

**UTILIZAÇÃO DE BIÓPSIA LÍQUIDA
BASEADA EM DETECÇÃO DE DNA
TUMORAL EM URINA E PLASMA
EM PACIENTES COM CARCINOMA
RENAL DE CÉLULAS CLARAS**

ISABELLA TANUS JOB E MEIRA

Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Dirce Maria Carraro, PhD

Coorientador: Dra. Giovana Tardin Torrezan, PhD

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Meira, Isabella Tanus Job

Utilização de biópsia líquida baseada em detecção de DNA tumoral em urina e plasma em pacientes com carcinoma renal de células claras/ Isabella Tanis Job e Meira - São Paulo, 2022.

95p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. Carcinoma de células renais/Renal cell carcinoma. 2. Biópsia líquida/Liquid biopsy. 3. DNA tumoral circulante/Circulating tumor DNA. 4. Sequenciamento de Nova geração/Next Generation Sequencing. 5. Variantes somáticas/. 6. Painel customizado/Custom Panel.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que estiveram ao meu lado e sempre me incentivaram a correr atrás dos meus objetivos, minha mãe Márcia, meu pai Beethoven, meu irmão Bruno, minha cunhada Serena, minha sobrinha linda Giorgia e meus padrinhos Luís e Rosalina. Sem o apoio de vocês isso não seria possível. E principalmente aos pacientes que aceitaram fazer parte deste estudo e suas famílias. A vocês, todo meu respeito e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente **a todos os pacientes** que aceitaram participar deste estudo, compartilhando momentos tão difíceis de suas histórias para que este trabalho fosse realizado. Sem vocês nada disso seria possível.

À minha orientadora, **Dr^a Dirce Maria Carraro**, pela confiança e dedicação a este trabalho, e acima de tudo pelo exemplo de pesquisadora e incentivadora. Obrigada por ter me recebido em seu laboratório por tantos anos, por me apoiar nas decisões tomadas ao longo deste caminho e prover todo o suporte para o meu desenvolvimento e o deste trabalho.

À minha co-orientadora **Dr^a Giovana Tardin Torrezan**, muito obrigada pelos ensinamentos, conversas e por sempre ter sido muito atenciosa comigo. Obrigada por dividir toda experiência, por ser um exemplo de pesquisadora e por sempre me incentivar a não desistir nos momentos mais difíceis.

À minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão, por terem me dado todo apoio em mais uma etapa da minha vida. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada pela paciência nos dias difíceis. Vocês foram e sempre serão meus maiores inspiradores.

Ao Dr. Stênio Zequi, Dr. Walter Henriques da Costa e toda equipe do departamento de urologia, à Dr^a Stephania Martins Bezerra e a enfermeira de pesquisa Cássia, por terem me dado todo o suporte nas discussões científicas, no recrutamento e monitoramento dos pacientes.

Aos meus amigos do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, que estiveram sempre ao meu lado. Obrigada pelos ensinamentos, pelas conversas e pela ajuda sempre que precisei. Em especial, gostaria de agradecer à **MsC. Ana C Miguez**, muito obrigada pela parceria, amizade e por todas as ajudas nos experimentos, você foi e está sendo essencial para o desenvolvimento deste projeto.

Às minhas amigas **Flávia Lima, Luíza Ferreira, Mariana Zirondi, Sara Oliveira, Nathália de Angelis e Ana Carolina de Araújo**, pela amizade sincera, suporte

emocional e incentivo nos momentos difíceis. Mesmo longe, vocês sempre estiveram muito presentes em todos esses momentos.

Ao meu companheiro **Fábio Mori**, que soube entender os momentos que precisei me ausentar para me dedicar ao desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo apoio emocional durante esta caminhada e pelo amor incondicional.

À equipe do Biobanco, por todo auxílio e processamento das amostras.

Aos funcionários da pós-graduação, do CIPE e da biblioteca, por toda atenção e disponibilidade quando precisei.

Por fim agradeço a **CAPES, CNPq, FAPESP e Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON)** pelo fomento financeiro e incentivo à pesquisa.

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Programa Nacional de Atenção de Apoio a Atenção Oncológica (PRONON) através de auxílio à Pesquisa - PRONON CEP: 2496/18 e 2397/17; CAPES bolsa de doutorado.

RESUMO

Meira ITJ. **Utilização de biópsia líquida baseada em detecção de DNA tumoral em urina e plasma em pacientes com carcinoma renal de células claras.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

O carcinoma de células renais (CCR) é o sétimo tipo de câncer mais comum no ocidente e vêm apresentando um aumento em sua prevalência. A classificação histológica dos CCRs é a abordagem mais utilizada para determinar o subtipo da doença, bem como prognosticar o paciente. Cerca de 70-80% dos CCRs é do subtipo células claras (ccRCC), o qual representa o subtipo mais prevalente e agressivo da doença. A escolha do tratamento difere para cada paciente, sendo a ressecção cirúrgica a terapia mais efetiva nos casos de doença localizada. Apesar de ser um tratamento já estabelecido, estudos mostram uma certa heterogeneidade entre massas renais detectadas, onde cerca de 20% apresentam um perfil benigno, 60% são considerados tumores indolentes, sugerindo desta forma que, entender de forma mais detalhada este tumor pode auxiliar na escolha de um tratamento mais direcionado para o paciente. Sendo assim, o presente trabalho buscou selecionar genes potencialmente alterados em CCR com o intuito de customizar um painel multigênico capaz de identificar variantes somáticas, específicas do tumor, e avaliar as variantes específicas do tumor de forma personalizada em amostras de ctDNA (DNA tumoral circulante) extraídas de plasma e dos dois componentes da urina (sedimento e sobrenadante) coletados no momento da cirurgia (*baseline*). Neste contexto, dentro de nossa proposta, construímos um painel com 28 genes associados com CCR e sequenciamos 89 casos de tumores renais, juntamente com as amostras de leucócitos. Identificamos que dentre os tumores analisados, 59 apresentavam pelo menos uma variante somática, ou seja, o painel customizado apresentou uma sensibilidade para identificar variantes somáticas em 66% dos casos. Com relação aos 45 tumores classificados como ccRCC em 38 casos identificamos pelo menos uma marca tumoral, ou seja, nosso painel foi capaz de detectar variantes somáticas específicas do tumor em 84,4% desses casos. Um total de 105 variantes somáti-

cas foram identificadas, e os genes mais frequentemente mutados nessa coorte de pacientes foram os genes *VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2*. Dos 59 casos em que identificamos variante somática, 44 casos foram avaliados as amostras *baseline* de plasma e 29 casos de urina (sobrenadante e sedimento), e encontramos pelo menos uma marca tumoral em um dos fluidos corpóreos em 11 pacientes, 6 em amostras de plasma e 6 amostras de urina. Através do desenvolvimento deste estudo, confirmamos que o subtipo ccRCC é o CCR mais bem caracterizado genomicamente e que é importante continuar a investigação genômica principalmente nos subtipos não ccRCC. Além disso o estudo demonstra a viabilidade de utilizar biópsia líquida ctDNA tanto no plasma quanto na urina para fins de diagnóstico e prognóstico.

Descritores: Carcinoma de células renais. Biópsia líquida. DNA tumoral circulante. Sequenciamento de Nova geração. Variantes somáticas. Painel customizado.

ABSTRACT

Meira ITJ. [Use of liquid biopsy based on detection of tumor DNA in urine and plasma in patients with clear cell renal carcinoma]. [Tese]. São Paulo; Fundação Antonio Prudente; 2022.

Renal cell carcinoma (RCC) is the seventh most common type of cancer in the West and its prevalence is increasing. The histological classification of RCCs is the most used approach to determine the disease subtype as well as the patient's prognosis. About 70% of RCCs are of the clear cell Renal Cell Carcinoma subtype (ccRCC), which represents the most prevalent and aggressive subtype of the disease. The choice of treatment is different for each patient. Resection is one of the most effective therapies in cases of localized disease. Despite being an established treatment, studies show a certain heterogeneous profile studied. In this profile, up to 20% even present a benign treatment, helping the indolent, thus suggesting that understanding this tumor in detail can help to choose a more targeted treatment for the patient. Therefore, the present work aimed to select potentially altered genes in CCR in order to customize a multigene panel capable of identifying somatic, tumor-specific variants, and to evaluate the tumor-specific variants in a personalized way in ctDNA (circulating tumor DNA) samples extracted from plasma and from two components of urine (sediment and supernatant) collected at the time of surgery (baseline). In this context, within our proposal, we built a panel with 28 genes associated with CCR and sequenced 89 cases of renal tumors, together with leukocyte samples. We identified that among the analyzed tumors, 59 had at least one somatic variant, that is, the customized panel showed sensitivity to identify somatic variants in 66% of cases. Of the 45 classified as ccRCC in 38 cases we identified at least one tumor marker, that is, our panel was able to detect tumor-specific somatic variants in 84.4%. A total of 105 somatic variants were identified, and the genes most frequently mutated in this cohort of patients were the *VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2* genes. Among 59 cases in which we identified somatic variant, 44 cases were evaluated in baseline plasma samples

and 29 cases in urine (supernatant and sediment), and we found at least one tumor mark in one of the body fluids in 11 patients, 6 in plasma samples and 6 urine samples. Through the development of this study, we confirm that the ccRCC subtype is the best genomically characterized CCR and that it is important to continue genomic investigation, especially in the non-ccRCC subtypes. Furthermore, the study demonstrates the feasibility of using ctDNA liquid biopsy in both plasma and urine for diagnostic and prognostic purposes.

Keywords: Renal cell carcinoma. Liquid biopsy. Circulating tumor DNA. Next Generation Sequencing. Somatic Variants. Custom Panel.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Características histológicas dos subtipos de CCRs mais comuns e suas respectivas frequências. | 9 |
| Figura 2 – Delineamento do estudo. | 19 |
| Figura 3 – Esquema da metodologia utilizada na construção das bibliotecas do painel customizados. | 23 |
| Figura 4 – Princípio dos UMIS. | 23 |
| Figura 5 – Metodologia do sequenciamento na plataforma <i>Illumina</i> | 26 |
| Figura 6 – Distribuição dos 89 casos avaliados no estudo de acordo com a classificação histológica. | 29 |
| Figura 7 – Análise <i>in silico</i> dos genes do painel customizado utilizando os dados de alteração genética dos estudos disponíveis no <i>cBioPortal</i> | 33 |
| Figura 8 – Distribuição dos 59 tumores identificados com variante somática separados por subtipos histológicos. | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Sistema de estadiamento mais utilizado em tumores renais. Sistema TNM, publicado pela <i>American Cancer Society</i> (2020). | 6 |
| Tabela 2 – Classificação dos carcinomas renais (WHO, 2018). | 7 |
| Tabela 3 – Informações gerais dos 89 pacientes que tiveram status mutacional avaliado neste estudo. | 30 |
| Tabela 4 – Genes inseridos no painel customizado. | 31 |
| Tabela 5 – Resultado da avaliação das amostras de BL <i>baseline</i> positivas para pelo menos uma marca tumoral. | 39 |
| Tabela 6 – Características clínicas dos pacientes recrutados neste estudo. | 66 |
| Tabela 7 – Relação das variantes somáticas inicialmente detectadas nos tumores dos pacientes. Dados gerados a partir da metodologia <i>Target sequencing</i> . | 69 |
| Tabela 8 – Resultados detalhados da avaliação dos fluidos corpóreos em todas as amostras avaliadas. | 74 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| AJCC | <i>American Joint Committee for Cancer</i> |
| AL | Angiomiolipoma |
| ARID1A | <i>AT-rich interaction domain 1A</i> |
| AR | <i>Androgen receptor</i> |
| BAP1 | <i>BRCA1 associated protein 1</i> |
| BL | Biópsia Líquida |
| BRAF | <i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i> |
| BT | Biópsia Tecidual |
| CCR | Carcinoma de Células Renais |
| ccRCC | <i>Clear cell renal cell carcinoma</i> |
| ctDNA | <i>Circulating tumor cell</i> |
| ctRNA | <i>Circulating tumor RNA</i> |
| CDKN2A | <i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CHRCC | <i>Cromophobe Renal Cell Carcinoma</i> |
| CTC | Célula Tumoral Circulante |
| Crom | Cromóforo |
| ddPCR | <i>Droplet digital PCR</i> |
| DNAg | DNA genômico |
| EGFR | <i>Epidermal growth factor receptor</i> |

| | |
|---------------|---|
| ELOC | <i>Elongin C</i> |
| emPCR | PCR em emulsão |
| FAT1 | <i>FAT atypical cadherin 1</i> |
| FH | <i>Fumarate hydratase</i> |
| FLCN | <i>Folliculin</i> |
| GST | Genes supressores de tumor |
| IGV | <i>Integrative Genomics Viewer</i> |
| ISUP | <i>International Society of Urological Pathology</i> |
| Inclas | Inclassificável |
| KDM5C | <i>Lysine demethylase 5C</i> |
| KDM6A | <i>Lysine demethylase 6A</i> |
| KRAS | <i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i> |
| LMS | Leiomioma |
| LPS | Lipossarcoma |
| LoF | <i>Loss of function</i> |
| MET | <i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i> |
| mTOR | <i>Mechanistic target of rapamycin kinase</i> |
| NF2 | <i>NF2, moesin-ezrin-radixin like (MERLIN) tumor suppressor</i> |
| NFE2L2 | <i>NFE2 like bZIP transcription factor 2</i> |
| NGS | <i>Next Generation Sequencing</i> |
| NRAS | <i>NRAS proto-oncogene, GTPase</i> |

| | |
|----------------|--|
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PBRM1 | Polibromo 1 |
| PCF11 | <i>PCF11 cleavage and polyadenylation factor subunit</i> |
| PCR | <i>Polimerase chain reaction</i> |
| PDGFR | <i>Platelet derived growth factor receptor beta</i> |
| PIK3CA | <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i> |
| POP | Procedimento operacional padrão |
| PRC1 | Papilífero tipo 1 |
| PRC2 | Papilífero tipo 2 |
| PRCC | <i>Papillary Renal Cell Carcinoma</i> |
| PTEN | <i>Phosphatase and tensin homolog</i> |
| Pb | Pares de base |
| RM | Ressonância magnética |
| SETD2 | <i>SET domain containing 2</i> |
| SMARCA4 | <i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4</i> |
| SMARCB1 | <i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1</i> |
| STAG2 | <i>Stromal antigen 2</i> |
| TCGA | <i>The Cancer Genome Atlas</i> |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TC | Tomografia Computadorizada |

| | |
|-------------|---|
| TERT | <i>Telomerase reverse transcriptase</i> |
| TFS | Tumor fibroso solitário |
| TP53 | <i>Tumor protein p53</i> |
| TP | Túbulo-papilar |
| UMI | <i>Unique Molecular Index</i> |
| VAF | Frequência alélica da variante |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| VHL | <i>Von Hippel-Lindau tumor suppressor</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | Epidemiologia | 1 |
| 1.2 | Aspectos gerais da patologia | 2 |
| 1.3 | Características gerais dos CCRs e seus subtipos mais frequentes | 5 |
| 1.4 | Perfis moleculares dos CCRs | 9 |
| 1.5 | Biópsia Líquida como ferramenta de detecção e avaliação da progressão dos carcinomas de células renais | 11 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 16 |
| 3 | OBJETIVOS | 17 |
| 3.1 | Objetivo geral | 17 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 17 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| 4.1 | Casuística | 18 |
| 4.2 | Delineamento experimental | 18 |
| 4.3 | Coletas de amostras de sangue e urina | 19 |
| 4.4 | Extração do DNA | 20 |
| 4.5 | Caracterização do perfil mutacional | 21 |
| 4.5.1 | Construção do painel customizado | 21 |
| 4.5.2 | Construção das bibliotecas | 22 |
| 4.5.3 | Sequenciamento de próxima geração (do inglês <i>next generation sequencing</i> – NGS) | 25 |
| 4.5.4 | Análise de Bioinformática | 27 |
| 5 | RESULTADOS | 29 |
| 5.1 | Seleção dos pacientes | 29 |

| | | |
|----------|---|-----------------------|
| 5.2 | Seleção dos genes e customização do painel | 30 |
| 5.3 | Avaliação genômica das amostras tumorais | 32 |
| 5.4 | Rastreamento das variantes específicas do tumor no plasma e urina dos pacientes | 37 |
| 6 | DISCUSSÃO | 41 |
| 7 | CONCLUSÕES | 48 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 49 |
| | ANEXOS | 58 |
| | Anexo A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP | 59 |
| | APÊNDICES | 60 |
| | Apêndice A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) | 61 |
| | Apêndice B – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES RECRUTADOS NESTE ESTUDO. | 65 |
| | Apêndice C – DADOS GERADOS A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO NGS DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES RECRUTADOS NESTE ESTUDO. | 68 |
| | Apêndice D – RESULTADOS DETALHADOS DA AVALIAÇÃO DOS FLUIDOS CORPÓREOS EM TODAS AS AMOSTRAS AVALIADAS. | 73 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer é o uma doença complexa multifatorial considerada o maior problema de saúde pública das últimas décadas e o segundo maior causador de óbitos no mundo, com uma média de 9,8 milhões de mortes ao ano (Pereira et al. 2022).

As neoplasias renais se destacam como sendo um dos 10 tipos de cânceres mais comuns no ocidente e estão classificadas em quatro tipos principais: Carcinoma de células renais (CCR), tumor de Wilms, neoplasias uroteliais e sarcoma renal (Pais et al. 2015). Ao avaliar a incidência e prevalência das neoplasias renais malignas, observa-se que a maioria dos pacientes acometidos por este tipo de câncer são idosos com prevalência média em torno de 64 anos, sendo raro em indivíduos com menos de 45 anos de idade (Ljungberg et al. 2019; Pais et al. 2015). A frequência de desenvolvimento é aproximadamente duas vezes maior em homem do que em mulheres, cujo risco no sexo masculino é cerca de 1 em 46, e no sexo feminino é de 1 em 82 (Ljungberg et al. 2019; Huang e Hsieh 2020).

Os dados epidemiológicos reportados nas últimas décadas indicam que a taxa de novos diagnósticos tem aumentado exponencialmente desde a década de 1990, enquanto a taxa de mortalidade tem reduzido, atingindo estabilidade nos últimos anos. Este aumento no número de casos possivelmente e redução da taxa de mortalidade é decorrente do uso de exames de imagem muito difundidos nos últimos anos, tais como, o ultrassom e a tomografia computadorizada, que detectam mais precocemente alguns tipos de cânceres que antes não seriam diagnosticados, possibilitando tratamento mais efetivo ¹.

O carcinoma de células renais (CCRs) constitui o tipo mais comum de neoplasia renal, considerado o sétimo tipo de câncer mais comum no mundo ocidental, com aumento de incidência correspondendo de 80 a 90% dos cânceres renais nos adultos, prevalência de 2% a 3% de todas as doenças malignas em adultos e mortalidade em torno de 40% (Siegel et al. 2021; Voog et al. 2019; Muglia e Prando 2015).

¹ <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatistica-para-cancer-de-rim/6844/239/> - Acesso em 10 de janeiro de 2022.

O CCR é o terceiro tipo de câncer geniturinário mais comum e a neoplasia maligna mais frequente nos rins, apresentando 403.000 novos diagnósticos anuais (2,2% de todos os tumores), e mais de 175.000 mortes neste mesmo período (1,8% da mortalidade por câncer) (Galceran et al. 2017; Bray et al. 2018). A incidência americana é estimada em 76.080 novos casos e 13.780 mortes em 2021 (Siegel et al. 2021). A sobrevida de pacientes com doença localmente avançada aos 5 anos é de 69,6% e de 12% naqueles com metástase (Ljungberg et al. 2019; Huang e Hsieh 2020). Em países desenvolvidos, dados reportados pela GLOBOCAN, estima uma incidência de 2,2% - 3,3% e mortalidade de 1,8% - 2,6% em (Ferlay et al. 2015; Bray et al. 2018).

A incidência estimada no Brasil é de 7 a 10 casos para cada 100 mil habitantes². Todavia, os dados epidemiológicos municipais descritos nos repositórios públicos são escassos e os dados são limitados a centros de ensino e treinamento³.

Embora mais casos tenham sido diagnosticados precocemente em função do aumento de aplicações de exames de imagem, o CCR ainda constitui um grande desafio de saúde pública tendo em vista que ele se caracteriza como um tumor frequentemente assintomático e com pouca manifestação clínica, quando comparado com os demais tipos de câncer (Huang e Hsieh 2020). No que tange o prognóstico de pacientes com CCR, constata-se que o acesso mais fácil às abordagens terapêuticas como terapia-alvo, inibidores de tirosina quinase e anticorpos monoclonais desde meados do ano 2000, bem como a idade do paciente e o diagnóstico precoce são fatores essenciais para um bom prognóstico (Chiong et al. 2012)².

1.2 ASPECTOS GERAIS DA PATOLOGIA

No que concerne aos fatores de risco deste grupo de neoplasias incluem-se predisposição à doença renal crônica, terapia estrogênica, exposição a asbestos, produtos derivados do petróleo e metais pesados, indivíduos diabéticos, sedentários ou com histórico familiar, hipertensão mal controlada, tabagismo e obesidade (Kotecha et al. 2019; Sanchez

² <https://www.inca.gov.br/noticias/ministerio-da-saude-amplia-tratamento-para-cancer-renal> - Acesso em 10 de janeiro de 2022.

³ <https://larcg.org/>

et al. 2020; Bao et al. 2013; Ljungberg et al. 2011). Importantes achados da literatura reportam que fatores genéticos são cruciais no desenvolvimento de neoplasias renais, onde 2-3% dos casos são provenientes de indivíduos com parentes de primeiro grau acometidos com a doença, cujo risco é quatro vezes maior de desenvolvimento da mesma (Siegel et al. 2021; Clague et al. 2009). Além disso, o CCR também pode ocorrer devido a associações com síndromes hereditárias, tais como síndrome de *Von-Hippel-Lindau*, relacionada ao gene *VHL*, carcinoma renal papilar hereditário, relacionada ao gene *MET*, carcinoma de célula renal e leiomiomatose hereditária, relacionadas ao gene *FH*, *Birt-Hogg-Dubé*, relacionada ao gene *FLCN* e translocação constitucional do cromossomo 3 (Pavlovich e Schmidt 2004).

O CCR pode desencadear sintomas locais como hematúria, dor na região lombar, massa abdominal palpável, e sintomas sistêmicos, como perda de peso, febre e dor abdominal (Figliuolo et al. 2016; Rini et al. 2009). Hematúria, dor lombar e massa abdominal palpável são consideradas a tríade clássica em abordagens diagnósticas do CCR. Ademais, entre 50-80% dos casos são diagnosticados incidentalmente através de ultrassonografia abdominal, contribuindo com a detecção precoce de tumores assintomáticos (Chang et al. 2011; Kane et al. 2008; Rini et al. 2009).

A estrutura do tumor do CCR apresenta formato arredondado e com tamanho variando de centímetros até ocupar o abdômen completamente. Pequenas massas renais que aumentam com o tempo, tornando-se mais contrastantes em exames de tomografia, devem ser consideradas extremamente suspeitas de neoplasias renais, embora existam muitas incertezas inerentes a esse tema (Rini et al. 2009). Assim, a terapia mais indicada para os casos de doença localizada é a ressecção cirúrgica total ou parcial do tumor, sendo a ressecção total realizada apenas frente a impossibilidade de ser feita a cirurgia mais conservadora, ou seja, em casos de doença localmente avançada, a qual, ocasionalmente exigirá ressecção de órgãos adjacentes (Ljungberg et al. 2015). Embora seja uma abordagem terapêutica já estabelecida e bem sedimentada na comunidade médica, estudos mostram uma certa heterogeneidade entre massas renais detectadas, onde cerca de 20% apresentam um perfil benigno, 60% são considerados tumores indolentes e 20% tumores potencialmente agressivos (Frank et al. 2003; Remzi et al. 2006). Desse modo, esses

achados sugerem que, a caracterização mais detalhada desses tumores, pode contribuir com a escolha de uma estratégia menos agressiva em determinados casos, e a intervenção cirúrgica em outros.

Pacientes com a doença metastática compõe um grupo heterogêneo, onde neste, diferentes terapias iniciais podem ser utilizadas, cujas metástases mais recorrentes são encontradas nos gânglios linfáticos, nos pulmões, nos ossos e no fígado (Ljungberg et al. 2015; Sachdeva e M. 2019). Aproximadamente 25% dos pacientes diagnosticados com CCR apresentam metástase ao diagnóstico e 20-40% desenvolverão metástase após tratamento do tumor primário. Pacientes com doença metastática apresentam uma sobrevida média de 6 meses a 1 ano, onde menos de 20% destes pacientes sobrevivem mais de 2 anos (Motzer et al. 1996; Janzen et al. 2003).

Alguns estudos randomizados foram realizados, e não mostraram benefícios em utilizar terapias sistêmicas adjuvantes como imunoterapias com interleucina-2 e interferon alfa (Atzpodien et al. 2005), radioterapias e tratamentos hormonais em pacientes com esta neoplasia (Rini et al. 2009). Portanto, maiores avanços na compreensão da biologia molecular do CCR foi requerida, proporcionando maiores estudos que possibilitaram a utilização de novos fármacos (terapia-alvo) em pacientes com CCR, dentre estes podemos citar aqueles que inibem a via do VEGF, inibidores da proteína mTOR e inibidores do PDGFR. Apesar destas novas terapias terem apresentado um aumento da sobrevida global e específica desses pacientes, a doença metastática, na maioria dos casos, ainda é incurável e requer um acompanhamento constante do paciente (Singer et al. 2013).

