uma ligase. (67) Esse oligonucleótido, complementar às extremidades 5' e 3' do ssDNA alvo hibrida-se simultaneamente a ambas as extremidades, formando uma estrutura circular interrompida por uma descontinuidade, designada por *nick*, que é reparado pela ação de uma DNA ligase, originando um círculo de cadeia simples. (65,66) Subsequentemente, realiza-se uma RCA, também utilizando o círculo de ssDNA como modelo, onde diversos fragmentos são amplificados simultaneamente entre 100 e 1000 cópias. (66) Por fim, sob condições apropriadas, a longa cadeia de DNA amplificado dobra-se em estruturas compactas e esféricas chamadas de DNBs, prontas para a fase da sequenciação. (65) As DNBs são carregadas com uma carga negativa em condições ácidas por causa da sua estrutura de fosfato, enquanto a superfície de um chip de silício carrega uma carga positiva. Essa interação entre cargas positivas e negativas é a principal força motriz que impulsiona o carregamento das DNBs na superfície da *flow cell*. (66) Na *flow cell*, existem diversas matrizes de ligação padronizadas, denominadas *patterned array*, de aproximadamente 200 nm uniformemente distribuídas em distâncias submicrométricas, de modo que cada local de ligação é o suficiente para ligar uma única DNB. Os *buffers* de carregamento apropriados asseguram que as DNBs permaneçam nos mesmos pontos para a etapa da sequenciação ao longo de diversos ciclos, sem que qualquer sinal seja comprometido, mas garantindo que não haja interferências entre os sinais de fluorescência de DNBs adjacentes. (65,66) Na química de sequenciação cPAS, ocorre primeiramente a hibridização dos primers de sequenciação (*anchor*) na região adaptadora dos DNBs. Depois disso, um dNTP marcado com um fluorocromo é incorporado por uma DNA *polymerase* em ciclos de sequenciação consecutivos. Os dNTPs não ligados são removidos por lavagem, enquanto os dNTPs que foram incorporados são excitados por um laser, na qual a fluorescência emitida pelas DNBs com dNTPs incorporados é capturada por câmaras avançadas e convertidas em sinal digital. As variantes são então identificadas durante o processo de *variant calling* através da utilização do *software* apropriado.



Após a detecção, o reagente de regeneração é inserido para remover os fluorocromos e preparar os DNBS para o próximo ciclo. (63–66) As vantagens desta tecnologia são o custo-benefício em comparação com outras plataformas, como a Illumina®, considerando fatores como a taxa de transferência e os comprimentos de leitura semelhantes, e as suas limitações são semelhantes a outras plataformas *short-read*, que é a incapacidade de resolver regiões complexas como regiões repetitivas e variantes estruturais, tais como inserções, deleções, entre outros. (63,64)

1.3.5. Pacific Biosciences – PacBio

Diferentemente das plataformas anteriormente descritas, a PacBio da empresa Pacific Biosciences, possui duas metodologias de sequenciação distintas, a sequenciação por ligação (SBB), utilizada na plataforma *short-read* ONSO System cuja a comercialização teve início em 2022, (68) e a sequenciação HiFi que surgiu em 2019, (69) sendo uma tecnologia de sequenciação *single-molecule, real-time sequencing technology* (SMRT), que promete fornecer uma elevada precisão na leitura de uma única molécula em leituras longas de dezenas de quilobases de comprimento ou até mais. (70)

Na sequenciação SBB, o processo inicia-se com a etapa da iniciação, durante a qual a polimerase incorpora um dNTP com um terminal reversivelmente bloqueado na extremidade 3' da cadeia de DNA, impedindo a incorporação de bases adicionais na cadeia molde. (71,72) Seguidamente, na fase da interrogação, as bases marcadas com fluorescência, desprovidas de bloqueador, preenchem a *flow cell*, o que permite a detecção da incorporação do nucleótido complementar. Quando a base complementar é incorporada na cadeia de DNA, é emitido um sinal fluorescente, que é medido pelo sistema ótico do equipamento Onso. (71,72) Neste processo, característico da sequenciação SBB, o dNTP marcado não é incorporado na cadeia de DNA, sendo apenas momentaneamente ligado e depois removido, permitindo a detecção da base com um sinal de fundo reduzido. Depois disso, na fase da ativação, a extremidade 3' do nucleótido é ativada através da remoção do bloqueador reversível. (71–73) Por fim, na etapa da incorporação, o nucleótido ativado é incorporado definitivamente na cadeia de DNA molde, começando o próximo ciclo com a incorporação do próximo dNTP com o bloqueador reversível. Assim, garante que a base complementar seja incorporada a partir de nucleotídeos bloqueados e não marcados que inundam a *flow cell*, bloqueando assim a incorporação adicional até ao momento mais apropriado no próximo ciclo. (71,72) A PacBio Onso possui a vantagem da precisão 90% Q40+, ou seja, possui uma taxa de erro de 1 em mais de 10000 pb, sendo uma elevada precisão comparativamente a outras plataformas *short-read*. (72) Esta melhoria de precisão, de cerca de 15x superior, traduz-se numa relação sinal-ruído de quase o dobro comparativamente a outras plataformas. Tal desempenho permite a detecção de variantes raras



com menos erros, uma maior sensibilidade com um menor número de leituras, e uma redução do limite de detecção, o que resulta num maior rendimento global com um menor custo por amostra. (71,74) Esta elevada sensibilidade auxilia na detecção de DNA tumoral circulante em biópsias líquidas, permitindo a detecção de variantes em DNA tumoral circulante com frequências muito baixas, e que facilmente são perdidas em outras plataformas *short-read*. (71) Apesar de ser uma plataforma recente, uma das limitações é semelhante a outras plataformas *short-read* como a dificuldade em gerar montagens longas de genomas complexos, principalmente quando contém regiões complexas como sequências repetitivas e variantes estruturais. (31,64)

Na sequenciação HiFi, o primeiro passo consiste na preparação da biblioteca, que evita a necessidade de amplificação clonal ao permitir a sequenciação direta de DNA, (12,33,48) através da utilização do formato de biblioteca *SMRTbell*, na qual os fragmentos de dsDNA são ligados em ambos os lados com adaptadores em formato *hairpin*, onde os primers de sequenciação ligam-se e ocorre a ligação da DNA *polymerase*. (75) Desta forma, cria-se um molde de DNA circular, que é sequenciado repetidamente. Posteriormente, vão sendo segmentadas e introduzidas adaptadores que originam subleituras, de modo a produzir-se as leituras HiFi, com uma precisão de 99,9%. (70) Podem ser criados para bibliotecas de diversos comprimentos de inserção, desde 250 bp até superiores a 25 mil bp. As amostras também podem ser codificadas com códigos de barras e multiplexadas para aumentar o rendimento. (75) Uma vez preparada a biblioteca, o centro da sequenciação ocorre dentro de milhões de pequenos poços no microchip *SMRT Cell*, na qual fragmentos únicos de DNA são imobilizadas nos poços e que à medida que a polimerase incorpora cada nucleótido, é emitida uma luz fluorescente. Este processo repete-se nos nucleótidos subsequentes, sendo a medição realizada em tempo real. As reações são registadas num formato que pode ser analisado usando ferramentas do equipamento, bem como no *software* adicional da PacBio. (12,70,75) O longo comprimento de leitura tenta ultrapassar as limitações do NGS, permitindo com uma elevada precisão a identificação de variantes genéticas em estudos de genoma humano, mesmo em regiões mais complexas como em áreas ricas em guanina-citocina (GC) ou repetidas, assim como em estudos de haplotipagem. (31,43,76) Para além de não envolver etapas de amplificação por PCR, evitando assim o viés da amplificação. (43) As principais desvantagens da sequenciação HiFi é principalmente o custo-benefício, e os custos iniciais do sistema ainda serem elevados. (12,21,76)

1.3.6. Oxford Nanopore Technologies – Nanopore

A história da sequenciação por nanoporos é relativamente antiga quando comparada com as outras metodologias, tendo o conceito sido introduzido pela primeira vez em 1980, fundamentado na



eletricidade física e na variação da corrente local quando a molécula de DNA atravessava o nanoporo para completar a determinação da sequência de bases. (44)

Antes da sequenciação, as bibliotecas de DNA são preparadas através da ligação dos adaptadores de sequenciação em ambas as extremidades dos fragmentos, utilizando métodos baseados por ligação ou química rápida. Na química baseada por ligação, o adaptador de sequenciação é ligado às extremidades de DNA durante a preparação da biblioteca, enquanto na química de base rápida, esse adaptador é incorporado através da ação de uma enzima que, simultaneamente, corta o DNA e insere os adaptadores, dispensando o uso de enzimas de ligação. Consoante o protocolo utilizado, a ligação dos adaptadores pode ser feita por PCR. Os adaptadores de sequenciação em ambas as extremidades possuem a ligação de uma proteína motora que se associa ao nanoporo na *flow cell*, com a função de regular a passagem da cadeia de DNA nos nanoporos. (77) Esta passagem pode ser configurada conforme desejado, de modo a aumentar ou diminuir a interação entre o DNA e o poro, de maneira a alterar a velocidade com que o DNA passa pela proteína motora. (48,77) A sequenciação de nanoporos depende de porinas, que são proteínas transmembranares que formam um canal poroso numa membrana. O sistema de sequenciação Nanopore consiste em nanoporos biológicos (α -hemolisina ou porina A de *Mycobacterium smegmatis*) sendo este o mais comum, ou nanoporos de estado sólido (nanoporos Si₃N₄ e SiO₂) que são inseridos numa membrana polimérica de elevada resistência elétrica, com canais de 1,5 nanómetros de diâmetro. (21,47,48,78) O dsDNA aproxima-se do nanoporo, e é puxado pela abertura da proteína motor, que prende a cadeia de DNA ao nanoporo, desenrolando a cadeia de DNA, de forma a regular a passagem do ssDNA pelo nanoporo para ser sequenciado. (21,77) Além da proteína motora, um segmento hidrofóbico da membrana é utilizado para ajudar a localizar o DNA molde na membrana, permitindo um contacto mais próximo com os nanoporos, melhorando a sensibilidade da metodologia. (77) Iões eletrolíticos atravessam os nanoporos através da membrana quando sujeitos a uma diferença de potencial, resultando num sinal sob a forma de corrente iónica. Quando um analito é translocado através do poro, o sinal da corrente iónica é interrompida, e essa interrupção é utilizada para identificar o dNTP específico. (15,21,31,37,48) O processamento de nucleótidos através do nanoporo provoca interrupções específicas no fluxo da corrente elétrica, de modo a gerar um sinal que é utilizado para determinar a sequência de bases. (21,37) A principal vantagem da sequenciação por nanoporos é o baixo custo do processo de preparação das amostras, aliado à eliminação da necessidade de nucleótidos modificados ou enzimas como ligases. (15,21,43) Para além disso, esta tecnologia destaca-se pela sua capacidade de realizar leituras longas, que permitem a sequenciação de fragmentos de DNA com centenas de pares de quilobases, sendo fundamental para a resolução de regiões genómicas complexas, tais como a



identificação de variantes, a análise de metilação e a haplotipagem, entre outras. No entanto, uma das principais limitações atuais da sequenciação por nanoporos é a elevada taxa de erro, que se mantém entre os 15 e os 40%. (12,37,44,48)

1.4. NGS na Oncologia Clínica

Sucintamente, o cancro é uma doença genética complexa, caracterizada pela acumulação de mutações em genes responsáveis pela regulação do crescimento, reparação e divisão celular. Estas alterações conduzem ao desenvolvimento de uma morfologia anaplásica, a um crescimento celular descontrolado, e à capacidade de invasão dos tecidos circulantes, bem como para outros órgãos (metastização). (79–81) Em 2022, o cancro causou cerca de 20 milhões de novos casos e 9,7 milhões de óbitos em todo o mundo. Atualmente, a utilização da metodologia do NGS em diversas áreas da investigação, como do cancro, tem permitido identificar os principais mecanismos biológicos das neoplasias e na descoberta de alvos terapêuticos, auxiliando a área da oncologia clínica. (31,79,82) A necessidade de estudos aprofundados sobre o cancro, levou à identificação de múltiplos genes associados à patologia, bem como ao recurso a metodologias de sequenciação, incluindo a sequenciação completa do genoma, sequenciação do transcriptoma, sequenciação do exoma completo (WES) e *targeted sequencing*. (26,31) Embora a sequenciação completa do genoma seja considerado o *gold standard* devido ao elevado grau de resolução para detetar alterações no genoma inteiro, contudo, a interpretação de variantes em determinadas regiões, muitas das quais apresentam significado clínico incerto, assim como os custos associados e os recursos analíticos necessários, continuam a dificultar a sua implementação para uso clínico de rotina. Assim, a utilização da sequenciação tem-se restringindo à análise de regiões genéticas específicas ou de genes conhecidos por contribuir para a progressão do cancro, bem como em WES, (7,13,31,50) utilizando as diversas plataformas de NGS descritas anteriormente (Figura 3).

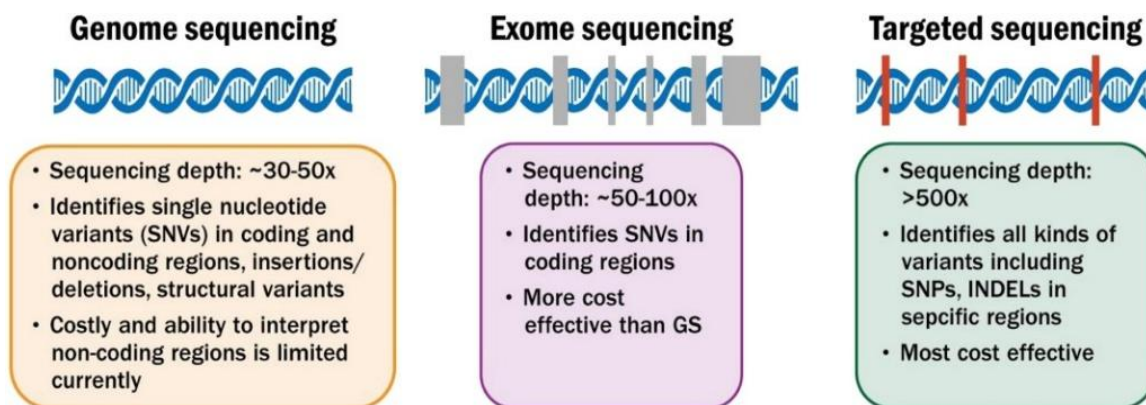


Figura 3: Comparações entre sequenciação de genoma, exoma e *targeted sequencing*. Legenda: GS – *Genome sequencing*, INDELs – Inserção e deleção, SNVs – *Single nucleotide variants*. (83)

1.4.1. Targeted Sequencing

A *targeted sequencing* é um método de sequenciação que, consoante o tipo de neoplasia, se foca na análise de genes ou regiões genéticas específicas. Esta abordagem é geralmente mais acessível e proporciona maior cobertura nas regiões de interesse. Diversos painéis permitem detetar múltiplos genes ou regiões críticas associadas a patologias específicas ou combinadas, sobretudo para fins de diagnóstico clínico de alterações somáticas, isto é, alterações que se acumulam apenas no genoma tumoral, não estando presentes de forma constitucional no indivíduo. (21,50,84) Por exemplo, painéis destinados à deteção de mutações *hotspot*, que são regiões do genoma particularmente suscetíveis a mutações, em neoplasias, têm como alvo identificar as mutações *hotspot* responsáveis por uma determinada neoplasia. (21,85) Para além destes painéis, existe também o *comprehensive genetic profile* que deteta as principais classes de alterações genómicas num conjunto amplo de genes relevantes para o cancro, incluindo biomarcadores complexos como a instabilidade de microssatélites e o *Tumor mutational burden* (TMB). Os microssatélites são sequências repetitivas e conservadas do DNA, distribuídas ao longo do genoma. Durante a replicação do DNA, estas regiões, que geralmente estão localizadas em regiões homopoliméricas, são suscetíveis à acumulação de mutações, designados como instabilidade de microssatélites. (18,86) O TMB indica a quantidade de mutações somáticas codificantes e não-sinónimas, que ocorrem numa região específica do genoma tumoral. A acumulação destas mutações pode provocar a formação de diversos neoantígenos imunogénicos, que têm a capacidade de desencadear uma resposta imunitária significativa contra o tumor. (18,87) Assim, a instabilidade de microssatélites e o TMB, juntamente com a expressão de PD-1/PD-L1, são preditores de resposta à imunoterapia, uma estratégia terapêutica que recorre ao sistema imunitário para combater o cancro. As proteínas PD-1/PD-L1 atuam como *checkpoints* imunológicos que regulam as respostas imunes no organismo. A interação entre o PD-1 expresso nas células T, e o PD-L1 nas células tumorais, inibe a



eliminação das células tumorais pelo sistema imunitário. Portanto, o TMB é considerado um biomarcador com potencial para prever a sensibilidade aos inibidores dos *checkpoints* imunológicos em diversos tipos de cancro. (87–89) Conforme revelado num estudo, a capacidade de resposta de pacientes com cancro do pulmão de não pequenas células em estadio avançado e com TMB elevado ao tratamento com Pembrolizumab, um fármaco que inibe a ação da PD-1 nas células T, permitindo a sua atuação na eliminação das células neoplásicas, resultou numa maior sobrevida na coorte de pacientes com mais de 200 mutações. Em contraste, os pacientes com baixo TMB, com menos de 200 mutações apresentaram menores taxas de sobrevida. (18,90,91)

1.4.2. Sequenciação de Exoma Completo (WES)

A WES é uma metodologia que envolve a sequenciação das regiões genéticas que codificam todas as proteínas no genoma humano, permitindo identificar a maioria das variantes associadas a patologias. Como os exões representam apenas 1% do genoma, a WES é mais acessível, e apresenta maior profundidade de cobertura do que a sequenciação de genoma completo. (37,50) Com uma diversidade de aplicações, como o estudo do cancro, possibilita a identificação de subtipos genómicos em diversas neoplasias como por exemplo da mama, pele, entre outros. Tem sido, por isso, frequentemente utilizada na identificação de alvos terapêuticos e no diagnóstico clínico, (21,50,79) nomeadamente em estudos de alterações germinativas que procuram detetar variantes em genes associados à predisposição para determinadas neoplasias, estando presentes em todas as células nucleadas do indivíduo, incluindo no genoma tumoral, podendo ser transmitidas à descendência. (84) Por exemplo, em um estudo integraram a WES com a finalidade de avaliarem o perfil genético do melanoma metastático num contexto semelhante à rotina clínica e, com a WES, conseguiram detetar mutações associadas à resistência primária a agentes de terapias dirigidas, contribuindo progressivamente para a integração desta abordagem na prática clínica. (92)



2. Objetivos

Pelo exposto na introdução, todas as plataformas de NGS apresentam particularidades que influenciam diretamente a sua aplicação na clínica na área da oncologia. Até ao momento, não foi descrito nenhum algoritmo que permita identificar as aplicações mais adequadas na oncologia clínica para cada plataforma de NGS, tanto em *targeted sequencing* como na WES.

Assim o principal objetivo do presente trabalho foi desenvolver um algoritmo que permita identificar as aplicações clínicas mais adequadas na área da oncologia para cada plataforma de NGS.

Para tal, foi efetuada uma pesquisa bibliográfica para identificar os parâmetros das principais plataformas de sequenciação utilizadas em *targeted sequencing* na WES e efetuar a sua caracterização para averiguar as plataformas mais adequadas para o estudo de mutações em genes específicos e em exomas.



3. Material e Métodos

3.1. Seleção dos parâmetros das plataformas de NGS

De modo a possibilitar uma possível comparação das diversas plataformas de NGS, foi essencial definir vários fatores, através da combinação de diretrizes (27,28,93–96) e dos dados obtidos nos artigos científicos analisados. Este processo minucioso possibilitou a construção de uma base robusta para uma análise comparativa, assegurando todos os critérios essenciais para este estudo. A seleção definitiva dos parâmetros abrangeu questões de desempenho como profundidade de cobertura média e mínima; tipo e entrada da amostra; comprimento de leitura; *Phred quality score* (Q score); limite de detecção; custo por amostra e tempo de resposta. Assim como, indicadores relativos à capacidade de sequenciar diversos tipos de variantes entre as quais: SNVs (variantes de nucleótido único); CNVs (variantes do número de cópias); indels (inserções-deleções); genes de fusão; e rearranjos estruturais. A combinação destas diretrizes e dos artigos obtidos proporcionou uma perspetiva abrangente sobre as capacidades e as limitações das diversas plataformas, possibilitando uma comparação detalhada e fundamentada.

De modo a elucidar alguns parâmetros, começando pelos critérios de desempenho, um dos mais relevantes é a profundidade de cobertura. Neste contexto, é importante distinguir dois conceitos fundamentais. A cobertura representa a proporção da região-alvo que foi sequenciada com qualidade, ou seja, “95% de cobertura” indica que 95% da região-alvo foi sequenciada pelo menos uma vez. A cobertura está diretamente relacionada à profundidade, que corresponde ao número de vezes que um nucleótido é lido durante a sequenciação. Quanto maior a profundidade de sequenciação, maior a confiança na *variant calling* numa determinada posição. Por exemplo, se um nucleótido particular for sequenciado 30 vezes, a profundidade de sequenciação nessa base é de 30x. (97,98) Em síntese, aumentar a profundidade tende a aumentar a cobertura, pois mais leituras aumentam a probabilidade de sequenciar todas as regiões alvo. No entanto, esta abordagem exige também mais recursos, nomeadamente custo, tempo e capacidade computacional para gerir o volume elevado de dados gerados. Para detecção de SNVs e indels é crucial uma elevada profundidade, para que a detecção de variantes não ocorra devido a erros de sequenciação, que teriam um elevado impacto clínico, principalmente na oncologia clínica. (97,99,100) No entanto, nas diversas diretrizes e publicações científicas que fundamentam o presente estudo, utilizam usualmente os conceitos de profundidade de cobertura média e mínima, sendo geralmente ambas expressas em número de vezes (X). A precisão de uma plataforma de NGS, é avaliada através da precisão da *calling* de base, através do Q score sendo definido como uma propriedade logarítmica ($Q = 10 \log_{10} P$), na qual P é a probabilidade da base estar



errada durante o *variant calling*. Para aumentar a precisão é recomendável remover as bases com Q scores baixos, ou seja, com uma elevada probabilidade de estarem incorretas. Valores acima de 30 (1 em 1000; precisão = 99,9%) são geralmente considerados aceitáveis, e um Q score <20 (1 em 100) é geralmente considerada de baixa qualidade, ou seja, com elevadas probabilidades de imprecisão. (13,101) Neste estudo, pretende-se analisar a percentagem total de bases Q score entre diferentes plataformas de NGS. Outro conceito a reter é o limite de deteção, definido como a menor fração alélica que em 95% das amostras é detetada de forma confiável. (93) Embora seja importante, principalmente na deteção de alterações somáticas com frequências alélicas baixas em amostras de tecido, é um aspeto que não é verificado com frequência em cada laboratório. Todavia é essencial determinar um limite de deteção mínimo para eliminar resultados falsos-positivos, sendo estimado com base no desempenho e nas limitações da metodologia utilizada. (102) Por último, entre as questões relacionadas ao desempenho, temos o tempo de resposta, que embora possa ter definições ligeiramente distintas dependendo do tipo de análise e da instituição é comumente descrito como o período de tempo entre a solicitação da análise até que o resultado seja relatado, sendo este um elemento fundamental para evidenciar a qualidade do laboratório, e as plataformas de NGS podem contribuir na redução do tempo de resposta. (103) De um modo geral, consoante os objetivos do estudo, as plataformas de NGS também apresentam capacidades distintas para sequenciar diversos tipos de variantes, como os SNVs, que são variantes que envolvem a substituição de nucleótidos únicos em regiões codificantes como não codificantes. (78,104) Além dos SNVs, os indels envolvem o ganho ou perda de nucleótidos de uma sequência, na qual se for múltiplo de três, denomina-se *in-frame*, e embora não cause mudanças na grelha de leitura, pode influenciar a proteína obtida. Entretanto, se o ganho ou perda de nucleótidos não for em múltiplos de três, ocorre uma *frameshift* que provoca alterações na grelha de leitura, resultando numa tradução diferente da sequência original. (78,104) As CNVs correspondem à variação de segmentos específicos de DNA entre genomas, podendo resultar de duplicações, deleções ou outras alterações, e abranger desde regiões curtas até fragmentos longos que podem envolver um ou mais genes. Entretanto, os grandes rearranjos são duplicações ou deleções de um ou mais exões de um gene que pode abranger até milhares de pares de nucleótidos, e a presença destes rearranjos pode potencialmente levar ao desenvolvimento de neoplasias por meio da inativação dos genes supressores tumorais. (105) Embora não exista uma definição precisa do número de pares de nucleótidos que distingue um indel de uma variante estrutural, como os CNVs, considera-se geralmente uma variante estrutural qualquer ganho ou perda de DNA que envolva mais de 1000 pb. (78,106) Para concluir o esclarecimento de conceitos das variáveis analisadas, os genes de fusão resultam da união de segmentos de genes distintos, resultantes de translocações

cromossômicas, podendo as proteínas de fusão contribuir para o desenvolvimento de neoplasias, como a fusão BCR::ABL1, associada a alguns tipos de leucemias. (107)

3.2. Delineamento do Estudo

O presente estudo exploratório utilizou três bases de dados científicos, nomeadamente a PubMed, a Web of Science e a Scopus, com o intuito de extrair dados pertinentes de artigos científicos originais sobre as diversas plataformas de NGS envolvidas em estudos *targeted sequencing* e WES, publicados no período de 2019 a 2025. A pesquisa combinou descritores das principais plataformas de NGS (Ion Torrent, Illumina, Nanopore, AVITI, MGI e PacBio) com termos relativos ao tipo de metodologia (*panel*, *exome*) ou ao contexto clínico (*cancer*, *Tumor Mutational Burden*, TMB), utilizando os operadores booleanos *AND* e *OR*. O operador *OR* foi usado apenas para combinar variações terminológicas da mesma plataforma, como "Ion Torrent"; "Ion Torrent Sequencing"; "Sequencing, Ion Torrent", e de forma equivalente para a Illumina® e Nanopore, enquanto *AND* combinou diferentes conceitos. Para *panel* ou *exome*, a plataforma, o tipo de estudo e o contexto clínico foram combinados, enquanto para TMB os termos da plataforma foram combinados apenas com o conceito clínico correspondente. Apenas na PubMed, e especificamente para a Illumina®, foi aplicado o filtro [Title/Abstract] para aumentar a relevância dos resultados. Esta pesquisa resultou num grande número de artigos (1815) (Figura 4).