Nesse contexto, numerosos estudos clínicos e pré-clínicos vêm explorando as potencialidades terapêuticas da inibição de *checkpoints* imunológicos, cujos resultados têm mostrado que essas terapias podem contribuir substancialmente com a sobrevida de pacientes oncológicos com neoplasias renais avançadas. Essas novas abordagens terapêuticas atuam bloqueando *checkpoints* imunológicos, os quais normalmente impedem o organismo de montar uma resposta imune contra células normais. Isso acontece porque algumas neoplasias podem adquirir estes *checkpoints* impedindo as células tumorais de não serem reconhecidas pelo sistema imune, e conseqüentemente inativando o sistema imunológico para o combate do tumor (Reis e Machado 2020). Assim, os mecanismos de ação dessas

terapias inibidoras de *checkpoints* imunológicos envolvem remoção dos sinais inibitórios da ativação de células T, que possibilitam as células tumorais superarem os mecanismos reguladores do sistema imune (Sharma e Allison 2015; Topalian et al. 2015; Pardoll 2012).

Em função disso, imunoterapias com inibidores de *checkpoints* (anti PD-1 e anti CTLA-4) estão emergindo no cenário do câncer urológico como promissoras opções de tratamento. Estudos clínicos estão em andamento, e os resultados parciais já mostram que determinados pacientes apresentam uma boa resposta frente ao tratamento, porém abordagens mais personalizadas precisam ser utilizadas para melhor estratificação dos pacientes, levando em consideração as suas características clínicas e principalmente moleculares (Özdemir et al. 2018; Pal et al. 2017; Bergerot et al. 2018; Miao et al. 2018).

1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS CCRS E SEUS SUBTIPOS MAIS FREQUENTES

O CCR é dito como uma doença complexa pois, não se caracteriza como uma doença individualizada, mas como um grupo heterogêneo de tumores com diferentes características genômicas, histológicas e clínicas. Em adição, outros fatores como extensão da doença, a apresentação de diferentes fenótipos clínicos e diferentes respostas ao tratamento tornam-na ainda mais complexa (Linehan et al. 2003; Rini et al. 2009; Smith et al. 2020).

O sistema de estadiamento do CCR mais utilizado é o TNM, adotado pela AJCC (do inglês, *American Joint Committee for Cancer*) e a partir de 1º de janeiro de 2018, sua 8ª edição é usada por médicos praticantes (Swami et al. 2019), cujos critérios envolvem o tamanho do tumor primário (T), linfonodos acometidos relacionados com a cadeia de drenagem linfática do órgão (N) e na presença ou não de metástase à distância (M). Outrossim, esses parâmetros podem receber graduações numéricas (T0 a T4; N0 a N1 e M0 a M1), alfabéticas (a, b, c) e “X” quando a categoria não pode ser avaliada, dando maiores detalhes sobre cada um desses aspectos analisados (Guinan et al. 1997; Edge e Compton 2010).

O quadro abaixo mostra essas diferentes categorias envolvendo classificação e des-

criação dos estadios das neoplasias renais (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Sistema de estadiamento mais utilizado em tumores renais. Sistema TNM, publicado pela *American Cancer Society* (2020).

| Estadio | Agrupamento dos estadios | Descrição |
|---------|--------------------------|---|
| I | T1 N0 M0 | O tumor tem 7 cm de diâmetro ou menos e está apenas no rim (T1). Não há disseminação para linfonodos (N0) ou órgãos distantes (M0). |
| II | T2 N0 M0 | O tumor tem mais de 7 cm de diâmetro, mas ainda está apenas no rim (T2). Não há disseminação para linfonodos (N0) ou órgãos distantes (M0). |
| III | T3 N0 M0 | O tumor está crescendo em uma veia principal (como a veia renal ou a veia cava) ou no tecido ao redor do rim, mas não está crescendo na glândula adrenal ou além da fáscia de Gerota (T3). Não há disseminação para linfonodos (N0) ou órgãos distantes (M0). |
| | T1 a T3 N1 M0 | O tumor principal pode ser de qualquer tamanho e pode estar fora do rim, mas não se espalhou além da fáscia de Gerota. O câncer se espalhou para linfonodos próximos (N1), mas não se espalhou para linfonodos distantes ou outros órgãos (M0). |
| IV | T4, qualquer N e M0 | O tumor principal está crescendo além da fáscia de Gerota e pode estar crescendo na glândula adrenal no topo do rim (T4). Pode ou não ter se espalhado para os linfonodos próximos (qualquer N). Não se espalhou para linfonodos distantes ou outros órgãos (M0). |
| | Qualquer T, N e M1 | O tumor principal pode ser de qualquer tamanho e pode ter crescido fora do rim (qualquer T). Pode ou não ter se espalhado para os linfonodos próximos (qualquer N). Ele se espalhou para linfonodos distantes e/ou outros órgãos (M1). |

Além disso, a Sociedade Internacional de Uropatologia (ISUP, do inglês *International Society of Urological Pathology*) projetou uma nova classificação, semelhante ao sistema de Fuhrman, porém mais fácil de ser aplicado e com intuito de ser mais clinicamente reprodutível e relevante. Este sistema pode caracterizar o tumor em quatro graus,

levando em consideração o grau de proeminência nucleolar para determinar os graus 1-3 e a presença de doença com células altamente atípicas pleomórficas e/ou morfologia sarcomatóide/rabdóide definindo o grau 4. Desta forma, o grau do tumor é definido de acordo com as células de grau mais alto presentes no fragmento (Warren e Harrison 2018; Samaratunga et al. 2014; Delahunt et al. 2013).

A compreensão dos aspectos biológicos e heterogeneidade do tumor, permitiram a caracterização dos subtipos de CCR, cuja classificação histológica é usada para diagnosticar tumores renais, identificar a severidade da doença, prever o prognóstico e orientar a escolha da terapia antineoplásica (Vivas-Pérez et al. 2022; Moch et al. 2016; Muglia e Prando 2015). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2018), os CCRs podem ser classificados histologicamente seguindo a descrição da Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação dos carcinomas renais (WHO, 2018).

| Tumores de células renais (Classificação da WHO, 2018) |
|---|
| Carcinoma renal de células claras |
| Neoplasia renal cística multilocular de baixo potencial maligno (*) |
| Carcinoma de células renais papilares |
| Carcinoma de células renais associado a leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais (*) |
| Carcinoma de células renais cromóforo |
| Carcinoma nos ductos coletores |
| Carcinoma medular renal (*) |
| Carcinoma renal com translocação da família MiT (*) |
| Carcinoma renal com deficiência na succinato desidrogenase |
| Carcinoma de células tubulares mucinosas e fusiformes (*) |
| Carcinoma de células renais tubulocítico (*) |
| Carcinoma de células renais associado à doença cística |
| Carcinoma renal de células claras papilares |
| Carcinoma de célula renal, sem classificação |
| Adenoma papilar |
| Oncocitoma |

Legenda: * Novas entidades tumorais renais reconhecidas pela WHO, 2016.

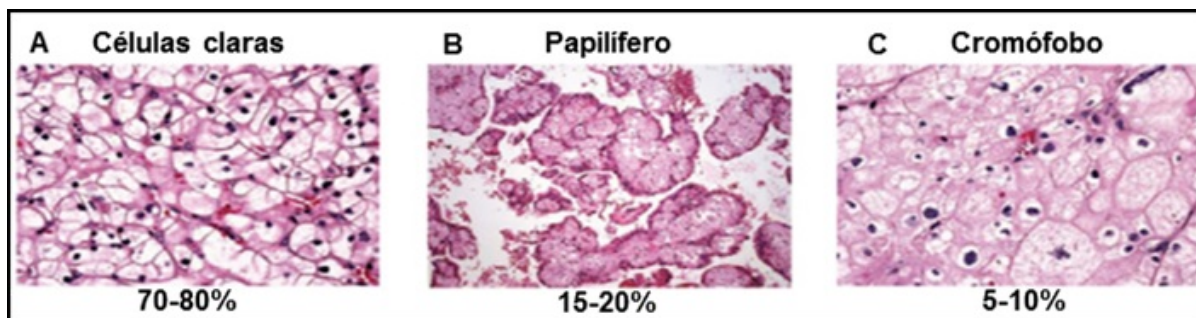
Em consonância com os dados apresentados e categorizados pela OMS, foram descritas as histologias mais comuns, as quais somam mais de 90% de todos os tumorais renais, sendo elas: carcinoma renal de células claras (ccRCC, do inglês *clear cell renal cell carcinoma*), papilífero (PRCC) e cromóforo (CHRC) (Muglia e Prando 2015).

Entre todos os casos de CCR, o ccRCC é o subtipo histológico mais prevalente e mais agressivo da doença, representando aproximadamente 75% dos casos de CCRs (Ricketts e Linehan 2018; Muglia e Prando 2015; Moch et al. 2016). O ccRCC origina-se no córtex renal e apresenta um crescimento expansivo. Histologicamente, este tumor é formado por células de cor clara, devido ao seu conteúdo citoplasmático, o qual é constituído de lipídeos e glicogênio (**Figura 1 A**). Além disso, pode ocorrer expansão desses tumores para a gordura peri renal e para o interior das veias renais e cavas, cuja ocorrência leva o desenvolvimento de metástases para outros órgãos como pulmão, fígado, e para os ossos (DeCastro e McKiernan 2008)). Macroscopicamente, caracteriza-se como uma lesão sólida, podendo apresentar graus diferentes de necrose, cor amarelada, pontos de hemorragia, calcificação e degeneração cística (Moch et al. 2016; Muglia e Prando 2015).

O PRCC representa em torno de 15-20% dos casos e constitui o segundo tipo de neoplasia renal mais comum, o qual é dividido em dois subtipos que estão diretamente associados ao prognóstico dos pacientes, entretanto, não podem ser distinguidos na fase pré-operatória através dos métodos convencionais de análise como exames de imagem (Ferro et al. 2016). Em relação aos subtipos, o tipo 1, trata-se de uma doença multifocal, com estruturas papilares e tubulares cobertas por células com citoplasma basofílico e pequenos núcleos ovais, e o tipo 2, caracterizado por ser uma doença mais heterogênea, com estruturas papilares cobertas por células maiores, com citoplasma eosinofílico, grandes núcleos e nucléolos proeminentes (**Figura 1 B**) (Moch et al. 2016; Allory et al. 2003).

O subtipo cromóforo (CHRCC) representa cerca de 5-10% dos CCRs, e embora apresente um perfil tumoral mais indolente quando comparado com ccRCC, existe um subconjunto desses tumores com perfil mais agressivo e com alto potencial metastático (Casuscelli et al. 2017; Finley et al. 2011). Referente as características histológicas desse subtipo, este apresenta células poligonais e grandes, com citoplasma reticulado e eosinofílico, e núcleos atípicos com halo perinuclear (**Figura 1 C**).

Embora avanços nos estudos anatomopatológicos, clínicos e moleculares das neoplasias renais, permitindo a avaliação de fatores prognósticos quando associados a algoritmos ou nomogramas ter mostrado uma substancial relevância neste âmbito (Finley et al.



Fonte: Adaptado de Rini et al. (2009).

Figura 1 – Características histológicas dos subtipos de CCRs mais comuns e suas respectivas frequências. A. Subtipo células claras (ccRCC). **B.** Subtipo papilífero (PRCC). **C.** Subtipo Cromóforo (CRCC).

2011; Novara et al. 2007), o estadiamento do tumor e sua classificação histológica ainda constituem um dos melhores indicadores de prognóstico e diagnóstico desse tipo tumoral (Arede 2014).

1.4 PERFIS MOLECULARES DOS CCRS

Apesar da classificação histológica dos tumores renais constituir uma ferramenta de grande importância no diagnóstico e na avaliação do prognóstico dos pacientes (Jonasch et al. 2012), a identificação de características moleculares que diferencie os subtipos desta doença tem sido uma abordagem cada vez mais usada e importante, com o objetivo de contribuir na caracterização mais precisa dos subtipos, como também no prognóstico e na escolha mais assertiva do tratamento (Sato et al. 2013).

Neste contexto, trabalhos vêm sendo desenvolvidos para caracterizar os aspectos moleculares de diversas doenças, principalmente doenças heterogêneas como as neoplasias malignas. Desta forma, consórcios como o Atlas do Genoma do Câncer (TCGA, do inglês, *The Cancer Genome Atlas*) vêm realizando diversos estudos genômicos, focando de forma individual em cada subtipo de tumor, utilizando dados gerados a partir de múltiplas plataformas (Chen et al. 2017).

No que se refere ao perfil molecular dos CCRs, alterações recorrentes são descritas em subtipos específicos. Em relação as alterações reportadas no subtipo ccRCC, o subtipo mais prevalente, os genes mais frequentemente descritos como alterados são: *VHL*,

PBRM1, *SETD2*, *KDM5C*, *PTEN*, *BAP1*, *MTOR*, *TP53*, *TCEB1* (*ELOC*), *SMARCA4*, *ARID1A* e *PIK3CA*. Além de alterações pontuais, alterações nos cromossomos 3, 5, 10 e 14 também são frequentemente descritas neste subtipo (Varela et al. 2011; Creighton et al. 2013; Sato et al. 2013; Gerlinger et al. 2014; Costa et al. 2018; Hsieh et al. 2018).

Cerca de 80% dos ccRCC apresentam inativação do gene *VHL* por mutação ou metilação (Nickerson et al. 2008; Sato et al. 2013). O gene *VHL* é um supressor tumoral, e em muitos casos, um de seus alelos é inativado por algum tipo de variação e o segundo é acometido por deleção na região 3p25-26 em aproximadamente 90% dos casos de ccRCC (Presti et al. 1991; Beroukhim et al. 2009; Brugarolas 2014), apresentando um papel importante tanto na doença hereditária quanto esporádica (Nickerson et al. 2008).

O tipo papilífero, subdividido em tipo 1 e 2, também apresenta características genéticas específicas. Os tumores tipo 1 foram associados por apresentarem variantes no gene *MET*, enquanto os tumores tipo 2 foram caracterizados por apresentarem alterações nos genes *CDKN2A*, *SETD2* e *FH* (Linehan et al. 2016). Alterações em *PBRM1*, *BAP1* e *SETD2* também são encontradas no subtipo papilífero do tipo 2, porém em frequências menores do que as observadas no ccRCC (Chen et al. 2017; Linehan et al. 2016; Creighton et al. 2013). Além disso, padrões de metilação também foram associados ao subtipo 2, caracterizando uma doença mais agressiva com menor taxa de sobrevida entre os pacientes (Linehan et al. 2016).

O CCR do subtipo cromóforo, também teve suas características moleculares analisadas. Em vista de ser um subtipo raro, as alterações identificadas apresentaram uma frequência menor (aproximadamente 10%) do que nas análises encontradas nos outros subtipos. Os genes encontrados mutados, nestes casos, foram o *PTEN* e o *TP53*, no entanto, também foi possível identificar alterações em *MTOR*, *NRAS* e *FLCN* (variantes germinativas relacionadas a síndrome hereditária). Além disso, fusões gênicas com o gene *TERT* foram reportadas de forma frequente neste subtipo, e perfis de metilação foram relacionados a uma doença mais agressiva (Davis et al. 2014). Além disso, alterações cromossômicas são frequentes neste subtipo, como perdas dos cromossomos Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17, e 21 (Rini et al. 2009).

1.5 BIÓPSIA LÍQUIDA COMO FERRAMENTA DE DETECÇÃO E AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DOS CARCINOMAS DE CÉLULAS RENAIAS

A detecção do câncer renal é usualmente realizada através dos sintomas ou incidentalmente por exames de imagem, cujo real diagnóstico do tumor é feito observando amostras de células renais ou aparência do órgão. As metodologias utilizadas em exames de imagem para detecção das neoplasias renais incluem tomografia computadorizada (TC), exame de ressonância magnética (RM), ultrassom, angiografia e cintilografia (AMERICAN CANCER SOCIETY 2020), cujos exames fornecem evidências do diagnóstico. Entretanto, alguns pacientes podem precisar de uma biópsia.

As biópsias teciduais (BT) constituem uma ferramenta fundamental nas investigações histológicas de tumores e, portanto, são essenciais na oncologia. Embora não seja uma metodologia usual na avaliação de tumores renais, a biópsia tecidual pode ser utilizada na caracterização histopatológica pré-operatória do tumor (Silverman et al. 2006; Muglia e Prando 2015). A caracterização molecular do tumor na biópsia tecidual (BT) tem se destacado em função de suas potencialidades, de forma a melhorar as avaliações principalmente de tumores caracterizados com elevada heterogeneidade (Saquicela et al. 2019).

A utilização de fluídos corpóreos no contexto de biópsia líquida (BL) vêm ganhando espaço como uma ferramenta importante na identificação de alterações genômicas e no monitoramento de pacientes oncológicos por se tratar de uma abordagem minimamente invasiva. Do ponto de vista clínico, obter amostras seriadas de tecido do paciente para avaliar progressão da doença seria na maioria dos casos inviável (Wan et al. 2013), uma vez que consideram outros fatores como questões financeiras e os riscos existentes para os pacientes associados à BT, bem como infecções e sangramentos (Wan et al. 2017).

Para monitoramento de resposta ao tratamento, progressão ou recidiva, a BT quando comparada com BL, fica menos atrativa. A BL permite coletas seriadas ao longo do monitoramento do paciente, possibilitando que seja realizada uma avaliação dinâmica, auxiliando na detecção precoce da progressão da doença, antes mesmo deste evento ser

detectado em exames de imagem, bem como avaliação da resposta ao tratamento (Murtaza et al. 2013; Bettegowda et al. 2014; Barros et al. 2018) além de monitoramento de pacientes considerados curados (Ferreira et al. 2016). Em adição, esta abordagem também permite avaliar a heterogeneidade tumoral, uma vez que o DNA encontrado nos fluidos pode ser representativo de diferentes regiões do tumor (Siravegna et al. 2017; Campos et al. 2018; Miguez et al. 2020).

Existem diversos componentes da BL que podem ser analisados, como, por exemplo, células tumorais circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (ctDNA), RNA tumoral circulante (ctRNA) e exossomos (Siravegna et al. 2017). Entretanto, o tempo de meia-vida dessas células é de poucas horas (em torno de 5h) e por isso precisam ser analisadas rapidamente (Kang e Pantel 2013). Em vista disso, foram desenvolvidos métodos altamente sensíveis e específicos para detecção de componentes como o ctDNA, permitindo a detecção precoce de células tumorais, evolução para metástase ou doença residual mínima (Saquicela et al. 2019).

Embora os relatos caracterizando os níveis de ctDNA no CCR sejam escassos e ainda não existam dados suficientes que sedimentam sua aplicação nesta área, o ctDNA representa uma estratégia promissora na BL para o monitoramento não invasivo de cânceres urológicos (Smith et al. 2020).

No tocante à detecção do ctDNA, ele pode ser detectado em fluidos como plasma (Perkins et al. 2012; Murtaza et al. 2015; Ferreira et al. 2016), urina (Birkenkamp-Demtröder et al. 2016; Togneri et al. 2016; Miguez et al. 2020), liquor (Pan et al. 2015), saliva (Alix-Panabières e Pantel 2016), líquido pleural (Kimura et al. 2006), entre outros. De modo geral, estas moléculas são resultantes de processos de apoptose e necrose sofridos pelas células tumorais, as quais são representativas e carregam alterações genômicas concordantes com o espectro mutacional do tumor (Qin et al. 2016; Mouliere et al. 2011). O ctDNA está contido em meio de cfDNA (do inglês, *cell-free DNA*), proveniente de mecanismos fisiológicos de células não tumorais, é normalmente encontrado em menor frequência (<1%) (Haber e Velculescu 2014) e em fragmentos degradados, em média 125 pares de bases (Campos et al. 2018).

Em virtude disso, para detectar alterações tumores-específicas no ctDNA, me-

tecnologias sensíveis são necessárias. Essas tecnologias podem tratar-se de abordagens direcionadas, ou seja, aquelas que pretendem detectar alterações previamente conhecidas (PCR digital (ddPCR, do inglês *droplet digital PCR*) e *amplicon deep sequencing*) ou abordagens não direcionadas, que visam rastrear novas alterações (sequenciamento de genoma completo ou exoma, e *target sequencing*) (Murtaza et al. 2013).

O sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*), vem sendo empregado neste cenário como uma ferramenta com boa sensibilidade (>94%) e especificidade (>98%) (Thierry et al. 2014; Bettegowda et al. 2014), possibilitando identificar alterações confiáveis com frequências menores de 1%, partindo de uma cobertura ≥ 20.000 vezes, “*deep sequencing*” (Phallen et al. 2017; Husain e Velculescu 2017). Desta forma, estudos recentes vêm mostrando uma correlação positiva entre detecção de alterações no tumor e no ctDNA extraídos de fluidos corpóreos, com progressão de doença (Murtaza et al. 2013; Murtaza et al. 2015; Thierry et al. 2014; Rothé et al. 2014). Além disso, ainda é possível relacionar a presença de ctDNA com estadiamento da doença, sendo este, encontrado em 75% dos casos de doenças de estadios mais avançados e em 50% dos tumores primários (Bettegowda et al. 2014).

Neste propósito, diversos estudos vêm sendo realizados utilizando ctDNA na detecção e monitoramento de diferentes tipos de câncer e em diferentes fluidos corpóreos (Bettegowda et al. 2014; Murtaza et al. 2015), incluindo trabalhos do nosso grupo (Ferreira et al. 2016; Barros et al. 2018).

Consonante aos CCRs, como dito anteriormente, cerca de 20-40% desses tumores irão evoluir para metástases (Janzen et al. 2003), porém, o momento do desenvolvimento e a localização destas, são difíceis de prever. Desta forma, a detecção precoce da doença metastática pode auxiliar na melhora dos desfechos clínicos dos pacientes. Sendo assim, o ctDNA detectado na BL vêm como uma alternativa promissora para ser utilizado na vigilância de pacientes submetidos à nefrectomia (Bergerot et al. 2018). Al-Qassab et al. (2017) avaliaram o ctDNA extraído do plasma de 30 pacientes com CCRs localizados utilizando um painel de 14 genes frequentemente mutados. Vinte pacientes tiveram variantes somáticas detectadas, por NGS, em pelo menos um dos 14 genes testados, indicando que, mesmo em CCRs localizados é possível detectar uma marca tumoral no ctDNA presente

nos fluidos corpóreos (Al-Qassab et al. 2017).

Além de apresentar um papel importante na doença renal localizada, o ctDNA também pode auxiliar em determinados aspectos das doenças metastáticas. Um estudo com 220 pacientes com CCR metastático, identificou em aproximadamente 79% dos pacientes, utilizando ctDNA, pelo menos uma alteração genômica, e as alterações mais frequentes foram identificadas em genes previamente relacionados ao CCR (Pal et al. 2017). Portanto, é possível sugerir a utilização da BL nesses casos como uma ferramenta auxiliar na detecção de biomarcadores, seleção de terapia e detecção de resistência ao tratamento (Lim et al. 2016; Rosenberg et al. 2016).

Devido à localização anatômica dos CCRs, a análise do conteúdo da urina como BL pode ser um dos mais aplicáveis, visto que este componente pode estar em constante contato com o tumor, havendo assim, uma maior probabilidade de se encontrar ctDNA na urina destes pacientes. O ctDNA encontrado na urina pode ser originário tanto da esfoliação das células epiteliais do trato urinário quanto do DNA transrenal proveniente da filtração glomerular, e ambos vêm sendo estudados para serem utilizados na detecção e monitoramento de tumores urológicos, principalmente em tumores de bexiga e próstata, e também não-urológicos (Szarvas et al. 2007; Majer et al. 2015; Salvi et al. 2016; Birkenkamp-Demtröder et al. 2016; Miguez et al. 2020). Partindo de informações como estas, Majer et al. (2015) publicaram uma revisão de como as potenciais abordagens de BL (urina e plasma) podem ser úteis na detecção de biomarcadores, no diagnóstico e monitoramento de pacientes com ccRCC, por ser o subtipo mais prevalente e agressivo, e concluíram, bem como outros estudos, que apesar de promissora, mais estudos necessitam serem realizados com objetivo de identificar resultados mais confiáveis (Junqueira-Neto et al. 2019; Meo et al. 2017; Majer et al. 2015). Um estudo do nosso grupo tem analisado urina para detecção de ctDNA em tumor de Wilms, um tumor renal pediátrico. Para todos os casos, foi possível detectar ctDNA em ao menos um dos fluidos corpóreos coletados antes do início do tratamento, além disso, houve uma diminuição significativa de ctDNA na primeira coleta após o início do tratamento neoadjuvante. Pacientes que apresentaram características clínicas de progressão tumoral, as marcas identificadas persistiram nos fluidos corpóreos durante o tratamento demonstrando, além da concordância com a progressão

clínica, o potencial de antecipar a progressão diagnosticada com exames de imagem. De forma geral, este estudo demonstrou o grande potencial da utilização de plasma e urina em conjunto para o monitoramento de pacientes com este tipo de tumor (Miguez et al. 2020). Assim, a BL destaca-se por seu grande potencial clínico, possibilitando conhecer os vários estágios do processo neoplásico tanto na detecção, monitoramento e metástase do câncer.

2 JUSTIFICATIVA

Diante da literatura vigente, fica clara a importância de caracterizar as alterações genômicas dos diferentes subtipos de CCR e de explorar a detecção de biomarcadores tumorais em fluidos corpóreos no sentido de avaliar o potencial desta abordagem em auxiliar de forma mais específica e precisa no diagnóstico diferencial de subtipos de CCR e de prognóstico. A incorporação da BL na prática clínica tem se mostrado promissora em relação ao valor prognóstico e no monitoramento de recidivas e de resposta ao tratamento, diminuindo a necessidade de intervenções cirúrgicas convencionais e sendo complementar a exames de imagem.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Explorar a utilização de biópsia líquida para detecção de DNA tumoral em plasma e urina usando painel multigênico customizado e *amplicon* personalizado como ferramenta com potencial para auxiliar o diagnóstico e prognóstico de pacientes diagnosticados com CCR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar um painel de genes frequentemente mutados em tumores renais;
- Avaliar a capacidade do painel multigênico customizado de detectar variantes somáticas em amostras tumorais (biópsias ou espécimes cirúrgicas) de pacientes diagnosticados com CCR;
- Avaliar a presença das variantes somáticas específicas do tumor em DNA livre no plasma ou urina dos pacientes, coletadas no momento do diagnóstico (*baseline*), por *amplicon* personalizado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Tamanho amostral: Foram analisados tumores primários de carcinoma CCR, sendo destes, uma estimativa de aproximadamente 75% serem do subtipo células claras e 25% outros subtipos. Como critérios de inclusão, selecionamos pacientes com idade ≥ 18 anos diagnosticados com CCRs, não previamente tratados, submetidos à ressecção cirúrgica do tumor primário, podendo esta ser nefrectomia parcial ou radical, e que aceitaram participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndice A**).

Os pacientes foram recrutados e os critérios de elegibilidade dos mesmos foram avaliados com auxílio e supervisão do Dr. Stênio Cássio Zequi e Dr. Walter Henriques da Costa, urologistas que compõe o corpo clínico do Núcleo de Urologia do A. C. Camargo Cancer Center (**Tabela 6, Apêndice B**).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após a ressecção cirúrgica do tumor, o mesmo foi submetido a uma avaliação histopatológica para classificação do subtipo e estadiamento da doença. Após esta primeira avaliação realizada para diagnosticar os pacientes, previamente à extração do DNA, uma nova lâmina do tecido foi obtida e corada com hematoxilina e eosina (HE) para que os casos fossem novamente avaliados por uma patologista especialista, Dra. Stephania Martins Bezerra, para garantir que todos os casos selecionados tratavam-se de CCRs, além disso, confirmar a presença do valor mínimo de 70% de células tumorais.

As amostras de tumores renais, após terem passado por esta avaliação criteriosa, foram submetidas a extração do DNA após marcação e dissecação do tecido com maior porcentagem de células tumorais. Foram incluídas amostras com no mínimo 60% de células tumorais. Além das amostras tumorais, também foram coletadas amostras de sangue, para utilização do leucócito e plasma, e urina de todos os pacientes no momento

da cirurgia (amostras aqui chamadas de *baseline*). As informações sobre as extrações do DNA das diferentes amostras serão abordadas mais adiante ainda na seção de Materiais e Métodos.

Após separadas as amostras utilizadas no estudo, duas avaliações genômicas foram realizadas. A primeira avaliação foi realizada utilizando as amostras de tumor e leucócito dos pacientes, as quais foram submetidas à uma avaliação utilizando um painel de genes confeccionado nesse trabalho, com objetivo de identificarmos as variantes somáticas, ou seja, as marcas tumorais de cada tumor. Em seguida, realizamos uma segunda avaliação genômica para rastrear as marcas tumorais no DNA extraído dos fluidos corpóreos coletados antes da cirurgia (*baseline*) de forma personalizada, ou seja, as marcas específicas do tumor de cada paciente. O delineamento geral do estudo está apresentado na **Figura 2**.

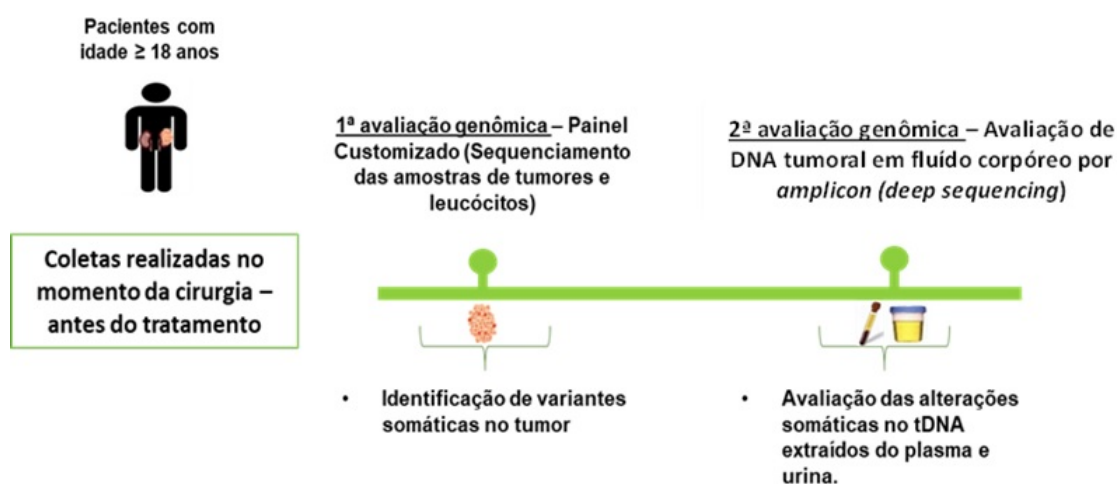


Figura 2 – Delineamento do estudo.

4.3 COLETAS DE AMOSTRAS DE SANGUE E URINA

As coletas de sangue e urina dos pacientes que aceitaram a participar do projeto mediante a assinatura do TCLE, foram realizadas por profissionais especializados do A. C. Camargo Cancer Center, sob acompanhamento de uma das integrantes do grupo de enfermeiras de pesquisa do Departamento de Tumores Urológicos do A. C. Camargo Cancer Center. Para separação do plasma, e posteriormente extração do DNA circulante presente no mesmo, foram realizadas coletas de 4 mL de sangue em tubos *PAXgene Blood*

DNA tubes (*QIAGEN*), os quais contêm reagentes que impedem a coagulação do sangue e estabilizam a amostra por até 14 dias em temperatura ambiente, de acordo com as especificações do fabricante (<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/sample-collection-stabilization/dna/paxgene-blood-dna-tubes/>). Para a separação do leucócito, foram realizadas as coletas de sangue em tubos contendo EDTA (anti-coagulante recomendado para melhor preservar a morfologia celular).

As coletas de urina foram realizadas em tubos coletores específicos para esta finalidade em um volume de aproximadamente 50 mL.

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA

As extrações dos DNAg (DNAs genômicos) das amostras foram realizadas no Laboratório de Macromoléculas vinculado ao Biobanco desta instituição, de forma automatizada, utilizando o equipamento *QIASymphony SP* (*QIAGEN*), de acordo com o procedimento operacional padrão (POP). Para as extrações do DNAg dos tumores, previamente avaliados e selecionados, e dos leucócitos foi utilizado o *kit QIASymphony DNA Mini Kit* (*QIAGEN*), para DNA circulante livre presente na amostra de plasma o *QIASymphony PAXgene Blood ccfDNA Kit* (*QIAGEN*) e para os componentes da urina, tanto o sedimento quanto o sobrenadante, utilizou-se o *kit QIASymphony DNA Midi* (*QIAGEN*). Além dos protocolos automatizados citados acima, os DNAs de algumas amostras de plasma foram extraídos de forma manual utilizando o *kit MagMax Cell-Free DNA Isolation* (*Thermo Fisher*), como forma de otimizar as análises deste fluido, visto que para a extração automatizada, é preciso de pelo menos 12 amostras para iniciar a extração neste equipamento.

Os DNAs extraídos, antes de serem utilizados para este estudo, foram avaliados quanto a sua pureza e integridade, utilizando o *Nanodrop 2000* e o *QIAseq DNA Quantimize kit* (*QIAGEN*), respectivamente. As quantificações do DNA inicial foram realizadas utilizando o *Qubit Fluorometer* com o *kit Qubit dsDNA HS Assay* (*Thermo Fisher*), o qual trata-se de um método de quantificação baseado em fluorescência que emprega fluorófilos específicos que se ligam ao DNA dupla fita, levando a uma quantificação mais

específica e exata quando comparada com métodos baseados em espectrometria.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL MUTACIONAL

4.5.1 Construção do painel customizado

Um painel customizado de genes foi desenvolvido a partir de consulta do banco de dados TCGA e de uma análise criteriosa da literatura disponível sobre CCR (Sanchez-Vega et al. 2018; Ricketts et al. 2018; Creighton et al. 2013; ??; Davis et al. 2014). Para a análise dos dados presentes no banco de dados do TCGA, acessamos o portal onde disponibilizam os dados genômicos dos estudos depositados. Dentro desta área do portal, *Genomic Data Commons Data Portal* (<https://portal.gdc.cancer.gov/>), selecionamos o sítio primário do tumor como sendo o órgão rim, onde neste, são listados todos os dados dos projetos que submeteram seus resultados neste portal. Para esta pesquisa, selecionamos o programa de dados do TCGA, o qual é composto por 943 casos, e os 4 projetos vinculados a este programa, o TCGA-KIRC, TCGA-KIRP, TCGA-KICH e TCGA-SARC, os quais trazem dados referentes aos seguintes subtipos de CCR, células claras, papilífero, cromóforo e sarcomatóide, respectivamente. A partir disso, tivemos acesso aos dados dos genes avaliados nestes estudos e as frequências de mutações nos mesmos. Desta forma, avaliamos os genes mais frequentemente mutados nestes estudos, e avaliamos de forma criteriosa na literatura como os mesmos se apresentavam descritos. Como forma de estimar a capacidade do painel customizado de detectar variante somática em tumores renais, utilizamos a ferramenta online *cBioPortal* (<http://www.cbioportal.org>) para analisar a frequência com que os genes selecionados encontravam-se alterados nos onze estudos disponíveis de CCRs com dados de alteração genética disponíveis nesta plataforma. O desenho dos *primers* foi baseado na inserção das coordenadas das regiões dos genes de interesse na ferramenta *QiaSeq DNA Panel Design* (<https://geneglobe.qiagen.com/us/product-groups/qiaseq-targeted-dna-custom-panels>), o qual possui um algoritmo próprio que considera uma série de fatores para desenhar de forma mais otimizada os primers, como: conteúdo GC, especificidade, interação entre as sequências desenhadas e cobertura ótima dos *primers*.

4.5.2 Construção das bibliotecas

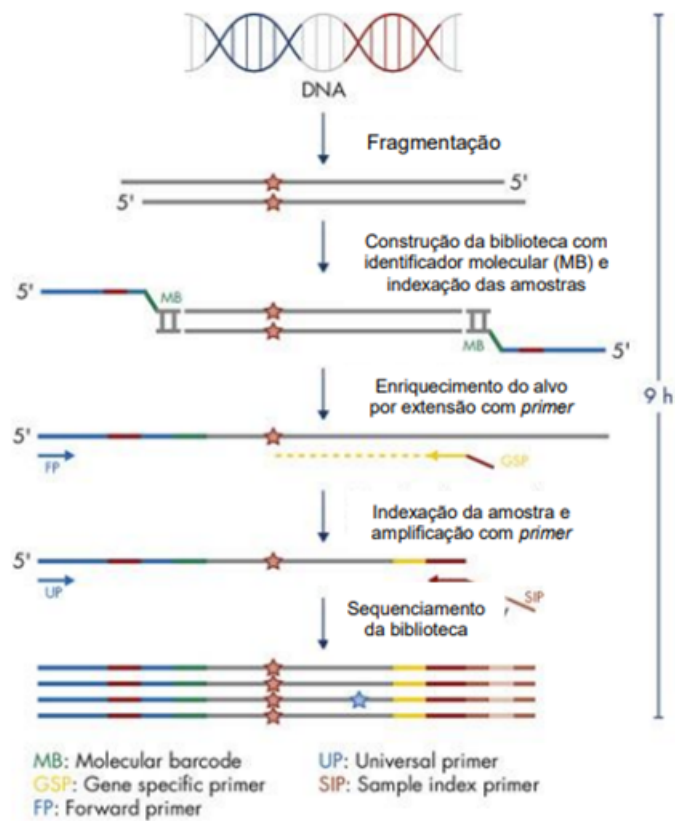
4.5.2.1 Bibliotecas de Painel Customizado

As bibliotecas das amostras de DNA do tumor e do leucócito foram construídas de acordo com o *kit QIAseq Targeted DNA Custom Panel (QIAGEN)*, segundo protocolo disponibilizado pelo fabricante.

Esta metodologia utiliza uma variação de 10 a 40 ng de DNA genômico (DNAg) o qual é fragmentado enzimaticamente e identificadores moleculares únicos (UMIs, do inglês, *Unique Molecular Index*) são inseridos a cada molécula original de DNA, além dos identificadores por amostra. Os fragmentos gerados a partir deste processo são utilizados como molde na etapa de enriquecimento, onde vários ciclos de PCR são realizados de forma direcionada utilizando um primer gene-específico e um primer universal. No passo final, ocorre a amplificação da biblioteca e a indexação das amostras com adaptadores específicos da plataforma Illumina utilizando o *kit QIAseq 96-Index I Set A (QIAGEN)* (**Figura 3**).

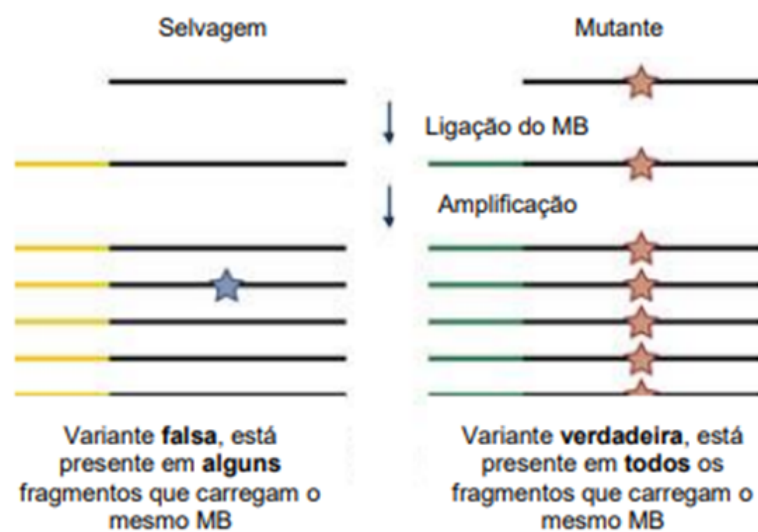
Pelo fato desta abordagem utilizar os UMIs, ela traz uma melhor sensibilidade na detecção de variantes de baixa frequência, visto que, esses identificadores podem ser contados e são representativos de moléculas únicas. Além disso, os UMIs permitem minimizar a taxa de identificação de variantes falsas positivas decorrentes de erros de amplificação por PCR, observando se os mesmos UMIs estão representando amplificação de uma única molécula de DNA original (**Figura 4**).

As bibliotecas das amostras de tumores foram feitas de forma individualizadas, ou seja, para cada amostra de tumor, uma biblioteca foi feita e indexada. No entanto, já para as amostras de leucócito, para otimizar as reações, juntamos de forma equimolar 40 ng de massa de de DNA a cada cinco amostras leucócitos diferentes em um mesmo *pool*. Utilizamos esta mesma estratégia de colocar as amostras em *pool* para as amostras de DNA tumoral extraídos dos plasmas e dos componentes da urina, que foram submetidas ao sequenciamento *target sequencing* (painel customizado). Para estes casos, foram colocadas em *pools* de quatro amostras de forma equimolar, com objetivo de aumentar a massa de DNA para iniciar a construção das bibliotecas.



Fonte: Adaptado de <http://biomarkerinsights.qiagen.com/2016/08/31/what-is-digital-nextgeneration-sequencing-technology/>

Figura 3 – Esquema da metodologia utilizada na construção das bibliotecas do painel customizados.



Fonte: Adaptado de <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/qiaseq-targeteddna-panels/#productdetails>

Figura 4 – Princípio dos UMIS.

Como uma ferramenta exploratória, utilizamos *pool* de quatro amostras de DNA extraído de plasma, com quantidades equimolares para obtermos um total de 25 ng de DNA. Para os DNAs extraídos dos componentes da urina (sedimento e sobrenadante) utilizamos 40 ng, para isso o *pool* de quatro amostras foi formado com 5 ng de DNA extraído do sedimento e do sobrenadante da mesma amostra, totalizando 10 ng de DNA de cada amostra em um *pool* final de quatro amostras contendo 40 ng de DNA/*pool*.

As bibliotecas foram quantificadas utilizando o kit de quantificação *QIAseq Library Quant Assay Kit (QIAGEN)*, de acordo com as instruções do fabricante, para que os cálculos das quantidades equimolares de cada biblioteca fossem realizados, como forma de normalizá-las para ficarem em uma molaridade inicial de 4 nM para seguirem com as demais diluições para serem sequenciadas.

4.5.2.2 Bibliotecas de *Amplicon*

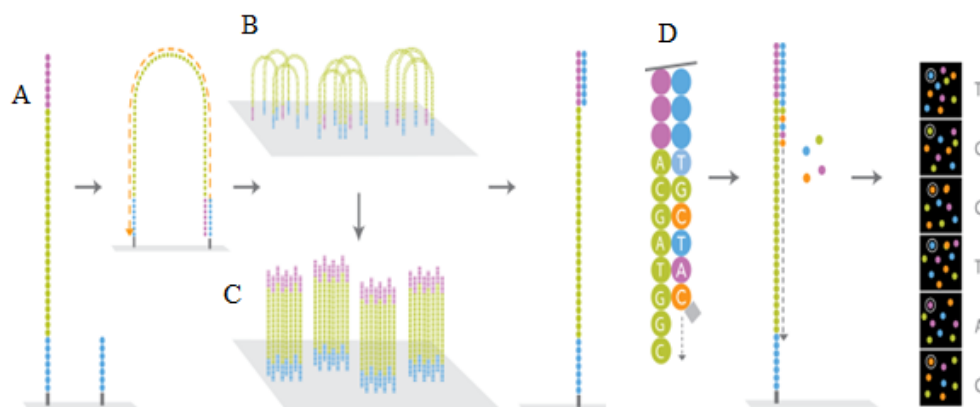
Após a identificação das variantes somáticas presentes nos tumores dos pacientes diagnosticados com CCR, para a avaliação do DNA extraído do plasma e dos dois componentes da urina, primers específicos para cada alteração foram desenhados utilizando a ferramenta online *Primer 3* (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e os DNAs (5-10 ng) foram submetidos a reações de PCR Multiplex, utilizando o *kit Qiagen Multiplex PCR Plus* para amplificar as regiões de interesse, seguindo as recomendações dos fabricantes. Os produtos das reações de PCR foram avaliados em eletroforese utilizando gel de agarose 2%, corado com *SybrSafe (ThermoFisher)*. As amostras amplificadas foram purificadas com *Ampure XP Beads*, e quantificadas com *Qubit dsDNA High Sensitivity*. Em seguida, os produtos de PCR purificados foram utilizados para o preparo da biblioteca de DNA com o *kit Ion Plus Fragment Library (Thermo Fisher)*, e submetidos ao sequenciamento NGS na plataforma *Ion Proton (Life Technologies)*, de acordo com as instruções do fabricante.

4.5.3 Sequenciamento de próxima geração (do inglês *next generation sequencing* – NGS)

4.5.3.1 Sequenciamento plataforma *Illumina*

Para a identificação das marcas tumorais dos pacientes selecionados, os DNAs extraídos do tumor primário obtidos por ressecção cirúrgica e dos leucócitos, foram submetidos ao sequenciamento de regiões alvos utilizando o painel de genes customizados (*Target sequencing*), na plataforma *NextSeq 500 (Illumina)*, onde nesta, as moléculas de DNA das regiões de interesse são hibridizadas a oligonucleotídeos que estão ligados à uma *flowcell*. Neste momento, uma polimerase faz a extensão de uma fita complementar ao fragmento, formando uma dupla fita. Esta dupla fita é desnaturada, e a fita original é lavada. A fita que permaneceu se curva, formando uma ponte, hibridizando sua extremidade em outro óligo complementar presente na *flowcell*. A polimerase liberada na reação realiza a extensão de uma fita complementar, formando uma ponte com dupla fita. Esta ponte passa por processo de desnaturação, formando então duas cópias do fragmento. Essas cópias se curvam, formando novas pontes, as quais passam pelo processo de amplificação inúmeras vezes. Após isto, as fitas reversas são lavadas, permanecendo na *flowcell* apenas as *fowards*. Para iniciar a leitura dos fragmentos *fowards*, ocorre a introdução do 1º *primer* de sequenciamento, iniciando assim a leitura do fragmento R1, onde a cada ciclo ocorre a incorporação de uma base e a emissão da fluorescência correspondente. Após isso, o produto da fita *foward* é lavado. Novamente ocorre a formação das pontes, amplificação dos fragmentos, porém desta vez, o fragmento original é lavado deixando apenas as fitas reversas. Para a leitura desta outra fita, R2, ocorre a introdução de um 2º *primer* de sequenciamento para que ocorra a síntese e a leitura dos fragmentos R2. A **Figura 5** explica de forma ilustrativa esta etapa de amplificação por PCR em ponte, a qual permite a formação de conjuntos de regiões iguais, “*clusters*”, na mesma região da *flowcell*. A leitura dos fragmentos é realizada base a base, onde em cada incorporação de um nucleotídeo ocorre um bloqueio de sinal, fazendo com que o equipamento leia um nucleotídeo por vez.

O equipamento é capaz de realizar a leitura dos nucleotídeos incorporados em



Fonte: https://www.dkfz.de/gpcf/hiseq_technology.html

Figura 5 – Metodologia do sequenciamento na plataforma *Illumina*. Em **A** podemos ver, uma molécula de DNA delimitada em suas extremidades por adaptadores, os quais se ligarão os nucleotídeos fixados na flowcell (base cinza). Em **B** a ilustração da PCR em ponte. Em **C** a formação dos clusters. Em **D**, a representação da leitura das fluorescências dos nucleotídeos pelo equipamento *HiSeq*, o qual é capaz de identificar e ler quatro fluorescências (o equipamento *NextSeq* é capaz de reconhecer e ler duas fluorescências).

duas cores, ou seja, a incorporação de timinas (T) emite uma fluorescência de cor verde, as citosinas (C) cor vermelha, adeninas (A) cor amarela, a qual é a mistura das cores verde e vermelha, e a guanina (G) é identificada pela ausência de fluorescência (Bronner et al. 2009).

Para os sequenciamentos realizados na plataforma *NextSeq 500*, utilizamos o kit de sequenciamento *Mid Output 300* ciclos (*Illumina*) e o sequenciamento do tipo *paired-end* (2x150), o qual é capaz de gerar até 260 milhões de seqüências em aproximadamente 39 Gb de dados.

4.5.3.2 Sequenciamento plataforma *Ion Torrent*

Para as bibliotecas que foram construídas utilizando a metodologia de *amplicon deep sequencing*, os sequenciamentos das mesmas foram realizados utilizando a plataforma *Ion Torrent*. Desta forma, após feitas as bibliotecas, foi realizada a etapa de PCR em emulsão (emPCR), onde os fragmentos de DNA são ligados à uma superfície contendo *beads* microscópicas. Cada fragmento de DNA é capturado por uma *bead* e amplificado, de forma individual milhares de vezes. Após esta etapa, é preciso ser realizado um processo que chamamos de enriquecimento, onde ocorre a seleção apenas das *beads* carregadas com

o material amplificado da etapa anterior, e assim procede-se a reação de sequenciamento. Neste tipo de plataforma, o sequenciamento é baseado na detecção da alteração do pH da solução utilizada para fazer o sequenciamento, e uma vez que ocorre a incorporação de uma base, uma molécula de hidrogênio é liberada, alterando desta forma o pH.

Os sequenciamentos para estas bibliotecas foram realizados na plataforma *Ion Proton* (*Thermo Fisher*), utilizando o *kit IonSequencing 200* (*Thermo Fisher*), e as reações de sequenciamento foram feitas em chips que são capazes de gerar até 10 giga bases de dados, equivalente à aproximadamente de 60-80 milhões de leituras.

4.5.4 Análise de Bioinformática

4.5.4.1 Análise dos dados gerados pela plataforma *Illumina*

Os dados gerados pela plataforma *Illumina*, referentes às bibliotecas realizadas com o painel customizado da *QIAGEN*, foram analisados online, onde mapeamento das sequências e a chamada das variantes foram feitas na plataforma *Data Analysis Center Qiagen* (<https://www.qiagen.com/dk/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>). A anotação das variantes foi realizada utilizando a ferramenta *Varseq* (*Golden Helix*), e os parâmetros utilizados na etapa inicial de seleção das variantes somáticas foram: cobertura média ≥ 200 sequências na região de interesse, frequência alélica da variante no tumor $\geq 2\%$ e sua ausência ou frequência $\leq 0,1\%$ no leucócito/*pool* de leucócito. Com relação ao efeito da variante, filtramos as que apresentaram classificação de *missense* (substituições de aminoácidos, deleções ou inserções *in frame*) e perda de função (LoF, do inglês *Loss of function* – alterações *nonsense*, em sítio de *splice* e inserções ou deleções *frameshit*, as quais podem levar ao truncamento da proteína). Além disso, uma avaliação visual das regiões chamadas foi realizada utilizando a ferramenta IGV (do inglês, *Integrative Genomics Viewer*).