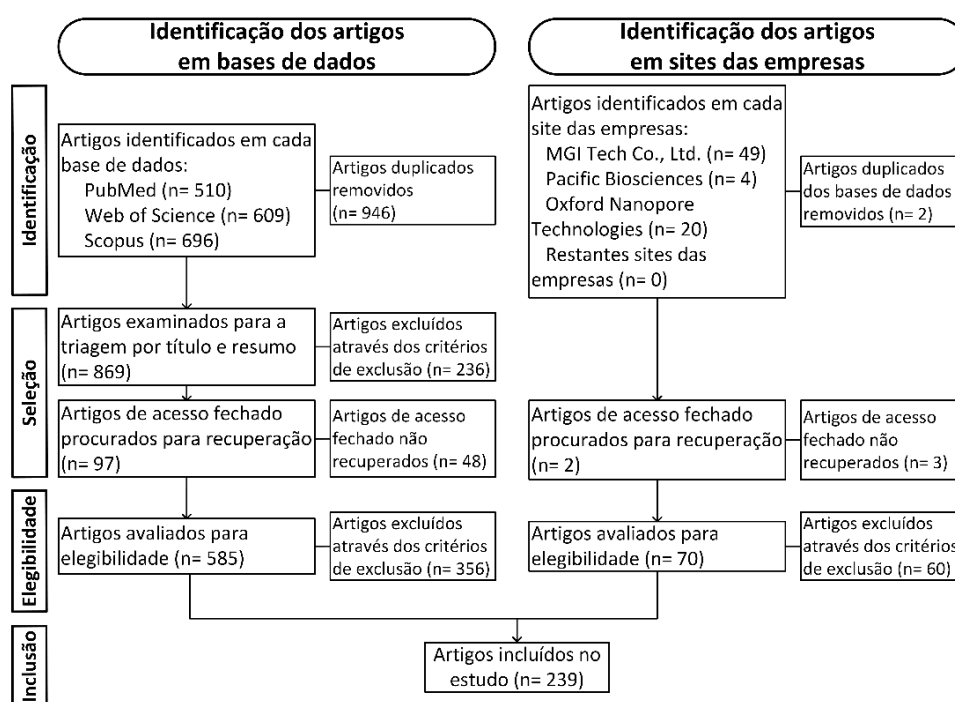


Figura 4: Delineamento do estudo de artigos científicos em bases de dados e em sites das empresas.



Após exclusão dos artigos em duplicado, aplicaram-se os seguintes critérios de exclusão com base nos títulos e resumos: i) não específicos para o tema; ii) sem amostras biológicas; iii) sem foco em neoplasias humanas; iv) não redigidos em inglês e v) não fossem publicações originais (como revisões narrativas, revisões sistemáticas, meta-análise, entre outros). O *impact factor* das revistas científicas não foi considerado como critério de inclusão e exclusão. Além, do uso dos motores de busca assinalados, foram extraídos artigos originais que se encontravam no endereço eletrónico de cada uma das empresas responsáveis pelas respetivas plataformas de NGS. Após a aplicação dos critérios de exclusão, os artigos restantes foram avaliados pela sua elegibilidade no estudo, tendo sido selecionados 239 artigos.

3.3. Seleção e Análise da informação das plataformas de NGS

Após a seleção final dos artigos relevantes, a presente etapa metodológica focou-se na identificação e seleção de informação sobre os parâmetros/características das diferentes plataformas de NGS, para posterior tratamento e análise dessa informação, com a finalidade de desenvolver um algoritmo que permita identificar as aplicações clínicas mais adequadas na área da oncologia para cada plataforma de NGS. De cada artigo selecionado, foram retirados manualmente, informações/dados quantitativos e qualitativos pertinentes referentes a cada parâmetro de interesse, nomeadamente: plataforma de NGS; metodologia de sequenciação (*targeted sequencing* e WES); profundidade de cobertura média e mínima; tipo e entrada da amostra; comprimento de leitura; Q score; limite de deteção; custo por amostra; o tempo de resposta; e o registo de diferentes tipos de variantes, como SNVs; CNVs; indels; genes de fusão; e rearranjos estruturais. Os dados foram registados e organizados num documento Excel (Microsoft 365), tendo sido categorizados por plataforma de NGS (Illumina®, Ion Torrent; MGI; Nanopore; PacBio *long-read*) e por metodologia de sequenciação (*targeted sequencing* e WES), de forma a ser possível efetuar uma análise comparativa por subgrupo. O tipo de análise estatística efetuada com os dados obtidos foi a descritiva, nomeadamente a mediana, intervalo interquartil (IQR), correspondente aos 25.º e 75.º percentis, e o intervalo (valores mínimo e máximo), para alguns dos parâmetros que estão descritos em todas as plataformas, tais como, profundidade de cobertura média, entrada de amostra e o comprimento de leitura. Os dados foram representados graficamente, tendo sido usado o tipo de gráfico Box Plot (*Min to Max. Show all points*), que ilustra a distribuição das categorias profundidade de cobertura média, entrada de amostra e comprimento de leitura por plataforma, com o propósito de resumir de forma concisa a mediana, o IQR e o intervalo de cada distribuição, permitindo efetuar comparações visuais entre as diferentes plataformas. Os gráficos de barras foram utilizados para representar as percentagens de deteção dos diversos tipos de variantes e de amostras, sendo estas calculadas pela divisão do número



de estudos que reportaram cada indicador pelo total da respetiva metodologia (*targeted sequencing* ou WES), multiplicada por 100. A utilização das diferentes plataformas de NGS nos estudos foram representadas através de gráficos circulares. A análise estatística e a representação gráfica foram efetuadas utilizando o *software* GraphPad 10.5.0.

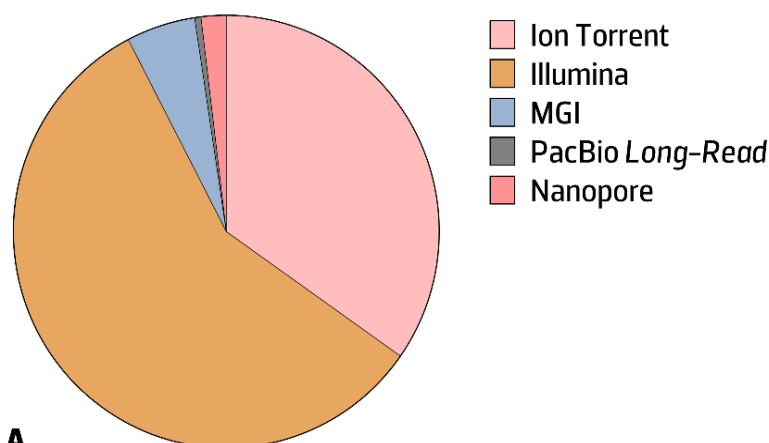
4. Resultados

4.1. Targeted Sequencing

4.1.1. Desempenho das plataformas NGS

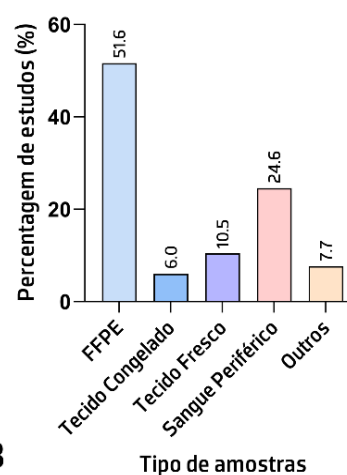
A maioria dos estudos selecionados empregaram as plataformas exclusivamente *short-read* para realizarem *targeted sequencing*, sendo maioritariamente da plataforma Illumina® (57,6%), (Figura 5.A). Os principais tipos de amostras utilizadas nestes estudos foram amostras de *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE) e de sangue periférico (Figura 5.B).

Plataformas de NGS em estudos Targeted Sequencing



A

Tipo de amostra em estudos Targeted Sequencing



B

Figura 5: Frequência das plataformas de NGS usadas nos estudos envolvendo *targeted sequencing*: Ion Torrent (34.76%); Illumina (57.62%); MGI (5.24%); PacBio Long-read (0.48%) e Nanopore (1.90%) (A); Frequência dos tipos de amostra utilizadas em estudos envolvendo *targeted sequencing* (B). Legenda: NGS- Sequenciação de nova geração; FFPE – *formalin-fixed paraffin-embedded*.

Na maioria destes estudos, utilizaram amostras de tecido, predominantemente amostras de FFPE (51,6%), apesar de terem sido utilizadas amostras de sangue periférico (24,6%), e outros tipos de amostras (7,7%).

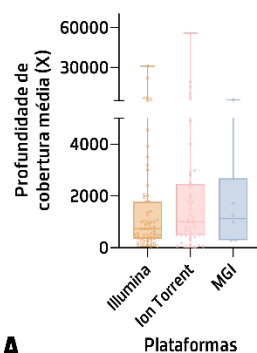
As estatísticas descritivas dos parâmetros de desempenho comuns a todas as plataformas de NGS estão registadas na Tabela 2, enquanto as distribuições dos dados estão representadas graficamente na Figura 6.

Tabela 2: Estatística descritivas relativas aos parâmetros de desempenho de cada plataformas de NGS usada em estudos de *targeted sequencing*.

Parâmetros de Desempenho													
Plataforma de NGS	Profundidade de cobertura média (X)				Entrada de amostra (ng)				Comprimento de leitura (pb)				Ref. ³
	Nº de Artigos	Mediana	IQR	Intervalo	Nº de Artigos	Mediana	IQR	Intervalo	Nº de Artigos	Mediana	IQR	Intervalo	
Illumina®	64	728.5	354.8-1767.0	50.0-31000.0	64	50.0	40.0-119.4	8.0-3394.0	49	150	101.0-150.0	75-301	(108-200)
Ion Torrent	45	1000.0	500.0-2451.0	15.3-55612.0	54	10.6	10.0-20.0	0.1-500.0	20	137	113.0-173.8	80-227	(108-118,200-244)
MGI	6	1125.0	300.0-2675.0	300.0-5600.0	11	250.0	200.0-500.0	50.0-800.0	7	100	75.0-150.0	50-150	(119,245-252)

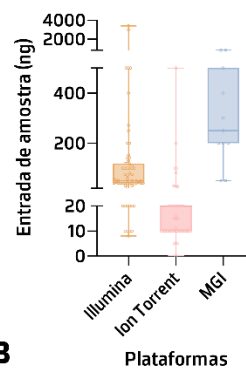
IQR: Intervalo Interquartil; NGS: Sequenciação de nova geração; Nº: Número; Ref.^a: Referência.

Distribuição da profundidade de cobertura média por plataforma de NGS



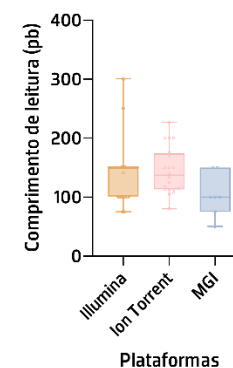
A

Distribuição da entrada de amostra por plataforma de NGS



B

Distribuição do comprimento de leitura por plataforma de NGS



C

Figura 6: Distribuição de parâmetros como profundidade de cobertura média (A), entrada de amostra (B) e comprimento de leitura (C) de sequenciação por plataforma de NGS. Legenda: NGS- Sequenciação de nova geração



A profundidade de cobertura média das plataformas em estudos envolvendo *targeted sequencing* está sumarizada na Tabela 2 e ilustrada na Figura 6.A. A plataforma Illumina®, predominante na maioria dos estudos, apresentou uma mediana de 728.5 X (IQR de 354.8 X–1767.0 X), enquanto a plataforma Ion Torrent registou uma mediana de 1000.0 X (IQR: 500.0–2451.0 X). Apesar do número limitado de estudos, a plataforma MGI registou uma mediana de 1125.0X (IQR: 300.0–2675.0 X). Em todas as plataformas, os IQRs amplos revelam uma variabilidade considerável nos valores de cobertura reportados, indicando uma heterogeneidade entre os estudos. Nas plataformas *long-read*, Nanopore e PacBio *long-read*, o número de artigos que reportaram a profundidade de cobertura média em *targeted sequencing* foi muito limitado (Nanopore: N=4; PacBio *long-read*: N=1). Devido à escassez de dados, não foi possível realizar uma análise estatística robusta (mediana e IQR), e nem as incluir nos Box Plot. Na plataforma Nanopore, a profundidade de cobertura média foi de 14.9X, (253) correspondendo à mais baixa registada entre todas as plataformas. Na plataforma PacBio *long-read* variou entre 15.9X–70.7 X. (254) O intervalo de entrada de amostra é apresentado na Figura 6.B para as plataformas Illumina®, Ion Torrent e MGI. A plataforma Illumina® revelou um intervalo alargado de 8.0 ng a 3394.0 ng, com uma mediana de 50.0 ng (IQR: 40.0–119.4 ng), evidenciando uma acentuada adaptabilidade a diferentes quantidades de entrada de amostra. Na plataforma Ion Torrent, a mediana foi de 10.6 ng, com um IQR estreito (10.0–20.0 ng), sugerindo que a maioria dos estudos utilizou quantidades relativamente baixas. Ainda assim, o intervalo observado (0,1–500.0 ng) indica uma capacidade de processar diferentes quantidades de amostra. A plataforma MGI, variou de 50.0 ng a 800.0 ng (mediana: 250.0 ng; IQR: 200.0–500.0 ng), revelando uma variabilidade considerável nas quantidades de amostra reportadas, com tendência para valores superiores em comparação com as plataformas Illumina® e Ion Torrent. No caso das plataformas *long-read*, os dados sobre a quantidade de entrada de amostra são escassos. Para a plataforma Nanopore, os valores reportados variam consoante o protocolo, situando-se entre 50–200 ng, (120) 600–700 ng (255) e 1200 ng, (253) sendo, em geral, inferiores aos reportados para a plataforma PacBio *long-read* (3000 ng). (254) Os comprimentos de leitura das plataformas Illumina®, Ion Torrent e MGI estão ilustrados na Figura 6.C. A plataforma Illumina® apresentou uma mediana de 150 pb (IQR: 101.0–150.0 pb), com um intervalo entre 75–301 pb, caracterizando a plataforma como *short-read* e adequada para a deteção de SNVs e indels. A plataforma Ion Torrent registou uma mediana de 137 pb (IQR: 113.0–173.8 pb) e, apesar do número de estudos incluídos ser inferior (N=20), os dados indicam também uma caracterização como plataforma *short-read*. A plataforma MGI apresentou uma mediana de 100 pb (IQR: 75.0–150.0 pb), reforçando a sua classificação como plataforma *short-read*, embora com tendência para comprimentos ligeiramente inferiores comparativamente às outras plataformas, mas



ainda dentro dos limites esperados para este parâmetro. Por outro lado, as plataformas Nanopore e a PacBio *long-read* caracterizam-se por comprimentos de leitura longos, sendo que a plataforma Nanopore atingiu, nos estudos recolhidos, leituras de até 10000 pb, (255,256) enquanto a plataforma PacBio *long-read* alcançou comprimentos de até 6000 pb. (254) A escassez de dados relativos a estas plataformas reflexe o foco dos estudos incluídos e não uma limitação intrínseca destas plataformas, o que limita comparações quantitativas robustas.

Constatou-se que a falta de registo consistente de variáveis, como profundidade de cobertura mínima, Q score, limite de deteção, custo por amostra e tempo de resposta, em todos os artigos analisados, impede uma comparação quantitativa precisa. Esta limitação evidencia a dificuldade de inferir conclusões comparativas definitivas entre plataformas. Na profundidade de cobertura mínima, entre as plataformas Ion Torrent, Illumina® e Nanopore, a plataforma Nanopore apresentou o menor intervalo de profundidade de cobertura mínima (10–20 X) (253,255,256) comparativamente às restantes plataformas Illumina® (10–3720 X) (112,115,122,123,128–132,138–140,142,143,153,154,156,185,190,191,193–195,257–260) e Ion Torrent (5–600 X). (109,114,202,203,206,207,215,216,222,224,225,236–238,240–243,261–263). Estes dados sugerem que a Nanopore pode atingir uma leitura mais uniforme, embora a quantidade limitada de estudos disponíveis impeça generalizações sólidas. Quanto ao custo de sequenciação por amostra, a plataforma Nanopore apresentou o menor valor (6,8 € por amostra), (120) enquanto as plataformas *short-read* apresentaram custos por amostra superiores, sendo a plataforma Illumina® a mais elevada (78,4–626,3 €), (114,120,140,264) e o Ion Torrent apresentando um custo de 321,7 € por amostra, (264) embora os valores dependam da preparação da biblioteca. Os valores apresentados encontram-se em euros (€), convertidos à taxa de câmbio de 14 de março de 2025, a partir das moedas originais dos estudos analisados. A percentagem total de bases com determinado Q score não é reportado na maioria dos artigos, no entanto, alguns estudos indicaram que a Illumina® pode atingir cerca de 94% das bases a Q30 (93,76%–R1/93,08%–R2). (153) Lang *et al.* compararam a taxa de Q20 entre as plataformas Illumina® e MGI, demonstrando que, embora a Illumina® apresente uma taxa de Q20 mais elevado (98,54% vs 97,61%), a MGI revelou maior consistência (92,12–97,61%) do que a Illumina® (86,34–98,54%), e valores mínimos superiores (92,12% vs 86,34%), sugerindo uma maior robustez da MGI. Esta variabilidade provavelmente reflete diferenças em metodologias da sequenciação, *software* de bioinformática ou características das plataformas. (119) Quanto ao limite de deteção, entre os estudos elegíveis que reportaram essa métrica, a plataforma Nanopore apresentou o menor intervalo (0,05–1%). (120) Entre as plataformas *short-read*, a Illumina® teve o menor intervalo de limite de deteção (3–15%), (130,131,152)

enquanto a plataforma Ion Torrent apresentou 0,50–20%. (112,201,203,206,227,239,240,265) Estes valores indicam que a Nanopore possui sensibilidade adequada para detetar variantes de baixa frequência alélica, correspondentes ao limite de deteção, embora a heterogeneidade dos estudos impeça comparações quantitativas precisas. Relativamente ao tempo de resposta, Thirunavukarasu *et al.* demonstraram que a plataforma Nanopore, com o método de sequenciação, o Oncogene Concatenated Enriched Amplicon Nanopore Sequencing (OCEANS) consegue sequenciar *amplicons* curtos utilizando leituras longas, obtendo um tempo de resposta de apenas 10 horas, comparativamente à plataforma Illumina®, cujo o tempo de resposta varia entre 24 horas e 72 horas. (120) No estudo Tomczak *et al.*, os resultados da sequenciação da plataforma Illumina® estiveram apenas disponíveis entre 3 e 31 dias úteis (máximo de 744 horas), com uma mediana de 9 dias úteis, (108) enquanto a plataforma Ion Torrent variou entre 168 até 336 horas. (108,206,266) Estes dados indicam a vantagem potencial das plataformas *long-read* em rapidez de análise, embora a quantidade limitada de estudos impeça generalizações.



4.1.2. Detecção de Variantes

Para além do desempenho, é essencial que as plataformas de NGS apresentem uma capacidade robusta para detetar diversas variantes presentes nas amostras, sobretudo aquelas que possam impactar a área da oncologia clínica. Este aspeto é ilustrado na percentagem de estudos que relataram a deteção de diferentes tipos de variantes nas plataformas mais representadas em estudos envolvendo *targeted sequencing* (Figura 7).

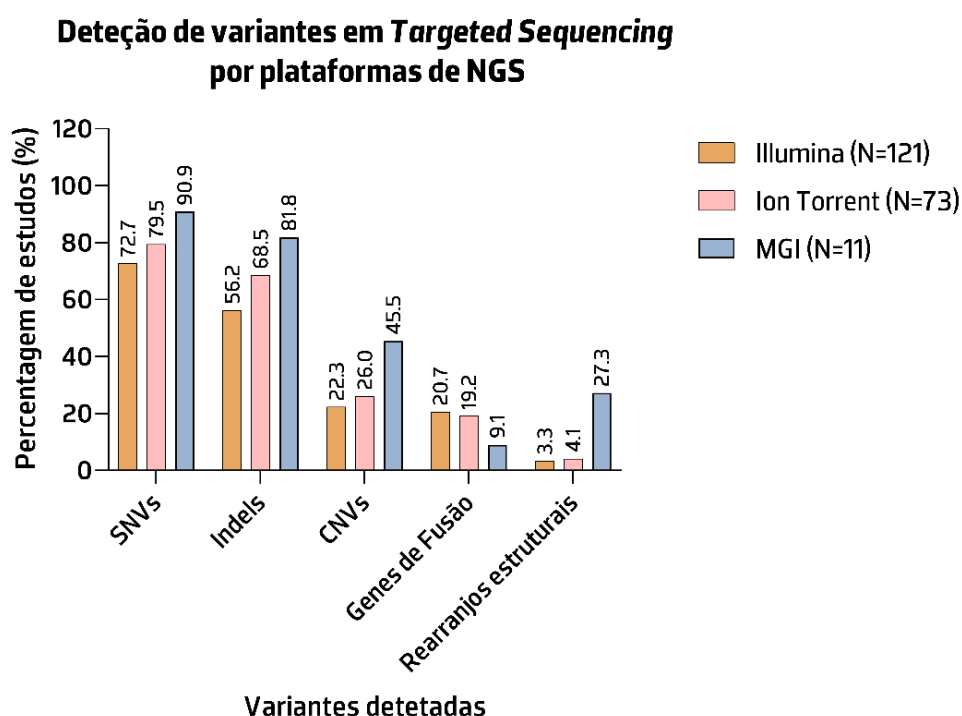


Figura 7: Frequência relativa de estudos para a deteção das variantes em *targeted sequencing* por plataforma de NGS (Illumina, Ion Torrent e MGI). Legenda: CNVs – variação do número de cópias, Indels – Inserção e deleção, SNVs – *Single nucleotide variants*.