Para detecção das variantes somáticas nos *pools* de amostras dos fluidos corpóreos (DNA de plasma e dos componentes da urina) sequenciados na plataforma *Illumina* realizamos as análises de forma online, utilizando a plataforma *Data Analysis Center Qiagen* (<https://www.qiagen.com/dk/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview->

page/). A anotação das variantes foi realizada utilizando a ferramenta Varseq (Golden Helix), com o *template Cancer Gene Panel* disponibilizado pela ferramenta, com critérios de qualidade de cobertura ≥ 2.500 leituras e frequência alélica da variante (VAF) $\geq 0,5\%$. A busca da marca tumoral nestas amostras foi feita de forma manual, buscando pela posição da variante e realizando a avaliação utilizando o IGV.

4.5.4.2 Análise dos dados gerados pela plataforma *Ion Torrent*

Os dados do sequenciamento das biópsias líquidas (plasma e urina) gerados pelo sequenciador *Ion Proton* foram analisados na ferramenta *Ion Torrent Server*, o qual mapeou as sequências gerando arquivos BAMs. A avaliação das variantes foi realizada a partir de uma inspeção visual utilizando a ferramenta IGV, e as frequências alélicas foram anotadas. Pelo fato de nesta etapa estarmos sequenciando regiões específicas de interesse com alterações somáticas já conhecidas, e por se tratar de biópsia líquida, como critério de avaliação utilizamos uma cobertura ≥ 20.000 sequências, nos dando a possibilidade de detecção acima de 0,5 a 1% de frequência alélica da variante (VAF). Como forma de identificar as marcas encontradas nas BL, além do critério de cobertura, utilizamos a VAF da amostra teste e a VAF de uma reação controle, a qual utilizamos para calcular o “ruído” da reação, como forma de classificar as variantes na BL em detectadas em 3 classes: Alta confiança (VAF $\geq 0,5\%$ e $\geq 2X$ o ruído da reação); Baixa confiança (VAF entre 0,1% e 0,5% e $\geq 2X$ o ruído da reação), e Não detectada (VAF $<0,1\%$ ou $<2X$ o ruído da reação). Para cada caso de tumor analisado, foram avaliadas até três variantes, com maior VAF, nas amostras de biópsia líquida.

5 RESULTADOS

5.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Um total de 103 pacientes foram recrutados para o estudo, porém, após a cirurgia, 12 lesões foram diagnosticadas como oncocitomas (massas renais benignas) ou neoplasias com baixo grau de malignidade, e 2 como carcinomas uroteliais, e foram excluídos do estudo. As informações gerais sobre sexo, tipo de cirurgia realizada, classificação de acordo com a ISUP e estadiamento do tumor estão descritas na **Tabela 3**. Como é possível observar a partir desta tabela, os participantes do projeto são em sua maioria do sexo masculino, são identificados em um estágio mais inicial da doença, ou seja, apresentam um perfil de doença menos agressiva ao diagnóstico, e como consequência foram submetidos a cirurgias mais conservadoras (nefrectomias parciais).

Dos 89 casos de carcinoma renal, 45 (50,6%; 45/89) casos foram classificados como carcinoma renal de células claras (ccRCC), 11 como cromóforo (12,4%; 11/89), 9 papilíferos do tipo 1 (10%; 9/89), 4 papilíferos tipo 2 (4,5%; 4/89), e os demais apresentaram outras classificações histológicas. O número de casos por subtipo histológico está apresentado na **Figura 6**.

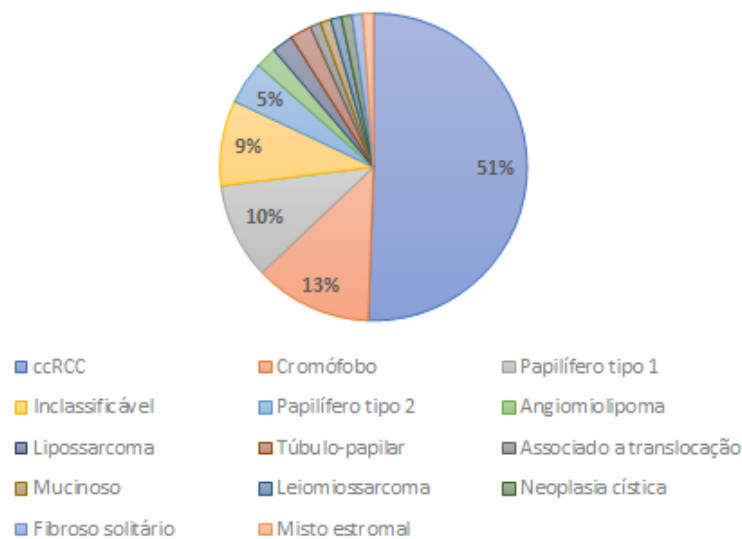


Figura 6 – Distribuição dos 89 casos avaliados no estudo de acordo com a classificação histológica.

Tabela 3 – Informações gerais dos 89 pacientes que tiveram status mutacional avaliado neste estudo.

| Variável | Categoria | Nº | (%) |
|-------------------------|-----------------|----|-----|
| Sexo | Masculino | 63 | 71 |
| | Feminino | 26 | 29 |
| Nefrectomia | Parcial | 62 | 70 |
| | Radical | 26 | 29 |
| | Retroperitoneal | 1 | 1 |
| ISUP | 0 | 6 | 7 |
| | 1 | 4 | 4 |
| | 2 | 23 | 26 |
| | 3 | 28 | 31 |
| | 4 | 13 | 15 |
| | - | 14 | 16 |
| | Alto grau | 1 | 1 |
| Estadiamento patológico | pT1b | 10 | 11 |
| | pT1bpN0 | 2 | 2 |
| | pT1bpNx | 1 | 1 |
| | pT2a | 4 | 4 |
| | pT3a | 9 | 10 |
| | pT3apN0 | 3 | 3 |
| | pT3apN1 | 2 | 2 |
| | pT3apNx | 1 | 1 |
| | pT3b | 2 | 2 |

Legenda: Estadiamento patológico: (T) tamanho do tumor primário, (N) linfonodos acometidos relacionados com a cadeia de drenagem linfática do órgão, (M) metástase à distância. As graduações numéricas indicam o tamanho do tumor e o número de linfonodos acometidos e metástases. As graduações alfabéticas indicam subcategorias e o “X” quando a categoria não pode ser avaliada.

5.2 SELEÇÃO DOS GENES E CUSTOMIZAÇÃO DO PAINEL

Para a seleção dos genes a serem inseridos no painel customizado, realizamos uma revisão bibliográfica de alterações somáticas reportadas em tumores renais, bem como a análise de dados genômicos disponíveis em bancos de dados, totalizando uma análise criteriosa de 16 artigos relevantes e comparando estes resultados. O desenho final apresentou um painel composto por um total de 28 genes, sendo que para 21 genes a região codificadora foi representada completamente e para 7 genes somente algumas regiões foram representadas no painel (**Tabela 4**) que denominamos de regiões *hotspots*. Essas regiões foram determinadas utilizando a ferramenta online disponível na plataforma do *cBioPortal*, onde é possível visualizar, selecionando os estudos e colocando uma lista de genes, quais as regiões onde se concentram o maior número de mutações naquele gene identifica-

Tabela 4 – Genes inseridos no painel customizado. Genes presentes no painel customizado e as frequências com que são encontrados alterados nos principais subtipos de CCRs (dados retirados do TCGA).

| Gene | Classificação do gene | ccCCR | Papilífero tipo 1 | Papilífero tipo 2 | Cromóforo | Predisposição hereditária |
|----------------|-----------------------|-------|-------------------|-------------------|-----------|---------------------------|
| <i>VHL</i> | GST | 51 | 1,1 | 1,1 | 0 | ccRCC |
| <i>PBRM1</i> | GST | 36 | 4 | 4 | 0 | |
| <i>BAP1</i> | GST | 10 | 5 | 5 | 0 | ccRCC |
| <i>SETD2</i> | GST | 13 | 6 | 6 | 1,5 | |
| <i>KDM5C</i> | GST | 7 | 0,4 | 0,4 | 0 | |
| <i>PTEN</i> | GST | 4 | 2,5 | 2,5 | 9 | ccRCC |
| <i>MTOR*</i> | Oncogene | 5 | 1,4 | 1,4 | 3 | |
| <i>TP53</i> | GST | 2,4 | 2,5 | 2,5 | 31 | |
| <i>ARID1A</i> | GST | 3 | 2,8 | 2,8 | 0 | |
| <i>SMARCA4</i> | GST | 2,4 | 4 | 4 | 0 | |
| <i>PIK3CA*</i> | Oncogene | 3 | 1,8 | 1,8 | 0 | |
| <i>PCF11</i> | | 0,9 | 4 | 4 | 0 | |
| <i>AR</i> | Oncogene | 0,2 | 5 | 5 | 0 | |
| <i>MET</i> | Oncogene | 0,7 | 7 | 7 | 0 | Papilífero tipo 1 |
| <i>FAT1</i> | GST | 1,7 | 4 | 4 | 1,5 | |
| <i>NF2</i> | GST | 0,9 | 4 | 4 | 0 | |
| <i>KDM6A</i> | GST | 0,9 | 4 | 4 | 0 | |
| <i>SMARCB1</i> | GST | 0,7 | 2,1 | 2,1 | 1,5 | |
| <i>NFE2L2</i> | Oncogene | 1,4 | 2,1 | 2,1 | 0 | |
| <i>STAG2</i> | GST | 1,9 | 2,5 | 2,5 | 0 | |
| <i>CDKN2A</i> | GST | 1,2 | 0,4 | 0,4 | 0 | |
| <i>FH</i> | GST | 0,2 | 0,7 | 0,7 | 0 | Papilífero tipo 2 |
| <i>FLCN</i> | GST | 0,2 | 0,4 | 0,4 | 0 | Cromóforo |
| <i>NRAS*</i> | Oncogene | 0 | 0,7 | 0,7 | 1,5 | |
| <i>BRAF*</i> | Oncogene | 0,2 | 1,4 | 1,4 | 0 | |
| <i>KRAS*</i> | Oncogene | 0,2 | 1,8 | 1,8 | 0 | |
| <i>EGFR*</i> | Oncogene | 1,7 | 0,4 | 0,4 | 0 | |
| <i>TCEB1*</i> | | 0,7 | 0,4 | 0,4 | 1,5 | |

Legenda: A sigla ccRCC foi utilizada para representar o subtipo histológico de carcinoma de células renais de células claras (do inglês, *clear cell Renal Cell Carcinoma*). Os genes apresentados na tabela com um (*), são os genes os quais estão representados em nosso painel por regiões *hotspots*, e não o gene completo como os demais. Para representar os genes classificados como genes supressores de tumor utilizamos na tabela a sigla GST. As frequências apresentadas em negrito e sublinhadas, estão relacionadas com os subtipos histológicos onde foram identificadas na literatura como frequentemente mutados.

das na literatura. Utilizando a ferramenta online *OncoKB* (<https://www.oncokb.org/>), a qual disponibiliza informações e níveis de evidências de acionabilidade dos genes, classificamos os genes em genes supressores de tumor (GST) e oncogenes. Dentre os 28 genes selecionados, 17 (aproximadamente 61%; 17/28) foram genes classificados GST, 9 (apro-

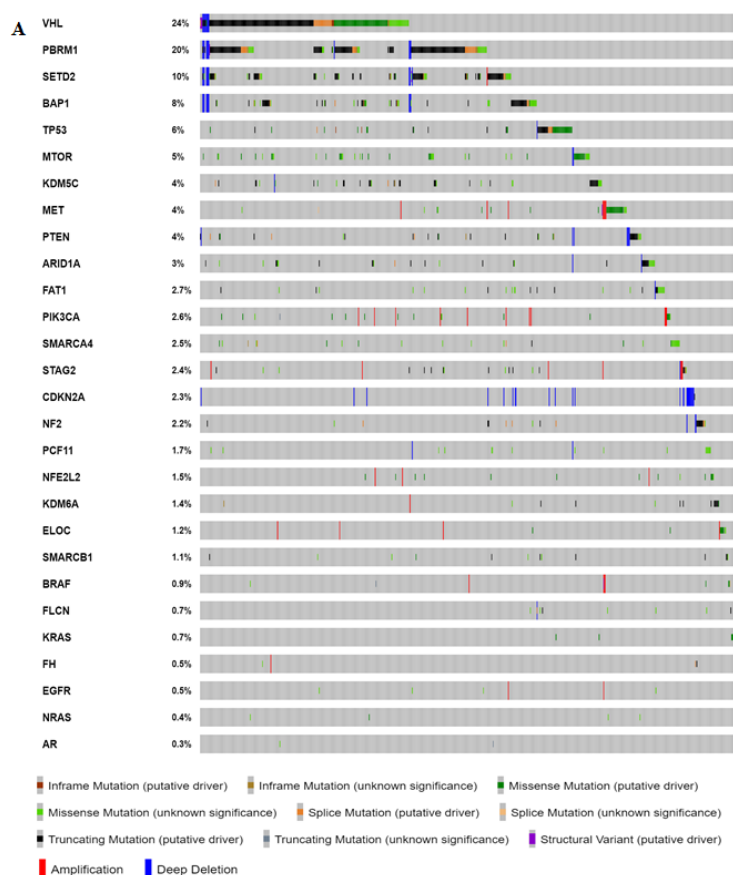
ximadamente 32%; 9/28) como oncogenes e 2, os genes *PCF11* e *TCEB1*, ainda não apresentam esta classificação muito evidente (**Tabela 4**).

O desenho final do painel customizado apresentou um total de 1.119 *amplicons* com tamanho de aproximadamente 150-250 pares de base (pb) cada, totalizando 84,090 bases, que abrangem 100% de cobertura horizontal das regiões selecionadas.

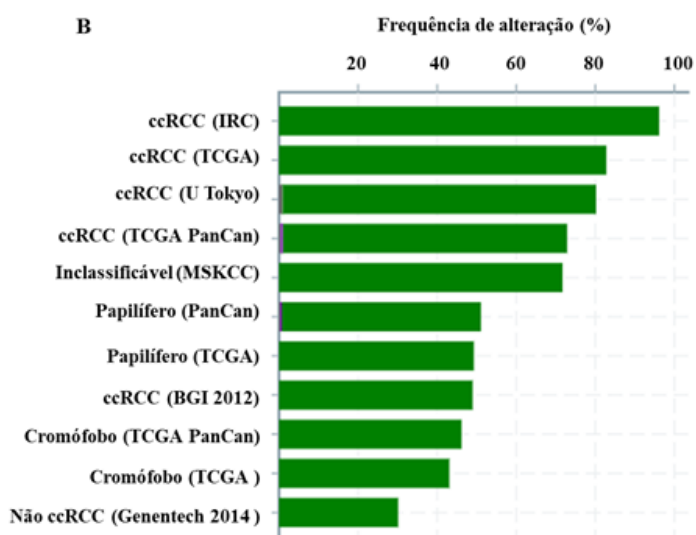
Como forma de estimar a capacidade do painel customizado de detectar variante somática em tumores renais, utilizamos a ferramenta online *cBioPortal* (<http://www.cbioportal.org>) para analisar a frequência com que os genes selecionados encontravam-se alterados em onze estudos de CCRs com dados de alteração genética disponíveis nesta plataforma, juntamente com dados disponíveis em mais cinco artigos curados manualmente (Sanchez-Vega et al. 2018; Ricketts et al. 2018; Creighton et al. 2013; Linehan et al. 2016; Davis et al. 2014). A partir dessa análise *in silico* foi possível observar que em mais de 1.200 amostras presentes no conjunto de estudos analisados e com dados submetidos no banco de dados *cBioPortal*, os genes presentes no nosso painel customizado foram identificados em 65% (777/1204) das amostras analisadas. Na **Figura 7A**, observamos o resultado desta análise juntamente com a frequência com que os genes foram identificados como alterados e suas respectivas alterações genéticas. Além disso, quando analisamos estes dados por subtipos histológicos, observamos que os genes do painel foram identificados como alterados em 80% dos dados submetidos referentes ao subtipo ccRCC (**Figura 7B**).

5.3 AVALIAÇÃO GENÔMICA DAS AMOSTRAS TUMORAIS

O sequenciamento de 89 tumores foi realizado em DNA de tumor, utilizando nosso painel de genes customizados. Identificamos em uma primeira análise, utilizando o *software Data Analysis Center Qiagen* (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>), pelo menos uma variante potencialmente somática em 72 tumores. Para confirmar se as alterações eram de origem somática, utilizamos os *primers* desenhados de forma específica que abrangiam as regiões das variantes encontradas, e avaliamos o DNA dos respectivos tumores e leucócitos. Após esta validação, 59 tumores apresentaram pelo menos uma



(a) Análise mostra que os genes presentes no painel customizados foram identificados como alterados em 65% das amostras com dados disponíveis e a frequência com que estes encontram-se alterados em ordem do mais frequente para o menos frequente.



(b) Análise mostra a porcentagem de frequência de alterações genéticas que os genes analisados nesses estudos se encontraram alterados nos estudos submetidos no portal.

Figura 7 – Análise *in silico* dos genes do painel customizado utilizando os dados de alteração genética dos estudos disponíveis no *cBioPortal*. ccRCC (do inglês *clear cell Renal Cell Carcinoma*).

variante somática, ou seja, identificamos em 66,3% dos casos sequenciados pelo menos uma marca tumoral (59/89). Em relação ao número das variantes detectadas, detectamos 105 variantes inicialmente classificadas como somáticas (**Tabela 7, Apêndice C**)

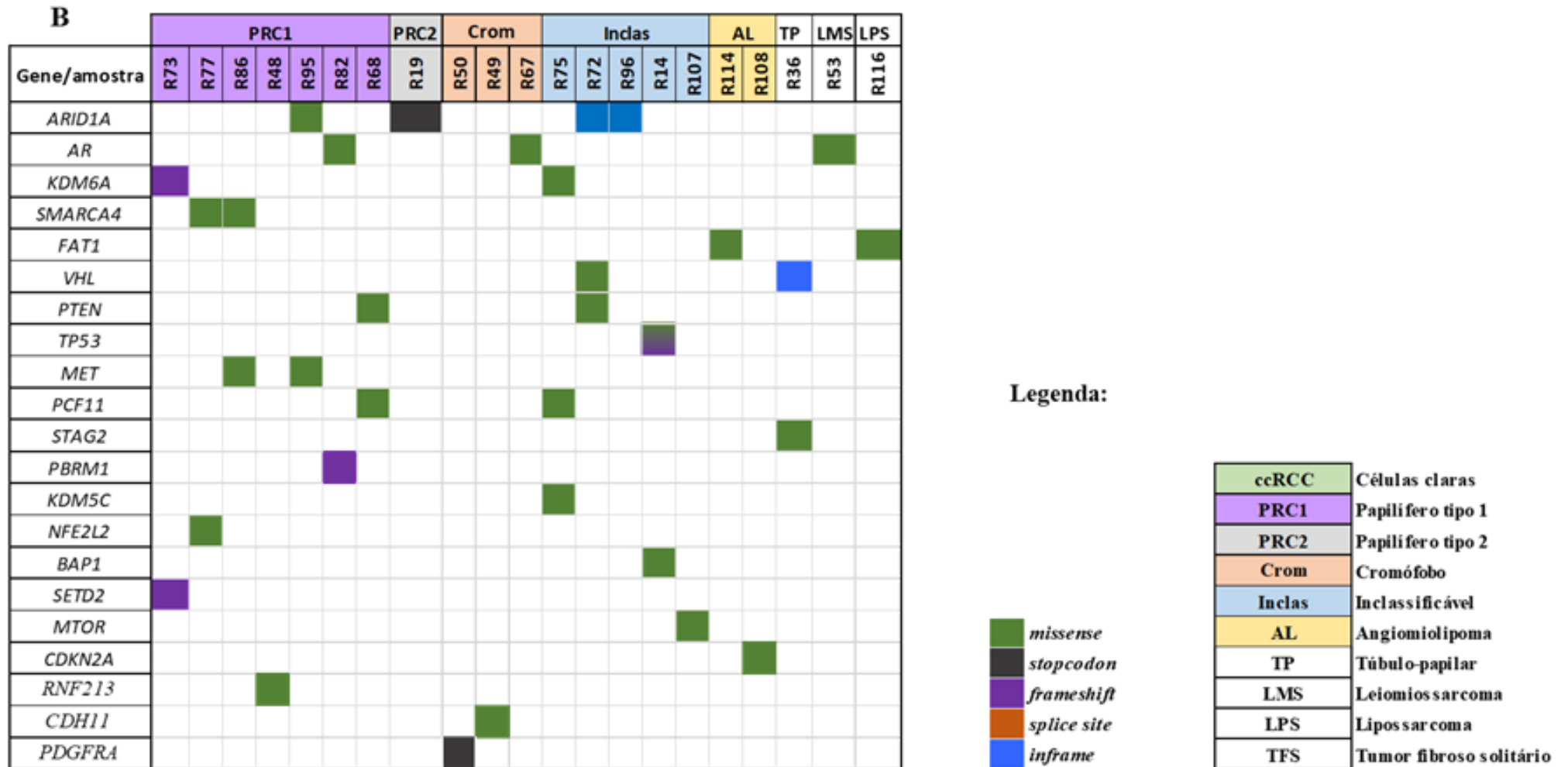
Como esperado, observamos que o gene *VHL* foi identificado como o mais frequentemente alterado, em 49,2% (29/59) dos casos identificados com alteração somática, e dentre os subtipos de CCR, este gene foi identificado como frequentemente alterado no subtipo ccRCC em 71% dos casos (27/38). Da mesma forma, identificamos que o gene *PBRM1* foi o segundo gene mais frequentemente alterado em 27,1% de todos os casos (16/59), e em 39,5% dos casos classificados como ccRCC (15/38). Ainda, ao analisarmos a **Figura 8**, identificamos nos tumores avaliados uma maior porcentagem de alterações somáticas do tipo *missense*, ou seja, 49,5% (52/105) das alterações apresentaram esta classificação. As demais classes de alterações genéticas foram identificadas nas frequências de 21,9% (23/105), 12,4% (13/105), 7,6% (8/105) e 7,6% (8/105), referente às alterações do tipo *frameshift*, *stop códon*, *splice site* e *inframe*, respectivamente.

As **figuras 8 A e B** mostram os 59 tumores alterados separados por subtipo histológico, em **A** os tumores classificados como células claras (ccRCC) e em **B** os demais subtipos, a relação do tipo de alteração e os genes onde elas foram identificadas. Com relação aos tumores classificados como ccRCC, dos 45 tumores sequenciados com esta classificação histológica, em 38 casos identificamos pelo menos uma marca tumoral, ou seja, para tumores com esta classificação, nosso painel apresentou uma sensibilidade de identificação de variantes somáticas genéticas de 84,4%.

A

| | | ccRCC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|------|-------|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|------|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|---|---|---|-----|-----|----|
| Gene/ amostra | R121 | R38 | R42 | R43 | R110 | R60 | R63 | R46 | R109 | R101 | R103 | R34 | R69 | R106 | R39 | R37 | R120 | R92 | R64 | R65 | R102 | R29 | R32 | R44 | R88 | R112 | R123 | R70 | R104 | R93 | R127 | R85 | R98 | R100 | R33 | R66 | R97 | R130 | % | | | | | |
| VHL | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | 71% | | |
| PBRM1 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | 40% | | |
| SETD2 | ■ | | | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 16% | | |
| BAP1 | ■ | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 16% | | |
| KDM5C | | | | | | | ■ | ■ | | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 13% | |
| FAT1 | | | | | | ■ | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 5% | |
| KDM6A | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 5% | |
| ARID1A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 5% | |
| SMARCA4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3% | |
| PCF11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3% | |
| STAG2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3% | |
| AR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3% | |
| MTOR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3% | |
| PTEN | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3% |
| TP53 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3% |

(a) Tumores do subtipo ccRCC (do inglês *clear cell Renal Cell Carcinoma*) que apresentaram pelo menos uma alteração somática. Distribuição das alterações identificadas por gene e por tipo de alteração.



(b) Tumores com as demais classificações histológicas avaliadas com ao menos uma alteração somática, distribuídos de acordo com o gene alterado e tipo de alteração.

Figura 8 – Distribuição dos 59 tumores identificados com variante somática separados por subtipos histológicos.

5.4 RASTREAMENTO DAS VARIANTES ESPECÍFICAS DO TUMOR NO PLASMA E URINA DOS PACIENTES

Dos 59 casos em que confirmamos pelo menos uma variante somática no DNA do tumor, amostras de plasma e urina antes da cirurgia (*baseline*) de 51 e 52 pacientes, respectivamente, foram coletados.