A prevalência de diferentes tipos de variantes apresentados em estudos de *targeted sequencing* está apresentada na Figura 7. A MGI (N=11), revelou a deteção de SNVs em 90.9% dos estudos, indels em 81.8%, CNVs em 45.5%, rearranjos estruturais em 27.3% e genes de fusão em 9.1%. A Illumina® (N=121) reportou SNVs em 72.7% dos estudos, indels em 56.2%, CNVs em 22.3%, rearranjos estruturais em 3.3% e genes de fusão em 20.7%. Por sua vez, o Ion Torrent (N=73) apresentou 79.5% para SNVs, 68.5% para indels, 26.0% para CNVs, 4.1% para rearranjos estruturais e 19.2% para genes de fusão. Os dados indicam que, mesmo com o número limitado de estudos envolvendo a MGI, esta plataforma apresenta uma elevada proporção de estudos que reportam múltiplos tipos de variantes. As plataformas Illumina® e Ion Torrent, com maior número de artigos incluídos, reportaram de forma consistente SNVs e indels como os tipos de variantes mais frequentes. As plataformas *long-read*, como Nanopore (N=3) e PacBio *long-read*

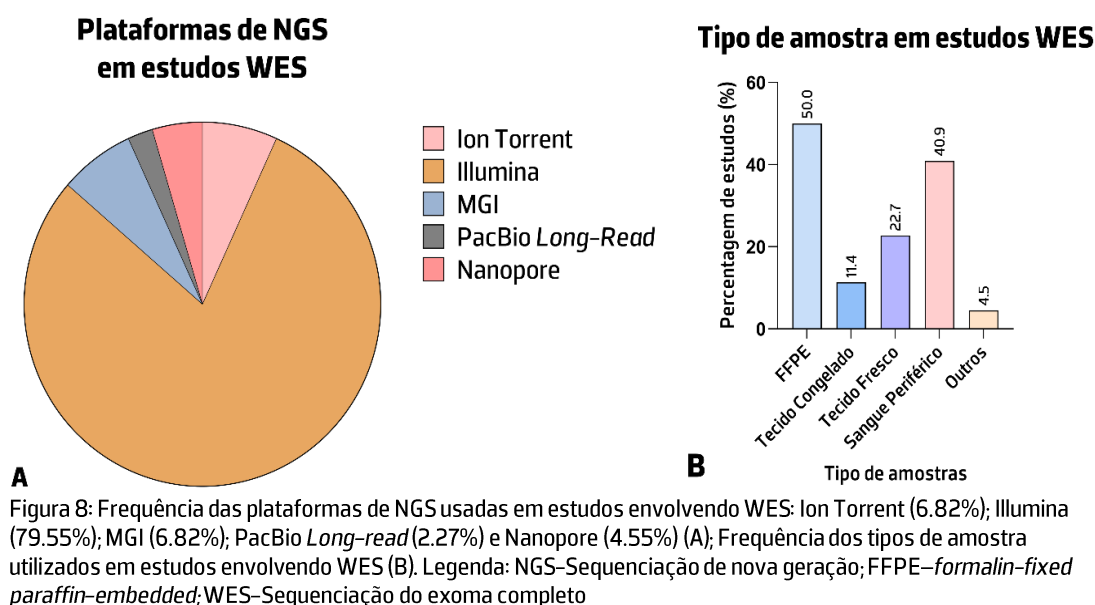


(N=1), não foram incluídas nesta representação gráfica devido ao número limitado de artigos que utilizaram *targeted sequencing* e reportaram a deteção de variantes específicas. Este reduzido número de dados seria estatisticamente não representativo e visualmente pouco fidedigno, podendo induzir uma falsa impressão de prevalência ou de capacidade comparável às plataformas com maior número de estudos. Assim, a análise destas plataformas ficou limitada a uma descrição qualitativa das observações mais relevantes identificadas nos estudos analisados. Entre os estudos analisados, apenas os estudos que utilizaram as plataformas MGI, (267) Nanopore, (253,255) e PacBio *long-read*, (254) descreveram a deteção de grandes rearranjos, considerados das alterações genómicas mais complexas de identificar por sequenciação. A eficácia da plataforma MGI na deteção de CNVs germinativos relacionados a diversos tipos de cancros em 2163 pacientes, recorrendo a um painel de 52 genes, foi avaliada por Koumarianou *et al*, tendo sido identificados grandes rearranjos, incluindo a deleção do exão 19 no gene *BRCA1*, a CNV mais frequente no estudo, bem como a deleção dos exões 9-10 no gene *CHEK2*, associada à ausência ou disfunção da proteína devido à exclusão destes exões. (267) A técnica de sequenciação de amostragem adaptativa foi aplicada na plataforma Nanopore em estudos conduzidos por Chevrier *et al*. e Patel *et al*. Esta abordagem permite a sequenciação em tempo real, possibilitando a seleção e o enriquecimento de regiões específicas de DNA durante a fase de sequenciação. O princípio baseia-se na reversão controlada da voltagem aplicada aos nanopores, o que possibilita a rejeição de cadeias de DNA não correspondentes antes da sua sequenciação completa, e elimina a necessidade de uma etapa prévia de seleção na preparação da biblioteca. (253,255) No estudo de Chevrier *et al*, foram enriquecidos 152 genes de predisposição ao cancro para avaliação da capacidade de deteção de SNVs e de rearranjos de larga escala em 30 amostras clínicas. Foi reportado que todos os rearranjos previamente identificados pelo Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), que é considerada a metodologia de referência, foram igualmente detetados pela plataforma Nanopore, tendo ainda sido possível identificar as coordenadas exatas das extremidades de cada rearranjo, o tamanho exato da deleção ou amplificação, e foi realizada uma caracterização mais robusta dos casos complexos. Um exemplo foi a identificação de uma grande deleção de 4967 pb, abrangendo os exões 1 e 2 do *BRCA1* e o exão 1 do gene não codificante *NBR2*, que anteriormente tinha sido descrita apenas como uma deleção parcial do promotor e com uma deleção complexa do exão 1a e do exão 2 do *BRCA1*. (253) No trabalho de Patel *et al*. foi utilizado o Rapid-CNS², baseado na sequenciação de amostragem adaptativa, que permite a classificação simultânea de metilação em tempo real e de CNVs, e de seguida possibilita um *comprehensive genetic profile* em menos de 24 horas cobrindo todas as informações diagnósticas e terapêuticas relevantes para o diagnóstico de neoplasias do sistema nervoso central. Foi relatado que,

numa amostra de glioblastoma, foi identificada uma deleção subclonal de 1,3 Mb no *EGFR*, abrangendo os exões 2 a 7 (*EGFR* VIII), tendo sido detetada com confiança, com um mapeamento consistente do ponto de rutura, não tendo sido previamente identificada nos dados de NGS. (255) Adicionalmente, Hu *et al.* demonstraram que a plataforma PacBio *long-read*, permite identificar rearranjos estruturais em genes associados ao cancro da mama, incluindo uma inserção de cerca de 250 pb no 3'UTR do *EGFR*, localizada numa região próxima do centrómero do cromossoma 7 e caracterizada pela presença de numerosas repetições em 19 pacientes, utilizando um painel de 28 genes. (254)

4.2. Sequenciação do Exoma Completo (WES)

De acordo com o que foi referido anteriormente, cerca de 93,2% dos estudos utilizaram plataformas *short-read*, em comparação às plataformas *long-read* (6,8%) para WES, sendo a maioria da plataforma Illumina® (79,6%), (Figura 8.A). Os principais tipos de amostras utilizados foram novamente FFPE e sangue periférico (Figura 8.B).



Na maioria destes estudos, utilizaram-se amostras de tecido (84,1%), sobretudo amostras de FFPE (50,0%), embora no WES usaram mais amostras de sangue periférico (40,9%), e houve uma menor diversidade de outros tipos de amostras (4,5%) do que no *targeted sequencing*. Para a plataforma Illumina®, a mediana da profundidade de cobertura média foi de 128.0 X (IQR: 100.0–258.0 X), inferior aos 728.5X observados em *targeted sequencing*, o que reflete a abrangência do WES, que ao cobrir regiões mais extensas do exoma tende a apresentar uma profundidade de cobertura média inferior. A

entrada de amostra, o intervalo variou entre 37.5 ng a 1100 ng, com uma mediana de 100.0 ng (IQR: 50.0–150.0 ng), evidenciando a flexibilidade da plataforma em processar quantidades distintas de DNA, enquanto o comprimento de leitura apresentou uma mediana de 150 pb (IQR: 82.0–150.0 ng), em linha com a natureza *short-read*. (163,199,268,269,269–271,271–299) Devido à escassez de dados, não foi possível realizar uma análise estatística robusta para as restantes plataformas nem generalizar o desempenho típico em WES. No entanto, os valores reportados indicam que as plataformas *short-read* como o Ion Torrent (121.7X–122.1X) (162,300,301) e a MGI (100X–200X) (302–304) apresentam profundidades de cobertura média superiores às plataformas *long-read* como o PacBio *long-read* (7X–19X) (305) e Nanopore (15X–30X). (305,306) Estes dados sugerem que as plataformas *short-read* mantêm uma profundidade de cobertura mais elevada em WES, embora a limitação de estudos impeça conclusões definitivas. Na profundidade de cobertura mínima, os valores só foram reportados nas plataformas Ion Torrent (100X) (301) e Illumina® (1–50X), (268,274,279,284–286,288,290,292), refletindo a ausência de valores correspondentes para as demais plataformas. As entradas de amostra das plataformas Ion Torrent (50–100 ng) (162,300,301), MGI (100–1000 ng) (302–304) e Nanopore (500 ng) (306) foram semelhantes às observadas para a Illumina®, sugerindo compatibilidade quanto à quantidade de DNA necessária para a WES. Somente Iqbal *et al.* e Kim *et al.* reportaram o Q score, no WES, demonstrando que, utilizando a plataforma Illumina®, as percentagens de bases a Q30 variou entre 91,5% e 97,1%, (282,283) evidenciando boa qualidade de leitura. De forma geral, os comprimentos de leitura do Illumina® (75–151 pb) (268,270,273,276,279,283,284,286,289–299) e do MGI (100–150 pb) (302,304) foram consistentes entre os estudos, refletindo as características *short-read* destas plataformas. Devido à escassez de dados não foi possível obter informações confiáveis relativamente a outras métricas de desempenho, como o limite de deteção, tempo de resposta, e custo por amostra, sublinhando a importância de estudos futuros que incluam estas métricas. Esta limitação também impediu uma análise estatística robusta, bem como a generalização sobre o desempenho típico da maioria das plataformas em estudos de WES, ou uma análise comparativa abrangente da deteção de variantes entre plataformas. A exceção foi a plataforma Illumina®, que apresentou o maior número de estudos em WES (N=35). A análise das percentagens registadas de variantes revelou que 91,43% dos estudos mencionaram SNVs, 68,57% indicaram indels, 31,43% identificaram CNVs e 8,57% reportaram genes de fusão, não tendo sido identificado qualquer estudo que documentasse rearranjos estruturais.



4.3. Proposta de Algoritmo para a utilização das plataformas de NGS

Através da seleção e da análise dos parâmetros definidos das diversas plataformas de sequenciação em *targeted sequencing* e WES, foi criado um algoritmo que propõe a utilização diferenciada das plataformas de NGS de acordo com a aplicação clínica em oncologia (Figura 9).

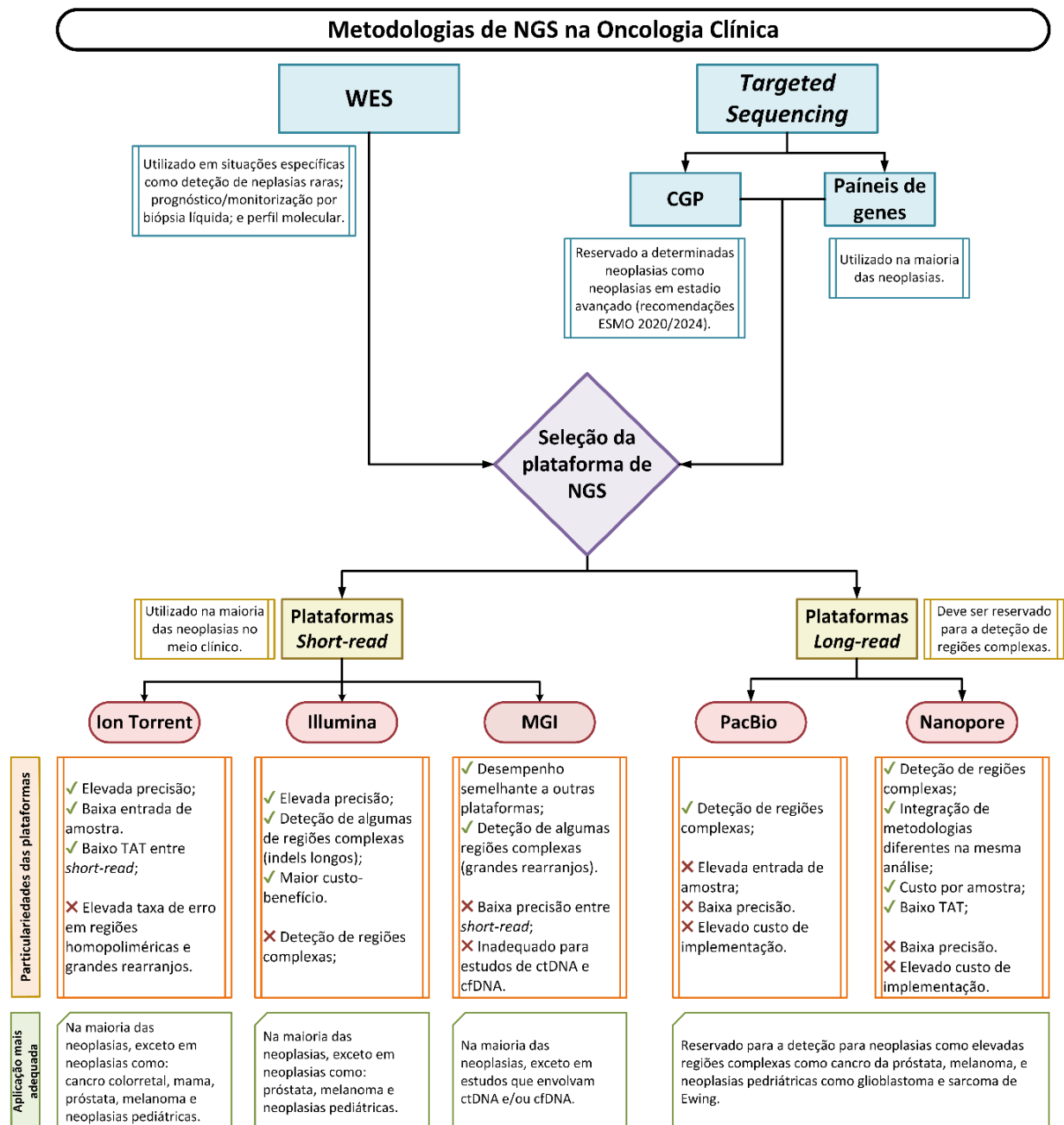


Figura 9: Proposta de um algoritmo para a seleção da plataforma de NGS mais adequada para um dado caso de oncologia clínica. Legenda: cfDNA- *Cell-free* DNA, ctDNA- DNA tumoral circulante, ESMO- European Society for Medical Oncology, NGS- Sequenciação da nova geração, TAT- Tempo de resposta, SNC- Sistema nervoso central, WES- Sequenciação do exoma completo.

Na prática clínica de rotina, a WES não é amplamente utilizada como metodologia primária, em grande parte devido ao custo e à complexidade associados. (124) Esta metodologia foi sobretudo aplicada em situações específicas, nomeadamente na deteção de variantes genéticas em neoplasias raras, como o tumor de células da granulosa do ovário, (283) no prognóstico e monitorização de determinadas neoplasias através de biópsia líquida no cancro da mama (303) no carcinoma hepatocelular, (268) e no cancro do endométrio, (272) bem como na caracterização do perfil molecular em síndromes hereditárias, como a Síndrome de Lynch, com o objetivo de compreender alterações como o TMB, que influenciam o tratamento dos doentes, permitindo prever e direcionar a terapêutica mais adequada. (162,271,301) Em contraste, o *targeted sequencing*, surgiu como a metodologia mais representada nos estudos analisados, mostrando-se como uma alternativa útil e economicamente mais acessível ao WES para a deteção de mutações relevantes, (235) sendo preferido em ambientes clínicos e de diagnóstico devido à sua facilidade de utilização, tempo de resposta mais curto, menos complexidade bioinformática e custo reduzido. (156) Apesar de não possuírem a mesma amplitude de cobertura que o WES, apresentam maior profundidade de sequenciação, o que permite a deteção de variantes em amostras de baixa celularidade, incluindo variantes subclonais associados à progressão tumoral. (238) A literatura indica que os pequenos painéis apresentam taxas de diagnóstico bem-sucedidas entre 30-50%, dependendo dos genes incluídos e da população estudada, enquanto os *comprehensive genetic profiles* atingem entre 50-70% mas detetam variantes pouco frequentes, (265) apresentando resultados de TMB semelhantes aos do WES, (124) ampliando assim as oportunidades de tratamento em estudos hereditários. (213) Estes fatores explicam a ampla aplicação do *targeted sequencing* na maioria das neoplasias refletindo a sua relevância como ferramenta de rotina clínica. (156,235)

Na presente análise, as plataformas *short-read* são, de forma predominante, as mais utilizadas (>90%) na área da oncologia, sobretudo em contexto clínico, em comparação com as plataformas *long-read*. Conforme demonstrado nos estudos analisados, as plataformas *short-read* tendem a apresentar maior profundidade de cobertura média do que as plataformas *long-read*, conferindo maior precisão na deteção de variantes, sendo importante salientar que os dados disponíveis não permitem generalizações amplas. As plataformas *long-read* demonstraram capacidade de detetar rearranjos estruturais complexos e de gerar perfis genéticos abrangentes em tempo reduzido, incluindo a identificação de variantes subclonais, deleções significativas e inserções em regiões repetitivas difíceis de mapear em amostras clínicas de neoplasias, como reportado em estudos com as plataformas Nanopore, (253, 255) e PacBio *long-read*. (254)

5. Discussão

O presente estudo exploratório teve como principal objetivo desenvolver um algoritmo que permita identificar as aplicações clínicas mais adequadas na área da oncologia para cada plataforma. Para tal, procedeu-se a uma análise dos parâmetros e avaliou-se comparativamente o desempenho e a capacidade de deteção de diversas plataformas de NGS em *targeted sequencing* e WES, com base na literatura publicada. No entanto, a análise comparativa entre as plataformas revelou um viés significativo na representatividade dos estudos, com a plataforma Illumina® a predominar uma proporção relevante da literatura avaliada (57.6% no *targeted sequencing* e 79.6% no WES dos 239 artigos) (Figura 5.A e Figura 8.A). Esta desproporção na literatura constitui uma limitação central deste estudo, que impactou a comparabilidade direta entre todas as plataformas, exigindo uma abordagem cautelosa na interpretação e generalização dos resultados obtidos para as diversas métricas de desempenho e deteção de variantes, de forma a mitigar potenciais distorções e, por esse motivo, a discussão na perspetiva quantitativa irá centrar-se nas plataformas *short-read* Illumina®, Ion Torrent e MGI que apresentam dados mais robustos, enquanto a análise das plataformas *long-read* Nanopore e PacBio *long-read* será realizada numa perspetiva mais qualitativa. Assim, esta abordagem foi escolhida para lidar com a heterogeneidade dos dados e a possível presença de valores discrepantes (*outliers*). A mediana e o IQR proporcionam medidas de tendência central e de dispersão que são robustas à influência de *outliers*, enquanto o intervalo total contextualiza a amplitude completa dos dados reportados. Em conjunto, este método permite uma representação mais consistente e abrangente da dispersão dos resultados. Para variáveis com disponibilidade limitada de dados quantitativos na literatura, como o Q score e o limite de deteção, procedeu-se à análise qualitativa quando aplicável.

Em relação aos estudos relacionados com *targeted sequencing*, as medianas de profundidade de cobertura média (Tabela 2 e Figura 6.A) entre as plataformas Illumina®, Ion Torrent e MGI apresentam diferenças que refletem variações metodológicas e otimizações específicas. É importante notar que nem todos os estudos atingiram a profundidade de cobertura mínima recomendada de 250X por região-alvo, conforme estabelecido pelas *guidelines* da Association for Molecular Pathology e o College of American Pathologists, (93) o que pode comprometer a deteção de variantes somáticas em regiões com cobertura insuficiente, reduzindo a eficácia na filtragem de artefactos de sequenciação e aumentando o risco de falsos-positivos. Assim, tais limitações devem ser consideradas na interpretação da comparabilidade entre os estudos. (27,100) Por exemplo, a plataforma Illumina® apresentou profundidades de cobertura médias inferiores ao da plataforma Ion Torrent em alguns estudos, possivelmente devido à sobrecarga de *clusters*, uma limitação descrita na literatura. (2) No entanto, todas as plataformas apresentam um

IQR amplo, indicando uma considerável variabilidade nos valores de cobertura observados entre os estudos. Apesar disso, a distribuição visualizada na Figura 6.A, a Illumina® indica uma variabilidade considerável, com a maioria dos estudos concentrada na faixa inferior e intermédia e na presença de valores discrepantes que se estendem até 31000X, refletindo a capacidade da plataforma para determinadas aplicações que exigem uma elevada sensibilidade para a deteção de variantes, principalmente em oncologia clínica. A plataforma Ion Torrent revelou também uma variabilidade significativa, com limites de cobertura que se sobrepõem aos da plataforma Illumina®, tornando-a uma alternativa robusta para *targeted sequencing*. Apesar do número limitado de estudos, a plataforma MGI demonstrou uma distribuição mais concentrada em valores intermédios, sugerindo uma aplicação direcionada para contextos específicos nos estudos analisados. Em suma, a variabilidade observada nos níveis de profundidade de cobertura média transcende as especificidades de cada plataforma, sugerindo que fatores mais amplos possam estar a influenciar o desempenho real, como a heterogeneidade dos *designs* dos estudos incluídos, que variam consideravelmente em termos de tamanho e complexidade dos painéis utilizados, tipos de amostra (ver Figura 5.B) e os objetivos específicos de cada projeto, assim como a implementação de diferentes protocolos de otimização de laboratório, e até da própria metodologia utilizada para reportar os resultados nos artigos, nos quais alguns focam-se na cobertura de alvos específicos, enquanto outros apresentam a cobertura média global do painel. (307,308) A entrada de amostra é um fator crucial, especialmente em oncologia, onde a quantidade e a qualidade do material genético são frequentemente limitadas devido à natureza das amostras, o que torna este fator importante, uma vez que o conteúdo de células tumorais é fundamental para a interpretação dos resultados, visto que um baixo conteúdo de células tumorais pode originar resultados falsos-negativos. (309) De forma geral, os dados analisados mostram que todas as plataformas estudadas quantitativamente, apresentam uma notável flexibilidade quanto à quantidade de entrada de amostra que conseguem processar, ainda que com padrões distintos relativamente às quantidades de entrada mais frequentemente utilizadas. Na plataforma Illumina®, a amplitude observada indica uma acentuada adaptabilidade a diversas entradas de amostra, o que evidencia a flexibilidade da plataforma para lidar tanto com amostras de elevada qualidade como as mais desafiadoras. No caso da plataforma Ion Torrent, os valores mais concentrados em entradas baixas, sugerem uma otimização para operar com menores quantidades de amostra, como descritas em diversos estudos, sendo inclusive apontada como uma das principais vantagens desta plataforma. (208,224) Ainda assim a distribuição e o intervalo reportado, demonstra que a plataforma pode processar quantidades mais variadas, embora a maioria dos estudos se concentre em valores reduzidos. A plataforma MGI, que apresenta uma tendência para

quantidades de entrada mais elevados, indica uma capacidade robusta para processar amostras em quantidades superiores comparativamente com as plataformas Ion Torrent e Illumina®. A distribuição, o intervalo e o IQR mais amplo entre as plataformas refletem uma considerável variabilidade na quantidade de amostra utilizada, possivelmente relacionada com a diversidade de aplicações ou protocolos mais frequentemente reportados. Assim, a capacidade das plataformas de acomodar esta diversidade representa uma vantagem clínica significativa, permitindo o processamento de amostras desafiadoras, e tornando-as mais adaptáveis às exigências da oncologia clínica. Esta variabilidade pode estar associada a diversos fatores, como otimizações nos protocolos de preparação das bibliotecas e na natureza das amostras clínicas. (309) Os comprimentos de leitura são uma característica fundamental das plataformas de NGS, influenciando diretamente o tipo de variantes genéticas que podem ser detetadas de forma eficaz. A análise estatística e da distribuição dos dados (ver Tabela 2 e Figura 6.C) demonstram que as plataformas Illumina®, Ion Torrent e MGI enquadram-se claramente na categoria de plataformas *short-read*. Embora a plataforma MGI apresente uma mediana ligeiramente inferior em comparação com as demais plataformas, a dispersão permanece dentro dos limites esperados para plataformas *short-read*, não evidenciando valores extremos que as enquadrassem na categoria *long-read*. A principal implicação destas plataformas operarem como plataformas *short-read*, é a sua elevada adequação para a deteção de variantes de SNVs e indels, sendo inclusive as plataformas mais comuns em oncologia clínica. (93) Contudo, esta característica impõe limitações na deteção de regiões mais complexas, nas quais plataformas *short-read* podem não fornecer informação suficiente para o alinhamento inequívoco ou para abranger a totalidade de um evento estrutural. (310) Apesar de a plataforma Illumina® ter conseguido detetar indels longos, comuns em neoplasias como no carcinoma renal de células claras, (311) estes podem estar associados a uma baixa qualidade, exigindo uma avaliação cuidadosa para garantir uma interpretação precisa. (142) De forma semelhante, a MGI demonstrou capacidade para detetar grandes rearranjos, (267) alterações fundamentais principalmente em estudos hereditários, embora frequentemente não sejam abordadas. (142) É fundamental considerar que o número de artigos que contribuem para o indicador de comprimento de leitura é consideravelmente menor para a Ion Torrent (N=20), e MGI (N=7) do que para Illumina® (N=49). Apesar das tendências refletidas pelos dados, a generalização das medianas e intervalos nas plataformas com número de artigos mais baixos deve ser efetuado com prudência.

Em termos da deteção de variantes no *targeted sequencing*, a elevada percentagem de estudos que reportam SNVs e indels nas plataformas Illumina® e Ion Torrent (conforme a Figura 7) é consistente com o facto de serem as variantes mais comuns no estudo da oncologia. (93) No entanto, a menor prevalência



de reporte de variantes mais complexas nestas plataformas poderá estar relacionada tanto com o foco dos estudos como limitações técnicas inerentes às plataformas *short-read*, que podem dificultar a deteção de variantes mais complexas. (310) Apesar do número limitado de estudos envolvendo a MGI (N=11), observa-se uma proporção elevada de estudos que reportam a deteção de SNVs, indels, CNVs e rearranjos estruturais, sugerindo que os estudos que empregam a MGI tendem a ser mais abrangentes na deteção de variantes ou que esta plataforma é escolhida para projetos com esse objetivo. Contudo, é fundamental considerar que o volume absoluto de dados ainda provém maioritariamente das plataformas Illumina® (N=121) e Ion Torrent (N=73), refletindo a sua maior utilização na literatura. Diversos estudos relataram dificuldades específicas da plataforma Ion Torrent na deteção de grandes rearranjos e regiões homopoliméricas, devido a limitações conhecidas desta plataforma. (208,215,243,244) Para além de que Lang *et al.* mostraram que, em comparação com a plataforma Illumina®, a plataforma MGI apresentou nos dados uma perda significativa de fragmentos entre 101-133 pb, possivelmente devido à fase de circularização do DNA. Tendo sido recomendada prudência na utilização da plataforma MGI em estudos que envolvam fragmentos curtos, que apresentem uma distribuição complexa de tamanhos (ex: amostras em FFPE), ou em estudos focados na distribuição de tamanhos do fragmento, tais como DNA tumoral circulante ou *cell-free* DNA. (119) A exceção ocorreu na deteção de genes de fusão, onde a plataforma MGI parece ser menos utilizada ou menos otimizada comparativamente com as plataformas Illumina® e Ion Torrent. É crucial destacar que o gráfico da Figura 7 reflete o reporte de variantes nos estudos analisados, e não necessariamente a capacidade intrínseca total de deteção de cada plataforma. Além disso, os objetivos dos estudos variam, pelo que um estudo focado apenas num tipo de variante não reportará outras variantes, mesmo que a plataforma tenha capacidade para as detetar.