Dos 51 casos com plasmas *baseline* coletados, 44 (aproximadamente 86% - 44/51) foram analisados, sendo destes, 36 a partir da metodologia de *amplicon* (*deep sequencing*) e 8 utilizando a metodologia do painel customizado. Com relação às amostras de urina *baseline*, das 52 amostras coletadas, 29 (aproximadamente 56% - 29/52) foram analisadas, sendo destas, 19 e 10 amostras analisadas utilizando as metodologias de *amplicon* (*deep sequencing*) e painel customizado, respectivamente. Considerando os casos que detectamos pelo menos uma marca em um dos fluidos corpóreos analisados nosso resultado de ctDNA positivo foi de 23,9% (11/46).

Dos 44 plasmas analisados, 29 eram do subtipo ccRCC (65,9%; 29/44), 7 papilíferos tipo 1 (15,9%; 7/44), 4 inclassificáveis (9,1%; 4/44), 1 angiomiolipoma (2,27%; 1/44), 1 cromóforo (2,27%; 1/44), 1 leiomioma (2,27%; 1/44) e 1 túbulo-papilar (2,27%; 1/44). Dentre estes casos analisados, identificamos pelo menos uma marca tumoral em 6 casos (13,6%; 6/44). Em relação a frequência de ctDNA positivo por tipo histológico, das 6 amostras plasma, dois casos eram ccRCC (33,3%; 2/6), três papilíferos tipo 1 (50%; 3/6) e um leiomioma (16,6%; 1/6).

Em relação a análise de BL em urina, extraímos DNA dos dois componentes da urina, sobrenadante e sedimento, para realizarmos a avaliação desses componentes de forma separada. No entanto, devido ao grande número de falhas ao avaliarmos esses dois componentes separadamente, pelo fato de termos uma baixa concentração de DNA, decidimos unir de forma equimolar os dois componentes para obtermos assim uma maior concentração de DNA e seguirmos a avaliação. Desta forma, quando nos referimos às avaliações das amostras de urina, estamos nos referindo a esta união de componentes. Das 29 urinas analisadas, 21 eram do subtipo ccRCC (72,4%; 21/29), 4 inclassificáveis (13,8%; 4/29), 2 papilíferos tipo 1 (6,9%; 2/29), 1 cromóforo (3,4%; 1/29) e 1 túbulo-

papilar (3,4%; 1/29). Dentre esses casos avaliados, identificamos pelo menos uma marca tumoral em 6 casos (20,7%; 6/29). Em relação a frequência de ctDNA positivo por tipo histológico, das 6 amostras de urina, cinco era do subtipo ccRCC (83,4%; 5/6) e um cromóforo (16,6%; 1/6).

Dentre os casos de BL *baseline* que identificamos pelo menos uma marca tumoral, apenas em uma amostra, R121, a qual trata-se de um tumor ccRCC de estadio patológico pT3a, foi possível observar a marca tumoral nos dois fluidos, plasma e urina. Os dados das amostras positivas para detecção de ctDNA em fluidos corpóreos estão detalhados na **Tabela 5** e os resultados detalhados da avaliação dos fluidos corpóreos em todas as amostras estão apresentados na **Tabela 8, Apêndice D)**

Tabela 5 – Resultado da avaliação das amostras de BL *baseline* positivas para pelo menos uma marca tumoral. Informações dos onze casos os quais identificamos pelo menos uma marca tumoral no plasma ou na urina, organizadas por subtipo histológico.

| ID | Classificação Histológica | ISUP | Estadiamento Patológico | Gene | HGVS c. | HGVS p. | Baseline plasma | | | Baseline urina | | |
|-------|---------------------------|-----------|-------------------------|--------------|-------------|------------------|--------------------|---------|-----------------|--------------------|----------------|-----------------|
| | | | | | | | Média de cobertura | VAF (%) | Metodologia | Média de cobertura | VAF (%) | Metodologia |
| R 38 | ccRCC | 3 | pT1 | <i>PBRM1</i> | c.2012delA | p.Asn671Thrfs | 36057 | ND | <i>Amplicon</i> | 124626 | 0,52% | <i>Amplicon</i> |
| R 38 | ccRCC | 3 | pT1 | <i>KDM6A</i> | c.2116C>A | p.Pro706Thr | 131157 | ND | <i>Amplicon</i> | 153680 | 2,06% | <i>Amplicon</i> |
| R 39 | ccRCC | 2 | pT1a | <i>VHL</i> | c.349T>C | p.Trp117Arg | 770607 | ND | <i>Amplicon</i> | 53288 | 4,95% | <i>Amplicon</i> |
| R 39 | ccRCC | 2 | pT1a | <i>PBRM1</i> | c.457C>T | p.Gln153Ter | 164759 | ND | <i>Amplicon</i> | 194515 | 5,98% | <i>Amplicon</i> |
| R 60 | ccRCC | 4 | pT3a | <i>VHL</i> | c.458T>C | p.Leu153Pro | 20052 | 4,00% | <i>Amplicon</i> | 2409 | ND | Painel |
| R 60 | ccRCC | 4 | pT3a | <i>BAP1</i> | c.38G>T | p.Gly13Val | 1010 | 2,67% | <i>Amplicon</i> | 2409 | ND | Painel |
| R 60 | ccRCC | 4 | pT3a | <i>FAT1</i> | c.5178delC | p.Phe1727Leufs*9 | 2343 | 2,31% | <i>Amplicon</i> | 2409 | ND | Painel |
| R 69 | ccRCC | 2 | pT3a | <i>VHL</i> | c.397dupA | p.Thr133Asnfs*2 | 23559 | ND | <i>Amplicon</i> | 399404 | 0,25% low conf | <i>Amplicon</i> |
| R 103 | ccRCC | 3 | pT1b | <i>KDM5C</i> | c.3937C>T | p.Gln1313Ter | 96329 | ND | <i>Amplicon</i> | 19994 | 0,26% low conf | <i>Amplicon</i> |
| R 121 | ccRCC | 4 | pT3a | <i>VHL</i> | c.458T>C | p.Leu153Pro | 12128 | 0,68% | <i>Amplicon</i> | 0 | NA | <i>Amplicon</i> |
| R 121 | ccRCC | 4 | pT3a | <i>SETD2</i> | c.4918-2A>G | - | 2517 | 25,14% | <i>Amplicon</i> | 194 | 1,03% | <i>Amplicon</i> |
| R 68 | Papilífero tipo 1 | - | pT2a | <i>PCF11</i> | c.4951A>G | p.Ser1651Gly | 28398 | 38,40% | <i>Amplicon</i> | 190735 | ND | <i>Amplicon</i> |
| R 82 | Papilífero tipo 1 | 4 | pT3a | <i>AR</i> | c.170T>A | p.Leu57Gln | 347 | 10,66% | <i>Amplicon</i> | 0 | NA | <i>Amplicon</i> |
| R 95 | Papilífero tipo 1 | 2 | pT1a | <i>MBT</i> | c.3335A>T | p.His1112Leu | 6001 | 4,16% | <i>Amplicon</i> | 2101 | NA | <i>Amplicon</i> |
| R 67 | Cromóforo | - | pT1a | <i>AR</i> | c.170T>A | p.Leu57Gln | NA | NA | NA | 4486 | 4,04% | <i>Amplicon</i> |
| R 53 | Leiomiossarcoma | Alto grau | - | <i>AR</i> | c.170T>A | p.Leu57Gln | 1260 | 4,44% | <i>Amplicon</i> | 0 | NA | <i>Amplicon</i> |

Legenda: Na coluna referente à classificação histológica dos tumores, a sigla ccRCC se refere a carcinoma de células renais do subtipo células claras. A abreviação VAF está representando a frequência alélica da variante identificada. Para as variantes avaliadas que não foram detectadas simbolizamos na tabela como “ND” e as que não foram avaliadas estão sinalizadas como “NA”. As marcas tumorais que foram identificadas em um dos fluidos corpóreos avaliados estão sinalizadas em verde.

Ao que se refere aos dados de BL e estadiamento patológico dos tumores em que a marca tumoral foi detectada na BL, 6/11 (54%) apresentavam estadiamento T1-T2 e 5/11 (45%) estadiamento T3-Alto grau, enquanto em toda a casuística de tumores avaliados 63/89 (70,7%) e 26/89 (29,2%) eram T1-T2 e T3-Alto grau, respectivamente. Desta forma, observamos que a marca tumoral na BL foi positiva em 9,5% (6/63) dos casos estadiados em T1-T2 contra 19,2% (5/26) dos casos T3-Alto grau, indicando ser maior em estadios mais avançados, apesar de não estatisticamente significativo (χ^2 : 1,61; $p = 0,20$).

Com relação à variação de VAF, identificamos uma variação alta em cada um dos fluidos analisado. Nas amostras de plasma, a VAF variou de 0,68%-38,4%, e nas amostras de urina 0,25%-5,98%.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram incluídos paciente diagnosticados com câncer de células renal (CCRs), independente do subtipo tumoral, que foram submetidos a cirurgia de nefrectomia parcial ou total, maiores de 18 anos e que tenham assinado o TCLE (**Apêndice A**). Nos dados apresentados sobre a casuística que compõe este estudo, é possível ter algumas informações sobre as características gerais dos pacientes, inicialmente recrutados, e de seus respectivos tumores.

Com relação ao sexo dos pacientes, observamos que dentro de nossa coorte analisada, 71% dos pacientes são do sexo masculino, o que está em consonância com a literatura, que traz uma incidência de casos de CCR quase duas vezes superior em homens do que em mulheres (Padalaa et al. 2020; Ljungberg et al. 2019). Quanto ao tipo de cirurgia observamos que em 70% dos casos, foram submetidos à nefrectomia parcial. A escolha do tipo de abordagem cirúrgica é determinada de acordo com o tamanho do tumor e extensão da doença. Existem alguns estudos que comparam a nefrectomia parcial e radical, e mostram que a abordagem de ressecção parcial, quando possível de ser performada, preservou de melhor forma a função renal geral, diminuindo o risco de desenvolvimento de distúrbios metabólicos e cardiovasculares (Ljungberg et al. 2019; Bhindi et al. 2019).

Ao que tange os aspectos de diagnóstico desta doença, o CCR é muitas vezes diagnosticado de forma incidental, no decorrer de um exame de imagem de rotina, como uma doença ainda localmente confinada ao órgão (Padalaa et al. 2020; Capitano et al. 2019). Corroborando com esses achados, aproximadamente 80% (82/103) dos pacientes que aceitaram a participar do estudo, apresentaram estadiamento patológico da doença pT1 e suas variações, ou seja, uma doença localmente confinada, com tumor de tamanho reduzido e em estadio inicial, além de termos 12 casos, dentre os 103, diagnosticados como massas renais benignas.

Apesar de não termos selecionados os pacientes de acordo com o subtipo histológico, observamos em nossa casuística mais de 50% dos pacientes sendo caracterizados e diagnosticados com o subtipo células claras (ccRCC). Embora um pouco abaixo do que é

descrito na literatura, este número maior de ccRCCs é esperado, visto que este é o subtipo mais frequente de CCR quando este valor é avaliado em grandes populações (Lalani et al. 2019; Atkins e Tannir 2018).

Ao que se refere as características tumorais dos CCRs, já existem estudos que caracterizam altos níveis de heterogeneidade tanto no cenário histopatológico quanto no cenário genético, caracterizando como desafiador o desenvolvimento de tratamentos e testes diagnósticos mais direcionados para estes pacientes (Hsieh et al. 2018; Stewart et al. 2015; Gerlinger et al. 2012).

Nos últimos anos, estudos genômicos vêm sendo realizados com objetivo de compreender de forma mais individualizada as entidades desta doença (Smith et al. 2020; Hsieh et al. 2018; Linehan et al. 2016; Hakimi et al. 2016; Creighton et al. 2013). Neste sentido, nosso trabalho vem para somar e contribuir com esses dados e enriquecer a literatura com informações genômicas, as quais são características importantes sobre esse tumor. Utilizamos neste estudo um painel customizado, composto por genes descritos como frequentemente mutados em CCR na literatura disponível no momento do desenho (Sanchez-Vega et al. 2018; Ricketts e Linehan 2018; Creighton et al. 2013; Linehan et al. 2016; Davis et al. 2014). Nosso painel foi desenhado de forma a abranger a sequência de 21 genes inteiros, e regiões *hotspots* de outros 7 genes, totalizando 28 genes. A relação dos genes que compõem o painel pode ser vista da seção de Materiais e Métodos deste documento. Inicialmente a utilização do painel customizado foi realizada no sequenciamento das amostras de tumor, leucócito e posteriormente também foi utilizado para sequenciar parte das amostras de plasma e urina. Foi realizado o sequenciamento de 89 casos de tumores renais, e seus respectivos leucócitos em *pool* (junção das amostras de leucócitos está descrita na seção de Materiais e Métodos), e após validação das variantes somáticas, identificamos pelo menos uma marca tumoral em 66% (59/89) dos casos de CCR.

Dos 59 casos com marcas tumorais, aproximadamente 64% (38/59) são ccRCC. Os carcinomas renais do subtipo células claras são descritos na literatura como o subtipo que apresenta uma maior taxa de alterações genéticas dentre os CCRs. Uma das alterações mais descritas e que pode ocorrer em aproximadamente 90% dos casos de ccRCC é a perda do braço curto do cromossomo 3 (Zbar et al. 1987). Esta alteração tem sido

descrita como o principal evento para a tumorigênese em ccRCC (Turajlic et al. 2018). Genes que participam de vias importantes estão localizados nesta região do cromossomo 3, são eles: *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*; e estes, foram descritos na literatura como frequentemente mutados no subtipo ccRCC (Linehan e Ricketts 2019; Ricketts e Linehan 2018; Creighton et al. 2013; Pena-Llopis et al. 2012). Dentre os genes identificados como frequentemente mutados em nossa casuística, tanto com relação a todos os subtipos analisados quanto referente à apenas o subtipo ccRCC, tivemos como resultado os genes *VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2* e *KDM5C*, corroborando com os dados já previamente disponíveis no TCGA (Creighton et al. 2013), o qual nos traz informações genômicas de mais de 400 tumores renais, principalmente ccRCC, devido à sua alta frequência quando comparada com os demais subtipos, e outros estudos disponíveis na literatura que abordam o mesmo tema (Linehan e Ricketts 2019; Ljungberg et al. 2019; Brugarolas 2014; Gerlinger et al. 2014).

Ao considerarmos a função dos genes identificados como os mais frequentemente alterados neste estudo, é possível observar que estes estão envolvidos em vias de muita importância no processo de desenvolvimento do CCR. O gene *VHL*, mutado em 71% (27/38) dos casos de ccRCC avaliados neste estudo, é um gene supressor tumoral, envolvido na regulação da via de hipóxia, através dos fatores indutores de hipóxia (HIF) (Schödel et al. 2016). Mutações neste gene levam os HIF a ativarem outros fatores de transcrição pró tumorigênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), podendo desencadear o processo de desenvolvimento do tumor renal, bem como sua progressão (Kim et al. 2018). É descrito na literatura que aproximadamente 60% dos casos de ccRCC apresentam alterações somáticas no gene *VHL*, o que corrobora de forma aproximada com nosso resultado. Os demais genes identificados como frequentemente mutados, *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2* e *KDM5C*, são genes codificadores de proteínas que participam do processo de remodelamento de cromatina e metilação de histonas (Ricketts e Linehan 2018). Mutações no gene *PBRM1* são descritas como a segunda mais frequente nos CCRs (Ricketts e Linehan 2018), e parecem estar limitadas aos casos de ccRCC, sendo observadas em menor frequência ou não observadas em outros subtipos (Carril-Ajuria et al. 2020). Esses dados descritos na literatura estão de acordo com o que identificamos neste estudo,

onde o segundo gene com maior número de mutações foi o *PBRM1*, 41% (15/38), no subtipo ccRCC, e em apenas um caso do subtipo papilífero tipo 1.

Avaliando nossos resultados, mutações no gene *BAP1*, foram encontradas em 16% nos casos de ccRCC. Ao que se refere na literatura, encontramos que aproximadamente 15% dos tumores ccRCC apresentam mutações no gene *BAP1*, o qual desempenha um papel importante na regulação do reparo do DNA (Carbone et al. 2020; Pena-Llopis et al. 2012). Os demais genes identificados como frequentemente mutados em nossa casuística, *SETD2* e *KDM5C*, também apresentam um papel importante no cenário da doença renal, e mutações somáticas nestes genes estão sendo correlacionadas com menor tempo de recorrência de doença inicialmente diagnosticada como local (Manley et al. 2019).

A utilização da biópsia líquida (BL), ou seja, a avaliação do DNA tumoral circulante (ctDNA), vem sendo uma alternativa estudada e empregada para alguns tumores, como uma forma não invasiva de obtenção de informações sobre determinado tipo de câncer. No entanto, quando se fala em CCR, ainda existem poucas evidências na literatura e relacionando esta utilização, principalmente com casos de doença localmente avançada ou já metastática (Heitzer et al. 2019; Bettegowda et al. 2014). Como já explanado anteriormente, vários fluidos corpóreos vêm sendo utilizados para no cenário de BL (Perkins et al. 2012; Murtaza et al. 2015; Ferreira et al. 2016; Birkenkamp-Demtröder et al. 2016; Togneri et al. 2016; Miguez et al. 2020; Pan et al. 2015). Com relação a amostra a ser utilizada nesta abordagem, embora saibamos que a urina é uma amostra que pode ser informativa para cânceres urológicos (Miguez et al. 2020; Dudley et al. 2019; Patel et al. 2017), este assunto se apresenta de forma escassa para pacientes adultos com CCR. Avaliando os dados deste estudo de BL *baseline*, os quais foram gerados utilizando a metodologia de *Target sequencing* (painel customizado) ou *Deep sequencing (amplicon)*, dos 46 casos que conseguimos avaliar o DNA de plasma ou de urina, 11 destes foi possível identificar pelo menos uma das variantes encontradas em algum fluido corpóreo, plasma ou urina, ou seja em 25%, sendo 13,6% considerando somente o plasma e 20,7% considerando somente urina. Inicialmente, uma das ideias deste trabalho era avaliar a urina em dois componentes distintos, no entanto, no decorrer do trabalho, observamos que não

estávamos obtendo massa de DNA suficiente para realizar a avaliação de forma separada deste fluido. Sendo assim, para alguns casos, tivemos que utilizar o DNA extraído do sobrenadante e do sedimento da urina juntos, para que assim conseguíssemos explorar melhor os dados.

Na avaliação dos fluidos corpóreos realizada no presente estudo, como citado anteriormente, identificamos pelo menos uma marca tumoral, em amostra de plasma, em 13,6% dos casos avaliados, em 20,7% das urinas avaliadas e em apenas um caso identificamos a marca tumoral nos dois fluidos corpóreos. Quando confrontamos nossos dados com os existentes na literatura, observamos que nossa taxa de detecção de marcas tumorais em amostras de BL, encontra-se posicionada de forma intermediária. Smith e colaboradores (2020) realizaram um trabalho bastante interessante, e de certa forma, similar ao nosso em alguns aspectos. Utilizando coortes diferentes, desde pacientes com massas benignas até pacientes com doença metastática, eles avaliaram tanto plasma quanto urina (sobrenadante e sedimento), em diferentes metodologias. Primeiramente, nossos dados corroboram, quando avaliamos o CCR como sendo uma doença com baixa taxa de ctDNA, mas que é possível utilizar essa ferramenta no manejo desses pacientes. No estudo de Smith, em linhas gerais, eles identificaram em aproximadamente 56% dos pacientes, de uma das coortes, ctDNA tanto de plasma quanto de urina. Em nossa casuística, identificamos as marcas tumorais de 23,9% (11/46) dos pacientes avaliados em plasma ou urina. Embora exista, de forma geral, essa discrepância na taxa de detecção da marca tumoral em amostras de BL quando comparamos os dois estudos, é importante ressaltar que o perfil de pacientes analisados com relação ao estadiamento patológico é um pouco distinto, assim como as metodologias de avaliação. Em nossa casuística, observamos que 15,2% (7/46) dos pacientes tiveram pelo menos um fluido de BL analisado e estadiamento T3- alto grau, enquanto no estudo de Smith e colaboradores (2020) essa porcentagem de tumores de alto grau compoendo sua casuística é bem maior, 45,8% (22/48). Desta forma, apesar de eles terem identificado ctDNA de uma amostra benigna, os demais pacientes tratavam-se clinicamente de doenças mais avançadas. Ao analisarmos os dados presentes na literatura, é possível observar que alguns estudos, que apresentam uma taxa de detecção maior ao avaliarem amostras de BL, utilizam como coorte de análise de pacientes que

já apresentam doença metastática (Smith et al. 2020; Yamamoto et al. 2019; Pal et al. 2017; Maia et al. 2017; Wan et al. 2013).

Quando comparamos os dados de forma separada os dados de urina e plasma do nosso estudo com o de Smith e colaboradores (2020), a taxa de detecção de ctDNA em amostras de urina foi de 20,7% e 21,6%, em nosso estudo e no estudo de Smith, respectivamente. E ao que tange a taxa de detecção nas amostras de plasma, observamos uma porcentagem de 13,6% e 22,9%, neste estudo e no de Smith, respectivamente. A comparação da relação da detecção de ctDNA entre as amostras de plasma e urina no cenário do CCR ainda não revelou uma relação clara entre estes compartimentos, o que também é observado em análises anteriores de câncer de bexiga (Smith et al. 2020; Patel et al. 2017; Togneri et al. 2016).

Apesar disso, no aspecto de superioridade de amostra, observamos que tanto o plasma quanto a urina foram fluidos informativos, e que sozinhos não seriam capazes de identificar todos os casos, corroborando com os dados presentes na literatura tanto de tumores renais quanto de outros tumores urológicos (Smith et al. 2020; Miguez et al. 2020; Patel et al. 2017).

Ainda que entendamos que nossos dados são referentes a uma casuística pequena, os resultados reforçam a importância de termos mais estudos genômicos no cenário de CCR, e que a utilização de BL neste cenário é desafiador. A implementação de novas metodologias para diagnosticar e prognosticar pacientes com CCR é importante, e a validação da BL neste ponto se faz promissora. Diante de todos os resultados discutidos acima, não há dúvidas do potencial dessa abordagem, e da sua relação com a malignidade da doença, no entanto, para afirmarmos tais associações, mais estudos precisam ser performados neste âmbito.

Como forma de continuarmos contribuindo na geração de dados genômicos no cenário da doença renal e a utilização de BL, dos 45 casos de ccRCC recrutados neste estudo, 39 estão sendo monitorados, a partir de coletas seriadas de amostras de sangue e urina, para que as marcas identificadas nos tumores sejam avaliadas através de sequenciamento de *amplicon*, buscando assim, entender a dinâmica tumoral utilizando amostras de BL. Estas coletas e análises estão em andamento, e farão parte da continuação de outro

projeto.

7 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos a partir do desenvolvimento deste trabalho, podemos concluir que o painel multigênico customizado neste estudo apresentou uma sensibilidade de 66,3% em detectar variantes somáticas em CCR e 84,4% de sensibilidade quando direcionado para os tumores do subtipo ccRCC. Resultados similares ao que obtivemos em nossa casuística foi corroborado ao realizarmos as análises *in silico* do painel com dados depositados em repositórios genômicos. Além disso, em relação as análises de BL, observamos que os dois fluidos corpóreos avaliados neste estudo foram informativos no cenário do CCR, com uma taxa de detecção de marcas tumorais de 24%. Apesar de não estatisticamente significativo, observamos uma tendência de aumento na taxa de detecção da marca tumoral na BL em casos com estadiamento patológico mais avançado.

Frente aos resultados e discussões gerados neste estudo, é possível identificar a potencialidade da utilização de BL no cenário de tumores urológicos, no entanto, mais estudos precisam ser performados para que este dado se torne cada vez mais robusto e contribua na possibilidade de futuras implementações de novas metodologias, tanto no diagnóstico quanto no prognóstico e monitoramento de pacientes com CCR.

8 REFERÊNCIAS

Al-Qassab U, Lorentz CA, Laganosky D, Ogan K, Master V, Pattaras J, et al. Pnfba-12 Liquid Biopsy for Renal Cell Carcinoma. *The Journal of Urology*. 2017; 197:e913–e914.

Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discovery*. 2016; 6:479–491.

Allory Y, Ouazana D, Boucher E, Thiounn N, Vieillefond A. Papillary renal cell carcinoma. Prognostic value of morphological subtypes in a clinicopathologic study of 43 cases. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2003; 442:336–42.

Arede AJA. Fatores de Prognóstico do Carcinoma das Células Renais. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Serviço de Urologia do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra. 2014;:.

Atkins MB, Tannir NM. Current and emerging therapies for first-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*. 2018; 70:127–137.

Atzpodien J, Schmitt E, Gertenbach U, Fornara P, Heynemann H, Maskow A, et al. Adjuvant treatment with interleukin-2- and interferon-alpha2a-based chemoimmunotherapy in renal cell carcinoma post tumour nephrectomy: results of a prospectively randomised trial of the german cooperative renal carcinoma chemoimmunotherapy group (DGCIN). *Br J Cancer*. 2005 mar.; 92:843–846.

Bao C, Yang X, Xu W, Luo H, Xu Z, Su C, et al. Diabetes mellitus and incidence and mortality of kidney cancer: a meta-analysis. *Journal of diabetes and its complications*. 2013 7; 27:357–364.

Barros B, Kupper B, Junior S, Mello CD, Begnami M, Chojniak R, et al. Mutation detection in tumor-derived cell free DNA anticipates progression in a patient with metastatic colorectal cancer. *Front Oncol*. 2018;:.

Bergerot PG, Hahn AW, Bergerot CD, Jones J, Pal SK. The Role of Circulating Tumor DNA in Renal Cell Carcinoma. *Current Treatment Options in Oncology*. 2018; 19:.

Beroukhim R, Brunet JP, Di Napoli A, Mertz KD, Seeley A, Pires MM, et al. Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippel lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer research*. 2009 6; 69:4674–4681.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science translational medicine*. 2014 2; 6:.

Bhindi B, Lohse CM, Schulte PJ, Mason RJ, Chevillie JC, Boorjian SA, et al. Predicting Renal Function Outcomes After Partial and Radical Nephrectomy(Figure presented.). *European Urology*. 2019; 75:766–772.

Birkenkamp-Demtröder K, Nordentoft I, Christensen E, Høyer S, Reinert T, Vang S, et al. Genomic Alterations in Liquid Biopsies from Patients with Bladder Cancer. *European urology*. 2016 7; 70:75–82.

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018; 68:394–424.
- Bronner I, Quail M, Turner D, H S. Europe PMC Funders Group Improved Protocols for Illumina Sequencing. 2009;:.
- Brugarolas J. Molecular genetics of clear-cell renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2014; 32:1968–1976.
- Campos CD, Jackson JM, Witek MA, Soper SA. Molecular Profiling of Liquid Biopsy Samples for Precision Medicine. *Cancer Journal (United States)*. 2018; 24:93–103.
- Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma [Figure presented]. *European Urology*. 2019; 75:74–84.
- Carbone M, Harbour JW, Brugarolas J, Bononi A, Pagano I, Dey A, et al. Biological mechanisms and clinical significance of BAP1 mutations in human cancer. *Cancer Discovery*. 2020; 10:1103–1120.
- Carril-Ajuria L, Santos M, Roldán-Romero JM, Rodríguez-Antona C, de Velasco G. Prognostic and predictive value of PBRM1 in clear cell renal cell carcinoma. *Cancers*. 2020; 12:1–15.
- Casuscelli J, Weinhold N, Gundem G, Wang L, Zabor EC, Drill E, et al. Genomic landscape and evolution of metastatic chromophobe renal cell carcinoma. *JCI Insight*. 2017;: 1–15.
- Chang YH, Chuang CK, Pang ST, Wu CT, Chuang KL, Chuang HC, et al. Prognostic value of TNM stage and tumor necrosis for renal cell carcinoma. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2011 2; 27:59–63.
- Chen F, Zhang Y, Bossé D, Lalani AKA, Hakimi AA, Hsieh JJ, et al. Pan-urologic cancer genomic subtypes that transcend tissue of origin. *Nature Communications* 2017 8:1. 2017 8; 8:1–15.
- Chiong E, Tay MH, Tan MH, Kumar S, Sim HG, Teh BT, et al. Management of kidney cancer in Asia: resource-stratified guidelines from the Asian Oncology Summit 2012. *The Lancet Oncology*. 2012 11; 13:e482–e491.
- Clague J, Lin J, Cassidy A, Matin S, Tannir NM, Tamboli P, et al. Family history and risk of Renal Cell Carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009 3; 18:801.
- da Costa WH, da Cunha IW, Fares AF, Bezerra SM, Shultz L, Clavijo DA, et al. Prognostic impact of concomitant loss of PBRM1 and BAP1 protein expression in early stages of clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2018; 36:1–243.
- Creighton CJ, Morgan M, Gunaratne PH, Wheeler DA, Gibbs RA, Robertson G, et al. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013 499:7456. 2013 6; 499:43–49.

- Davis CF, Ricketts CJ, Wang M, Yang L, Cherniack AD, Shen H, et al. The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2014; 26:319–330.
- DeCastro GJ, McKiernan JM. Epidemiology, clinical staging, and presentation of renal cell carcinoma. *The Urologic clinics of North America*. 2008 11; 35:581–592.
- Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, Mckenney J, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Grading System for Renal Cell Carcinoma and Other Prognostic Parameters The Members of the ISUP Renal Tumor Panel. *Am J Surg Pathol*. 2013; 37:1490–1504.
- Dudley JC, Schroers-Martin J, Lazzareschi DV, Shi WY, Chen SB, Esfahani MS, et al. Detection and surveillance of bladder cancer using urine tumor DNA. *Cancer Discovery*. 2019; 9:500–509.
- Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of Surgical Oncology*. 2010 6; 17:1471–1474.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 2015 3; 136:E359–E386.
- Ferreira EN, Barros BDF, De Souza JE, Almeida RV, Torrezan GT, Garcia S, et al. A genomic case study of desmoplastic small round cell tumor: comprehensive analysis reveals insights into potential therapeutic targets and development of a monitoring tool for a rare and aggressive disease. *Human genomics*. 2016 11; 10:1–13.
- Ferro MC, Santo DAdE, Jr ALB. Carcinoma de células renais papilífero tipo 2 de apresentação infrequente: relato de caso. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*. 2016 10; 18:68.
- Figliuolo G, Alarcón KMG, Costa DM, Silva FLT. Estudo Epidemiológico sobre Câncer Renal para Conhecimento de sua Incidência no Estado do Amazonas. *Urominas. Revista Científica de Urologia da SBU-MG*. 2016; 3:16–24.
- Finley DS, Shuch B, Said JW, Galliano G, Jeffries RA, Afifi AA, et al. The chromophobe tumor grading system is the preferred grading scheme for chromophobe renal cell carcinoma. *Journal of Urology*. 2011; 186:2168–2174.
- Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. Solid renal tumors: An analysis of pathological features related to tumor size. *Journal of Urology*. 2003; 170: 2217–2220.
- Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2017 7; 19: 799–825.
- Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nature Genetics*. 2014; 46:225–233.

- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intra-tumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *The New England journal of medicine*. 2012;:.
- Guinan P, Sobin LH, Algaba F, Badellino F, Kameyama S, MacLennan G, et al. TNM Staging of Renal Cell Committee on Cancer (AJCC) Carcinoma. 1997; 80:.
- Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer discovery*. 2014; 4:650–661.
- Hakimi AA, Reznik E, Lee CH, Creighton CJ, Brannon AR, Luna A, et al. An Integrated Metabolic Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma A. *Cancer Cell*. 2016; 176:139–148.
- Heitzer E, Haque IS, Roberts CE, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nature Reviews Genetics*. 2019; 20:71–88.
- Hsieh JJ, Le V, Cao D, Cheng EH, Creighton CJ. Genomic classifications of renal cell carcinoma: a critical step towards the future application of personalized kidney cancer care with pan-omics precision. *Journal of Pathology*. 2018; 244:525–537.
- Huang JJ, Hsieh JJ. The Therapeutic Landscape of Renal Cell Carcinoma: From the Dark Age to the Golden Age. *Seminars in nephrology*. 2020 1; 40:28–41.
- Husain H, Velculescu VE. Cancer DNA in the Circulation: The Liquid Biopsy. *JAMA*. 2017 10; 318:1272–1273.
- Janzen NK, Kim HL, Figlin RA, Beldegrun AS. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. *Urologic Clinics of North America*. 2003; 30:843–852.
- Jonasch E, Futreal PA, Davis IJ, Bailey ST, Kim WY, Brugarolas J, et al. State of the science: an update on renal cell carcinoma. *Molecular cancer research : MCR*. 2012 7; 10: 859–880.
- Junqueira-Neto S, Batista IA, Costa JL, Melo SA. Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA. *Acta cytologica*. 2019 10; 63:479–488.
- Kane CJ, Mallin K, Ritchey J, Cooperberg MR, Carroll PR. Renal cell cancer stage migration: analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer*. 2008 7; 113:78–83.
- Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer cell*. 2013 5; 23:573–581.
- Kim HS, Kim JH, Jang HJ, Han B, Zang DY. Clinicopathologic significance of vhl gene alteration in clear-cell renal cell carcinoma: An updated meta-analysis and review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19:.
- Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, et al. EGFR mutation status in tumour-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to gefitinib. *British journal of cancer*. 2006 11; 95:1390–1395.
- Kotecha RR, Motzer RJ, Voss MH. Towards individualized therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Nature reviews Clinical oncology*. 2019 10; 16:621–633.

- Lalani AKA, McGregor BA, Albiges L, Choueiri TK, Motzer R, Powles T, et al. Systemic Treatment of Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma in 2018: Current Paradigms, Use of Immunotherapy, and Future Directions. *European Urology*. 2019; 75:100–110.
- Lim SM, Park HS, Kim S, Kim S, Ali SM, Greenbowe JR, et al. Next-generation sequencing reveals somatic mutations that confer exceptional response to everolimus. *Oncotarget*. 2016; 7:10547–10556.
- Linehan WM, Ricketts CJ. The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications. *Nature Reviews Urology*. 2019; 16:539–552.
- Linehan WM, Spellman PT, Ricketts CJ, Creighton CJ, Fei SS, Davis C, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2016 1; 374:135–145.
- Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. *The Journal of urology*. 2003; 170:2163–2172.
- Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, Bensalah K, Dabestani S, Montes SFP, et al. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. *European Urology*. 2019; 75:799–810.
- Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *European urology*. 2015 5; 67:913–924.
- Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, et al. Corrigendum to "The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma"[*Eur Urol* 2011;60:615-21]. *European urology*. 2011 12; 60:1317.
- Maia MC, Bergerot PG, Dizman N, Hsu JA, Jones J, Lanman RB, et al. Association of Circulating Tumor DNA (ctDNA) Detection in Metastatic Renal Cell Carcinoma (mRCC) with tumor burden. *Kidney Cancer*. 2017; 1:65–70.
- Majer W, Kluzek K, Bluysen H, Wesoly J. Potential Approaches and Recent Advances in Biomarker Discovery in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Journal of Cancer*. 2015; 6: 1105.
- Manley BJ, Reznik E, Ghanaat M, Kashan M, Becerra MF, Casascelli J, et al. Characterizing recurrent and lethal small renal masses in clear cell renal cell carcinoma using recurrent somatic mutations. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2019; 37:12–17.
- Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM. Liquid biopsy: A step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Molecular Cancer*. 2017; 16:1–14.
- Miao D, Miao D, Margolis CA, Gao W, Voss MH, Li W, et al. Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma. *Science*. 2018; 5951:1–11.
- Miguez ACK, Barros BDF, de Souza JE, da Costa CML, Cunha IW, Barbosa PNVP, et al. Assessment of somatic mutations in urine and plasma of Wilms tumor patients. *Cancer Medicine*. 2020; 9:5948–5959.

- Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology*. 2016 7; 70:93–105.
- Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 1996; 335:865–875.
- Mouliere F, Robert B, Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. *PLOS ONE*. 2011; 6:e23418.
- Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiologia brasileira*. 2015 7; 48:166–174.
- Murtaza M, Dawson SJ, Pogrebniak K, Rueda OM, Provenzano E, Grant J, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nature communications*. 2015 11; 6:.
- Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forsheew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 2013; 497:108–112.
- Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, et al. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008 8; 14:4726–4734.
- Novara G, Martignoni G, Artibani W, Ficarra V. Grading systems in renal cell carcinoma. *The Journal of urology*. 2007 2; 177:430–436.
- Özdemir BC, Siefker-Radtke AO, Campbell MT, Subudhi SK. Current and Future Applications of Novel Immunotherapies in Urological Oncology: A Critical Review of the Literature. *European urology focus*. 2018 4; 4:442–454.
- Padalaa SA, Barsoukb A, Thandrac KC, Saginalad K, Mohammeda A, Vakitie A, et al. Epidemiology of renal cell carcinoma in Germany. *Onkologe*. 2020; 11:79–87.
- Pais A, Cleto A, Silva A, Quintela A, Figueiredo A, et al OA. *Recomendações Clínicas no Tratamento do Carcinoma de Células Renais*. F Calais da Silva - Grupo Português Génito-Urinário. 2015; 1a edição:.
- Pal SK, Sonpavde G, Agarwal N, Vogelzang NJ, Srinivas S, Haas NB, et al. Evolution of Circulating Tumor DNA Profile from First-line to Subsequent Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *European Urology*. 2017; 72:557–564.
- Pan W, Gu W, Nagpal S, Gephart MH, Quake SR. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. *Clinical chemistry*. 2015 3; 61:514–522.
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2012 4; 12:252–264.
- Patel KM, Van Der Vos KE, Smith CG, Mouliere F, Tsui D, Morris J, et al. Association of Plasma and Urinary Mutant DNA with Clinical Outcomes in Muscle Invasive Bladder Cancer. *Scientific Reports*. 2017; 7:1–12.

- Pavlovich CP, Schmidt LS. Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. *Nature reviews Cancer*. 2004; 4:381–393.
- Pena-Llopis S, Vega-Rubin-De-Celis S, Liao A, Leng N, Pavia-Jimenez A, Wang S, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nature Genetics*. 2012; 44:751–759.
- Pereira CAG, de Araújo Pontes BL, Valente TR, Moura AF, de Mesquita RB, Mont’Alverne DGB. Influência dos Cânceres Gástrico e Hematológico na Qualidade de Vida e na Funcionalidade de Pacientes Oncológicos. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2022 1; 68:.
- Perkins G, Yap TA, Pope L, Cassidy AM, Dukes JP, Riisnaes R, et al. Multi-Purpose Utility of Circulating Plasma DNA Testing in Patients with Advanced Cancers. *PLoS ONE*. 2012 11; 7:47020.
- Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Science translational medicine*. 2017 8; 9:.
- Presti J, Rao P, Chen Q, et al. Histopathological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Res*. 1991; 51:1544–52.
- Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C, Tong Y, Liang J. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chinese journal of cancer*. 2016 5; 35:.
- Reis APd, Machado JAN. Imunoterapia no câncer - inibidores do checkpoint imunológico. *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia*. 2020; 4:72–77.
- Remzi M, Ozsoy M, Klingler HC, Susani M, Waldert M, Seitz C, et al. Are Small Renal Tumors Harmless? Analysis of Histopathological Features According to Tumors 4 Cm or Less in Diameter. *Journal of Urology*. 2006; 176:896–899.
- Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H, Smith CC, Lang M, Reznik E, et al. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Reports*. 2018; 23:313–326.
- Ricketts CJ, Linehan WM. Multi-regional Sequencing Elucidates the Evolution of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell*. 2018; 173:540–542.
- Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet (London, England)*. 2009; 373:1119–1132.
- Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, Van Der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet (London, England)*. 2016 5; 387:1909–1920.
- Rothé F, Laes JF, Lambrechts D, Smeets D, Vincent D, Maetens M, et al. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2014 10; 25:1959–1965.
- Kush Sachdeva M, M EJA. Renal cell carcinoma. *Medscape*. 2019;:.

- Salvi S, Martignano F, Molinari C, Gurioli G, Calistri D, De Giorgi U, et al. The potential use of urine cell free DNA as a marker for cancer. *Expert review of molecular diagnostics*. 2016 12; 16:1283–1290.
- Samaratunga H, Gianduzzo T, Delahunt B. The ISUP system of staging, grading and classification of renal cell neoplasia. *Journal of Kidney Cancer and VHL*. 2014; 1:26–39.
- Sanchez A, Furberg H, Kuo F, Vuong L, Ged Y, Patil S, et al. Transcriptomic signatures related to the obesity paradox in patients with clear cell renal cell carcinoma: a cohort study. *The Lancet Oncology*. 2020 2; 21:283–293.
- Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila WK, Luna A, La KC, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell*. 2018 4; 173:321–337.
- Saquicela RS, Esaki PHM, Issi WS, de Araújo VB, Gabriel Freire do Nascimento and ILdP, de Paiva GL, et al. BIÓPSIA LÍQUIDA: DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DO CÂNCER. Atena editora. 2019;:6–12.
- Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nature Genetics*. 2013; 45:860–867.
- Schödel J, Grampp S, Maher ER, Moch H, Ratcliffe PJ, Russo P, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factors, and renal cancer. *European Urology*. 2016; 69:646–657.
- Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science (New York, NY)*. 2015 4; 348:56–61.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. *Cancer Statistics, 2021*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021; 71:7–33.
- Silverman SG, Gan YU, Morteale KJ, Tuncali K, Cibas ES. Renal Masses in the Adult Patient: The Role of Percutaneous Biopsy¹. <https://doi.org/10.1148/radiol.2401050061>. 2006 7; 240:6–22.
- Singer EA, Gupta GN, Marchalik D, Srinivasan R. Evolving therapeutic targets in renal cell carcinoma. *Current opinion in oncology*. 2013 5; 25:273–280.
- Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2017 9; 14:531–548.
- Smith CG, Moser T, Mouliere F, Field-Rayner J, Eldridge M, Riediger AL, et al. Comprehensive characterization of cell-free tumor DNA in plasma and urine of patients with renal tumors. *Genome Medicine*. 2020; 12:1–17.
- Stewart GD, O’Mahony FC, Laird A, Eory L, Lubbock AL, Mackay A, et al. Sunitinib treatment exacerbates intratumoral heterogeneity in metastatic renal cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015; 21:4212–4223.
- Swami U, Nussenzveig RH, Haaland B, Agarwal N. Revisiting AJCC TNM staging for renal cell carcinoma: quest for improvement. *Annals of Translational Medicine*. 2019 3; 0:18–18.
- Szarvas T, Kovalszky I, Bedi K, Szendroi A, Majoros A, Riesz P, et al. Deletion analysis of tumor and urinary DNA to detect bladder cancer: urine supernatant versus urine sediment. *undefined*. 2007; 18:405–409.

- Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nature medicine*. 2014; 20:430–435.
- Togneri FS, Ward DG, Foster JM, Devall AJ, Wojtowicz P, Alyas S, et al. Genomic complexity of urothelial bladder cancer revealed in urinary cfDNA. *European Journal of Human Genetics*. 2016; 24:1167–1174.
- Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell*. 2015 4; 27:450.
- Turajlic S, Xu H, Litchfield K, Rowan A, Horswell S, Chambers T, et al. Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell*. 2018; 173:595–610.
- Varela I, Tarpey P, Raine K, Huang D, Ong CK, Stephens P, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature*. 2011 1; 469:539–542.
- Abad Vivas-Pérez JI, Barrabino Martín R, Urda Romacho J. Cáncer renal avanzado, perfiles para los nuevos tratamientos. *Medicina Clínica Práctica*. 2022 1; 5:100277.
- Voog E, Campillo-Gimenez B, Elkouri C, Priou F, Rolland F, Laguerre B, et al. Long survival of patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. Results of real life study of 344 patients. *International Journal of Cancer*. 2019; 146:1643–1651.
- Wan J, Zhu L, Jiang Z, Cheng K. Monitoring of plasma cell-free DNA in predicting postoperative recurrence of clear cell renal cell carcinoma. *Urologia Internationalis*. 2013; 91:273–278.
- Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews Cancer*. 2017; 17:223–238.
- Warren AY, Harrison D. WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World Journal of Urology*. 2018; 36: 1913–1926.
- Yamamoto Y, Uemura M, Fujita M, Maejima K, Koh Y, Matsushita M, et al. Clinical significance of the mutational landscape and fragmentation of circulating tumor DNA in renal cell carcinoma. *Cancer Science*. 2019; 110:617–628.
- Zbar B, Brauch H, Talmadge C, Linehan M. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature*. 1987;:

ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



A.C. Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

APROVAÇÃO

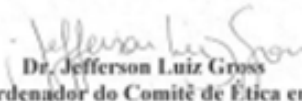
Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **19/09/2017**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **08/08/2017**, aprovaram a realização do projeto nº **2397/17** intitulado: **“Utilização de biópsia líquida baseada em detecção de DNA tumoral em urina e plasma em pacientes com carcinoma renal de células claras.”**

Pesquisadora responsável: Dra. Dirce Maria Carraro
Aluna: Isabella Tanus Job e Meira (Doutorado).

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

São Paulo, 03 de outubro de 2017.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



**A.C. Camargo
Cancer Center**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

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

1. NOME DO PARTICIPANTE: _____
SEXO: M F
DATA NASCIMENTO: ____/____/_____
ENDEREÇO: _____ Nº _____ APTO: _____
BAIRRO: _____ CIDADE: _____
CEP: _____ TELEFONE: DDD (____) _____

2. RESPONSÁVEL LEGAL: _____
NATUREZA (gran de parentesco, tutor, curador etc.): _____
SEXO: M F
DATA NASCIMENTO: ____/____/_____
ENDEREÇO: _____ Nº _____ APTO: _____
BAIRRO: _____ CIDADE: _____
CEP: _____ TELEFONE: DDD (____) _____

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **MEDICINA PERSONALIZADA APLICADA PARA O MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DO PACIENTE ONCOLÓGICO**

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra. Dirce Maria Carraro

3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:

CIPE:

- Dra. Giovana Tardin Torrezan
- Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen
- Dra. Vilma Martins
- Dr. Tiago Goss dos Santos
- Dr. Kenneth John Gollob

Departamento Oncologia Clínica do A.C. Camargo Cancer Center

- Dr. Helano C. Freitas
- Dr. Vladimir C. Cordeiro de Lima
- Dra. Solange Sanchez
- Dra. Rachel Riechelmann
- Dra. Maria Nirvana da Cruz Formiga
- Dr. Celso Abdon Lopes de Mello

Departamento de Cirurgia Oncológica

- Dra. Fabiana Baroni Alves Makhissi

Rúbrica do participante:

Rúbrica do responsável pela aplicação do termo:



- Dr. Stenio Cassio Zequi
- Dr. Walter Henriques da Costa
- Dr. Samuel Aguiar Junior
- Dr. Luiz Paulo Kowalski
- Dr. Jefferson Gross

- Equipe de Enfermeiras de Pesquisa

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa ("Medicina Personalizada Aplicada para o Monitoramento Terapêutico do Paciente Oncológico"), que será realizada no A.C. Camargo Cancer Center.

IV - OBJETIVOS DA PESQUISA

O projeto pretende caracterizar as alterações exclusivas do material genético do tumor utilizando painéis de genes para análise desse material (por método de sequenciamento) e monitorar, usando como modelo as alterações exclusivas encontradas no tumor, a eficácia do tratamento pela avaliação em plasma e em determinados casos, em urina. Além disso, pretendemos investigar outros componentes de seu sangue como célula tumoral circulante (CTC), vesículas extracelulares (VE), células do sistema imune e marcadores imunológicos para estudar os mecanismos envolvidos na eficácia e resistência ao tratamento.

V - JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

Várias evidências científicas têm demonstrado que tumores sólidos liberam material genético e outros componentes, como células tumorais circulantes e vesículas extracelulares, na circulação sanguínea do paciente. Há atualmente vários grupos de pesquisa padronizando os procedimentos para detecção destes marcadores na corrente sanguínea do paciente. No entanto, apesar de ter tido grandes avanços, esses procedimentos ainda apresentam limitações para sua utilização na rotina clínica.

Assim, esse projeto tem o objetivo de investigar, por técnicas de sequenciamento, o material genético de parte de seu tumor, que será armazenado no nosso Biobanco, com sua devida autorização, para determinar as alterações específicas no DNA. Com esse procedimento, nós pretendemos desenvolver uma ferramenta para identificar no seu plasma e/ou urina a presença de DNA da célula tumoral. Além disso, para um subgrupo de pacientes, também iremos analisar outros componentes da biópsia líquida presentes no plasma, bem como investigar, em amostras de sangue periférico, as células do sistema imune e moléculas relacionadas. Como se trata de um projeto científico, sua aplicação na rotina não será imediata, uma vez que é um processo experimental.

Uma vez superado todos os desafios decorrentes desse projeto e estabelecido com segurança este procedimento, sua aplicação poderá ser bastante ampla na área da oncologia, tanto na detecção precoce de recidiva do tumor como para monitorar resposta à quimioterapia.

VI - DESENHO DA PESQUISA

O estudo a ser realizado será experimental, exploratório, longitudinal, prospectivo e envolverá também aspectos de pesquisa básica. Os tumores a serem avaliados incluem: carcinoma de pulmão não

Rúbrica do
participante:

Rúbrica do
responsável pela aplicação do termo:



pequenas células (CPNPC), adenocarcinoma de reto e colon, cancer de mama triplo negativo (CMTN), carcinomas renais (CR), melanoma e carcinomas de cabeça e pescoço (cavidade oral).

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se concordar em participar deste estudo, você será submetido a coletas de sangue (aproximadamente 8 mL), antes do início do tratamento (cirurgia ou quimioterapia/radioterapia), e em diferentes momentos, sendo que serão feitas em média 6 coletas ao longo da pesquisa. Caso haja necessidade, dependendo do tratamento e de seu consentimento, mais coletas de sangue serão realizadas.

Você não precisará vir ao hospital apenas para a coleta desta pesquisa. Contataremos você nas datas que você tiver exames e na maioria das vezes, aproveitaremos as punções venosas (coleta de sangue) dos exames no laboratório de rotina. Caso não tenha exames a ser realizados, contataremos você nos dias que tiver consulta ou outros procedimentos no hospital. Toda identificação do seu material será feita por códigos para preservar sua confidencialidade.

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

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

Nenhum dano imediato ou tardio, que comprometa a sua saúde, poderá ser decorrente deste estudo, uma vez que você não será submetido a nenhum procedimento adicional aqueles realizados durante o seu tratamento neste hospital.

No momento das coletas de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados, o que diminui as chances de complicações.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Não haverá benefícios de qualquer espécie para os voluntários, apenas a importância de contribuir para uma pesquisa científica cujos dados obtidos poderão trazer benefícios para pessoas com câncer no futuro. A recusa em participar, não acarretará prejuízo em seu tratamento.

X - CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica/pesquisa e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

Para se fazer pesquisas mais relevantes, é importante que os pesquisadores compartilhem informações obtidas de estudos com amostras humanas. Eles fazem isso depositando os resultados em um ou mais bancos de dados científicos, onde são armazenados junto com informações de outros estudos. Os pesquisadores podem então estudar as informações combinadas para aprender ainda mais

Rúbrica do
participante:

Rúbrica do
responsável pela aplicação do termo:



sobre saúde e doenças. A deposição dos dados sempre é feita de forma anonimizada e seu nome e outras informações que poderiam identificá-lo diretamente nunca serão colocados em um banco de dados científicos. Se você concordar em participar do estudo, algumas de suas informações genéticas e de saúde podem ser colocadas em um ou mais bancos de dados científicos e publicadas em revistas científicas. Existem muitos tipos diferentes de bancos de dados científicos, que podem ser mantidos por instituições nacionais ou internacionais. Apesar de ser extremamente pequeno, há um risco de você poder ser identificado, uma vez que a sua composição genética é única. Por isso, o acesso de pesquisadores para estudarem as informações presentes nos bancos de dados é realizado de forma altamente controlada, através de uma autorização de acesso pelos responsáveis do banco de dados e da concordância com os termos de uso de cada banco, garantindo o compromisso de proteger sua privacidade e manter suas informações confidenciais.

Os pesquisadores comprometem-se a manter a confidencialidade dos dados do estudo e do paciente, porém há um risco mínimo de perda desta confidencialidade.

XI – ACHADOS INCIDENTAIS

A pesquisa da qual você irá participar pode identificar informações genéticas que não estavam sendo procuradas, mas que podem ter implicações na sua saúde e/ou na saúde de membros da sua família. Você pode escolher ser ou não ser informado sobre estes resultados por seu médico ou outro médico especialista no assunto. Para isso, assinale apenas uma das alternativas abaixo:

- Quero ser informado
 Não quero ser informado.

XII - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

XIII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Os pesquisadores e médicos se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. **TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS, REAÇÕES ADVERSAS OU QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO:** Dra. Dirce Maria Carraro – pesquisadora (011 2189-5023), Vilma Regina Martins – pesquisadora (011 2189 5000 – ramal 2979), Ludmilla Thomé Domingos Chinen (011 2189 500 – ramal 2936).

XIV. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

As amostras coletadas serão processadas pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. O excedente, não utilizado por este projeto de pesquisa, poderá ser descartado ou, se autorizado pelo participante, ser armazenado e utilizado em outros projetos, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Dependendo da escolha do participante, poderá ser ou não necessária a assinatura de novo TCLE. Para isso, pedimos que o (a) senhor (a) escolha uma das seguintes opções quanto ao armazenamento de sua amostra biológica:

Rúbrica do
participante:

Rúbrica do
responsável pela aplicação do termo:

**Apêndice B – Características clínicas dos pacientes
recrutados neste estudo.**

Tabela 6 – Características clínicas dos pacientes recrutados neste estudo.

| ID | Classificação Histológica | Tipo de cirurgia | Gradação Histológica (ISUP) | Estadiamento patológico | Sexo |
|-----|---|------------------|-----------------------------|-------------------------|------|
| R14 | Inclassificável | parcial E | 3 | pT1bpNx | F |
| R19 | Papilífero tipo 2 | radical D | 3 | pT3apN1 | M |
| R29 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 3 | pT1a | M |
| R32 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical D | 3 | pT1bpN0 | M |
| R33 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 2 | pT1a | M |
| R34 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 2 | pT1b | M |
| R36 | Túbulo-papilar | parcial D | 1 | pT1b | M |
| R37 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical D | 2 | pT2a | F |
| R38 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial D | 3 | pT1 | M |
| R39 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 2 | pT1a | M |
| R42 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 2 | pT1a | M |
| R43 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical E | 4 | pT3a | M |
| R44 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 3 | pT1a | M |
| R46 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical D | 4 | pT3apNx | M |
| R48 | Papilífero tipo 1 | parcial E | 2 | pT1a | M |
| R49 | Cromóforo | parcial E | - | pT1a | M |
| R50 | Cromóforo | parcial D | - | pT1a | M |
| R53 | Leiomiossarcoma | parcial D | Alto grau | - | F |
| R60 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical E | 4 | pT3a | F |
| R63 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 2 | pT1a | M |
| R64 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 2 | pT1a | M |
| R65 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 3 | pT1a | M |
| R66 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial D | 4 | pT1a | M |
| R67 | Cromóforo | parcial E | - | pT1a | M |
| R68 | Papilífero tipo 1 | radical E | - | pT2a | M |
| R69 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 2 | pT3a | F |
| R70 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 3 | pT1a | M |
| R72 | Inclassificável | parcial E | 2 | - | F |
| R73 | Papilífero tipo 1 | radical D | 3 | pT1b | M |
| R75 | Inclassificável | parcial E | 3 | pT1a | M |
| R77 | Papilífero tipo 1 | parcial D | 2 | pT1a | M |
| R82 | Papilífero tipo 1 | parcial E | 4 | pT3a | M |
| R85 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 2 | pT1 | M |
| R86 | Papilífero tipo 1 | parcial D | - | pT1a | M |
| R88 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 3 | pT1a | M |
| R92 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical E | 4 | pT1b | F |
| R93 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial D | 3 | pT1a | M |
| R95 | Papilífero tipo 1 | parcial E | 2 | pT1a | M |
| R96 | Inclassificável | parcial D | 3 | pT1b | M |

| | | | | | |
|------|---|-----------------|---|------------|---|
| R97 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 3 | pT1a | M |
| R98 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 3 | pT1a | F |
| R100 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical D | 3 | pT3apN0 | M |
| R101 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical E | 4 | pT1b | M |
| R102 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical E | 3 | pT2a | M |
| R103 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical E | 3 | pT1b | M |
| R104 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 2 | pT3a | F |
| R106 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial D | 3 | pT1apNx | M |
| R107 | Inclassificável | parcial D | 2 | pT1a | F |
| R108 | Angiomiolipoma | parcial D | 0 | pT1apNxpMx | F |
| R109 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical E | 2 | pT1b | M |
| R110 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical E | 4 | pT3a | M |
| R112 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 1 | pT1a | M |
| R114 | Angiomiolipoma | parcial D | - | - | F |
| R116 | Lipossarcoma | retroperitoneal | - | - | F |
| R120 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial E | 4 | pT1a | M |
| R121 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial D | 4 | pT3a | M |
| R123 | Carcinoma de células renais tipo células claras | parcial D | 1 | pT1a | F |
| R127 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical D | 3 | pT3b | M |
| R130 | Carcinoma de células renais tipo células claras | radical E | 4 | pT3b | F |

Apêndice C – Dados gerados a partir do sequenciamento NGS das amostras dos pacientes recrutados neste estudo.

Tabela 7 – Relação das variantes somáticas inicialmente detectadas nos tumores dos pacientes. Dados gerados a partir da metodologia *Target sequencing*.

| ID | Classificação Histológica | Chr:Pos | Ref/Alt | Gene | HGVS c. | HGVS p. | Cobertura | VAF (%) |
|------|---------------------------|-------------|---------------|----------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------|---------|
| R 14 | Inclassificável | 3:52441253 | A/T | <i>BAP1</i> | NM_004656.3:c.517T>A | NP_004647.1:p.Tyr173Asn | 10001 | 10,05% |
| R 14 | Inclassificável | 17:7577570 | C/T | <i>TP53</i> | NM_000546.5:c.711G>A | NP_000537.3:p.Met237Ile | 13889 | 10,89% |
| R 14 | Inclassificável | 17:7578527 | A/- | <i>TP53</i> | NM_000546.5:c.403delT | NP_000537.3:p.Cys135Alafs | 10628 | 6,71% |
| R 19 | Papilífero tipo 2 | 1:27106293 | T/A | <i>ARID1A</i> | NM_006015.4:c.5904T>A | NP_006006.3:p.Cys1968Ter | 18159 | 42,05% |
| R 19 | Papilífero tipo 2 | 1:27107170 | A/- | <i>ARID1A</i> | NM_006015.4:c.6781delA | NP_006006.3:p.Ile2261Serfs | 21004 | 42,82% |
| R 29 | ccRCC | 3:10183818 | A/C | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.287A>C | NP_000542.1:p.Gln96Pro | 697 | 31,82% |
| R 32 | ccRCC | 3:10191470 | G/A | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.464-1G>A | - | 10056 | 45% |
| R 33 | ccRCC | 3:52637708 | G/A | <i>PBRM1</i> | NM_018313.4:c.2608C>T | NP_060783.3:p.Gln870Ter | 20703 | 61% |
| R 34 | ccRCC | 3:10183793 | T/A | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.262T>A | NP_000542.1:p.Trp88Arg | 7433 | 32,73% |
| R 34 | ccRCC | 3:52620661 | A/T | <i>PBRM1</i> | NM_018313.4:c.3092T>A | NP_060783.3:p.Val1031Asp | 10056 | 32,20% |
| R 36 | Túbulo-papilar | 3:10183816 | GCA/- | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.285_287delGCA | NP_000542.1:p.Gln96del | 7491 | 9,03% |
| R 36 | Túbulo-papilar | X:123215360 | C/A | <i>STAG2</i> | NM_001042749.2:c.2906C>A | NP_001036214.1:p.Ala969Asp | 1777 | 13,40% |
| R 37 | ccRCC | 3:10183793 | T/A | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.262T>A | NP_000542.1:p.Trp88Arg | 6020 | 37,50% |
| R 37 | ccRCC | 3:52443756 | A/C | <i>BAP1</i> | NM_004656.3:c.41T>G | NP_004647.1:p.Leu14Arg | 11750 | 41,84% |
| R 37 | ccRCC | 19:11143985 | G/T | <i>SMARCA4</i> | NM_001128849.1:c.3566G>T | NP_001122321.1:p.Arg1189Leu | 4039 | 28,00% |
| R 38 | ccRCC | 3:10188220 | -/T | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.362_363insT | NP_000542.1:p.Ala122Cysfs | 9527 | 40,59% |
| R 38 | ccRCC | 3:52643884 | T/- | <i>PBRM1</i> | NM_018313.4:c.2012delA | NP_060783.3:p.Asn671Thrfs | 11493 | 42,90% |
| R 38 | ccRCC | X:44928860 | C/A | <i>KDM6A</i> | NM_001291415.1:c.2116C>A | NP_001278344.1:p.Pro706Thr | 5489 | 57,59% |
| R 39 | ccRCC | 3:10188206 | T/C | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.349T>C | NP_000542.1:p.Trp117Arg | 9669 | 17,33% |
| R 39 | ccRCC | 3:52696220 | G/A | <i>PBRM1</i> | NM_018313.4:c.457C>T | NP_060783.3:p.Gln153Ter | 15204 | 19,87% |
| R 42 | ccRCC | 3:10188297 | T/- | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.444delT | NP_000542.1:p.Phe148Leufs*11 | 2274 | 46,07% |
| R 42 | ccRCC | 3:52620500 | C/A | <i>PBRM1</i> | NM_018313.4:c.3253G>T | NP_060783.3:p.Glu1085Ter | 2448 | 50,52% |
| R 42 | ccRCC | X:66765158 | T/A | <i>AR</i> | NM_000044.3:c.170T>A | NP_000035.2:p.Leu57Gln | 1194 | 7,14% |
| R 43 | ccRCC | 3:10183693 | GGAGGCCGGGC/- | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.162_172delGGAGGCCGGGC | NP_000542.1:p.Glu55Alafs | 7243 | 53,32% |
| R 43 | ccRCC | 3:47144835 | C/T | <i>SETD2</i> | NM_014159.6:c.4917+1G>A | - | 8374 | 54,23% |
| R 43 | ccRCC | 3:52620674 | G/A | <i>PBRM1</i> | NM_018313.4:c.3079C>T | NP_060783.3:p.Arg1027Ter | 11905 | 50,26% |
| R 44 | ccRCC | 3:10183788 | C/A | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.257C>A | NP_000542.1:p.Pro86His | 10898 | 46,65% |
| R 46 | ccRCC | 3:10188202 | -/C | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.344_345insC | NP_000542.1:p.Leu116Profs | 9685 | 28,48% |

Apêndice C. Dados gerados a partir do sequenciamento NGS das amostras dos pacientes recrutados neste estudo.

| | | | | | | | | |
|------|-------------------|-------------|------------------|---------------|--|--------------------------------|-------|--------|
| R 46 | ccRCC | 3:52682359 | C/T | <i>PBRM1</i> | NM_018313.4:c.813+1G>A | - | 3328 | 31,83% |
| R 46 | ccRCC | 4:187554849 | T/C | <i>FAT1</i> | NM_005245.3:c.4312A>G | NP_005236.2:p.Ile1438Val | 8108 | 44,73% |
| R 46 | ccRCC | 11:82877317 | A/G | <i>PCF11</i> | NM_001346413.1:c.1378A>G | NP_001333342.1:p.Ile460Val | 16839 | 49,19% |
| R 46 | ccRCC | X:53246997 | -/A | <i>KDM5C</i> | NM_004187.3:c.503_504insT | NP_004178.2:p.Gln168Hisfs | 6029 | 46,96% |
| R 46 | ccRCC | X:53246997 | T/G | <i>KDM5C</i> | NM_004187.3:c.503A>C | NP_004178.2:p.Gln168Pro | 6029 | 46,96% |
| R 48 | Papilífero tipo 1 | 17:78341796 | A/T | <i>RNF213</i> | NM_001256071.3:c.12008A>T | NP_001243000;p.Asp4003Val | 765 | 29,00% |
| R 49 | Cromóforo | 16:64981618 | G/A | <i>CDH11</i> | NM_001797.4:c.2279C>T | NP_001788;p.Ser760Leu | 3062 | 13,00% |
| R 50 | Cromóforo | 4:55133520 | T/A | <i>PDGFRA</i> | NM_006206.6:c.824T>A | NP_006197;p.Leu275Ter | 2191 | 15,00% |
| R 53 | Leiomiossarcoma | X:66765158 | T/A | <i>AR</i> | NM_000044.3:c.170T>A | NP_000035.2;p.Leu57Gln | 1275 | 7% |
| R 60 | ccRCC | 3:10188315 | T/C | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.458T>C | NP_000542.1:p.Leu153Pro | 2932 | 21% |
| R 60 | ccRCC | 3:52443759 | C/A | <i>BAP1</i> | NM_004656.3:c.38G>T | NP_004647.1:p.Gly13Val | 4180 | 20% |
| R 60 | ccRCC | 4:187542562 | G/- | <i>FAT1</i> | NM_005245.3:c.5178delC | NP_005236.2:p.Phe1727Leufs*9 | 2236 | 17% |
| R 63 | ccRCC | 3:10183787 | CCCGTATGGCTCAA/- | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.257_270delCCGTATGGCTCAAC | NP_000542.1:p.Pro86Leufs*41 | 6008 | 24% |
| R 63 | ccRCC | 3:52651447 | G/A | <i>PBRM1</i> | NM_018313.4:c.1649C>T | NP_060783.3;p.Pro550Leu | 4674 | 20% |
| R 64 | ccRCC | 3:10191476 | ACTCTGAAAGAG/- | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.469_480delACTCTGAAAGAG | NP_000542.1:p.Thr157_Glu160del | 1048 | 29% |
| R 65 | ccRCC | 3:10188290 | C/T | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.433C>T | NP_000542.1:p.Gln145Ter | 1907 | 53% |
| R 66 | ccRCC | 3:47165015 | T/- | <i>SETD2</i> | NM_014159.6:c.1111delA | NP_054878.5;p.Thr371Glnfs*113 | 798 | 21% |
| R 67 | Cromóforo | X:66765158 | T/A | <i>AR</i> | NM_000044.3:c.170T>A | NP_000035.2;p.Leu57Gln | 1242 | 5% |
| R 68 | Papilífero tipo 1 | 10:89692959 | C/A | <i>PTEN</i> | NM_000314.6:c.443C>A | NP_000305.3;p.Ala148Glu | 5276 | 27% |
| R 68 | Papilífero tipo 1 | 11:82895826 | A/G | <i>PCF11</i> | NM_001346413.1:c.4951A>G | NP_001333342.1:p.Ser1651Gly | 9376 | 54% |
| R 69 | ccRCC | 3:10188252 | -/A | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.397dupA | NP_000542.1:p.Thr133Asnfs*2 | 2784 | 43% |
| R 69 | ccRCC | 3:52643863 | C/T | <i>PBRM1</i> | NM_018313.4:c.2033G>A | NP_060783.3;p.Arg678His | 5738 | 40% |
| R 70 | ccRCC | 3:52713692 | G/- | <i>PBRM1</i> | NM_018313.4:c.36delC | NP_060783.3;p.Ser13Alafs*32 | 5169 | 8% |
| R 72 | Inclassificável | 3:10191495 | T/A | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.488T>A | NP_000542.1:p.Leu163His | 2837 | 48% |
| R 72 | Inclassificável | 10:89720661 | T/C | <i>PTEN</i> | NM_000314.6:c.812T>C | NP_000305.3;p.Phe271Ser | 3243 | 16% |
| R 73 | Papilífero tipo 1 | 3:47125740 | A/- | <i>SETD2</i> | NM_014159.6:c.5530delT | NP_054878.5;p.Ser1844Leufs*21 | 5288 | 24% |

| | | | | | | | | |
|-------|-------------------|-------------|---------------|----------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------|-----|
| R 73 | Papilífero tipo 1 | X:44929412 | ACAA/- | <i>KDM6A</i> | NM_021140.3:c.2515_2518delAACA | NP_066963.2:p.Asn839Valfs*27 | 1166 | 55% |
| R 75 | Inclassificável | 11:82877674 | A/G | <i>PCF11</i> | NM_001346413.1:c.1735A>G | NP_001333342.1:p.Thr579Ala | 4589 | 13% |
| R 75 | Inclassificável | X:44929290 | G/A | <i>KDM6A</i> | NM_021140.3:c.2390G>A | NP_066963.2:p.Cys797Tyr | 1941 | 6% |
| R 75 | Inclassificável | X:53227973 | G/T | <i>KDM5C</i> | NM_004187.3:c.2341C>A | NP_004178.2:p.Leu781Met | 949 | 8% |
| R 77 | Papilífero tipo 1 | 2:178098959 | T/C | <i>NFE2L2</i> | NM_006164.4:c.86A>G | NP_006155.2:p.Asp29Gly | 3934 | 25% |
| R 77 | Papilífero tipo 1 | 19:11145798 | A/T | <i>SMARCA4</i> | NM_001128849.1:c.4160A>T | NP_001122321.1:p.Gln1387Leu | 4311 | 43% |
| R 82 | Papilífero tipo 1 | 3:52598186 | T/- | <i>PBRM1</i> | NM_018313.4:c.3680delA | NP_060783.3:p.Asn1227Metfs*17 | 5681 | 51% |
| R 82 | Papilífero tipo 1 | X:66765158 | T/A | <i>AR</i> | NM_000044.3:c.170T>A | NP_000035.2:p.Leu57Gln | 1330 | 7% |
| R 85 | ccRCC | 3:47163513 | A/C | <i>SETD2</i> | NM_014159.6:c.2613T>G | NP_054878.5:p.Tyr871Ter | 2292 | 7% |
| R 86 | Papilífero tipo 1 | 7:116415115 | T/C | <i>MET</i> | NM_000245.4:c.3209T>C | NP_000236.2:p.Val1070Ala | 8529 | 52% |
| R 86 | Papilífero tipo 1 | 19:11144118 | G/A | <i>SMARCA4</i> | NM_003072.5:c.3699G>A | NP_003063.2:p.Met1233Ile | 3383 | 38% |
| R 88 | ccRCC | 3:10183846 | G/- | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.317delG | NP_000542.1:p.Gly106Alafs*53 | 4087 | 39% |
| R 92 | ccRCC | 3:10183857 | T/A | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.326T>A | NP_000542.1:p.Ile109Asn | 2885 | 18% |
| R 92 | ccRCC | 3:52436640 | -/A | <i>BAP1</i> | NM_004656.3:c.2034dupT | NP_004647.1:p.Ile679Tyrfs*38 | 4104 | 10% |
| R 93 | ccRCC | 3:52442590 | CATTG/- | <i>BAP1</i> | NM_004656.3:c.150_155delCAAATG | NP_004647.1:p.Phe50_Trp52delinsLeu | 10091 | 3% |
| R 95 | Papilífero tipo 1 | 1:27023252 | C/T | <i>ARIDIA</i> | NM_006015.4:c.358C>T | NP_006006.3:p.Pro120Ser | 3548 | 41% |
| R 95 | Papilífero tipo 1 | 7:116417464 | A/T | <i>MET</i> | NM_001127500.2:c.3335A>T | NP_001120972.1:p.His1112Leu | 3049 | 69% |
| R 96 | Inclassificável | 1:27023008 | -GGC | <i>ARIDIA</i> | NM_006015.4:c.126_128dupGGC | NP_006006.3:p.Ala45_Ala45dup | 4425 | 29% |
| R 97 | ccRCC | 1:11188164 | G/T | <i>MTOR</i> | NM_004958.4:c.5930C>A | NP_004949.1:p.Thr1977Lys | 3854 | 10% |
| R 98 | ccRCC | 1:27106040 | CAGCAGAGGGT/- | <i>ARIDIA</i> | NM_006015.4:c.5651_5661delCAGCAGAGGGT | NP_006006.3:p.Thr1884Asnfs*13 | 3579 | 38% |
| R 100 | ccRCC | 10:89692885 | CTGTAAAG/- | <i>PTEN</i> | NM_000314.8:c.372_379delTAAAGCTG | NP_000305.3:p.Cys124Trpfs*53 | 1157 | 31% |
| R 101 | ccRCC | 3:10188208 | G/T | <i>VHL</i> | NM_000551.4:c.351G>T | NP_000542.1:p.Trp117Cys | 2324 | 19% |
| R 101 | ccRCC | 3:52637555 | G/A | <i>PBRM1</i> | NM_001366071.2:c.2824C>T | NP_001353000.1:p.Arg942Ter | 2054 | 27% |
| R 101 | ccRCC | X:53243980 | T/- | <i>KDM5C</i> | NM_004187.5:c.1013delA | NP_004178.2:p.Lys338Serfs*92 | 3235 | 56% |
| R 102 | ccRCC | 3:10183752 | T/A | <i>VHL</i> | NM_000551.4:c.221T>A | NP_000542.1:p.Val74Asp | 1394 | 21% |

| | | | | | | | | |
|-------|-----------------|-------------|-------------------------|---------------|------------------------------------|---------------------------------|-------|--------|
| R 103 | ccRCC | 3:10191530 | TACAGGAGAC/- | <i>VHL</i> | NM_000551.4:c.524_533delACAGGAGACT | NP_000542.1:p.Tyr175Trpfs*24 | 1809 | 43% |
| R 103 | ccRCC | 3:52651315 | A/T | <i>PBRM1</i> | NM_001366071.2:c.1844T>A | NP_001353000.1:p.Phe615Tyr | 601 | 42% |
| R 103 | ccRCC | X:53223422 | G/A | <i>KDM5C</i> | NM_004187.5:c.3937C>T | NP_004178.2:p.Gln1313Ter | 1283 | 60% |
| R 104 | ccRCC | 1:27023756 | C/T | <i>ARID1A</i> | NM_006015.6:c.862C>T | NP_006006.3:p.Gln288Ter | 720 | 27% |
| R 104 | ccRCC | 3:52651415 | TT/- | <i>PBRM1</i> | NM_001366071.2:c.1743_1744delAA | NP_001353000.1:p.Lys581Asnfs*12 | 1433 | 31% |
| R 106 | ccRCC | 3:10191540 | TGGACA/- | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.534_539delGGACAT | NP_000542.1:p.Asp179_Ile180del | 12370 | 17% |
| R 107 | Inclassificável | 1:11184573 | G/A | <i>MTOR</i> | NM_004958.3:c.664C>T | NP_004949.1:p.Ser2215Phe | 4345 | 31% |
| R 108 | Angiomiolipoma | 9:21970916 | C/T | <i>CDKN2A</i> | NM_000077.5:c.442G>A | NP_000068.1:p.Ala148Thr | 3908 | 88% |
| R 109 | ccRCC | 3:10188200 | C/T | <i>VHL</i> | NM_000551.3:c.343C>T | NP_000542.1:p.His115Tyr | 3035 | 38,81% |
| R 109 | ccRCC | 3:52621469 | G/- | <i>PBRM1</i> | NM_018313.4:c.2966-18delC | - | 2824 | 40,22% |
| R 110 | ccRCC | 3:10183811 | G/T | <i>VHL</i> | NM_000551.4:c.280G>T | NP_000542.1:p.Glu94Ter | 2215 | 40% |
| R 110 | ccRCC | 3:47164861 | G/C | <i>SETD2</i> | NM_014159.7:c.1265C>G | NP_054878.5:p.Ser422Ter | 1212 | 11% |
| R 110 | ccRCC | 3:52682459 | C/T | <i>PBRM1</i> | NM_001366071.2:c.778-1G>A | - | 1951 | 33% |
| R 112 | ccRCC | 3:10183712 | CC/- | <i>VHL</i> | NM_000551.4:c.182_183delCC | NP_000542.1:p.Pro61Argfs*70 | 2617 | 27% |
| R 114 | Angiomiolipoma | 4:187630597 | C/G | <i>FAT1</i> | NM_005245.4:c.385G>C | NP_005236.2:p.Val129Leu | 4697 | 50% |
| R 116 | Lipossarcoma | 4:187524525 | C/T | <i>FAT1</i> | NM_005245.4:c.11155G>A | NP_005236.2:p.Val3719Met | 4229 | 51% |
| R 120 | ccRCC | 3:10191479 | C/G | <i>VHL</i> | NM_000551.4:c.472C>G | NP_000542.1:p.Leu158Val | 1805 | 19% |
| R 120 | ccRCC | 3:52443601 | C/T | <i>BAP1</i> | NM_004656.4:c.91G>A | NP_004647.1:p.Glu31Lys | 1795 | 26% |
| R 121 | ccRCC | 3:10188315 | T/C | <i>VHL</i> | NM_000551.4:c.458T>C | NP_000542.1:p.Leu153Pro | 1450 | 37% |
| R 121 | ccRCC | 3:47143047 | T/C | <i>SETD2</i> | NM_014159.7:c.4918-2A>G | - | 301 | 16% |
| R 121 | ccRCC | 3:52439198 | G/- | <i>BAP1</i> | NM_004656.4:c.1044delC | NP_004647.1:p.Asn349Thrfs*13 | 2858 | 5% |
| R 121 | ccRCC | X:44913096 | T/A | <i>KDM6A</i> | NM_001291415.2:c.771T>A | NP_001278344.1:p.Asp257Glu | 1832 | 6% |
| R 123 | ccRCC | 3:10183872 | G/A | <i>VHL</i> | NM_000551.4:c.340+1G>A | - | 1576 | 34% |
| R 127 | ccRCC | 3:47098437 | -/A | <i>SETD2</i> | NM_014159.7:c.6837dupT | NP_054878.5:p.Val2280Cysfs*89 | 3571 | 31% |
| R 127 | ccRCC | X:53230890 | GGCGGTAGTGCTCAATGCACT/- | <i>KDM5C</i> | NM_004187.5:c.1883_1903del | NP_004178.2:p.Gln628_Arg634del | 1468 | 27% |
| R 130 | ccRCC | 17:7578419 | C/T | <i>TP53</i> | NM_000546.6:c.511G>A | NP_000537.3:p.Glu171Lys | 3053 | 33% |

Legenda: Tumores com classificação histológica de células claras estão representados pela abreviação ccRCC (do inglês *clear cell Renal Cell Carcinoma*). A abreviação VAF está representando a frequência alélica da variante identificada.