A análise dos resultados, evidencia que a escassez de dados quantitativos para WES na maioria das plataformas impediu uma análise comparativa abrangente do desempenho e da deteção de variantes. Esta menor representatividade sugere que a WES não é a metodologia primária, em grande parte devido ao custo e à complexidade associadas. (124) Apesar disso, a WES tem vindo a ser cada vez é mais utilizado devido à cobertura abrangente do exoma, embora apresente profundidades de cobertura média inferiores às do *targeted sequencing*. (27) Esta metodologia tem sido aplicada principalmente em situações específicas, como a deteção de variantes genéticas em neoplasias raras, (283) no prognóstico e monitorização de determinadas neoplasias por biópsia líquida, (268,272,303) e na caracterização molecular de uma neoplasia específica ou síndrome hereditária, como a Síndrome de Lynch, com o propósito de compreender as alterações, como o TMB que influenciam o tratamento dos pacientes.

(162,271,301) No entanto, mesmo com a escassez de dados foi possível realizar uma análise quantitativa da plataforma Illumina®. A profundidade de cobertura média inferior observada em WES em relação ao *targeted sequencing* é consistente com a metodologia que ao abranger uma cobertura mais ampla do exoma, consequentemente provoca uma distribuição da profundidade de cobertura média mais baixa, apesar de ser suficiente para a deteção da maioria das variantes relevantes em regiões codificantes. (27) O IQR e o intervalo, refletem uma variabilidade considerável, possivelmente associada a diversos fatores como protocolos de otimização, e nos objetivos dos diversos estudos que podem priorizar uma cobertura mais uniforme ou a uma maior profundidade em determinadas regiões-alvo. (27) A entrada de amostra, demonstra que a Illumina® mantém flexibilidade em WES, sendo capaz de processar um amplo intervalo de quantidades de entrada de DNA, o que pode ser crucial para amostras limitadas ou de qualidade inferior. Em termos de comprimento de leitura, a Illumina® continua a operar como uma plataforma *short-read*, adequada para a deteção de SNVs e indels em todo o exoma, mas limitada na identificação de variantes mais complexas. Relativamente á deteção de variantes, a Illumina® demonstra uma elevada capacidade para detetar SNVs e indels, confirmando a robustez da plataforma para a identificação das variantes mais comuns em oncologia em todo o exoma. A deteção de CNVs e genes de fusão foi reportada em menos artigos, sugerindo que a sua identificação em WES é menos consistente ou mais desafiadora, sendo que nenhum estudo reportou a deteção de rearranjos estruturais, refletindo as limitações inerentes às plataformas *short-read* para identificar variantes mais complexas que exigem maiores comprimentos de leitura para serem resolvidos. (310) Embora a escassez de dados em WES, foram encontrados alguns achados de forma qualitativa referentes à deteção de variantes em outras plataformas como a dificuldade do Ion Torrent em detetar regiões homopoliméricas, que são comuns em neoplasias como a instabilidade de microssatélites no cancro colorretal (18) e o gene *BRCA* no cancro da mama, (18,208) conforme descrito anteriormente na análise do *targeted sequencing*, foi igualmente evidenciado no WES por Kassem *et al.* quando utilizou a plataforma Ion Torrent para analisar o perfil mutacional do carcinoma hepatocelular em pacientes egípcios. (300)

Em relação às plataformas *short-read*, AVITI™ e PacBio Onso, devido à sua recente comercialização, nenhum estudo foi incluído, todavia existem artigos em *preprint* e posters que já mostram resultados promissores da capacidade de sequenciação de ambas as plataformas. Zhang *et al.* examinaram as propriedades de desempenho do método de sequenciação por avidez na deteção de variantes somáticas em amostras FFPE, e compararam a concordância na deteção de variantes entre as plataformas AVITI™ e Illumina®, avaliando as *variant calling* de 518 genes associados ao cancro utilizando o painel Oncoscreen™ Plus da Burning Rock, e mostraram que a plataforma AVITI™ conseguiu detetar com



sucesso diversas variantes relacionadas ao cancro, como SNVs; indels; genes de fusão; CNVs; instabilidade de microssatélites e TMB. Além disso, o sistema AVITI™ com 100 ng de entrada de amostra, e um comprimento de leitura de 150 pb, produziu um Q score superior (AVITI >91% vs Illumina® >89%), além de melhores taxas de atribuição de índice e profundidade de cobertura média, e uma menor taxa de duplicação ótica em comparação com a plataforma Illumina®. (312) Revil *et al.* em formato de póster, mostraram através do projeto DOvEEgene (Detecting Ovarian and Endometrial cancer Early using Genomics) que visa diagnosticar cânceros do ovário e do endométrio por um custo baixo e acessível, decidiram comparar a plataforma PacBio Onso, que promete aumentar a especificidade e a sensibilidade, com a plataforma Illumina®. Os resultados preliminares indicaram que a plataforma PacBio Onso apresenta um Q score mais elevado e taxas de erro empíricas mais baixas, independentemente do método utilizado para a correção de erros, bem como uma maior detecção de microssatélites instáveis em amostras conhecidas, quando comparada com a plataforma Illumina®. (313)

Na presente análise, as plataformas *short-read* foram as mais utilizadas na oncologia em contexto clínico, apresentando maior precisão na detecção de variantes em comparação com as plataformas *long-read*, embora os dados disponíveis não permitam generalizações amplas. Embora o custo por amostra nas plataformas *long-read* possa ser inferior aos das plataformas *short-read*, os investimentos iniciais necessários para as plataformas *long-read*, incluindo os equipamentos, consumíveis (como *flow cells* e kits de preparação da biblioteca), *software* de bioinformática, infraestrutura laboratorial, formação de profissionais especializados, tornam a sua integração na clínica mais limitada. (120,314) Deste modo, na prática clínica, as plataformas *long-read* foram predominantemente utilizadas na detecção de regiões de elevada complexidade para as plataformas *short-read*, como a identificação de rearranjos estruturais (incluindo grandes rearranjos), haplotipagem, regiões repetitivas e homopoliméricas (18,41–43), embora ainda sejam necessárias adaptações das *guidelines* internacionais para a sequenciação da terceira geração. (253,255) Fora do escopo deste estudo, estas plataformas são amplamente aplicadas em estudos de transcriptoma, epigenética e sequenciação completa do genoma, contribuindo para a caracterização da biologia tumoral, na descoberta de novos biomarcadores, e de isoformas, podendo auxiliar na previsão e direcionamento de tratamentos mais adequados aos pacientes. (315) Nos estudos analisados, verificou-se que, mesmo com profundidade de cobertura média relativamente baixa (<70X), as plataformas *long-read* conseguiram sequenciar regiões complexas de forma eficaz. A tecnologia de sequenciação de amostragem adaptativa, aplicada na plataforma Nanopore, permitiu sequenciar com uma elevada robustez rearranjos de larga escala, (253,255) que ocorrem em neoplasias pediátricas (glioblastoma, sarcoma de Ewing, entre outros), (316) cancro da próstata, melanoma, (317) entre outros.

Além da possibilidade de realizar a classificação simultânea de metilação em tempo real e de CNVs, e seguidamente de um *comprehensive genetic profile* em apenas 24 horas. (255) Hu *et al*, utilizando a plataforma PacBio *long-read*, evidenciaram a detecção de rearranjos estruturais em genes associados ao cancro da mama, incluindo uma inserção de 250 pb no 3' UTR do *EGFR*. (254)

Apesar do objetivo deste estudo seja mostrar as particularidades das diversas plataformas de NGS, é importante considerar que todas as restantes etapas de sequenciação podem influenciar na detecção das variantes. Um dos principais fatores que influencia é a qualidade e o tipo do DNA genómico utilizado, sendo que, como evidenciado nas Figuras 5.B e 8.B, mais da metade dos estudos analisados utilizaram amostras de tecido, com ênfase em amostras com FFPE, devido à sua acessibilidade na anatomia patológica. (156) Entretanto, o tecido em FFPE impacta negativamente a qualidade do DNA genómico, devido às alterações que a formalina provoca no DNA, (138) ocorrendo igualmente em amostras de RNA, (180,318) reduzindo o desempenho dos *amplicons*, ocasionando em alterações na expressão genética analisadas pelo NGS, o que leva aos laboratórios optarem frequentemente por tecidos congelados ou frescos. (215,236,246) Quanto mais antigas forem as amostras de FFPE (> 5 anos), menores tendem a ser o Q score e a profundidade de cobertura, comprometendo a detecção de variantes. (134) No entanto, quando as amostras apresentam uma elevada qualidade de DNA genómico, uma profundidade de cobertura mais baixa tem um impacto reduzido nessa detecção de variantes como o polimorfismo de nucleótido único e TMB, (146,161) sendo que o envelhecimento não afeta de forma tão significativa outros tipos de amostras, como sangue periférico. (230,253) Assim, para contornar essa dificuldade das plataformas de NGS, existem alguns kits de preparação de biblioteca que estão adaptados para lidar com este tipo de amostras como o TruSight Oncology 500, (191) Painel RAS, (194) e Ion Torrent™ Oncomine™ (319) ou realizam pequenas modificações nos protocolos como uma etapa extra de purificação do DNA FFPE. (212) Outros fatores que podem ter impacto incluem o conteúdo tumoral da amostra, que pode afetar o rendimento e a quantidade de entrada da amostra, além da heterogeneidade intratumoral que pode influenciar o *variant calling*, e o intervalo entre a colheita e a realização do NGS. (180,258) Na preparação da biblioteca, um dos fatores mais impactantes é a escolha do *design* do painel, especialmente na metodologia *targeted sequencing*, na qual existe uma variedade de painéis que identificam variantes de apenas alguns genes até de múltiplos genes. A principal diferença entre os pequenos painéis e o *comprehensive genetic profile* reside na taxa de diagnósticos bem-sucedidos, onde os *comprehensive genetic profile* apresentam uma taxa mais elevada de diagnósticos bem-sucedidos, (265) ampliando as oportunidades de tratamento em estudos hereditários. (213) Além disso, os painéis multigenes, como os *comprehensive genetic profile*, são recomendados pela ESMO (European Society



for Medical Oncology) em certas neoplasias, como no adenocarcinoma do pulmão e em neoplasias avançadas, devendo ser implementados em centros académicos com acesso a ensaios clínicos. (224,320,321) Todavia, os painéis multigenes não abrangem todos os potenciais defeitos genéticos, principalmente rearranjos genéticos ou CNVs. (322) Por fim, na análise de bioinformática, Karimnezhad *et al.* e Stockley *et al.* desmitificam a influência das plataformas na deteção de variantes, mostrando que a reprodutibilidade e a precisão dos resultados da sequenciação, dependem mais da viabilidade entre réplicas e da análise bioinformática do que das plataformas e do painel de genes. (109,118) Essa discordância acontece principalmente entre *softwares* de bioinformática, como valores padrão para a frequência mínima dos alelos, cobertura ou qualidade das leituras; parâmetros de filtragem; variações entre modelos estatísticos; sendo que a principal distinção ocorre nas *calling* de falsos positivos. (109)

Relativamente aos restantes critérios como profundidade de cobertura mínima, Q score, limite de deteção, tempo de resposta e custo por amostra, a inconsistência na análise destes indicadores representa um desafio para uma avaliação completa da qualidade e sensibilidade das plataformas para uso clínico onde a robustez e a fiabilidade são primordiais. No entanto, na oncologia clínica, o potencial do NGS reside essencialmente, na integração do *targeted sequencing*, WES, epigenética e sequenciação de genoma completo numa única análise (análise multiómica), para ser aplicado na prática clínica. Isso inclui o uso durante o meio intraoperatório como exemplificado pela tecnologia Rapid-CNS², baseada em sequenciação adaptativa em tempo real, que permite a análise simultânea de metilação e de CNVs. (255) Assim como em novas tecnologias de sequenciação, como a tecnologia de sequenciação por expansão (SBX) da ROCHE, que promete mais rapidez e precisão, (323,324) ou na otimização de tecnologias como a sequenciação de amostragem adaptativa da Nanopore, com a finalidade de conceber a plataforma ideal para o desenvolvimento de diagnósticos capazes de identificar com precisão as opções de tratamento, melhorando assim a sobrevida dos pacientes. (235) Assim como qualquer outro estudo, este também apresenta as suas limitações como a ausência de padronização dos critérios de qualidade nos diversos estudos, devido à falta de consenso dos critérios de qualidade, na qual diversas entidades internacionais tentam definir padrões e regulamentar as plataformas de NGS. Assim como, a limitação na recolha de estudos de determinadas plataformas como o AVITI™ e o PacBio Onso, à discrepância da quantidade de estudos entre as diferentes plataformas de NGS, e na escassez de dados de determinados indicadores, principalmente para o WES. Por último, a seleção dos estudos foi arbitrária, resultando em informações sujeitas ao viés de seleção com grande interferência da percepção subjetiva. No futuro, prevê-se que este trabalho possa ser alargado para incorporar novas plataformas de sequenciação, diferentes etapas do processo de NGS e tipos de análises genómicas, bem como aprofundar a caracterização das aplicações

mais adequadas de cada plataforma, de modo a permitir uma avaliação mais abrangente da eficácia de cada tecnologia na prática clínica em oncologia. Estes desdobramentos poderão também servir como fundamento para a validação do algoritmo desenvolvido, tendo em conta que, até ao momento o mesmo não foi validado.



6. Conclusões

O surgimento contínuo de diversas plataformas de NGS, com métodos distintos de amplificação e de sequenciação, revela particularidades únicas que impactam diretamente na oncologia clínica. Até ao momento, não havia sido descrito nenhum algoritmo que permitisse identificar a plataforma de NGS mais apropriada em *targeted sequencing* como em WES. A escolha da plataforma depende de parâmetros de desempenho e da capacidade de detetar diferentes tipos de variantes.

O *targeted sequencing* é predominantemente usado na maioria das neoplasias e na monitorização clínica devido à maior profundidade de cobertura média e menor complexidade. A WES é aplicado em situações específicas, como neoplasias raras ou síndromes hereditárias, oferecendo uma cobertura abrangente do exoma, apesar do maior custo e complexidade. As plataformas *long-read* são indicadas para regiões genómicas complexas e rearranjos estruturais, complementando as *short-read*, mas apresentam limitações de infraestrutura e custo inicial.

Apesar de algumas limitações na representatividade da literatura disponível, a análise destes parâmetros permitiu desenvolver um algoritmo que orienta na seleção da plataforma mais adequada à aplicabilidade pretendida, facilitando a escolha acertada de acordo com o painel e promovendo uma aplicação mais eficiente das plataformas de sequenciação em contexto clínico.



Referências Bibliográficas

1. Rapley R, editor. Basic Molecular Biology Techniques. Em: Molecular Biology and Biotechnology [Internet]. 7.^a ed. London: Royal Society of Chemistry; 2021. p. 13–43. Disponível em: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=3580643&lang=pt-pt&site=ehost-live&scope=site>
2. Meera Krishna B, Khan MA, Khan ST. Next-Generation Sequencing (NGS) Platforms: An Exciting Era of Genome Sequence Analysis. Em: Tripathi V, Kumar P, Tripathi P, Kishore A, Kamle M, editores. Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems [Internet]. Singapore: Springer; 2019 [citado 18 de novembro de 2024]. p. 89–109. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-981-32-9860-6_6
3. The Editors of Encyclopaedia Britannica. Frederick Griffith [Internet]. 2025 [citado 21 de julho de 2025]. Disponível em: <https://www.britannica.com/biography/Frederick-Griffith>
4. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types. J Exp Med [Internet]. 1 de fevereiro de 1944 [citado 21 de julho de 2025];79(2):137–58. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/79/2/137/4753/STUDIES-ON-THE-CHEMICAL-NATURE-OF-THE-SUBSTANCE>
5. WATSON JD, CRICK FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature [Internet]. 1 de abril de 1953;171(4356):737–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/171737a0>
6. Zallen DT. Despite Franklin's work, Wilkins earned his Nobel. Nature [Internet]. setembro de 2003 [citado 7 de novembro de 2024];425(6953):15–15. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/425015b>
7. Anekpuritanang T, Raess PW, Press RD. Introduction to Next-Generation Sequencing. Em: Crane GM, Loghavi S, editores. Precision Molecular Pathology of Aggressive B-Cell Lymphomas [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2023 [citado 7 de novembro de 2024]. p. 47–82. (Molecular Pathology Library). Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-46842-1_4
8. Banaganapalli B, Shaik NA, Rashidi OM, Jamalalail B, Bahattab R, Bokhari HA, et al., editores. In Silico PCR. Em: Essentials of Bioinformatics, Volume I: Understanding Bioinformatics: Genes to Proteins [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [citado 23 de novembro de 2024]. p. 355–70. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02634-9>
9. Ping Chiu K. Evolution of DNA Sequencing Technologies. Em: Next-generation Sequencing and Sequence Data Analysis [Internet]. Sharjah: Bentham Science Publishers; 2016. p. 17–24. Disponível em: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=1108992&lang=pt-pt&site=ehost-live&scope=site>
10. DNA Sequencing [Internet]. 2024 [citado 7 de novembro de 2024]. DNA Sequencing. Disponível em: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/DNA-Sequencing>



11. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. fevereiro de 1977 [citado 6 de novembro de 2024];74(2):560–4. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.74.2.560>
12. Wing-Kin Sung. *Algorithms for Next-Generation Sequencing* [Internet]. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC; 2017. (Chapman & Hall/CRC Mathematical and Computational Biology Series). Disponível em: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=1521284&lang=pt-pt&site=ehost-live&scope=site>
13. Kotta-Loizou I, editor. *Genome Sequencing. Em: Molecular Biology and Biotechnology* [Internet]. 7.^a ed. London: Royal Society of Chemistry; 2021. p. 209–18. Disponível em: <https://research.ebsco.com/linkprocessor/plink?id=dc087753-37ce-3bdb-9a48-5ffa2fd6077c>
14. Chidgeavadze ZG, Beabealashvili RS. 2', 3' -Dideoxy-3' aminonucleoside 5'triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(3):1671–86.
15. Jain KK. *DNA Sequencing. Em: Textbook of Personalized Medicine.* 3.^a ed. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 43–100.
16. Nirmala Akoijam, Joshi SR, Kumar A, Choudhury B, Dayanandan S, editores. *Conservation Metagenomics: Understanding Microbiomes for Biodiversity Sustenance and Conservation. Em: Molecular Genetics and Genomics Tools in Biodiversity Conservation* [Internet]. Singapore: Springer Nature; 2022 [citado 23 de novembro de 2024]. p. 31–61. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-6005-4>
17. Bourn D. *Out of Sequence: Genome-Scale Testing. Em: Diagnostic Genetic Testing* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2022 [citado 18 de novembro de 2024]. p. 97–119. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-85510-9_7
18. Rapoport BL, Troncone G, Schmitt F, Nayler S. *Fast Facts: Comprehensive Genomic Profiling* [Internet]. Abingdon, UK: S. Karger AG; 2020 [citado 6 de novembro de 2024]. Disponível em: <https://www.karger.com/Book/Home/280435>
19. Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science* [Internet]. 17 de julho de 1998 [citado 7 de novembro de 2024];281(5375):363–5. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.281.5375.363>
20. Parmar S, Sharma VK, Kumar J. *Application of Molecular and Sequencing Techniques in Analysis of Microbial Diversity in Agroecosystem. Em: Tripathi V, Kumar P, Tripathi P, Kishore A, Kamle M, editores. Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems* [Internet]. Singapore: Springer; 2019 [citado 18 de novembro de 2024]. p. 21–44. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-981-32-9860-6_2
21. Shetty PJ, Shaik NA, Amirtharaj F, Hakeem KR, Banaganapalli B, Elango R, editores. *Introduction to Nucleic Acid Sequencing. Em: Essentials of Bioinformatics, Volume I: Understanding Bioinformatics: Genes to Proteins* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [citado 23 de novembro de 2024]. p. 97–126. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02634-9>



22. Rothberg JM, Leamon JH. The development and impact of 454 sequencing. *Nat Biotechnol* [Internet]. outubro de 2008 [citado 19 de dezembro de 2024];26(10):1117–24. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt1485>
23. Nyrén P, editor. The History of Pyrosequencing®. Em: *Pyrosequencing Protocols* [Internet]. New Jersey: Humana Press; 2006 [citado 19 de março de 2025]. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1385/1597453773>
24. Quiban Bioinformatics [Internet]. [citado 13 de agosto de 2025]. Filtering of variants in homopolymeric regions. Disponível em: https://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/650/Filtering_variants_in_homopolymeric_regions.html
25. Your Genome [Internet]. [citado 19 de dezembro de 2024]. What was the 454 method of DNA sequencing? How does it work? Disponível em: <https://www.yourgenome.org/theme/what-was-the-454-method-of-dna-sequencing/>
26. Wang M. Next-Generation Sequencing (NGS). Em: Pan S, Tang J, editores. *Clinical Molecular Diagnostics* [Internet]. Singapore: Springer; 2021 [citado 18 de novembro de 2024]. p. 305–27. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-1037-0_23
27. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* [Internet]. setembro de 2013 [citado 10 de novembro de 2024];15(9):733–47. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098360021027313>
28. Rehder C, Bean LJH, Bick D, Chao E, Chung W, Das S, et al. Next-generation sequencing for constitutional variants in the clinical laboratory, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* [Internet]. agosto de 2021 [citado 10 de novembro de 2024];23(8):1399–415. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098360021050565>
29. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology* [Internet]. 13 de julho de 2023 [citado 11 de novembro de 2024];12(7):997. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-7737/12/7/997>
30. Chowdhury S, Ghosh S. *Stem Cells: Biology and Therapeutics* [Internet]. Singapore: Springer; 2021 [citado 23 de novembro de 2024]. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-1638-9>
31. Thomas Rio Frio, Le Tourneau C, Kamal M, editores. High-Throughput Technologies: DNA and RNA Sequencing Strategies and Potential. Em: *Pan-cancer Integrative Molecular Portrait Towards a New Paradigm in Precision Medicine* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [citado 23 de novembro de 2024]. p. 47–68. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-22189-2>
32. Thermo Fisher Scientific Inc. [Internet]. [citado 18 de maio de 2025]. Targeted Sequencing Approaches for NGS. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/targeted-sequencing-approaches.html>



33. Ralph Rapley. Molecular Biology and Biotechnology [Internet]. Vol. Seventh edition. London: Royal Society of Chemistry; 2021. Disponível em: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=3580643&lang=pt-pt&site=ehost-live&scope=site>
34. Amplicon Sequencing vs. Hybridization Capture: The Comparison of Target Enrichment Methods for Disease Panel – CD Genomics [Internet]. [citado 18 de maio de 2025]. Disponível em: <https://www.cd-genomics.com/diseasepanel/amplicon-sequencing-vs-hybridization-capture-the-comparison-of-target-enrichment-methods-for-disease-panel.html>
35. US20150211047A1.pdf [Internet]. [citado 18 de maio de 2025]. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/df/30/f6/8c6fa6f4cee991/US20150211047A1.pdf>
36. National Human Genome Research Institute [Internet]. 2024 [citado 19 de dezembro de 2024]. Bioinformatics. Disponível em: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Bioinformatics>
37. Tiwary BK. Bioinformatics and computational biology: a primer for biologists. Singapore: Springer; 2022.
38. Singh V, Kumar A, editores. Next Generation Sequencing. Em: Advances in Bioinformatics [Internet]. Singapore: Springer; 2021 [citado 23 de novembro de 2024]. p. 277–302. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-981-33-6191-1>
39. Banaganapalli B, Shaik NA, Hakeem KR, Elango R, editores. Introduction to Bioinformatics. Em: Essentials of Bioinformatics, Volume I: Understanding Bioinformatics: Genes to Proteins [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [citado 23 de novembro de 2024]. p. 1–14. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02634-9>
40. Tripathi V, Kumar P, Tripathi P, Kishore A, Kamle M, editores. Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems: Volume 2 [Internet]. Vol. 2. Singapore: Springer; 2019 [citado 17 de novembro de 2024]. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-32-9860-6>
41. Eisele M, Kappelmann-Fenzl M. NGS Technologies. Em: Kappelmann-Fenzl M, editor. Next Generation Sequencing and Data Analysis [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [citado 18 de novembro de 2024]. p. 47–58. (Learning Materials in Biosciences). Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-62490-3_4
42. Hon T, Mars K, Young G, Tsai YC, Karalius JW, Landolin JM, et al. Highly accurate long-read HiFi sequencing data for five complex genomes. Sci Data [Internet]. 17 de novembro de 2020 [citado 29 de novembro de 2024];7(1):399. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41597-020-00743-4>
43. Dubey A, Malla MA, Kumar A, Anamika Dubey, editores. Role of Next-Generation Sequencing (NGS) in Understanding the Microbial Diversity. Em: Molecular Genetics and Genomics Tools in Biodiversity Conservation [Internet]. Singapore: Springer Nature; 2022 [citado 23 de novembro de 2024]. p. 307–28. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-6005-4>



44. Pan S, Tang J, editores. Clinical Molecular Diagnostics [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2021 [citado 17 de novembro de 2024]. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-1037-0>
45. Genohub [Internet]. 2024 [citado 14 de maio de 2025]. Ion Torrent Proton System. Disponível em: <https://genohub.com/ngs-sequencer/36/ion-torrent-proton-system/>
46. ion-torrent-innovations-infographic.pdf [Internet]. [citado 14 de maio de 2025]. Disponível em: <https://assets.thermofisher.cn/TFS-Assets/CSD/Flyers/ion-torrent-innovations-infographic.pdf>
47. Jain KK. Textbook of Personalized Medicine [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [citado 17 de novembro de 2024]. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-62080-6>
48. El Bairi K, Azzam F, Amrani M. The Arrival of Next-Generation Sequencing: An Overview of Current Technologies. Em: El Bairi K, editor. Illuminating Colorectal Cancer Genomics by Next-Generation Sequencing [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [citado 18 de novembro de 2024]. p. 73–89. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-53821-7_3
49. DiStefano JK, editor. Disease Gene Identification: Methods and Protocols [Internet]. 2.^a ed. New York, NY: Springer; 2018 [citado 23 de novembro de 2024]. (Methods in Molecular Biology; vol. 1706). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7471-9>
50. Willard HF, Ginsburg GS. Genomic and Personalized Medicine : V1-2 [Internet]. 2.^a ed. Vol. 1. London: Academic Press; 2013. Disponível em: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=485475&lang=pt-pt&site=ehost-live&scope=site>
51. Beleggia F, Wollnik B, Özgüç M, editores. Emerging Technologies for Gene Identification in Rare Diseases. Em: Rare Diseases: Integrative PPPM Approach as the Medicine of the Future [Internet]. Dordrecht: Springer; 2015 [citado 23 de novembro de 2024]. p. 33–45. (Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine; vol. 6). Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9214-1>
52. Illumina [Internet]. [citado 25 de novembro de 2024]. Flow Cell Overview. Disponível em: https://support-docs.illumina.com/IN/NextSeq_550-500/Content/IN/NextSeq/FlowCell_Overview_fNS.htm
53. CD Genomics [Internet]. [citado 13 de dezembro de 2024]. Principles of Illumina Next-generation Sequencing (NGS). Disponível em: <https://www.cd-genomics.com/resource-principles-illumina-next-generation-sequencing.html#guide2>
54. Illumina [Internet]. [citado 9 de dezembro de 2024]. Next-generation Sequencing Glossary | NGS terminology. Disponível em: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/tutorials/glossary.html>
55. Arslan S, Garcia FJ, Guo M, Kellinger MW, Kruglyak S, LeVieux JA, et al. Sequencing by avidity enables high accuracy with low reagent consumption. Nat Biotechnol [Internet]. janeiro de 2024



[citado 2 de novembro de 2024];42(1):132–8. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41587-023-01750-7>

56. Lackmann M, Boyd AW. Ephrins and Their Receptors. Em: Encyclopedia of Hormones [Internet]. Elsevier; 2003 [citado 23 de dezembro de 2024]. p. 537–44. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012341103300320X>
57. Gleichmann N. Immunology & Microbiology from Technology Networks. 2023 [citado 23 de dezembro de 2024]. Affinity vs Avidity. Disponível em: <http://www.technologynetworks.com/immunology/articles/affinity-vs-avidity-333559>
58. Element Biosciences. Element Biosciences. [citado 27 de novembro de 2024]. Innovative Avidite Sequencing Technology. Disponível em: <https://www.elementbiosciences.com/technology/avidite-base-chemistry>
59. Element Bioscience. Element AVITI System Specification Sheet [Internet]. 2024 [citado 27 de novembro de 2024]. Disponível em: https://sourcebioscience.com/wp-content/uploads/aviti_system_specification_sheet.pdf
60. Element Bioscience. Shift your science [Internet]. 2024 [citado 27 de novembro de 2024]. Disponível em: <https://go.elementbiosciences.com/aviti-system-brochure>
61. Element Biosciences. Sequencing, Rebuilt [Internet]. 2024 [citado 2 de novembro de 2024]. Disponível em: https://liondx.com/wp-content/uploads/2024/06/AVITI24_Flyer_A4_General.pdf
62. MGI Tech Co., Ltd. [Internet]. [citado 28 de novembro de 2024]. Company development history: MGI gene sequencing technology and applications, solutions-MGI Tech website-Leading Life Science Innovation. Disponível em: <https://en.mgi-tech.com/about/process/>
63. MGI Tech Co., Ltd. [Internet]. [citado 28 de novembro de 2024]. DNBSEQ Technology | MGI-tech | Leading Life Science Innovation. Disponível em: <https://mgi-tech.eu/technology>
64. Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, Halpern AL, Burns NL, Kermani BG, et al. Human Genome Sequencing Using Unchained Base Reads on Self-Assembling DNA Nanoarrays. Science [Internet]. janeiro de 2010 [citado 28 de novembro de 2024];327(5961):78–81. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1181498>
65. MGI Tech Co., Ltd. [Internet]. 2024. How does DNBSEQ™ sequencing technology work? Disponível em: <https://mgi-tech.eu/technology>
66. MGI Tech Co., Ltd. [Internet]. [citado 5 de novembro de 2024]. Introduction to MGI Sequencing Technology. Disponível em: <https://en.mgi-tech.com/products/resources>
67. Kershaw CJ, O’Keefe RT. Splint Ligation of RNA with T4 DNA Ligase. Em: Conn GL, editor. Recombinant and In Vitro RNA Synthesis [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [citado 10 de setembro de 2025]. p. 257–69. (Methods in Molecular Biology; vol. 941). Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-113-4_19



68. Pacific Biosciences [Internet]. [citado 28 de novembro de 2024]. PacBio Announces Onso, the Highly Accurate Short-Read Sequencing Platform. Disponível em: https://www.pacb.com/press_releases/pacbio-announces-onso-the-highly-accurate-short-read-sequencing-platform/
69. Wenger AM, Peluso P, Rowell WJ, Chang PC, Hall RJ, Concepcion GT, et al. Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. Nat Biotechnol [Internet]. outubro de 2019 [citado 28 de novembro de 2024];37(10):1155–62. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41587-019-0217-9>
70. Pacific Biosciences [Internet]. [citado 28 de novembro de 2024]. How does HiFi sequencing work? Disponível em: <https://www.pacb.com/technology/hifi-sequencing/how-it-works/>
71. Pacific Biosciences [Internet]. Next-level discovery – Setting a new standard for short reads with the Onso™ system. Disponível em: <https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Onso-brochure.pdf>
72. Pacific Biosciences [Internet]. 2023 [citado 28 de novembro de 2024]. Sequencing 101: SBB sequencing. Disponível em: <https://www.pacb.com/blog/sbb-sequencing/>
73. PDF [Internet]. [citado 28 de novembro de 2024]. Disponível em: <https://www.pacb.com/wp-content/uploads/SBB-Product-note.pdf>
74. Pacific Biosciences [Internet]. [citado 30 de novembro de 2024]. Onso system. Disponível em: <https://www.pacb.com/onso/>
75. Pacific Biosciences [Internet]. 2020 [citado 29 de novembro de 2024]. Sequencing 101: from DNA to discovery – the steps of SMRT sequencing. Disponível em: <https://www.pacb.com/blog/steps-of-smrt-sequencing/>
76. Pacific Biosciences [Internet]. 2024 [citado 29 de novembro de 2024]. Sequencing 101: Comparing long-read sequencing technologies. Disponível em: <https://www.pacb.com/blog/sequencing-101-comparing-long-read-sequencing-technologies/>
77. Oxford Nanopore Technologies [Internet]. 2024. Chemistry Technical Document (CHTD_500_v1_revAR_25Nov2024) | Oxford Nanopore Technologies. Disponível em: <https://nanoporetech.com/document/chemistry-technical-document#introduction-to-library-preparation-chemistry>
78. Kappelmann-Fenzl M, editor. Next Generation Sequencing and Data Analysis [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [citado 17 de novembro de 2024]. (Learning Materials in Biosciences). Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-62490-3>
79. Ping Chiu K. Evolution of DNA Sequencing Technologies. Em: Next-generation Sequencing and Sequence Data Analysis [Internet]. Sharjah: Bentham Science Publishers; 2016. p. 17–24. Disponível em: <https://research.ebsco.com/linkprocessor/plink?id=28688f51-d680-321e-8488-b6230f41d099>



80. National Cancer Institute. What Is Cancer? 2007 [citado 25 de dezembro de 2024]. The Definition of Cancer. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
81. Wu W, Choudhry H, editores. Next Generation Sequencing in Cancer Research, Volume 2: From Basepairs to Bedsides [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [citado 23 de novembro de 2024]. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-15811-2>
82. World Health Organization (WHO) [Internet]. 2024 [citado 25 de dezembro de 2024]. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
83. Vora NL, Norton ME. Prenatal exome and genome sequencing for fetal structural abnormalities. Am J Obstet Gynecol [Internet]. 1 de fevereiro de 2023 [citado 6 de março de 2025];228(2):140–9. Disponível em: [https://www.ajog.org/article/S0002-9378\(22\)00683-4/fulltext](https://www.ajog.org/article/S0002-9378(22)00683-4/fulltext)
84. Frost DA. National Health Service (NHS). 2024 [citado 26 de dezembro de 2024]. Constitutional (germline) vs somatic (tumour) variants. Disponível em: <https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/genotes/knowledge-hub/constitutional-germline-vs-somatic-tumour-variants/>
85. Chen T, Wang Z, Zhou W, Chong Z, Meric-Bernstam F, Mills GB, et al. Hotspot mutations delineating diverse mutational signatures and biological utilities across cancer types. BMC Genomics [Internet]. 23 de junho de 2016;17(2):394. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2727-x>
86. Zeps N, Hemmings C, editores. Rare Cancers. Em: Rare Diseases: Integrative PPPM Approach as the Medicine of the Future [Internet]. Dordrecht: Springer; 2015 [citado 23 de novembro de 2024]. p. 109–30. (Özgüç M, Nikolajs Zeps, eds. Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine; vol. 6). Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9214-1>
87. El Bairi K, Afqir S. Next-Generation Sequencing for Colorectal Cancer Management. Em: El Bairi K, editor. Illuminating Colorectal Cancer Genomics by Next-Generation Sequencing [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [citado 18 de novembro de 2024]. p. 91–110. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-53821-7_4
88. National Cancer Institute [Internet]. 2019 [citado 26 de dezembro de 2024]. Immune Checkpoint Inhibitors. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/checkpoint-inhibitors>
89. National Cancer Institute [Internet]. 2015 [citado 26 de dezembro de 2024]. Immunotherapy for Cancer. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy>
90. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Science [Internet]. 3 de abril de 2015 [citado 26 de dezembro de 2024];348(6230):124–8. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaa1348>



91. Cancer Research UK. How does pembrolizumab work? 2023 [citado 26 de dezembro de 2024]. Pembrolizumab (Keytruda). Disponível em: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/treatment/drugs/pembrolizumab>
92. Vanni I, Pastorino L, Tanda ET, Andreotti V, Dalmasso B, Solari N, et al. Whole-Exome Sequencing and cfDNA Analysis Uncover Genetic Determinants of Melanoma Therapy Response in a Real-World Setting. *Int J Mol Sci* [Internet]. 21 de fevereiro de 2023 [citado 26 de dezembro de 2024];24(5):4302. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/5/4302>
93. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels. *J Mol Diagn* [Internet]. maio de 2017 [citado 11 de novembro de 2024];19(3):341–65. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525157817300259>
94. Bean LJH, Funke B, Carlston CM, Gannon JL, Kantarci S, Krock BL, et al. Diagnostic gene sequencing panels: from design to report—a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. março de 2020;22(3):453–61.
95. Aziz N, Zhao Q, Bry L, Driscoll DK, Funke B, Gibson JS, et al. College of American Pathologists' Laboratory Standards for Next-Generation Sequencing Clinical Tests. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. abril de 2015 [citado 12 de novembro de 2024];139(4):481–93. Disponível em: <http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2014-0250-CP>
96. Hume S, Nelson TN, Speevak M, McCready E, Agatep R, Feilotter H, et al. CCMG practice guideline: laboratory guidelines for next-generation sequencing. *J Med Genet* [Internet]. dezembro de 2019 [citado 12 de novembro de 2024];56(12):792–800. Disponível em: <https://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmedgenet-2019-106152>
97. Sequencing Depth vs. Coverage: Key Metrics in NGS Explained [Internet]. [citado 1 de fevereiro de 2025]. Disponível em: <https://3billion.io/blog/sequencing-depth-vs-coverage>
98. Basepair Support [Internet]. [citado 1 de fevereiro de 2025]. What is the difference between coverage and read depth? Disponível em: <https://support.basepairtech.com/support/solutions/articles/14000124252-what-is-the-difference-between-coverage-and-read-depth-how-many-reads-do-you-need-for-atac-seq-data->
99. Schatz MC, Delcher AL, Salzberg SL. Assembly of large genomes using second-generation sequencing. *Genome Res* [Internet]. setembro de 2010 [citado 5 de fevereiro de 2025];20(9):1165–73. Disponível em: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.101360.109>
100. Petrackova A, Vasinek M, Sedlarikova L, Dyskova T, Schneiderova P, Novosad T, et al. Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics. *Front Oncol* [Internet]. 4 de setembro de 2019 [citado 1 de fevereiro de 2025];9(851):1–6. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2019.00851/full>
101. Singh V, Kumar A, editores. *Advances in Bioinformatics* [Internet]. 2.^a ed. Singapore: Springer; 2021 [citado 23 de novembro de 2024]. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-981-33-6191-1>



102. Miura T, Yasuda S, Sato Y. A simple method to estimate the in-house limit of detection for genetic mutations with low allele frequencies in whole-exome sequencing analysis by next-generation sequencing. *BMC Genomic Data* [Internet]. 18 de fevereiro de 2021 [citado 5 de fevereiro de 2025];22(1):8. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12863-020-00956-x>
103. Chung HJ, Lee W, Chun S, Park HI, Min WK. Analysis of Turnaround Time by Subdividing Three Phases for Outpatient Chemistry Specimens. *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. 2009;39(2):144–9. Disponível em: <http://www.annclinlabsci.org/content/39/2/144.long>
104. Pierron G, Le Tourneau C, Gaëlle Pierron, editores. Basis for Molecular Genetics in Cancer. Em: *Pan-cancer Integrative Molecular Portrait Towards a New Paradigm in Precision Medicine* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [citado 23 de novembro de 2024]. p. 15–30. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-22189-2>
105. Sun Z, Bai C, Su M, Tang H, Wu X, Wang Y, et al. Comprehensive profiling of pathogenic germline large genomic rearrangements in a pan-cancer analysis. *Mol Oncol* [Internet]. 2023 [citado 3 de fevereiro de 2025];17(9):1917–29. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1878-0261.13430>
106. Copy Number Variation (CNV) [Internet]. [citado 3 de fevereiro de 2025]. Disponível em: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Copy-Number-Variation-CNV>
107. Definition of fusion gene – NCI Dictionary of Cancer Terms – NCI [Internet]. 2011 [citado 3 de fevereiro de 2025]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/fusion-gene>
108. Tomczak A, Springfield C, Dill MT, Chang DH, Kazdal D, Wagner U, et al. Precision oncology for intrahepatic cholangiocarcinoma in clinical practice. *Br J Cancer* [Internet]. 2022;127(9):1701–8. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85136492555&doi=10.1038%2fs41416-022-01932-1&partnerID=40&md5=eb3fda33c8817bd16b699a69c0dce557>
109. Karimnezhad A, Palidwor GA, Thavorn K, Stewart DJ, Campbell PA, Lo B, et al. Accuracy and reproducibility of somatic point mutation calling in clinical-type targeted sequencing data. *BMC Med Genomics* [Internet]. 15 de outubro de 2020;13(1):1–14. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85092700392&doi=10.1186%2fs12920-020-00803-z&partnerID=40&md5=d0aae27330930d14d53691b5cc45825c>
110. Kim Y, Park I, Kim B, Choi YJ, Oh SC, Lee KA. Comparison of Homologous Recombination Repair Gene Next-Generation Sequencing Analysis in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Between Local and Central Laboratories in Korea. *Ann Lab Med* [Internet]. janeiro de 2023;43(1):64–72. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85137068125&doi=10.3343%2falm.2023.43.1.64&partnerID=40&md5=565cf93f838eb7405fe31abac19c4d9c>
111. Moreno F, Gayarre J, López-Tarruella S, Del Monte-Millán M, Picornell AC, Álvarez E, et al. Concordance of Genomic Variants in Matched Primary Breast Cancer, Metastatic Tumor, and Circulating Tumor DNA: The MIRROR Study. *JCO Precis Oncol* [Internet]. 10 de maio de 2019;3:1–16.



Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85077484363&doi=10.1200%2fP0.18.00263&partnerID=40&md5=f4768093b746f2c1ccdb8eb6d87d6310>

112. Oliver J, Quezada Urban R, Franco Cortés CA, Díaz Velásquez CE, Montealegre Paez AL, Pacheco-Orozco RA, et al. Latin American Study of Hereditary Breast and Ovarian Cancer LACAM: A Genomic Epidemiology Approach. *Front Oncol* [Internet]. 20 de dezembro de 2019;9:1–13. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85077464342&doi=10.3389%2ffonc.2019.01429&partnerID=40&md5=3a52ada53edd88228196c9c91479f213>
113. Bormann Chung C, Lee J, Barritault M, Bringuier PP, Xu Z, Huang WY, et al. Evaluating Targeted Next-Generation Sequencing Assays and Reference Materials for NTRK Fusion Detection. *J Mol Diagn JMD*. janeiro de 2022;24(1):18–32.
114. Heydt C, Wölwer CB, Velazquez Camacho O, Wagener-Rydzek S, Pappesch R, Siemanowski J, et al. Detection of gene fusions using targeted next-generation sequencing: a comparative evaluation. *BMC Med Genomics* [Internet]. 27 de fevereiro de 2021;14(1):1–14. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85101820557&doi=10.1186%2fs12920-021-00909-y&partnerID=40&md5=8858be3b4fa27c241dadcd251bfbdcd09>
115. Kim Y, Kim KH, Kim B, Shin S, Lee KA. Evaluation of a hybridization capture-based hereditary cancer panel for the ion semiconductor-based next-generation sequencing system. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* [Internet]. outubro de 2021;521:223–8. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85111489246&doi=10.1016%2fj.cca.2021.07.018&partnerID=40&md5=f777da5e04d025db8ccb f83a440de39c>
116. Qu X, Yeung C, Coleman I, Nelson PS, Fang M. Comparison of four next generation sequencing platforms for fusion detection: Oncomine by ThermoFisher, AmpliSeq by illumina, FusionPlex by ArcherDX, and QIAseq by QIAGEN. *Cancer Genet* [Internet]. maio de 2020;243:11–8. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85082132333&doi=10.1016%2fj.cancergen.2020.02.007&partnerID=40&md5=3ebac3e973732131ea945da6cb1adca8>
117. Roma C, Esposito Abate R, Sacco A, Califano D, Arenare L, Bergantino F, et al. Harmonization of homologous recombination deficiency testing in ovarian cancer: Results from the MITO16A/MaNGO-OV2 trial. *Eur J Cancer* [Internet]. julho de 2024;206:1–7. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85194070569&doi=10.1016%2fj.ejca.2024.114127&partnerID=40&md5=3c15d676d7d1fb60956140b8123a3a59>
118. Stockley TL, Lo B, Box A, Corredor AG, DeCoteau J, Desmeules P, et al. CANTRK: A Canadian Ring Study to Optimize Detection of NTRK Gene Fusions by Next-Generation RNA Sequencing. *J Mol Diagn* [Internet]. março de 2023;25(3):168–74. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85148666744&doi=10.1016%2fj.jmoldx.2022.12.004&partnerID=40&md5=2857bb8912971532d4eae1bd080bcf51>



119. Lang J, Zhu R, Sun X, Zhu S, Li T, Shi X, et al. Evaluation of the MGISEQ-2000 Sequencing Platform for Illumina Target Capture Sequencing Libraries. *Front Genet* [Internet]. 27 de outubro de 2021;12:1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85118793389&doi=10.3389%2ffgene.2021.730519&partnerID=40&md5=af1e7102fedffd3931a6add6df6987a3>
120. Thirunavukarasu D, Cheng LY, Song P, Chen SX, Borad MJ, Kwong L, et al. Oncogene Concatenated Enriched Amplicon Nanopore Sequencing for rapid, accurate, and affordable somatic mutation detection. *Genome Biol* [Internet]. 6 de setembro de 2021;22(1):1–17. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85114345651&doi=10.1186%2fs13059-021-02449-1&partnerID=40&md5=bf57c277a035ee2c9f955f1b7bdd96b8>
121. Chun YJ, Choi JW, Hong MH, Jung D, Son H, Cho EK, et al. Molecular characterization of lung adenocarcinoma from Korean patients using next generation sequencing. *PloS One* [Internet]. 25 de novembro de 2019;14(11):1–17. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85075500994&doi=10.1371%2fjournal.pone.0224379&partnerID=40&md5=fc565cda770d64327f7fec981f30137c>
122. Hansen MLU, Bendtsen SK, Jakobsen KK, Schmidt AY, Hahn CH, von Buchwald C, et al. Liquid Biopsies in Follicular Thyroid Carcinomas–A Brief Report. *Diagn Basel Switz* [Internet]. julho de 2024;14(14):1–10. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85199752253&doi=10.3390%2fdiagnostics14141577&partnerID=40&md5=c58c7fe8a5ef7d44704501a4de7951d9>
123. Jensen JM, Sjöstedt SMS, Carmona JL, Ahlborn LB, Vieira FG, Nielsen FC, et al. Genomic alterations in the stepwise progression from normal mucosa to metastasizing oral squamous cell carcinoma. *Front Oncol* [Internet]. 11 de setembro de 2024;14:1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85204686928&doi=10.3389%2ffonc.2024.1450361&partnerID=40&md5=a67ebb19a0b8a64289e70c0c7ec139db>
124. Kim H, Hong JY, Lee J, Park SH, Park JO, Park YS, et al. Clinical sequencing to assess tumor mutational burden as a useful biomarker to immunotherapy in various solid tumors. *Ther Adv Med Oncol* [Internet]. fevereiro de 2021;13:1–8. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85101899452&doi=10.1177%2f1758835921992992&partnerID=40&md5=d9071b94eb49274046a3744d9ba3c080>
125. Kim HR, Ahn S, Jo H, Kim H, Hong J, Lee J, et al. The Impact of Tumor Mutation Burden on the Effect of Frontline Trastuzumab Plus Chemotherapy in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Advanced Gastric Cancers. *Front Oncol* [Internet]. 2 de dezembro de 2021;11:1–6. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85121367915&doi=10.3389%2ffonc.2021.792340&partnerID=40&md5=789851a43b796032c92e06575ea59e82>
126. Kim H, Kim H, Kim R, Jo H, Kim HR, Hong J, et al. Tumor Mutational Burden as a Biomarker for Advanced Biliary Tract Cancer. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. dezembro de



2021;20:15330338211062324.