Apêndice D – Resultados detalhados da avaliação dos fluidos corpóreos em todas as amostras avaliadas.

Tabela 8 – Resultados detalhados da avaliação dos fluidos corpóreos em todas as amostras avaliadas.

| ID | Classificação Histológica | Chr:Pos | Ref/Alt | Gene | HGVS c. | HGVS p. | Cobertura no Tumor | VAF (%) no Tumor | Baseline plasma | | | Baseline urina | | |
|------|---------------------------|-------------|---------------|---------|-------------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|---------|-------------|--------------------|---------|-------------|
| | | | | | | | | | Média de cobertura | VAF (%) | Metodologia | Média de cobertura | VAF (%) | Metodologia |
| R 14 | Inclassificável | 3:52441253 | A/T | BAP1 | c.517T>A | p.Tyr173Asn | 10001 | 10,05% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 14 | Inclassificável | 17:7577570 | C/T | TP53 | c.711G>A | p.Met237Ile | 13889 | 10,89% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 14 | Inclassificável | 17:7578527 | A/- | TP53 | c.403delT | p.Cys135Alafs | 10628 | 6,71% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 19 | Papilífero tipo 2 | 1:27106293 | T/A | ARID1A | c.5904T>A | p.Cys1968Ter | 18159 | 42,05% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 19 | Papilífero tipo 2 | 1:27107170 | A/- | ARID1A | c.6781delA | p.Ile2261Serfs | 21004 | 42,82% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 29 | ccRCC | 3:10183818 | A/C | VHL | c.287A>C | p.Gln96Pro | 697 | 31,82% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 32 | ccRCC | 3:10191470 | G/A | VHL | c.464-1G>A | | 10056 | 45% | 23727 | ND | Amplicon | 20860 | ND | Amplicon |
| R 33 | ccRCC | 3:52637708 | G/A | PBRM1 | c.2608C>T | p.Gln870Ter | 20703 | 61% | 37704 | ND | Amplicon | 65094 | ND | Amplicon |
| R 34 | ccRCC | 3:10183793 | T/A | VHL | c.262T>A | p.Trp88Arg | 7433 | 32,73% | 83291 | ND | Amplicon | 42014 | ND | Amplicon |
| R 34 | ccRCC | 3:52620661 | A/T | PBRM1 | c.3092T>A | p.Val1031Asp | 10056 | 32,20% | 112589 | ND | Amplicon | 45544 | ND | Amplicon |
| R 36 | Túbulo-papilar | 3:10183816 | GCA/- | VHL | c.285_287delGCA | p.Gln96del | 7491 | 9,03% | 129897 | ND | Amplicon | 110380 | ND | Amplicon |
| R 36 | Túbulo-papilar | X:123215360 | C/A | STAG2 | c.2906C>A | p.Ala969Asp | 1777 | 13,40% | 136061 | ND | Amplicon | 156996 | ND | Amplicon |
| R 37 | ccRCC | 3:10183793 | T/A | VHL | c.262T>A | p.Trp88Arg | 6020 | 37,50% | 56896 | ND | Amplicon | 354744 | ND | Amplicon |
| R 37 | ccRCC | 3:52443756 | A/C | BAP1 | c.41T>G | p.Leu14Arg | 11750 | 41,84% | 56746 | ND | Amplicon | 22522 | ND | Amplicon |
| R 37 | ccRCC | 19:11143985 | G/T | SMARCA4 | c.3566G>T | p.Arg1189Leu | 4039 | 28,00% | 133934 | ND | Amplicon | 451394 | ND | Amplicon |
| R 38 | ccRCC | 3:10188220 | -/T | VHL | c.362_363insT | p.Ala122Cysfs | 9527 | 40,59% | 147948 | ND | Amplicon | 83231 | ND | Amplicon |
| R 38 | ccRCC | 3:52643884 | T/- | PBRM1 | c.2012delA | p.Asn671Thrfs | 11493 | 42,90% | 36057 | ND | Amplicon | 124626 | 0,52% | Amplicon |
| R 38 | ccRCC | X:44928860 | C/A | KDM6A | c.2116C>A | p.Pro706Thr | 5489 | 57,59% | 131157 | ND | Amplicon | 153680 | 2,06% | Amplicon |
| R 39 | ccRCC | 3:10188206 | T/C | VHL | c.349T>C | p.Trp117Arg | 9669 | 17,33% | 770607 | ND | Amplicon | 53288 | 4,95% | Amplicon |
| R 39 | ccRCC | 3:52696220 | G/A | PBRM1 | c.457C>T | p.Gln153Ter | 15204 | 19,87% | 164759 | ND | Amplicon | 194515 | 5,98% | Amplicon |
| R 42 | ccRCC | 3:10188297 | T/- | VHL | c.444delT | p.Phe148Leufs*11 | 2274 | 46,07% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 42 | ccRCC | 3:52620500 | C/A | PBRM1 | c.3253G>T | p.Glu1085Ter | 2448 | 50,52% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 42 | ccRCC | X:66765158 | T/A | AR | c.170T>A | p.Leu57Gln | 1194 | 7,14% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 43 | ccRCC | 3:10183693 | GGAGGCCGGGC/- | VHL | c.162_172delGGAGGCCGGGC | p.Glu55Alafs | 7243 | 53,32% | 9415 | ND | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 43 | ccRCC | 3:47144835 | C/T | SETD2 | c.4917+1G>A | | 8374 | 54,23% | 68440 | ND | Amplicon | 41444 | ND | Amplicon |
| R 43 | ccRCC | 3:52620674 | G/A | PBRM1 | c.3079C>T | p.Arg1027Ter | 11905 | 50,26% | 67484 | ND | Amplicon | 21682 | ND | Amplicon |
| R 44 | ccRCC | 3:10183788 | C/A | VHL | c.257C>A | p.Pro86His | 10898 | 46,65% | 162379 | ND | Amplicon | 109891 | ND | Amplicon |
| R 46 | ccRCC | 3:10188202 | -/C | VHL | c.344_345insC | p.Leu116Profs | 9685 | 28,48% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-------------------|-------------|------------------|---------------|----------------------------|--------------------|-------|--------|---------|--------|----------|--------|----------------------|----------|
| R 46 | ccRCC | 3:52682359 | C/T | <i>PBRM1</i> | c.813+1G>A | | 3328 | 31,83% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 46 | ccRCC | 4:187554849 | T/C | <i>FAT1</i> | c.4312A>G | p.Ile1438Val | 8108 | 44,73% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 46 | ccRCC | 11:82877317 | A/G | <i>PCF11</i> | c.1378A>G | p.Ile460Val | 16839 | 49,19% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 46 | ccRCC | X:53246997 | -/A | <i>KDM5C</i> | c.503_504insT | p.Gln168Hisfs | 6029 | 46,96% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 46 | ccRCC | X:53246997 | T/G | <i>KDM5C</i> | c.503A>C | p.Gln168Pro | 6029 | 46,96% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 48 | Papilífero tipo 1 | 17:78341796 | A/T | <i>RNF213</i> | c.12008A>T | p.Asp4003Val | 765 | 29,00% | 46485 | ND | Amplicon | NA | NA | NA |
| R 49 | Cromóforo | 16:64981618 | G/A | <i>CDH11</i> | c.2279C>T | p.Ser760Leu | 3062 | 13,00% | 4726 | ND | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 50 | Cromóforo | 4:55133520 | T/A | <i>PDGFRA</i> | c.824T>A | p.Leu275Ter | 2191 | 15,00% | NA | NA | NA | 74 | NA | Amplicon |
| R 53 | Leiomiossarcoma | X:66765158 | T/A | <i>AR</i> | c.170T>A | p.Leu57Gln | 1275 | 7% | 1260 | 4,44% | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 60 | ccRCC | 3:10188315 | T/C | <i>VHL</i> | c.458T>C | p.Leu153Pro | 2932 | 21% | 20052 | 4,00% | Amplicon | 2409 | ND | Painel |
| R 60 | ccRCC | 3:52443759 | C/A | <i>BAP1</i> | c.38G>T | p.Gly13Val | 4180 | 20% | 1010 | 2,67% | Amplicon | 2409 | ND | Painel |
| R 60 | ccRCC | 4:187542562 | G/- | <i>FAT1</i> | c.5178delC | p.Phe1727Leufs*9 | 2236 | 17% | 2343 | 2,31% | Amplicon | 2409 | ND | Painel |
| R 63 | ccRCC | 3:10183787 | CCCGTATGGCTCAA/- | <i>VHL</i> | c.257_270delCCGTATGGCTCAAC | p.Pro86Leufs*41 | 6008 | 24% | 16400 | ND | Amplicon | 3597 | ND | Painel |
| R 63 | ccRCC | 3:52651447 | G/A | <i>PBRM1</i> | c.1649C>T | p.Pro550Leu | 4674 | 20% | 38313 | ND | Amplicon | 3597 | ND | Painel |
| R 64 | ccRCC | 3:10191476 | ACTCTGAAAGAG/- | <i>VHL</i> | c.469_480delACTCTGAAAGAG | p.Thr157_Glu160del | 1048 | 29% | 50497 | ND | Amplicon | 1300 | ND | Painel |
| R 65 | ccRCC | 3:10188290 | C/T | <i>VHL</i> | c.433C>T | p.Gln145Ter | 1907 | 53% | 45148 | ND | Amplicon | 1300 | ND | Painel |
| R 66 | ccRCC | 3:47165015 | T/- | <i>SETD2</i> | c.1111delA | p.Thr371Glnfs*113 | 798 | 21% | 2045395 | ND | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 67 | Cromóforo | X:66765158 | T/A | <i>AR</i> | c.170T>A | p.Leu57Gln | 1242 | 5% | NA | NA | NA | 4486 | 4,04% | Amplicon |
| R 68 | Papilífero tipo 1 | 10:89692959 | C/A | <i>PTEN</i> | c.443C>A | p.Ala148Glu | 5276 | 27% | 1 | NA | Amplicon | 100471 | ND | Amplicon |
| R 68 | Papilífero tipo 1 | 11:82895826 | A/G | <i>PCF11</i> | c.4951A>G | p.Ser1651Gly | 9376 | 54% | 28398 | 38,40% | Amplicon | 190735 | ND | Amplicon |
| R 69 | ccRCC | 3:10188252 | -/A | <i>VHL</i> | c.397dupA | p.Thr133Asnfs*2 | 2784 | 43% | 23559 | ND | Amplicon | 399404 | 0,25% low conf | Amplicon |
| R 69 | ccRCC | 3:52643863 | C/T | <i>PBRM1</i> | c.2033G>A | p.Arg678His | 5738 | 40% | 8861 | ND | Amplicon | 82316 | ND | Amplicon |
| R 70 | ccRCC | 3:52713692 | G/- | <i>PBRM1</i> | c.36delC | p.Ser13Alafs*32 | 5169 | 8% | 2812 | ND | Painel | 157661 | ND | Amplicon |
| R 72 | Inclassificável | 3:10191495 | T/A | <i>VHL</i> | c.488T>A | p.Leu163His | 2837 | 48% | 23297 | ND | Amplicon | 94347 | ND | Amplicon |
| R 72 | Inclassificável | 10:89720661 | T/C | <i>PTEN</i> | c.812T>C | p.Phe271Ser | 3243 | 16% | 0 | NA | Amplicon | 1 | NA | Amplicon |
| R 73 | Papilífero tipo 1 | 3:47125740 | A/- | <i>SETD2</i> | c.5530delT | p.Ser1844Leufs*21 | 5288 | 24% | 71527 | ND | Amplicon | NA | NA | Amplicon |
| R 73 | Papilífero tipo 1 | X:44929412 | ACAA/- | <i>KDM6A</i> | c.2515_2518delAACA | p.Asn839Valfs*27 | 1166 | 55% | 13388 | ND | Amplicon | NA | NA | Amplicon |
| R 75 | Inclassificável | 11:82877674 | A/G | <i>PCF11</i> | c.1735A>G | p.Thr579Ala | 4589 | 13% | 34.664 | ND | Painel | 649629 | ND | Painel |
| R 75 | Inclassificável | X:44929290 | G/A | <i>KDM6A</i> | c.2390G>A | p.Cys797Tyr | 1941 | 6% | 34.664 | ND | Painel | 649629 | ND | Painel |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|-------------|---------------|----------------|---------------------------|------------------------|-------|-----|---------|--------|----------|---------|----------------------|----------|
| R 75 | Inclassificável | X:53227973 | G/T | <i>KDM5C</i> | c.2341C>A | p.Leu781Met | 949 | 8% | 34.664 | ND | Painel | 649629 | ND | Painel |
| R 77 | Papilífero tipo 1 | 2:178098959 | T/C | <i>NFE2L2</i> | c.86A>G | p.Asp29Gly | 3934 | 25% | 34.664 | ND | Painel | 129966 | ND | Painel |
| R 77 | Papilífero tipo 1 | 19:11145798 | A/T | <i>SMARCA4</i> | c.4160A>T | p.Gln1387Leu | 4311 | 43% | 34.664 | ND | Painel | 129966 | ND | Painel |
| R 82 | Papilífero tipo 1 | 3:52598186 | T/- | <i>PBRM1</i> | c.3680delA | p.Asn1227Metfs*17 | 5681 | 51% | 38079 | ND | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 82 | Papilífero tipo 1 | X:66765158 | T/A | <i>AR</i> | c.170T>A | p.Leu57Gln | 1330 | 7% | 347 | 10,66% | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 85 | ccRCC | 3:47163513 | A/C | <i>SETD2</i> | c.2613T>G | p.Tyr871Ter | 2292 | 7% | 33349 | ND | Amplicon | 96512* | NA | Painel |
| R 86 | Papilífero tipo 1 | 7:116415115 | T/C | <i>MET</i> | c.3209T>C | p.Val1070Ala | 8529 | 52% | 323480 | ND | Amplicon | 96512* | NA | Painel |
| R 86 | Papilífero tipo 1 | 19:11144118 | G/A | <i>SMARCA4</i> | c.3699G>A | p.Met1233Ile | 3383 | 38% | 22383 | ND | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 88 | ccRCC | 3:10183846 | G/- | <i>VHL</i> | c.317delG | p.Gly106Alafs*53 | 4087 | 39% | 266338 | ND | Painel | 649629 | ND | Painel |
| R 92 | ccRCC | 3:10183857 | T/A | <i>VHL</i> | c.326T>A | p.Ile109Asn | 2885 | 18% | 8884 | ND | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 92 | ccRCC | 3:52436640 | -/A | <i>BAP1</i> | c.2034dupT | p.Ile679Tyrfs*38 | 4104 | 10% | 14530 | ND | Amplicon | 6954* | NA | Painel |
| R 93 | ccRCC | 3:52442590 | CATTTG/- | <i>BAP1</i> | c.150_155delCAAATG | p.Phe50_Trp52delinsLeu | 10091 | 3% | 48418 | ND | Painel | 6954* | NA | Painel |
| R 95 | Papilífero tipo 1 | 1:27023252 | C/T | <i>ARIDIA</i> | c.358C>T | p.Pro120Ser | 3548 | 41% | 17429 | ND | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 95 | Papilífero tipo 1 | 7:116417464 | A/T | <i>MET</i> | c.3335A>T | p.His1112Leu | 3049 | 69% | 6001 | 4,16% | Amplicon | 2101 | NA | Amplicon |
| R 96 | Inclassificável | 1:27023008 | -/GGC | <i>ARIDIA</i> | c.126_128dupGGC | p.Ala45_Ala45dup | 4425 | 29% | 6011 | ND | Amplicon | 2409 | ND | Painel |
| R 97 | ccRCC | 1:11188164 | G/T | <i>MTOR</i> | c.5930C>A | p.Thr1977Lys | 3854 | 10% | 38860 | ND | Painel | 240913 | ND | Painel |
| R 98 | ccRCC | 1:27106040 | CAGCAGAGGGT/- | <i>ARIDIA</i> | c.5651_5661delCAGCAGAGGGT | p.Thr1884Asnfs*13 | 3579 | 38% | 163.995 | ND | Painel | 5961* | NA | Painel |
| R 100 | ccRCC | 10:89692885 | CTGTAAAG/- | <i>PTEN</i> | c.372_379delTAAAGCTG | p.Cys124Trpfs*53 | 1157 | 31% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 101 | ccRCC | 3:10188208 | G/T | <i>VHL</i> | c.351G>T | p.Trp117Cys | 2324 | 19% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 101 | ccRCC | 3:52637555 | G/A | <i>PBRM1</i> | c.2824C>T | p.Arg942Ter | 2054 | 27% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 101 | ccRCC | X:53243980 | T/- | <i>KDM5C</i> | c.1013delA | p.Lys338Serfs*92 | 3235 | 56% | NC | NC | NC | 89672 | ND | Amplicon |
| R 102 | ccRCC | 3:10183752 | T/A | <i>VHL</i> | c.221T>A | p.Val74Asp | 1394 | 21% | 118889 | ND | Amplicon | 1739494 | ND | Amplicon |
| R 103 | ccRCC | 3:10191530 | TACAGGAGAC/- | <i>VHL</i> | c.524_533delACAGGAGACT | p.Tyr175Trpfs*24 | 1809 | 43% | 806609 | ND | Amplicon | 877444 | ND | Amplicon |
| R 103 | ccRCC | 3:52651315 | A/T | <i>PBRM1</i> | c.1844T>A | p.Phe615Tyr | 601 | 42% | 383263 | ND | Amplicon | 22973 | ND | Amplicon |
| R 103 | ccRCC | X:53223422 | G/A | <i>KDM5C</i> | c.3937C>T | p.Gln1313Ter | 1283 | 60% | 96329 | ND | Amplicon | 19994 | 0,26% low conf | Amplicon |
| R 104 | ccRCC | 1:27023756 | C/T | <i>ARIDIA</i> | c.862C>T | p.Gln288Ter | 720 | 27% | 28927 | ND | Amplicon | 371560 | ND | Amplicon |
| R 104 | ccRCC | 3:52651415 | TT/- | <i>PBRM1</i> | c.1743_1744delAA | p.Lys581Asnfs*12 | 1433 | 31% | 599522 | ND | Amplicon | NA | NA | Amplicon |
| R 106 | ccRCC | 3:10191540 | TGGACA/- | <i>VHL</i> | c.534_539delGGACAT | p.Asp179_Ile180del | 12370 | 17% | 115620 | ND | Amplicon | 96512* | NA | Painel |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----------------|-------------|-------------------------|---------------|----------------|--------------------|------|--------|----------|--------------------|----------|--------|-------|----------|
| R 107 | Inclassificável | 1:11184573 | G/A | <i>MTOR</i> | c.6644C>T | p.Ser2215Phe | 4345 | 31% | 1.639,95 | ND | Painel | 649629 | ND | Painel |
| R 108 | Angiomiolipoma | 9:21970916 | C/T | <i>CDKN2A</i> | c.442G>A | p.Ala148Thr | 3908 | 88% | 28564 | ND | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 109 | ccRCC | 3:10188200 | C/T | <i>VHL</i> | c.343C>T | p.His115Tyr | 3035 | 38,81% | 29586 | ND | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 109 | ccRCC | 3:52621469 | G/- | <i>PBRM1</i> | c.2966-18delC | | 2824 | 40,22% | 0 | NA | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 110 | ccRCC | 3:10183811 | G/T | <i>VHL</i> | c.280G>T | p.Glu94Ter | 2215 | 40% | 13 | 0,027% Low conf | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 110 | ccRCC | 3:47164861 | G/C | <i>SETD2</i> | c.1265C>G | p.Ser422Ter | 1212 | 11% | 29833 | ND | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 110 | ccRCC | 3:52682459 | C/T | <i>PBRM1</i> | c.778-1G>A | | 1951 | 33% | 109 | NA | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 112 | ccRCC | 3:10183712 | CC/- | <i>VHL</i> | c.182_183delCC | p.Pro61Argfs*70 | 2617 | 27% | 1 | NA | Amplicon | NA | NA | Amplicon |
| R 114 | Angiomiolipoma | 4:187630597 | C/G | <i>FAT1</i> | c.385G>C | p.Val129Leu | 4697 | 50% | NA | NA | Amplicon | NA | NA | Amplicon |
| R 116 | Lipossarcoma | 4:187524525 | C/T | <i>FAT1</i> | c.11155G>A | p.Val3719Met | 4229 | 51% | NA | NA | Amplicon | NA | NA | Amplicon |
| R 120 | ccRCC | 3:10191479 | C/G | <i>VHL</i> | c.472C>G | p.Leu158Val | 1805 | 19% | NA | NA | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 120 | ccRCC | 3:52443601 | C/T | <i>BAP1</i> | c.91G>A | p.Glu31Lys | 1795 | 26% | 30895 | ND | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 121 | ccRCC | 3:10188315 | T/C | <i>VHL</i> | c.458T>C | p.Leu153Pro | 1450 | 37% | 12128 | 0,68% | Amplicon | 0 | NA | Amplicon |
| R 121 | ccRCC | 3:47143047 | T/C | <i>SETD2</i> | c.4918-2A>G | | 301 | 16% | 2517 | 25,14% | Amplicon | 194 | 1,03% | Amplicon |
| R 121 | ccRCC | 3:52439198 | G/- | <i>BAP1</i> | c.1044delC | p.Asn349Thrfs*13 | 2858 | 5% | 15721 | ND | Amplicon | 27 | NA | Amplicon |
| R 121 | ccRCC | X:44913096 | T/A | <i>KDM6A</i> | c.771T>A | p.Asp257Glu | 1832 | 6% | 8715 | ND | Amplicon | 25 | NA | Amplicon |
| R 123 | ccRCC | 3:10183872 | G/A | <i>VHL</i> | c.340+1G>A | | 1576 | 34% | NA | NA | Amplicon | NA | NA | Amplicon |
| R 127 | ccRCC | 3:47098437 | -/A | <i>SETD2</i> | c.6837dupT | p.Val2280Cysfs*89 | 3571 | 31% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 127 | ccRCC | X:53230890 | GGCGGTAGTGCTCAATGCACT/- | <i>KDM5C</i> | c.1883_1903del | p.Gln628_Arg634del | 1468 | 27% | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| R 130 | ccRCC | 17:7578419 | C/T | <i>TP53</i> | c.511G>A | p.Glu171Lys | 3053 | 33% | NA | NA | Amplicon | NA | NA | Amplicon |

Legenda: Tumores com classificação histológica de células claras estão representados pela abreviação ccRCC (do inglês *clear cell Renal Cell Carcinoma*). A abreviação VAF está representando a frequência alélica da variante identificada. O identificador “NA” representa as amostras que não foram avaliadas, “NC” as que não foram coletadas e “ND” as que foram avaliadas, no entanto não foram detectadas.