Disponível

em:

[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85125971905&doi=10.1177%2f15330338211062324&partnerID=40&md5=d83585b6188aca5c910525b116ab3506)

85125971905&doi=10.1177%2f15330338211062324&partnerID=40&md5=d83585b6188aca5c910525b116ab3506

127. Koh J, Nam SK, Roh H, Kim J, Lee BC, Kim JW, et al. Somatic mutational profiles of stage II and III gastric cancer according to tumor microenvironment immune type. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. janeiro de 2019;58(1):12–22. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85055055916&doi=10.1002%2fgcc.22683&partnerID=40&md5=11c135f5561ebdc5d840fe820538ff65>
128. Kuo AJ, Paulson VA, Hempelmann JA, Beightol M, Todhunter S, Colbert BG, et al. Validation and implementation of a modular targeted capture assay for the detection of clinically significant molecular oncology alterations [Internet]. Vol. 19, *Practical Laboratory Medicine. RADARWEG 29, 1043 NX AMSTERDAM, NETHERLANDS: ELSEVIER*; 2020. p. 1–12. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85079854209&doi=10.1016%2fj.plabm.2020.e00153&partnerID=40&md5=5f5f340f7f220a6d96ad66fcf9f8d7c5>
129. Valentini V, Silvestri V, Bucalo A, Conti G, Karimi M, Di Francesco L, et al. Molecular profiling of male breast cancer by multigene panel testing: Implications for precision oncology. *Front Oncol* [Internet]. 2022;12:1–12. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85146553102&doi=10.3389%2ffonc.2022.1092201&partnerID=40&md5=7272fc7bc65201d22a382df1743e01cc>
130. Abdullah M, Meilany S, Trimarsanto H, Malik SG, Sukartini N, Idrus F, et al. Genomic profiles of Indonesian colorectal cancer patients. *F1000Research* [Internet]. 2022;11:1–16. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85152915431&doi=10.12688%2ff1000research.109136.2&partnerID=40&md5=e7500d2b9d69e14ea3bdc8a8cbfb5b80>
131. Adamczyk-Gruszka O, Horecka-Lewitowicz A, Gruszka J, Wawszczak-Kasza M, Strzelecka A, Lewitowicz P. Endometrial Cancer in Aspect of Forkhead Box Protein Contribution. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. agosto de 2022;19(16):1–7. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85136576963&doi=10.3390%2fijerph191610403&partnerID=40&md5=042230fe3447cc32950aa1ada5826ca2>
132. Adamczyk-Gruszka O, Horecka-Lewitowicz A, Strzelecka A, Wawszczak-Kasza M, Gruszka J, Lewitowicz P. The Roles of TP53 and FGFR2 in Progress Made Treating Endometrial Cancer. *Diagn Basel Switz* [Internet]. julho de 2022;12(7):1–10. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85137316833&doi=10.3390%2fdiagnostics12071737&partnerID=40&md5=118947cb7c4d1a3f0f433ef9f84114ea>
133. Ajaz S, Zaidi SEZ, Ali S, Siddiq A, Memon MA. Germline Mutation Analysis in Sporadic Breast Cancer Cases With Clinical Correlations. *Front Genet* [Internet]. 9 de março de 2022;13:1–8. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

85127434593&doi=10.3389%2ffgene.2022.820610&partnerID=40&md5=c4b3c55c076a358e8e971e0a97548482

134. Akahane T, Kanomata N, Harada O, Yamashita T, Kurebayashi J, Tanimoto A, et al. Targeted next-generation sequencing assays using triplet samples of normal breast tissue, primary breast cancer, and recurrent/metastatic lesions. *BMC Cancer* [Internet]. 1 de outubro de 2020;20(1):1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85092530426&doi=10.1186%2fs12885-020-07432-w&partnerID=40&md5=6ec6d7bd149f7bf204f26c5538a94ad1>
135. Aktas T, Kizmazoglu D, Aktas S, Erol A, Serinan E, Gokbayrak O, et al. Unraveling the Mystery: Next Generation Sequencing Sheds Light on Neuroblastoma Pathogenesis and Targeted Therapies. *Front Biosci Landmark Ed.* 17 de agosto de 2023;28(8):1–10.
136. Bahlinger V, Stoehr R, Hartmann A, Hes O, Agaimy A. Small cell neuroendocrine carcinoma and poorly differentiated rhabdomyosarcomas of the urinary bladder in adults–A comparative analysis in favor of a common histogenesis. *Virchows Arch Int J Pathol.* outubro de 2024;485(4):615–23.
137. Barateiro LGRP, de Oliveira Cavagna R, Dos Reis MB, de Paula FE, Teixeira GR, Moreno DA, et al. Somatic mutational profiling and clinical impact of driver genes in Latin-Iberian medulloblastomas: Towards precision medicine. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol.* 12 de maio de 2024;45:30–7.
138. Bregni G, Sticca T, Camera S, Akin Telli T, Craciun L, Trevisi E, et al. Feasibility and clinical impact of routine molecular testing of gastrointestinal cancers at a tertiary centre with a multi-gene, tumor-agnostic, next generation sequencing panel. *Acta Oncol Stockh Swed* [Internet]. 1 de dezembro de 2020;59(12):1438–46. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85089755347&doi=10.1080%2f0284186X.2020.1809704&partnerID=40&md5=c89ff1d1710abd99f0a36cc983e14939>
139. Cabral ERM, Pacanhella MF, Lengert AVH, Dos Reis MB, Leal LF, de Lima MA, et al. Somatic mutation detection and KRAS amplification in testicular germ cell tumors. *Front Oncol* [Internet]. 16 de março de 2023;13:1–10. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85152044488&doi=10.3389%2ffonc.2023.1133363&partnerID=40&md5=a96a26346de1f1718c29876c587457b1>
140. Carrara S, Soldà G, Di Leo M, Rahal D, Peano C, Giunta M, et al. Side-by-side comparison of next-generation sequencing, cytology, and histology in diagnosing locally advanced pancreatic adenocarcinoma. *Gastrointest Endosc* [Internet]. março de 2021;93(3):597–604.e5. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85092919910&doi=10.1016%2fj.gie.2020.06.069&partnerID=40&md5=1cad000f93b22e2d1db3555ac294345a>
141. Cattaneo D, Croci GA, Bucelli C, Tabano S, Cannone MG, Gaudio G, et al. Triple-Negative Essential Thrombocythemia: Clinical-Pathological and Molecular Features. A Single-Center Cohort Study. *Front Oncol.* 2021;11:1–10.
142. Chan W, Lee M, Yeo ZX, Ying D, Grimaldi KA, Pickering C, et al. Development and validation of next generation sequencing based 35-gene hereditary cancer panel. *Hered Cancer Clin Pract* [Internet]. 28 de abril de 2020;18(1):1–8. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2->



s2.0-85084314874&doi=10.1186%2fs13053-020-00141-2&partnerID=40&md5=aa4c302d22d646b1fe3d9560cc718c3a

143. Dal Buono A, Poliani L, Greco L, Bianchi P, Barile M, Giatti V, et al. Prevalence of Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients with Pancreatic Cancer or Suspected Related Hereditary Syndromes: Historical Prospective Analysis. *Cancers* [Internet]. março de 2023;15(6):1–10. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85151389475&doi=10.3390%2fcancers15061852&partnerID=40&md5=d3726b2231be0bdc612483d28b286066>
144. de Lange K, de Boer EN, Bosga A, Alimohamed MZ, Johansson LF, Mulder AB, et al. Targeted RNA-Sequencing Enables Detection of Relevant Translocations and Single Nucleotide Variants and Provides a Method for Classification of Hematological Malignancies–RANKING. *Clin Chem* [Internet]. dezembro de 2020;66(12):1521–30. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85103042348&doi=10.1093%2fclinchem%2fhvaa221&partnerID=40&md5=443d35a55cff4d8506aa527035f1103a>
145. Deng MY, Sill M, Sturm D, Stichel D, Witt H, Ecker J, et al. Diffuse glioneuronal tumour with oligodendroglioma-like features and nuclear clusters (DGONC) – a molecularly defined glioneuronal CNS tumour class displaying recurrent monosomy 14. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Internet]. agosto de 2020;46(5):422–30. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85079038769&doi=10.1111%2fnan.12590&partnerID=40&md5=0f38d37092b4e93e05acad971e008751>
146. Dongre HN, Haave H, Fromreide S, Erland FA, Moe SEE, Dhayalan SM, et al. Targeted Next-Generation Sequencing of Cancer-Related Genes in a Norwegian Patient Cohort With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Novel Actionable Mutations and Correlations With Pathological Parameters. *Front Oncol* [Internet]. 24 de setembro de 2021;11:1–13. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85116891269&doi=10.3389%2ffonc.2021.734134&partnerID=40&md5=52516be99b61129edb0bc330ac8b2147>
147. Dregelies T, Haumaier F, Sterlacci W, Backert S, Vieth M. Mutational analysis differentiating sporadic carcinomas from colitis-associated colorectal carcinomas. *Cell Commun Signal* [Internet]. 10 de outubro de 2024 [citado 7 de janeiro de 2025];22(1):1–11. Disponível em: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-024-01856-8>
148. Dupain C, Masliah-Planchon J, Gu C, Girard E, Gestraud P, Du Rusquec P, et al. Fine-needle aspiration as an alternative to core needle biopsy for tumour molecular profiling in precision oncology: prospective comparative study of next-generation sequencing in cancer patients included in the SHIVA02 trial. *Mol Oncol* [Internet]. janeiro de 2021;15(1):104–15. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85090936933&doi=10.1002%2f1878-0261.12776&partnerID=40&md5=e5d3ee1cecbeacf96cbbef313dd6c0e0>
149. Erdem HB, Bahsi T. Spectrum of germline cancer susceptibility gene mutations in Turkish colorectal cancer patients: a single center study. *Turk J Med Sci* [Internet]. 2020;50(4):1015–21. Disponível em:



<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85090720616&doi=10.3906%2fsag-2002-46&partnerID=40&md5=515d13a32193caadf265c729fa6e32a6>

150. Fielding DI, Dalley AJ, Singh M, Nandakumar L, Lakis V, Chittoory H, et al. Evaluating Diff-Quik cytology smears for large-panel mutation testing in lung cancer-Predicting DNA content and success with low-malignant-cellularity samples. *Cancer Cytopathol* [Internet]. junho de 2023;131(6):373–82. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85150839994&doi=10.1002%2fcncy.22690&partnerID=40&md5=9e31690fc72d35143c5c5edf5d1deef>
151. Franzese E, Centonze S, Diana A, Lombardi A, Carlino F, Guerrera LP, et al. Genomic Profile and BRCA-1 Promoter Methylation Status in BRCA Mutated Ovarian Cancer: New Insights in Predictive Biomarkers of Olaparib Response. *Front Oncol* [Internet]. 29 de novembro de 2019;9:1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85076878556&doi=10.3389%2ffonc.2019.01289&partnerID=40&md5=221fca035205699d2d7575767c4eb8b3>
152. Ghosh M, Naik R, Lingaraju SM, Susheela SP, Patil S, Srinivasachar GK, et al. Landscape of clinically actionable mutations in breast cancer `A cohort study'. *Transl Oncol* [Internet]. janeiro de 2021;14(1):1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85093682814&doi=10.1016%2fj.tranon.2020.100877&partnerID=40&md5=8c4197fe2e6128ccffc0450d80902777>
153. Giacò L, Palluzzi F, Guido D, Nero C, Giacomini F, Duranti S, et al. A Computational Framework for Comprehensive Genomic Profiling in Solid Cancers: The Analytical Performance of a High-Throughput Assay for Small and Copy Number Variants. *Cancers* [Internet]. dezembro de 2022;14(24):1–14. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85144941431&doi=10.3390%2fcancers14246152&partnerID=40&md5=77933f7d4e83151abdc1a8dcb64aa50e>
154. Guglielmi C, Scarpitta R, Gambino G, Conti E, Bellè F, Tancredi M, et al. Detection of Germline Variants in 450 Breast/Ovarian Cancer Families with a Multi-Gene Panel Including Coding and Regulatory Regions. *Int J Mol Sci* [Internet]. julho de 2021;22(14):1–20. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85110765525&doi=10.3390%2fijms22147693&partnerID=40&md5=806d26e7e747686cd5c6374cf2dc1496>
155. Gupta V, Vashisht V, Vashisht A, Mondal AK, Alptekin A, Singh H, et al. Comprehensive Analysis of Clinically Relevant Copy Number Alterations (CNAs) Using a 523-Gene Next-Generation Sequencing Panel and NxClinical Software in Solid Tumors. *Genes* [Internet]. abril de 2024;15(4):1–13. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85191581937&doi=10.3390%2fgenes15040396&partnerID=40&md5=7c671669546b3f443a9a5395d336b563>
156. Gurav M, Epari S, Gogte P, Pai T, Deshpande G, Karnik N, et al. Targeted molecular profiling of solid tumours-Indian tertiary cancer centre experience. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. agosto de 2023;149(10):7413–25. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85150244733&doi=10.1007%2fs00432-023-04693-3&partnerID=40&md5=cd72bb33f6f25c389ac994c524cf6f10>



157. Henkel J, Laner A, Locher M, Wohlfrom T, Neitzel B, Becker K, et al. Diagnostic yield and clinical relevance of expanded germline genetic testing for nearly 7000 suspected HBOC patients. *Eur J Hum Genet* [Internet]. agosto de 2023;31(8):925–30. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85159357136&doi=10.1038%2fs41431-023-01380-2&partnerID=40&md5=071c07ad7ace6331b3199f3d710f7419>
158. Heydt C, Ruesseler V, Pappesch R, Wagener S, Haak A, Siebolts U, et al. Comparison of in Situ and Extraction-Based Methods for the Detection of ROS1 Rearrangements in Solid Tumors. *J Mol Diagn* [Internet]. novembro de 2019;21(6):971–84. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85073317816&doi=10.1016%2fj.jmoldx.2019.06.006&partnerID=40&md5=45019165da7b947654d8acf0689c4ac0>
159. Hsieh YY, Kuo WL, Hsu WT, Tung SY, Li C. *Fusobacterium Nucleatum*-Induced Tumor Mutation Burden Predicts Poor Survival of Gastric Cancer Patients. *Cancers* [Internet]. janeiro de 2023;15(1):1–12. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85145895776&doi=10.3390%2fcancers15010269&partnerID=40&md5=0b290ed6d40e8270e5d88c4159c7ca4b>
160. Hwang J, Kim H, Han J, Lee J, Hong S, Kim S, et al. Identification of Survival-Specific Genes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Using a Customized Next-Generation Sequencing Gene Panel. *J Pers Med* [Internet]. janeiro de 2022;12(1):1–21. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85123173876&doi=10.3390%2fjpm12010113&partnerID=40&md5=027da015cb996f83190bbad75dc1e5f8>
161. Ito T, Matoba R, Maekawa H, Sakurada M, Kushida T, Orita H, et al. Detection of gene mutations in gastric cancer tissues using a commercial sequencing panel. *Mol Clin Oncol* [Internet]. novembro de 2019;11(5):455–60. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85073605379&doi=10.3892%2fmco.2019.1926&partnerID=40&md5=35e7dec24862890ae55c0b35d1a1b51d>
162. Kiyozumi Y, Matsubayashi H, Higashigawa S, Horiuchi Y, Kado N, Hirashima Y, et al. Role of tumor mutation burden analysis in detecting lynch syndrome in Precision Medicine: Analysis of 2,501 Japanese cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2021;30(1):166–74. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85100979950&doi=10.1158%2f1055-9965.EPI-20-0694&partnerID=40&md5=280953e463f5af23e71122178d52bd75>
163. Rescigno P, Gurel B, Pereira R, Crespo M, Rekowski J, Rediti M, et al. Characterizing CDK12-Mutated Prostate Cancers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* [Internet]. 15 de janeiro de 2021;27(2):566–74. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85100232800&doi=10.1158%2f1078-0432.CCR-20-2371&partnerID=40&md5=9ad901d2b49e06ec60c8f0c2c71afc73>
164. Jeong SY, Hong JY, Park JO, Park YS, Lim HY, Jang JY, et al. The efficacy of immune checkpoint inhibitors in biliary tract cancer with KRAS mutation. *Ther Adv Gastroenterol* [Internet]. 2023;16:1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->



85158088822&doi=10.1177%2f17562848231170484&partnerID=40&md5=aa7132f78faf6d56683dbd1b136b269c

165. Jeong SY, Park YS, Lee J, Jang J, Jeon Y, Jung YJ, et al. Tumor mutation burden in gastro-entero-pancreatic-neuroendocrine neoplasms. *J Gastrointest Oncol* [Internet]. 31 de agosto de 2023;14(4):1707–14. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85173940920&doi=10.21037%2fjgo-22-1190&partnerID=40&md5=72b72bc766e3b1809c91d17bc5f7cb2e>
166. Jia B, Xia P, Dong J, Feng W, Wang W, Liu E, et al. Genetic testing and prognosis of sarcomatoid hepatocellular carcinoma patients. *Front Oncol* [Internet]. 2022;12:1–13. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85147225703&doi=10.3389%2ffonc.2022.1086908&partnerID=40&md5=fdb49339c7bdf3887ed1406bb30cd739>
167. Kartti S, Bouricha EM, Zarrik O, Aghlallou Y, Mounjid C, ELJaoudi R, et al. Targeted Gene Panel Sequencing Unveiled New Pathogenic Mutations in Patients With Breast Cancer. *Bioinforma Biol Insights* [Internet]. junho de 2023;17:1–10. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85163690708&doi=10.1177%2f11779322231182054&partnerID=40&md5=47d15dee1eacc5a9cee74026ee99428e>
168. Kaur HB, Salles DC, Paulk A, Epstein JI, Eshleman JR, Lotan TL. PIN-like ductal carcinoma of the prostate has frequent activating RAS/RAF mutations. *Histopathology* [Internet]. janeiro de 2021;78(2):327–33. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85091386495&doi=10.1111%2fhis.14224&partnerID=40&md5=0f327ebf3d1161e325893bec9fe5da3d>
169. Keup C, Storbeck M, Hauch S, Hahn P, Sprenger-Haussels M, Tewes M, et al. Cell-Free DNA Variant Sequencing Using CTC-Depleted Blood for Comprehensive Liquid Biopsy Testing in Metastatic Breast Cancer. *Cancers* [Internet]. fevereiro de 2019;11(2):1–14. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85063587898&doi=10.3390%2fcancers11020238&partnerID=40&md5=4e2163c53e34bbaba840d5d8f0e5fa9d>
170. Keup C, Benyaa K, Hauch S, Sprenger-Haussels M, Tewes M, Mach P, et al. Targeted deep sequencing revealed variants in cell-free DNA of hormone receptor-positive metastatic breast cancer patients. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. fevereiro de 2020;77(3):497–509. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85068330544&doi=10.1007%2fs00018-019-03189-z&partnerID=40&md5=fddbf81413c951666ad7468592cd03c5>
171. Kit OI, Trifanov VS, Petrusenko NA, Gvaldin DY, Kutilin DS, Timoshkina NN. Identification of new candidate genes and signalling pathways associated with the development of neuroendocrine pancreatic tumours based on next generation sequencing data. *Mol Biol Rep* [Internet]. junho de 2020;47(6):4233–43. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85085342555&doi=10.1007%2fs11033-020-05534-z&partnerID=40&md5=8dd721f6374f8a4b16b87e8bd31ead5a>



172. Kleo K, Jovanovic VM, Arndold A, Lehmann A, Lammert H, Berg E, et al. Response prediction in patients with gastric and esophagogastric adenocarcinoma under neoadjuvant chemotherapy using targeted gene expression analysis and next-generation sequencing in pre-therapeutic biopsies. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. março de 2023;149(3):1049–61. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85125633170&doi=10.1007%2fs00432-022-03944-z&partnerID=40&md5=d4061d6034a40ca8e8ecd1834d4fe6ba>
173. Kuang S, Chen K, Sayal S, Prabahan G, Rabey MR, Le LW, et al. Repeat Next-Generation Sequencing (15-Gene Panel) in Unifocal, Synchronous, and Metachronous Non-Small-Cell Lung Cancer-A Single-Center Experience. *Curr Oncol* [Internet]. agosto de 2024;31(8):4476–85. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85202602411&doi=10.3390%2fcurroncol31080334&partnerID=40&md5=f2b5986a79a88cb396a56e92203ce15d>
174. Laraqui A, Cavaillé M, Uhrhammer N, ElBiad O, Bidet Y, El Rhaffouli H, et al. Identification of a novel pathogenic variant in PALB2 and BARD1 genes by a multigene sequencing panel in triple negative breast cancer in Morocco. *J Genomics*. 2021;9:43–54.
175. Lee S, Kim HY, Jung YJ, Jung CS, Im D, Kim JY, et al. Comparison of mutational profiles between triple-negative and hormone receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancers in T2N0-1M0 stage: Implications of TP53 and PIK3CA mutations in Korean early-stage breast cancers. *Curr Probl Cancer* [Internet]. abril de 2022;46(2):1–11. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85124614369&doi=10.1016%2fj.currproblcancer.2022.100843&partnerID=40&md5=adb43f112bb399f63c852fb3df25f134>
176. Machlowska J, Kapusta P, Baj J, Morsink FHM, Wołkow P, Maciejewski R, et al. High-Throughput Sequencing of Gastric Cancer Patients: Unravelling Genetic Predispositions Towards an Early-Onset Subtype. *Cancers* [Internet]. julho de 2020;12(7):1–14. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85088248674&doi=10.3390%2fcancers12071981&partnerID=40&md5=62a93b8f951b6a2f66334fccc7b25c24>
177. Machnicki MM, Górniak P, Pępek M, Szymczyk A, Iskierka-Jądzewska E, Steckiewicz P, et al. Predictive significance of selected gene mutations in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib. *Eur J Haematol*. março de 2021;106(3):320–6.
178. McCabe MJ, Gauthier MEA, Chan CL, Thompson TJ, De Sousa SMC, Puttick C, et al. Development and validation of a targeted gene sequencing panel for application to disparate cancers. *Sci Rep* [Internet]. 19 de novembro de 2019;9(1):1–16. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85075200306&doi=10.1038%2fs41598-019-52000-3&partnerID=40&md5=c056a6c3b9412d28d6ef4dbf1b489ecd>
179. Mitiushkina NV, Tiurin VI, Anuskina AA, Bordovskaya NA, Shestakova AD, Martianov AS, et al. Molecular Analysis of Biliary Tract Cancers with the Custom 3' RACE-Based NGS Panel. *Diagn Basel Switz* [Internet]. outubro de 2023;13(20):1–16. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->



85175461789&doi=10.3390%2fdiagnostics13203168&partnerID=40&md5=6199145c38061847dbca6da9a36d26db

180. Mosteiro M, Azuara D, Villatoro S, Alay A, Gausachs M, Varela M, et al. Molecular profiling and feasibility using a comprehensive hybrid capture panel on a consecutive series of non-small-cell lung cancer patients from a single centre. *ESMO Open*. dezembro de 2023;8(6):1–10.
181. Mueller SA, Gauthier MEA, Blackburn J, Grady JP, Kraitsek S, Hajdu E, et al. Molecular patterns in salivary duct carcinoma identify prognostic subgroups. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc [Internet]*. outubro de 2020;33(10):1896–909. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85085471863&doi=10.1038%2fs41379-020-0576-2&partnerID=40&md5=e842ede26e93f6318a377f6db0c7412e>
182. Nagy N, Reis H, Hadaschik B, Niedworok C, Módos O, Szendrői A, et al. Prevalence of APC and PTEN Alterations in Urachal Cancer. *Pathol Oncol Res [Internet]*. outubro de 2020;26(4):2773–81. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85089071808&doi=10.1007%2fs12253-020-00872-6&partnerID=40&md5=d7897291ecacd3b104ae4dcf43f4b8a0>
183. Nishida H, Kondo Y, Kusaba T, Kawamura K, Oyama Y, Daa T. CD8/PD-L1 immunohistochemical reactivity and gene alterations in cutaneous squamous cell carcinoma. *PloS One [Internet]*. 13 de fevereiro de 2023;18(2):1–11. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85147904963&doi=10.1371%2fjournal.pone.0281647&partnerID=40&md5=d0525c207b0472f82094cc3cc2e650f9>
184. Park CK, Cho NH. Differences in genomic profile of high-grade urothelial carcinoma according to tumor location. *Urol Oncol Semin Orig Investig [Internet]*. março de 2022;40(3):109.e1–109.e9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85117413025&doi=10.1016%2fj.urolonc.2021.08.019&partnerID=40&md5=02e52c6d86695caa98552f89aa1f02fd>
185. Pestinger V, Smith M, Sillo T, Findlay JM, Laes JF, Martin G, et al. Use of an Integrated Pan-Cancer Oncology Enrichment Next-Generation Sequencing Assay to Measure Tumour Mutational Burden and Detect Clinically Actionable Variants. *Mol Diagn Ther [Internet]*. junho de 2020;24(3):339–49. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85084119440&doi=10.1007%2fs40291-020-00462-x&partnerID=40&md5=ccf9800bfe44272d60062769d72c9df0>
186. Poliani L, Greco L, Barile M, Dal Buono A, Bianchi P, Basso G, et al. Canonical and uncanonical pathogenic germline variants in colorectal cancer patients by next-generation sequencing in a European referral center. *ESMO Open [Internet]*. dezembro de 2022;7(6):1–8. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85141683581&doi=10.1016%2fj.esmoop.2022.100607&partnerID=40&md5=8b7604aac4e794f8f55eb91aed4b5b38>
187. Radefeldt M, Stellmacher-Kaiser S, Krake S, Kragl B, Lemke S, Beetz C, et al. Basic ctDNA Panel Promises Affordable Clinical Validity in Colon Cancer Patients but Not in Pancreas Cancer Patients.



Life Basel Switz [Internet]. dezembro de 2023;13(12):1–11. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85192799114&doi=10.3390%2flife13122274&partnerID=40&md5=6d028571d78992137e6b97bbb8db16bb>

188. Rosenthal SH, Gerasimova A, Ma C, Li HR, Grupe A, Chong H, et al. Analytical validation and performance characteristics of a 48-gene next-generation sequencing panel for detecting potentially actionable genomic alterations in myeloid neoplasms. *PloS One* [Internet]. 2021;16(4):1–21. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85105102665&doi=10.1371%2fjournal.pone.0243683&partnerID=40&md5=c311be4f8ce7c06167182ba3688cf4e7>
189. Schroeder C, Gatidis S, Kelemen O, Schütz L, Bonzheim I, Muyas F, et al. Tumour-informed liquid biopsies to monitor advanced melanoma patients under immune checkpoint inhibition. *Nat Commun*. 9 de outubro de 2024;15(1):1–9.
190. Shi Z, Lopez J, Kalliney W, Sutton B, Simpson J, Maggert K, et al. Development and evaluation of ActSeq: A targeted next-generation sequencing panel for clinical oncology use. *PloS One* [Internet]. 2022;17(4):1–16. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85128603446&doi=10.1371%2fjournal.pone.0266914&partnerID=40&md5=c1979f59b49c4a26e0764dae1a261eb4>
191. Sjöstedt S, Schmidt AY, Vieira FG, Willemoe GL, Agander TK, Olsen C, et al. Major driver mutations are shared between sinonasal intestinal-type adenocarcinoma and the morphologically identical colorectal adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. abril de 2021;147(4):1019–27. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85092457583&doi=10.1007%2fs00432-020-03421-5&partnerID=40&md5=689bc3c57dbfad3a8b86318e4b5c1b4e>
192. Stradella A, Gargallo P, Cejuela M, Petit A, Bosch-Schips J, Carbonell P, et al. Genomic characterization and tumor evolution in paired samples of metaplastic breast carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* [Internet]. agosto de 2022;35(8):1066–74. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85125101032&doi=10.1038%2fs41379-022-01017-7&partnerID=40&md5=5c19f206674dbcc0a6cdfef6ee3178da>
193. Tsaousis GN, Papadopoulou E, Apessos A, Agiannitopoulos K, Pepe G, Kampouri S, et al. Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: novel and multiple pathogenic mutations. *BMC Cancer* [Internet]. 3 de junho de 2019;19(1):1–19. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85066855192&doi=10.1186%2fs12885-019-5756-4&partnerID=40&md5=f08f97fe725216406a0054868f76709b>
194. Udar N, Iyer A, Porter M, Haigis R, Smith S, Dhillon S, et al. Development and Analytical Validation of a DNA Dual-Strand Approach for the US Food and Drug Administration–Approved Next-Generation Sequencing–Based Praxis Extended RAS Panel for Metastatic Colorectal Cancer Samples. *J Mol Diagn* [Internet]. fevereiro de 2020;22(2):159–78. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->



85078715523&doi=10.1016%2fj.jmoldx.2019.09.009&partnerID=40&md5=20cb98a28aa10b7
Ode628f644e2558e7

195. Vicente-Garcés C, Esperanza-Cebollada E, Montesdeoca S, Torrebadell M, Rives S, Dapena JL, et al. Technical Validation and Clinical Utility of an NGS Targeted Panel to Improve Molecular Characterization of Pediatric Acute Leukemia. *Front Mol Biosci* [Internet]. 7 de abril de 2022;9:1–15. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85128688590&doi=10.3389%2ffmolb.2022.854098&partnerID=40&md5=29019a94647610bf3c56bf9d01af1d63>
196. Xu L, Shen L, Polski A, Prabakar RK, Shah R, Jubran R, et al. Simultaneous identification of clinically relevant RB1 mutations and copy number alterations in aqueous humor of retinoblastoma eyes. *Ophthalmic Genet* [Internet]. 1 de novembro de 2020;41(6):526–32. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85089545397&doi=10.1080%2f13816810.2020.1799417&partnerID=40&md5=e2e097941704c873f5de3319d2dd160e>
197. Yamamoto S, Sakamoto Y, Nakano S, Fujii K, Ueda K, Okumura Y, et al. Next-generation sequencing assay in salivary gland cytology: A pilot study. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* [Internet]. novembro de 2020;49(10):1037–43. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85091724750&doi=10.1111%2fjop.13109&partnerID=40&md5=933cc4750a46cf6d2430a141544ed3cb>
198. Yang PS, Chao YT, Lung CF, Liu CL, Chang YC, Li KC, et al. Association of Pathway Mutations With Survival in Taiwanese Breast Cancers. *Front Oncol* [Internet]. 2022;12:1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85135453046&doi=10.3389%2ffonc.2022.819555&partnerID=40&md5=faa144c238c84a150f6a32ccc32debdb>
199. Fielding D, Lakis V, Dalley AJ, Chittoory H, Newell F, Koufariotis LT, et al. Evaluation of Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration (EBUS-TBNA) Samples from Advanced Non-Small Cell Lung Cancer for Whole Genome, Whole Exome and Comprehensive Panel Sequencing. *Cancers* [Internet]. janeiro de 2024 [citado 16 de março de 2025];16(4):1–20. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/16/4/785>
200. Ottestad AL, Huang M, Emdal EF, Mjelle R, Skarpeteig V, Dai HY. Assessment of Two Commercial Comprehensive Gene Panels for Personalized Cancer Treatment. *J Pers Med* [Internet]. janeiro de 2023;13(1):1–12. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85146668340&doi=10.3390%2fjpm13010042&partnerID=40&md5=3ee57bccc4fda89b0780ff3a50c2d5dd>
201. Chang JWC, Huang CJ, Huang WK, Wang YC, Hsieh JJ, Chang YY, et al. Genomic and tumour microenvironmental biomarkers of immune checkpoint inhibitor response in advanced Taiwanese melanoma. *Clin Transl Immunol* [Internet]. 2023;12(8):1–13. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85169169089&doi=10.1002%2fcti2.1465&partnerID=40&md5=7874e5bc5b3c13ad7f56770efd054609>



202. Pepe F, Pisapia P, Gristina V, Rocco D, Micheli M, Micheli P, et al. Tumor mutational burden on cytological samples: A pilot study. *Cancer Cytopathol* [Internet]. junho de 2021;129(6):460–7. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85098276732&doi=10.1002%2fcncy.22400&partnerID=40&md5=10cbd92b4ffac7bf59c96ff7b42c4cb0>
203. Tomlins SA, Hovelson DH, Harms P, Drewery S, Falkner J, Fischer A, et al. Development and Validation of StrataNGS, a Multiplex PCR, Semiconductor Sequencing–Based Comprehensive Genomic Profiling Test. *J Mol Diagn* [Internet]. novembro de 2021;23(11):1515–33. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85115937789&doi=10.1016%2fj.jmoldx.2021.08.005&partnerID=40&md5=0375dbb046272f3836d9623c2d41378b>
204. Thakur S, Rathor A, Jain S, Nambirajan A, Khurana S, Malik PS, et al. Pleural effusion supernatant: a reliable resource for cell-free DNA in molecular testing of lung cancer. *J Am Soc Cytopathol* [Internet]. 2024;13(4):291–302. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85192078041&doi=10.1016%2fj.jasc.2024.03.006&partnerID=40&md5=86e81276bbb9ab6810821b5b2cabf32d>
205. Alanazi M, Parine NR, Shaik JP, Al Naeem A, Aldhaian S. Targeted sequencing of crucial cancer causing genes of breast cancer in Saudi patients. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. outubro de 2020;27(10):2651–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85087373637&doi=10.1016%2fj.sjbs.2020.05.047&partnerID=40&md5=116aeadd4284e8034efb459bf8453311>
206. Bayle A, Basile D, Garinet S, Rance B, Laurent–Puig P, Blons H, et al. Next-Generation Sequencing Targeted Panel in Routine Care for Metastatic Colon Cancers. *Cancers* [Internet]. novembro de 2021;13(22):1–13. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85119073466&doi=10.3390%2fcancers13225750&partnerID=40&md5=e73d257ebee641b1f802c3712d84d471>
207. Beinse G, Just PA, Rance B, Izac B, Letourneur F, Saidu NEB, et al. The NRF2 transcriptional target NQO1 has low mRNA levels in TP53–mutated endometrial carcinomas. *PloS One* [Internet]. 25 de março de 2019;14(3):1–19. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85063576807&doi=10.1371%2fjournal.pone.0214416&partnerID=40&md5=22edd83af65c99537f672b1e02f1a991>
208. Bergholtz H, Kumar S, Wärnberg F, Lüders T, Kristensen V, Sørli T. Comparable cancer-relevant mutation profiles in synchronous ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Cancer Rep Hoboken NJ* [Internet]. junho de 2020;3(3):1–7. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85085623801&doi=10.1002%2fcnr.2.1248&partnerID=40&md5=821ec501ef1214ba0f49a160b1932ae9>
209. Braicu C, Buiga R, Cojocneanu R, Buse M, Raduly L, Pop LA, et al. Connecting the dots between different networks: miRNAs associated with bladder cancer risk and progression. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 29 de outubro de 2019;38(1):1–17. Disponível em:



<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85074442310&doi=10.1186%2fs13046-019-1406-6&partnerID=40&md5=1b0d834749e52c7849d2e0404badb44f>

210. Fleming JL, Pugh SL, Fisher BJ, Lesser GJ, Macdonald DR, Bell EH, et al. Long-Term Report of a Comprehensive Molecular and Genomic Analysis in NRG Oncology/RTOG 0424: A Phase II Study of Radiation and Temozolomide in High-Risk Grade II Glioma. *JCO Precis Oncol* [Internet]. agosto de 2021;5:1397–407. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85117730687&doi=10.1200%2fP0.21.00112&partnerID=40&md5=046e4a63f444c5fcd0c254af9021db86>
211. Fujita S, Masago K, Sasaki E, Tsukushi S, Horio Y, Kuroda H, et al. Weak-evidence Fusion Candidates Detected by a FusionPlex Assay Using the Ion Torrent System. *Vivo Athens Greece* [Internet]. abril de 2021;35(2):993–8. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85101926796&doi=10.21873%2fINVIVO.12342&partnerID=40&md5=74fd32836086afcf93abd5a6515ee268>
212. Gupta P, Saha K, Vinarkar S, Banerjee S, Choudhury SS, Parihar M, et al. Next generation sequencing in lung cancer: An initial experience from India. *Curr Probl Cancer* [Internet]. junho de 2020;44(3):1–11. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85081916844&doi=10.1016%2fj.crrprc.2020.100562&partnerID=40&md5=6558f5329198a13fb6759f3b8bf2aa9c>
213. Gutiérrez Pérez C, Lastra Aras E, Saiz López P, García Toro E, Blanco Abad C, Rodríguez Ledesma I, et al. Single-center analysis of a real-world cohort of patients with metastatic urothelial carcinoma evaluated by NGS: molecular landscape and efficacy of targeted therapies. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. 15 de agosto de 2024;27:1211–20.
214. Hemissi I, Boussetta S, Dallali H, Hellal F, Durand G, Voegelé C, et al. Development of a custom next-generation sequencing panel for the determination of bladder cancer risk in a Tunisian cohort. *Mol Biol Rep* [Internet]. fevereiro de 2022;49(2):1233–58. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85120382171&doi=10.1007%2fs11033-021-06951-4&partnerID=40&md5=356aeb87cbfaedbe1c6f6188fbd71bed>
215. Hobeck AD, Wendt S, Krohn S, Knuebel G, Bartels S, Schipper E, et al. Comparative Analyses of Targeted Myeloid Cancer Next-Generation Sequencing Panel in Fresh Blood, Bone Marrow and FFPE Material. *Int J Mol Sci* [Internet]. março de 2024;25(6):1–15. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85189008605&doi=10.3390%2fijms25063534&partnerID=40&md5=5fb01a0649dc7429fb0ae14d52a4446f>
216. Huang CC, Liu CY, Huang CJ, Hsu YC, Lien HH, Wong JU, et al. Deciphering Genetic Alterations of Taiwanese Patients with Pancreatic Adenocarcinoma through Targeted Sequencing. *Int J Mol Sci* [Internet]. fevereiro de 2022;23(3):1–15. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85123642048&doi=10.3390%2fijms23031579&partnerID=40&md5=218772f14d74e1aacedc01d9db644504>



217. Iurca I, Isakescu E, Pop LA, Budisan L, Pirlog R, Harangus A, et al. Next-generation sequencing as a valuable tool for mutational spectrum in advanced-stage NSCLC patients. *Med Pharm Rep* [Internet]. 2024;97(3):298–307. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85200369076&doi=10.15386%2fmpr-2763&partnerID=40&md5=abc13682f99d0d7b00bf8f55c2ae5257>
218. Ivanov M, Chernenko P, Breder V, Laktionov K, Rozhavskaia E, Musienko S, et al. Utility of cfDNA Fragmentation Patterns in Designing the Liquid Biopsy Profiling Panels to Improve Their Sensitivity. *Front Genet* [Internet]. 12 de março de 2019;10:1–12. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85066606605&doi=10.3389%2ffgene.2019.00194&partnerID=40&md5=61c79d5d671ff71c1bd981e628fb4cbe>
219. Jayaprakash C, Varghese VK, Jayaram P, Chakrabarty S, Kudva A, Ray S, et al. Relevance and actionable mutational spectrum in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* [Internet]. maio de 2020;49(5):427–34. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85077903119&doi=10.1111%2fjop.12985&partnerID=40&md5=0832a332638b0510ffe622615306aebc>
220. Kocsis-Deák B, Árvai K, Balla B, Tóbiás B, Kohánka A, Járny B, et al. Targeted Mutational Profiling and a Powerful Risk Score as Additional Tools for the Diagnosis of Papillary Thyroid Cancer. *Pathol Oncol Res* [Internet]. janeiro de 2020;26(1):101–8. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85075385573&doi=10.1007%2fs12253-019-00772-4&partnerID=40&md5=24c736634ad74f0b6015c67274d79de5>
221. Manca A, Paliogiannis P, Colombino M, Casula M, Lissia A, Botti G, et al. Mutational concordance between primary and metastatic melanoma: a next-generation sequencing approach. *J Transl Med* [Internet]. 28 de agosto de 2019;17(1):1–10. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85071640531&doi=10.1186%2fs12967-019-2039-4&partnerID=40&md5=d9104af26365d6753b37fde3adb04ca3>
222. Messaoudi SA, Al Sharhan NA, Alharthi B, Babu SR, Alsaleh AB, Alasiri AM, et al. Detection of genetic mutations in patients with breast cancer from Saudi Arabia using Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v.2.0. *Biomed Rep* [Internet]. abril de 2022;16(4):1–13. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85127760459&doi=10.3892%2fBR.2022.1509&partnerID=40&md5=9d5583010d676f594422aae7b95f5b5c>
223. Nassar A, Abouelhoda M, Mansour O, Loutfy SA, Hafez MM, Gomaa M, et al. Targeted next generation sequencing identifies somatic mutations in a cohort of Egyptian breast cancer patients. *J Adv Res* [Internet]. julho de 2020;24:149–57. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85083317806&doi=10.1016%2fj.jare.2020.04.001&partnerID=40&md5=1c480e698e41969925864360ce0f8a5e>



224. Normanno N, Machado JC, Pescarmona E, Buglioni S, Navarro L, Esposito Abate R, et al. European Real-World Assessment of the Clinical Validity of a CE-IVD Panel for Ultra-Fast Next-Generation Sequencing in Solid Tumors. *Int J Mol Sci* [Internet]. setembro de 2023;24(18):1–11. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85172803895&doi=10.3390%2fijms241813788&partnerID=40&md5=b2d941dde66255f4a91904bf785bfb11>
225. Olbryt M, Pigłowski W, Rajczykowski M, Pfeifer A, Student S, Fiszer-Kierzkowska A. Genetic Profiling of Advanced Melanoma: Candidate Mutations for Predicting Sensitivity and Resistance to Targeted Therapy. *Target Oncol* [Internet]. fevereiro de 2020;15(1):101–13. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85078427536&doi=10.1007%2fs11523-020-00695-0&partnerID=40&md5=91bc57d516bb5cb9a541aff82e180f11>
226. Olbryt M, Rajczykowski M, Bal W, Fiszer-Kierzkowska A, Cortez AJ, Mazur M, et al. NGS Analysis of Liquid Biopsy (LB) and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Melanoma Samples Using Oncomine™ Pan-Cancer Cell-Free Assay. *Genes* [Internet]. julho de 2021;12(7):1–12. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85111386174&doi=10.3390%2fgenes12071080&partnerID=40&md5=87297184d715843efad99ea15a00bfa9>
227. Park J, Yoo HM, Sul HJ, Shin S, Lee SW, Kim JG. Genetic Characterization of Molecular Targets in Korean Patients with Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Gastric Cancer* [Internet]. março de 2020;20(1):29–40. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85087887726&doi=10.5230%2fjgc.2020.20.e2&partnerID=40&md5=fd64aa89c7cf17201e3fae1c81113cb7>
228. Payungwong T, Angkulkreerkrai K, Chaiboonchoe A, Lausoontornsiri W, Jirawatnotai S, Chindavijak S. Comparison of mutation landscapes of pretreatment versus recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity: The possible mechanism of resistance to standard treatment. *Cancer Rep Hoboken NJ* [Internet]. março de 2024;7(3):1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85187868876&doi=10.1002%2fcnr.2.2004&partnerID=40&md5=8a141db28db3fb8748110d7c79b90f06>
229. Rao U, Schoedel KE, Petrosko P, Sakai N, LaFramboise W. Genetic variants and copy number changes in soft tissue leiomyosarcoma detected by targeted amplicon sequencing. *J Clin Pathol* [Internet]. dezembro de 2019;72(12):810–6. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85069497909&doi=10.1136%2fjclinpath-2019-205998&partnerID=40&md5=7ab45fe2d07775e80c69f16fcfb9c795>
230. Ritter M, Paradiso V, Widmer P, Garofoli A, Quagliata L, Eppenberger-Castori S, et al. Identification of Somatic Mutations in Thirty-year-old Serum Cell-free DNA From Patients With Breast Cancer: A Feasibility Study. *Clin Breast Cancer* [Internet]. outubro de 2020;20(5):413–421.e1. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85087740439&doi=10.1016%2fj.clbc.2020.04.005&partnerID=40&md5=46f2d4a77d7f65af19d3cda0167825c2>



231. Sande CM, Wu R, Yang G, Sussman RT, Bigdeli A, Rushton C, et al. Rapid and Automated Semiconductor-Based Next-Generation Sequencing for Simultaneous Detection of Somatic DNA and RNA Aberrations in Myeloid Neoplasms. *J Mol Diagn JMD*. fevereiro de 2023;25(2):87–93.
232. Sestokaite A, Gedvilaite V, Cicenass S, Sabaliauskaite R, Jarmalaite S. Surveillance of cfDNA Hot Spot Mutations in NSCLC Patients during Disease Progression. *Int J Mol Sci [Internet]*. abril de 2023;24(8):1–14. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85156153047&doi=10.3390%2fijms24086958&partnerID=40&md5=35a66458c6a5d22d8dbf8a285f75146>
233. Seto K, Masago K, Fujita S, Haneda M, Horio Y, Hida T, et al. Targeted RNA sequencing with touch imprint cytology samples for non-small cell lung cancer patients. *Thorac Cancer [Internet]*. julho de 2020;11(7):1827–34. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85085112307&doi=10.1111%2f1759-7714.13460&partnerID=40&md5=7c6030d9ded6cbcd0c54d491e9ed1712>
234. Shah OS, Soran A, Sahin M, Knapick BA, Ugras S, Celik E, et al. Identifying Genomic Alterations in Patients With Stage IV Breast Cancer Using MammaSeq: An International Collaborative Study. *Clin Breast Cancer [Internet]*. junho de 2021;21(3):210–7. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85096139809&doi=10.1016%2fj.clbc.2020.08.009&partnerID=40&md5=0ee01ae918fee774b6061eb57c199153>
235. Smith NG, Gyanchandani R, Shah OS, Gurda GT, Lucas PC, Hartmaier RJ, et al. Targeted mutation detection in breast cancer using MammaSeq™. *Breast Cancer Res [Internet]*. 8 de fevereiro de 2019;21(1):1–11. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85061277053&doi=10.1186%2fs13058-019-1102-7&partnerID=40&md5=7696533383caa302ec622bb1d1a8b9a2>
236. Sun WY, Lee J, Kim BK, Kim JO, Park J. Distinct Somatic Alteration Features Identified by Gene Panel Sequencing in Korean Triple-Negative Breast Cancer with High Ki67 Expression. *Diagn Basel Switz [Internet]*. março de 2021;11(3):1–11. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85108945405&doi=10.3390%2fdiagnostics11030416&partnerID=40&md5=9130d72335492e7c3b2b274858c32fa1>
237. Tavano F, Gioffreda D, Fontana A, Palmieri O, Gentile A, Latiano T, et al. Evaluation of inherited germline mutations in cancer susceptibility genes among pancreatic cancer patients: a single-center study. *Mol Med Camb Mass [Internet]*. 30 de janeiro de 2023;29(1):1–12. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85147023867&doi=10.1186%2fs10020-023-00600-1&partnerID=40&md5=f9b6aa5718b34098c6fc765fe9d12bb9>
238. Wang J, Gerrard G, Poskitt B, Dawson K, Trivedi P, Foroni L, et al. Targeted next generation sequencing of pancreatic solid pseudopapillary neoplasms show mutations in Wnt signaling pathway genes. *Pathol Int [Internet]*. abril de 2019;69(4):193–201. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85062360175&doi=10.1111%2fpin.12778&partnerID=40&md5=c945305ec22abc9d67e0a94b0b2feeae>



239. Wei R, Gao F, Zeng Z, Gui Z, Shang Y, Shen N, et al. Molecular profiling of gene fusions in soft tissue sarcomas by Ion AmpliSeq™: a study of 35 cases. *Transl Cancer Res.* março de 2022;11(3):488–99.
240. Winter H, Kaisaki PJ, Harvey J, Giacomuzzi E, Ferla MP, Pentony MM, et al. Identification of Circulating Genomic and Metabolic Biomarkers in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancers* [Internet]. dezembro de 2019;11(12):1–19. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85075888735&doi=10.3390%2fcancers11121895&partnerID=40&md5=ce43201199f1af2f3510cf24daf8e170>
241. Yildiz S, Musarurwa TN, Algar U, Chambuso R, Rebello G, Goldberg PA, et al. Genetic insights: High germline variant rate in an indigenous African cohort with early-onset colorectal cancer. *Front Oncol* [Internet]. 27 de outubro de 2023;13:1–17. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85176941711&doi=10.3389%2ffonc.2023.1253867&partnerID=40&md5=419baae1b95156da5ee4788bfe7a9497>
242. Youssef ASAD, Abdel-Fattah MA, Lotfy MM, Nassar A, Abouelhoda M, Touny AO, et al. Multigene Panel Sequencing Reveals Cancer-Specific and Common Somatic Mutations in Colorectal Cancer Patients: An Egyptian Experience. *Curr Issues Mol Biol* [Internet]. março de 2022;44(3):1332–52. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85127649440&doi=10.3390%2fcimb44030090&partnerID=40&md5=cb34f1eb0f51d8978f8e0c3f96225d18>
243. Izevbaye I, Liang LY, Mather C, El-Hallani S, Maglantay RJ, Saini L. Clinical Validation of a Myeloid Next-Generation Sequencing Panel for Single-Nucleotide Variants, Insertions/Deletions, and Fusion Genes. *J Mol Diagn JMD.* fevereiro de 2020;22(2):208–19.
244. Zbieranski N, Insuasti-Beltran G. Analytical Validation of an Automated Semiconductor-Based Next-Generation Sequencing Assay for Detection of DNA and RNA Alterations in Myeloid Neoplasms. *J Mol Diagn JMD.* janeiro de 2024;26(1):29–36.
245. Du Y, Zhang S, Zhang G, Hu J, Zhao L, Xiong Y, et al. Mutational profiling of Chinese patients with thyroid cancer. *Front Endocrinol.* 3 de julho de 2023;14:1–12.
246. Li W, Shao D, Li L, Wu M, Ma S, Tan X, et al. Germline and somatic mutations of multi-gene panel in Chinese patients with epithelial ovarian cancer: a prospective cohort study. *J Ovarian Res.* 31 de agosto de 2019;12(1):1–9.
247. Wan S, Gao Y, Wu S, Wang H, Tong J, Wei W, et al. Somatic mutation of targeted sequencing identifies risk stratification in advanced ovarian clear cell carcinoma. *Gynecol Oncol* [Internet]. dezembro de 2024 [citado 16 de março de 2025];191:56–66. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825824011430>
248. Yu D, Wang J, Zheng B, Yuan M, Gu D, Chen R, et al. Comprehensive genomic profiling of small bowel adenocarcinoma by tissue and plasma biopsy. *Genomics* [Internet]. 1 de janeiro de 2024 [citado 16 de março de 2025];116(1):1–13. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754323002100>



249. Nikolaidi A, Papadopoulou E, Haidopoulos D, Lontos M, Fountzilas E, Tsaousis G, et al. Molecular Alterations in Paired Epithelial Ovarian Tumors in Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancers* [Internet]. janeiro de 2024 [citado 16 de março de 2025];16(21):1–13. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/16/21/3580>
250. Lin Y, Li D, Hui H, Miao H, Luo M, Roy B, et al. Genomic landscape and tumor mutational features of resected preinvasive to invasive lung adenocarcinoma. *Front Oncol* [Internet]. 13 de maio de 2024 [citado 16 de março de 2025];14:1–9. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2024.1389618/full>
251. Hong L, Patel S, Drusbosky LM, Xiong Y, Chen R, Geng R, et al. Molecular landscape of ERBB2 alterations in 3000 advanced NSCLC patients. *Npj Precis Oncol* [Internet]. 1 de outubro de 2024 [citado 16 de março de 2025];8(1):1–11. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41698-024-00720-9>
252. Ding T, Li X, Zhang L, Wei Z, Xiong C, Wang H, et al. Comparison of androgen receptor mutation detection between plasma extracellular vesicle DNA and cell-free DNA and its relationship to prostate cancer prognosis. *Ann Med* [Internet]. 31 de dezembro de 2024 [citado 16 de março de 2025];56(1):1–10. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07853890.2024.2426770>
253. Chevrier S, Richard C, Mille M, Bertrand D, Boidot R. Nanopore adaptive sampling accurately detects nucleotide variants and improves the characterization of large-scale rearrangement for the diagnosis of cancer predisposition. *Clin Transl Med* [Internet]. janeiro de 2025 [citado 5 de abril de 2025];15(1):1–14. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ctm2.70138>
254. Hu T, Li J, Long M, Wu J, Zhang Z, Xie F, et al. Detection of Structural Variations and Fusion Genes in Breast Cancer Samples Using Third-Generation Sequencing. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 13 de abril de 2022;10:1–11. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85128845006&doi=10.3389%2ffcell.2022.854640&partnerID=40&md5=aed083bfc5ed88e29cbf0d2e33d2d178>
255. Patel A, Göbel K, Ille S, Hinz F, Schoebe N, Bogumil H, et al. Prospective, multicenter validation of a platform for rapid molecular profiling of central nervous system tumors. *Nat Med* [Internet]. 25 de março de 2025 [citado 5 de abril de 2025];31:1567–77. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-025-03562-5>
256. Grimes SM, Kim HS, Roy S, Sathe A, Ayala CI, Bai X, et al. Single-cell multi-gene identification of somatic mutations and gene rearrangements in cancer. *NAR Cancer* [Internet]. 9 de junho de 2023;5(3):1–17. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85165974854&doi=10.1093%2fnarcan%2fzcad034&partnerID=40&md5=786977a9aa259dfa8b3b95b7dc3e3ed0>
257. Schubert S, van Luttikhuisen JL, Auber B, Schmidt G, Hofmann W, Penkert J, et al. The identification of pathogenic variants in BRCA1/2 negative, high risk, hereditary breast and/or ovarian cancer patients: High frequency of FANCM pathogenic variants. *Int J Cancer* [Internet]. 1 de junho de 2019;144(11):2683–94. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85059898410&doi=10.1002%2fijc.31992&partnerID=40&md5=86f2f7975c72aa4c3faeac8e8443b1ad>



258. Fielding D, Dalley AJ, Singh M, Nandakumar L, Lakis V, Chittoory H, et al. Discrepancies in tumor mutation burden reporting from sequential endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration samples within single lymph node stations – brief report. *Front Oncol* [Internet]. 19 de outubro de 2023;13:1–10. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85175726299&doi=10.3389%2ffonc.2023.1259882&partnerID=40&md5=a027060f3c26df54d06d929439a74405>
259. Mundi N, Prokopec SD, Ghasemi F, Warner A, Patel K, MacNeil D, et al. Genomic and human papillomavirus profiling of an oral cancer cohort identifies TP53 as a predictor of overall survival. *Cancers Head Neck*. 2019;4:1–8.
260. Nacheva E, Ahyye T, Addada J, Navarette C, Pamphilon D, Regan F, et al. Absence of damaging effects of stem cell donation in unrelated donors assessed by FISH and gene variance screening. *Bone Marrow Transplant*. julho de 2020;55(7):1290–6.
261. Eefsen RL, Simonsen KS, Grundtvig P, Klarskov L, Chen IM, Høgdall D, et al. Genomic landscape of treatment refractory metastatic colorectal cancer. *Acta Oncol* [Internet]. 2021;60(12):1621–8. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85116353738&doi=10.1080%2f0284186X.2021.1984575&partnerID=40&md5=f176b03e7c0a8e819e08921bec3a38ce>
262. Beinse G, Rance B, Just PA, Izac B, Letourneur F, Saidu NEB, et al. Identification of TP53 mutated group using a molecular and immunohistochemical classification of endometrial carcinoma to improve prognostic evaluation for adjuvant treatments. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc* [Internet]. maio de 2020;30(5):640–7. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85082101356&doi=10.1136%2fijgc-2019-000871&partnerID=40&md5=b480cec424177f06143078ff85fd7d73>
263. Vassella E, Kashani E, Zens P, Kündig A, Fung C, Scherz A, et al. Mutational profiles of primary pulmonary adenocarcinoma and paired brain metastases disclose the importance of KRAS mutations. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* [Internet]. dezembro de 2021;159:227–36. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85118887782&doi=10.1016%2fj.ejca.2021.10.006&partnerID=40&md5=43b256e7c3520beed0d5288a510dd03c>
264. Kumar S, Bennett A, Campbell PA, Palidwor G, Lo B, Perkins TJ, et al. Costs of Next-Generation Sequencing Assays in Non-Small Cell Lung Cancer: A Micro-Costing Study. *Curr Oncol* [Internet]. agosto de 2022;29(8):5238–46. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85135133791&doi=10.3390%2fcurroncol29080416&partnerID=40&md5=693a71c988743baf85fab9ff0521c624>
265. El Zaitouni S, Laraqui A, Ghaouti M, Benzekri A, Kettani F, Boustany Y, et al. Genetic Profiling of Non-Small Cell Lung Cancer in Moroccan Patients by Targeted Next-Generation Sequencing. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2024;23:1–17. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85205605155&doi=10.1177%2f15330338241288907&partnerID=40&md5=d0b1e95b6d61f65c1028b0590bd1f0a6>



266. Bochtler T, Reiling A, Endris V, Hielscher T, Volckmar AL, Neumann O, et al. Integrated clinicomolecular characterization identifies RAS activation and CDKN2A deletion as independent adverse prognostic factors in cancer of unknown primary. *Int J Cancer* [Internet]. 1 de junho de 2020;146(11):3053–64. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85081750275&doi=10.1002%2fijc.32882&partnerID=40&md5=d1427ed70d2e9702400134c5fca4a178>
267. Agiannitopoulos K, Pepe G, Tsaousis GN, Potska K, Bouzarelou D, Katseli A, et al. Copy Number Variations (CNVs) Account for 10.8% of Pathogenic Variants in Patients Referred for Hereditary Cancer Testing. *Cancer Genomics Proteomics*. 2023;20(5):448–55.
268. Kunadirek P, Chuaypen N, Jenjaroenpun P, Wongsurawat T, Pinjaroen N, Sirichindakul P, et al. Cell-Free DNA Analysis by Whole-Exome Sequencing for Hepatocellular Carcinoma: A Pilot Study in Thailand. *Cancers* [Internet]. maio de 2021;13(9):1–15. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85105230025&doi=10.3390%2fcancers13092229&partnerID=40&md5=38547d770e4eb92561b1e7743167aad4>
269. Wang Y, Li J, Hao P, Li J, Han R, Lin J, et al. Integrated Whole-Exome and Transcriptome Sequencing Indicated Dysregulation of Cholesterol Metabolism in Eyelid Sebaceous Gland Carcinoma. *Transl Vis Sci Technol* [Internet]. fevereiro de 2023;12(2):1–13. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85147457679&doi=10.1167%2ftvst.12.2.4&partnerID=40&md5=9bba5ae681676d8e96cdd2f1463e24ae>
270. Kim D, Lee JY, Yoo JY, Cho JY. Genetic Features of Lung Adenocarcinoma with Ground- Glass Opacity: What Causes the Invasiveness of Lung Adenocarcinoma? *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*. 5 de outubro de 2020;53(5):250–7.
271. Niyomnaitham S, Parinyanitikul N, Roothumnong E, Jinda W, Samarnthai N, Atikankul T, et al. Tumor mutational profile of triple negative breast cancer patients in Thailand revealed distinctive genetic alteration in chromatin remodeling gene. *PeerJ* [Internet]. 25 de fevereiro de 2019;7(2):1–17. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85063697002&doi=10.7717%2fpeerj.6501&partnerID=40&md5=ae670bbeeb884cea562fc623f128818>
272. Moss EL, Gorsia DN, Collins A, Sandhu P, Foreman N, Gore A, et al. Utility of Circulating Tumor DNA for Detection and Monitoring of Endometrial Cancer Recurrence and Progression. *Cancers* [Internet]. agosto de 2020;12(8):1–13. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85089707779&doi=10.3390%2fcancers12082231&partnerID=40&md5=042c5e2d0df2c7330ca1d8329309a5c9>
273. Aboul-Soud MAM, Alzahrani AJ, Mahmoud A. Decoding variants in drug-metabolizing enzymes and transporters in solid tumor patients by whole-exome sequencing. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. janeiro de 2021;28(1):628–34. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85096555374&doi=10.1016%2fj.sjbs.2020.10.052&partnerID=40&md5=b326abe68b7f2fd169ae303c21918b4c>



274. Akkad N, Kodgule R, Duncavage EJ, Mehta-Shah N, Spencer DH, Watkins M, et al. Evaluation of Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma with Whole Exome and Genome Sequencing. *Aesthet Surg J* [Internet]. 21 de fevereiro de 2023;43(3):318–28. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85153179930&doi=10.1093%2fasj%2fsjac282&partnerID=40&md5=394d2d10bbbd70ea4f76319283339f38>
275. Alzahrani OR, Mir R, Alatwi HE, Hawsawi YM, Alharbi AA, Alessa AH, et al. Potential Impact of PI3K-AKT Signaling Pathway Genes, KLF-14, MDM4, miRNAs 27a, miRNA-196a Genetic Alterations in the Predisposition and Progression of Breast Cancer Patients. *Cancers* [Internet]. fevereiro de 2023;15(4):1–30. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85149108554&doi=10.3390%2fcancers15041281&partnerID=40&md5=b1e2ba6ae4adf750c5c8ccf2108b147a>
276. Aron M, Chandrashekar DS, Canete-Portillo S, Brimo F, Williamson SR, Osunkoya AO, et al. Nested and Large Nested Subtypes of Urothelial Carcinoma of the Upper Urinary Tract: A Multi-institutional Study. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* [Internet]. dezembro de 2023;36(12):1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85181177758&doi=10.1016%2fj.modpat.2023.100333&partnerID=40&md5=918cf49f0366f1179b1fb403a576998b>
277. Awotoye W, Whitt JC, Yoo B, Farooqi MS, Farrow EG, Allareddy V, et al. Genetic heterogeneity and enrichment of variants in DNA-repair genes in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* [Internet]. março de 2023;52(3):263–70. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85148658580&doi=10.1111%2fjop.13410&partnerID=40&md5=25a8ef5b6352e2fc5f2ab2afb9287edc>
278. Chang YS, Lee CC, Ke TW, Chang CM, Chao DS, Huang HY, et al. Molecular characterization of colorectal cancer using whole-exome sequencing in a Taiwanese population. *Cancer Med* [Internet]. julho de 2019;8(8):3738–47. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85069517236&doi=10.1002%2fcam4.2282&partnerID=40&md5=e8532a9ffe9b5dcc4727a81f1ffd5bb2>
279. Dacic S, Cao X, Bota-Rabassedas N, Sanchez-Espiridion B, Berezowska S, Han Y, et al. Genomic Staging of Multifocal Lung Squamous Cell Carcinomas Is Independent of the Comprehensive Morphologic Assessment. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* [Internet]. fevereiro de 2024;19(2):273–84. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85173284574&doi=10.1016%2fj.jtho.2023.09.275&partnerID=40&md5=0b27b13ca743554514c21153035bbf0d>
280. Duppala SK, Poleboyina PK, Kour B, Bale G, Vyas A, Pawar SC, et al. A Pilot Study Based on the Correlation Between Whole Exome and Transcriptome Reveals Potent Variants in the Indian Population of Cervical Cancer. *Indian J Microbiol* [Internet]. setembro de 2024;64(3):1222–45. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85193709113&doi=10.1007%2fs12088-024-01295-6&partnerID=40&md5=877c1d1c82be10cbf4a8bcaad28f4333>



281. He Y, Huang W, Tang Y, Li Y, Peng X, Li J, et al. Clinical and genetic characteristics in pancreatic cancer from Chinese patients revealed by whole exome sequencing. *Front Oncol* [Internet]. 2023;13:1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85161805579&doi=10.3389%2ffonc.2023.1167144&partnerID=40&md5=d4305f15729c7a7f2bb117d41ebdd342>
282. Iqbal Z, Absar M, Akhtar T, Aleem A, Jameel A, Basit S, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies ANKRD36 Gene as a Novel and Common Biomarker of Disease Progression in Chronic Myeloid Leukemia. *Biology*. novembro de 2021;10(11):1–16.
283. Kim S, Kim S, Mun S, Kwak Y, Suh KS, Choi SY, et al. Whole-exome sequencing reveals rare genetic variations in ovarian granulosa cell tumor. *Bosn J Basic Med Sci* [Internet]. 1 de junho de 2022;22(3):403–11. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85131270477&doi=10.17305%2fbjbm.2021.6789&partnerID=40&md5=0eba9dc8f2052882cfdb416023895b2c>
284. Kudryavtseva AV, Lukyanova EN, Kalinin DV, Zaretsky AR, Pokrovsky AV, Golovyuk AL, et al. Mutational load in carotid body tumor. *BMC Med Genomics*. março de 2019;12(2):23–34.
285. Kumari N, Singh RK, Mishra SK, Krishnani N, Mohindra S, L R. Identification of PI3K-AKT signaling as the dominant altered pathway in intestinal type ampullary cancers through whole-exome sequencing. *J Pathol Transl Med* [Internet]. maio de 2021;55(3):192–201. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85106645658&doi=10.4132%2fjptm.2021.01.23&partnerID=40&md5=0731337aa23f0bb9055d457edb612c1a>
286. Liang Y, Jiang L, Zhong X, Hochwald SN, Wang Y, Huang L, et al. Discovery of Aberrant Alteration of Genome in Colorectal Cancer by Exome Sequencing. *Am J Med Sci* [Internet]. novembro de 2019;358(5):340–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85070888359&doi=10.1016%2fj.amjms.2019.07.012&partnerID=40&md5=f6869cfea4544fb8dc470d52c3c78663>
287. Liao CT, Yang LY, Lee LY, Lin CY, Wang HM, Ng SH, et al. Whole-exome sequencing identifies biosignatures that predict adverse survival outcomes in surgically treated patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. novembro de 2021;122:1–10. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85117710161&doi=10.1016%2fj.oraloncology.2021.105547&partnerID=40&md5=1080054f506587fcba1570bbe31463d1>
288. Lim SM, Kim E, Jung KH, Kim S, Koo JS, Kim SI, et al. Genomic landscape of extraordinary responses in metastatic breast cancer. *Commun Biol* [Internet]. 9 de abril de 2021;4(1):1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85104158340&doi=10.1038%2fs42003-021-01973-x&partnerID=40&md5=48de46c4f678d3b60dfcf93ceb557072>
289. Peculis R, Mandrika I, Petrovska R, Dortane R, Megnis K, Nazarovs J, et al. Pituispheres Contain Genetic Variants Characteristic to Pituitary Adenoma Tumor Tissue. *Front Endocrinol* [Internet]. 2020;11:1–12. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->



85087543034&doi=10.3389%2ffendo.2020.00313&partnerID=40&md5=95bd541da2ba628924f95c67b0d060e3

290. Peculis R, Rovite V, Megnis K, Balcere I, Breiksa A, Nazarovs J, et al. Whole exome sequencing reveals novel risk genes of pituitary neuroendocrine tumors. *PloS One*. 2022;17(8):1–12.
291. Prieske K, Alawi M, Oliveira-Ferrer L, Jaeger A, Eylmann K, Burandt E, et al. Genomic characterization of vulvar squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol* [Internet]. setembro de 2020;158(3):547–54. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85086778113&doi=10.1016%2fj.ygyno.2020.06.482&partnerID=40&md5=190122e9e1e7d8f4a95d8826c2a30c06>
292. Singh V, Katiyar A, Malik P, Kumar S, Mohan A, Singh H, et al. Identification of molecular biomarkers associated with non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) using whole-exome sequencing. *Cancer Biomark*. 17 de março de 2025;41(3–4):1–18.
293. Snezhkina AV, Lukyanova EN, Zaretsky AR, Kalinin DV, Pokrovsky AV, Golovyuk AL, et al. Novel potential causative genes in carotid paragangliomas. *BMC Med Genet*. 9 de abril de 2019;20(1):5–13.
294. Villacis RAR, Côrtes L, Basso TR, do Canto LM, Souza JS, Aagaard MM, et al. Germline DNA Damage Repair Gene Alterations in Patients with Metachronous Breast and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. outubro de 2024;25(19):1–15. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85206479562&doi=10.3390%2fijms25190275&partnerID=40&md5=983f9841d8845192700664f8756c2fc2>
295. Yu G, Hsu WL, Coghill AE, Yu KJ, Wang CP, Lou PJ, et al. Whole-Exome Sequencing of Nasopharyngeal Carcinoma Families Reveals Novel Variants Potentially Involved in Nasopharyngeal Carcinoma. *Sci Rep* [Internet]. 9 de julho de 2019;9(1):1–10. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85068734834&doi=10.1038%2fs41598-019-46137-4&partnerID=40&md5=c3824358fd2723425e5e845eaf9631cd>
296. Zhang H, Lu X, Huang G, Hua M, Zhang W, Wang T, et al. A genomic mutation spectrum of collecting duct carcinoma in the Chinese population. *BMC Med Genomics* [Internet]. 3 de janeiro de 2022;15(1):1–12. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85122180018&doi=10.1186%2fs12920-021-01143-2&partnerID=40&md5=52a4674465dc24d87754cc4047cd078f>
297. Shakeel M, Khan SA, Mughal AJ, Irfan M, Hoessli DC, Choudhary MI, et al. Distinct genetic landscape and a low response to doxorubicin in a luminal-A breast cancer cell line of Pakistani origin. *Mol Biol Rep* [Internet]. outubro de 2021;48(10):6821–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85114435841&doi=10.1007%2fs11033-021-06681-7&partnerID=40&md5=d75de30e1c987f8dd4df8a3e17779915>
298. Iafolla MAJ, Yang C, Chandran V, Pintilie M, Li Q, Bedard PL, et al. Predicting Toxicity and Response to Pembrolizumab Through Germline Genomic HLA Class 1 Analysis. *JNCI Cancer Spectr* [Internet].



fevereiro de 2021;5(1):1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85113649821&doi=10.1093%2fjncics%2fпкаа115&partnerID=40&md5=d22bfa72543286633aec8a94d7c514c8>

299. Abou Kors T, Meier M, Mühlenbruch L, Betzler AC, Oliveri F, Bens M, et al. Multi-omics analysis of overexpressed tumor-associated proteins: gene expression, immunopeptide presentation, and antibody response in oropharyngeal squamous cell carcinoma, with a focus on cancer-testis antigens. *Front Immunol* [Internet]. 29 de julho de 2024;15:1–16. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85200915359&doi=10.3389%2ffimmu.2024.1408173&partnerID=40&md5=c63fe73f704bd18190bbdbeb41e60b3c>
300. Kassem PH, Montasser IF, Mahmoud RM, Ghorab RA, AbdelHakam DA, Fathi MESA, et al. Genomic landscape of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients by whole exome sequencing. *BMC Med Genomics* [Internet]. 9 de agosto de 2024;17(1):1–19. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85200899098&doi=10.1186%2fs12920-024-01965-w&partnerID=40&md5=ca7ddb388609389216dfd5a825e7bde5>
301. Caro-Vegas C, Ramirez C, Landis J, Adimora AA, Strickler H, French AL, et al. Molecular profiling of breast and lung cancer in women with HIV reveals high tumor mutational burden. *AIDS Lond Engl* [Internet]. 15 de março de 2022;36(4):567–71. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85125211857&doi=10.1097%2fQAD.0000000000003144&partnerID=40&md5=534f680d60b6dd0039869099410fae1f>
302. Shatalov PA, Falaleeva NA, Bykova EA, Korostin DO, Belova VA, Zabolotneva AA, et al. Genetic and therapeutic landscapes in cohort of pancreatic adenocarcinomas: next-generation sequencing and machine learning for full tumor exome analysis. *Oncotarget* [Internet]. 5 de fevereiro de 2024 [citado 16 de março de 2025];15(1):91–103. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.28512>
303. Alba-Bernal A, Godoy-Ortiz A, Domínguez-Recio ME, López-López E, Quirós-Ortega ME, Sánchez-Martín V, et al. Increased blood draws for ultrasensitive ctDNA and CTCs detection in early breast cancer patients. *Npj Breast Cancer* [Internet]. 15 de maio de 2024 [citado 16 de março de 2025];10(1):1–14. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41523-024-00642-6>
304. Banerjee S, Zhang X, Kuang S, Wang J, Li L, Fan G, et al. Comparative analysis of clonal evolution among patients with right- and left-sided colon and rectal cancer. *iScience*. 23 de julho de 2021;24(7):1–20.
305. Zwaig M, Johnston MJ, Lee JJY, Farooq H, Gallo M, Jabado N, et al. Linked-read based analysis of the medulloblastoma genome. *Front Oncol* [Internet]. 2023;13:1–15. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85167931040&doi=10.3389%2ffonc.2023.1221611&partnerID=40&md5=e1c304c4ac746112ee9d1f906651ff8e>

306. Lee YF, Phua CZJ, Yuan J, Zhang B, Lee MY, Kannan S, et al. PARP4 interacts with hnRNPM to regulate splicing during lung cancer progression. Vol.16, Genome medicine. CAMPUS, 4 CRINAN ST, LONDON N1 9XW, ENGLAND: BMC; 2024. p. 1–21.
307. Harismendy O, Ng PC, Strausberg RL, Wang X, Stockwell TB, Beeson KY, et al. Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. Genome Biol [Internet]. 27 de março de 2009 [citado 24 de julho de 2025];10(3):R32.1–R32.13. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r32>
308. Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, Kip NS, Klee EW, Lincoln SE, et al. Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. J Mol Diagn [Internet]. 1 de janeiro de 2018 [citado 24 de julho de 2025];20(1):4–27. Disponível em: [https://www.jmdjournal.org/article/S1525-1578\(17\)30373-2/fulltext](https://www.jmdjournal.org/article/S1525-1578(17)30373-2/fulltext)
309. Schmid S, Jochum W, Padberg B, Demmer I, Mertz KD, Joerger M, et al. How to read a next-generation sequencing report—what oncologists need to know. ESMO Open [Internet]. 29 de setembro de 2022 [citado 9 de julho de 2025];7(5):100570. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9588890/>
310. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. Hum Immunol [Internet]. novembro de 2021 [citado 10 de novembro de 2024];82(11):801–11. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885921000628>
311. Turajlic S, Litchfield K, Xu H, Rosenthal R, McGranahan N, Reading JL, et al. Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis. Lancet Oncol [Internet]. agosto de 2017 [citado 19 de abril de 2025];18(8):1009–21. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204517305168>
312. Zhang G, Liu Y, Luo Y, Han Y, Zhang Z. Accurate somatic variant calling performance using Avidity Sequencing with Burning Rock's OncoScreen™ Plus panel. bioRxiv; 2023.
313. Revil T, Nairi Pezeshkian, Nasko D, Lucy Gilbert, Alexandra Sockell, Jiannis Ragoussis. Improved detection of low frequency mutations in ovarian and endometrial cancers by utilizing a highly accurate sequencing platform [Internet]. Pacific Bioscience; 2024 [citado 31 de agosto de 2025]. Disponível em: https://www.pacb.com/wp-content/uploads/AMP_McGill_poster_20241112.pdf
314. Allied Market Research [Internet]. [citado 16 de abril de 2025]. Long Read Sequencing Market Size, Trends | Forecast – 2032. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/long-read-sequencing-market-A14421>
315. O'Neill K, Pleasance E, Fan J, Akbari V, Chang G, Dixon K, et al. Long-read sequencing of an advanced cancer cohort resolves rearrangements, unravels haplotypes, and reveals methylation landscapes. Cell Genomics [Internet]. novembro de 2024 [citado 16 de abril de 2025];4(11):100674. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666979X24002933>
316. Van Belzen IAEM, Van Tuil M, Badloe S, Janse A, Verwiel ETP, Santoso M, et al. Complex structural variation is prevalent and highly pathogenic in pediatric solid tumors. Cell Genomics [Internet]. novembro de 2024 [citado 19 de abril de 2025];4(11):100675. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666979X24002945>



317. Pan-cancer analysis of whole genomes. Nature [Internet]. 2020 [citado 19 de abril de 2025];578(7793):82–93. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7025898/>
318. Nozzoli F, Lazar AJ, Castiglione F, Campanacci DA, Beltrami G, De Logu F, et al. NTRK Fusions Detection in Paediatric Sarcomas to Expand the Morphological Spectrum and Clinical Relevance of Selected Entities. Pathol Oncol Res [Internet]. 28 de fevereiro de 2022;28:1–9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85127073779&doi=10.3389%2fpore.2022.1610237&partnerID=40&md5=1ec5c71437d033d3ab0bc234b49219dd>
319. Oncomine tumor specific panels [Internet]. Thermo Fisher Scientific Inc.; [citado 20 de abril de 2025]. Disponível em: <https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CSD/brochures/Oncomine-Tumor-Spec-Panels-Brochure.pdf>
320. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. Ann Oncol [Internet]. novembro de 2020 [citado 13 de novembro de 2024];31(11):1491–505. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753420399713>
321. Mosele MF, Westphalen CB, Stenzinger A, Barlesi F, Bayle A, Bièche I, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with advanced cancer in 2024: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. Ann Oncol [Internet]. 1 de julho de 2024 [citado 12 de novembro de 2024];35(7):588–606. Disponível em: [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(24\)00111-X/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(24)00111-X/fulltext)
322. Kutahyaliloglu M, Nguyen HT, Kwatampora L, Clarke C, Silva A, Ibrahim E, et al. Genetic profiling as a clinical tool in advanced parathyroid carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol [Internet]. agosto de 2019;145(8):1977–86. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85068957150&doi=10.1007%2fs00432-019-02945-9&partnerID=40&md5=17821c69e53dac7397b0ff21a09bb977>
323. Kokoris M, McRuer R, Nabavi M, Jacobs A, Prindle M, Cech C, et al. Sequencing by Expansion (SBX) – a novel, high-throughput single-molecule sequencing technology [Internet]. Genomics; 2025 [citado 16 de abril de 2025]. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2025.02.19.639056>
324. Hoffmann F. Media & Investor Release – Roche unveils a new class of next-generation sequencing with its novel sequencing by expansion technology [Internet]. Group Communications Roche Group Media Relations; [citado 16 de abril de 2025]. Disponível em: <https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2025-02-20>

P.PORTO

ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



M

MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA