

**CARACTERIZAÇÃO DE XENOENXERTOS DERIVADOS DE
PACIENTES COM CARCINOMAS DE CÉLULAS RENAIIS E
AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE A TERAPIAS
ANTIANGIOGÊNICAS**

ADRIANO DE OLIVEIRA BESERRA

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Tiago Góss dos Santos

São Paulo

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Beserra, Adriano de Oliveira.

Caracterização de xenoenxertos derivados de pacientes com carcinomas de células renais e avaliação de sensibilidade a terapias antiangiogênicas. Adriano de Oliveira Beserra. São Paulo, 2025.

154f.

Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Tiago Góss dos Santos.

1. Carcinoma de Células Renais, 2. Vulnerabilidades Genéticas,
3. Xenoenxertos Derivados de Pacientes.

ADRIANO DE OLIVEIRA BESERRA

**CARACTERIZAÇÃO DE XENOENXERTOS DERIVADOS DE PACIENTES COM
CARCINOMAS DE CÉLULAS RENAIIS E AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE A TERAPIAS
ANTIANGIOGÊNICAS**

Aprovado em: 07/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr Tiago Góss dos Santos

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Giovana Tardin Torrezan

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Aldo Lourenço Abbade Dettino

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Humberto Dellê

Instituição: Universidade Nove de Julho UNINOVE

Membro da banca: Érico Costa

Instituição: Hospital Sírio-Libanês

"O importante é nunca parar de questionar.
A curiosidade tem sua própria razão de existir."

— **ALBERT EINSTEIN**

Dedico este trabalho à minha família, pela confiança e pela capacidade de acreditar no meu trabalho e no meu potencial. **MÃE**, foi o seu carinho e dedicação que, em diversos momentos, me deram forças para continuar e não desistir. **PAI**, sua presença trouxe estabilidade e a certeza de que nunca enfrentei essa jornada sozinho.

AGRADECIMENTOS

“Nenhuma conquista é verdadeiramente individual. Ela é tecida com os fios do apoio, da inspiração e da generosidade daqueles que cruzam o nosso caminho e acreditam no nosso trabalho.”

Agradeço primeiramente a **DEUS**, por ser essencial na minha vida, autor do meu destino, e principalmente por me dar coragem para questionar realidades e por me proporcionar um mundo de infinitas possibilidades, por ampliar meu conhecimento me proporcionando descobrir novos horizontes.

Agradeço aos meus pais, **ROSIMERE DE S. OLIVEIRA** e **ADEILDO PONCIANO BESERRA**, pelo fato de existirem em minha vida, e, sobretudo, por serem fundamentais de todas as formas para a conclusão de mais este trabalho.

Agradeço ao meu amigo, meu companheiro de todas as horas, **RAÍ PEREIRA DOS SANTOS**, sua presença constante na etapa final deste trabalho, me fez entender que cada coisa nas nossas vidas tem um momento, e uma hora certa para acontecer. Seu carinho e entusiasmo comigo e com o meu trabalho, serviram de impulso para que eu pudesse dar o meu melhor em mais esse projeto.

Ao meu orientador **PROF DR TIAGO GÓSS DOS SANTOS**, registro minha mais profunda gratidão. Sua sabedoria, paciência e dedicação foram verdadeiras fontes de inspiração ao longo desses últimos quatro anos. Em cada conversa, em cada reunião, suas palavras não apenas orientaram este trabalho, mas também abriram novos horizontes, instigaram reflexões mais profundas, novos questionamentos, e fortaleceram minha confiança como pesquisador. Agradeço por me conceder a oportunidade de realizar este doutorado sob sua orientação, por acreditar em meu potencial e, sobretudo, pelo incentivo constante, mesmo nos momentos mais desafiadores, e nos momentos de correria, diante das tantas demandas que se fizeram presentes. Este trabalho é resultado, em grande parte, pela sua confiança depositada no meu trabalho. Levarei comigo para sempre o aprendizado construído ao

longo desta jornada. Agradeço ainda pela empatia e cuidado durante a Pandemia, pelo reconhecimento durante os projetos em colaboração e nas publicações, agradeço sobretudo, por estar sempre presente na minha caminhada, me ajudando a encontrar sempre as melhores soluções para os eventuais problemas que surgiram.

Agradeço a toda à equipe do Laboratório de Genômica Clínica e Funcional, desde os alunos de Iniciação Científica, Mestres, Doutores e Pesquisadores pelo companheirismo, pelo carinho e aprendizado em por todos os momentos, em especial a **DRA DIRCE MARIA CARRARO**, a **DRA GIOVANA TARDIN TORREZAN**, e a **DRA ANA CAROLINA KEREKES MIGUEZ**, por toda a ajuda com a caracterização por sequenciamento genômico.

Agradeço ao centro de referência em Urologia do A.C.Camargo Cancer Center, em especial ao **DR STENIO DE CASSIO ZEQUI**, pelo apoio neste trabalho, pelas orientações, pelo incentivo constante, e pela atenção.

Agradeço ao Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, em especial a **DRA STEPHANIA MARTINS BEZERRA**, pelo entusiasmo, pela dedicação e companheirismo. Seu apoio foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Também não posso deixar de mencionar a **MARISTELA APARECIDA BARBOSA** que durante todo o tempo nos ajudou com as coletas dos tumores e sangue dos pacientes convidados para participar deste projeto.

Aproveito e registro aqui também os meus agradecimentos aos funcionários e técnicos dos laboratórios de apoio (*core facilities*) do Centro Internacional de Pesquisa, sua ajuda foi fundamental para a conclusão de mais este trabalho.

Agradeço ao Biobanco e Laboratório de Histologia do A.C.Camargo Cancer Center, em especial a **DRA ELOISA HELENA RIBEIRO OLIVIERI**, **ANA PAULA MITSUE SUENAGA**, **NATHÁLIA VARELLA**, **LOUISE DANIELLE DE CARVALHO**, **KEILA TAIRA MACEDO**, e **SEVERINO DA SILVA FERREIRA** pela paciência, contribuição e pontualidade, sua ajuda foi essencial para a conclusão de mais este projeto.

Agradeço também, aos técnicos, **ORACI LIMA LEITE** e **DANILO DAS NEVES SILVA** por todo o empenho e ajuda constante durante a realização dos experimentos, garantindo que os insumos necessários estivessem sempre disponíveis.

Um agradecimento especial a enfermeira de pesquisa **DRA CÁSSIA DA SILVA**, pelo engajamento e comprometimento durante todo o andamento do projeto, por toda a atenção na identificação e recrutamento dos pacientes para o estudo.

Agradeço também ao **MATHEUS TOSHIO HISATUGU**, do serviço de consultoria em estatística, por todo o auxílio durante a realização das análises estatísticas utilizadas no estudo.

RESUMO

Beserra AO. **Caracterização de xenoenxertos derivados de pacientes com carcinomas de células renais e avaliação de sensibilidade a terapias antiangiogênicas.** São Paulo; 2025.

O carcinoma de células renais (CCR) é responsável por até 90% de todos os tumores renais, com 30% dos pacientes apresentando metástases no momento do diagnóstico, enquanto 20%-50% daqueles tratados para doença localizada, e curável apresentam recorrência. Nesse cenário, a sobrevida global em 5 anos é inferior a 10% para pacientes com a doença metastática, e de 30%-50% para pacientes que apresentam recidiva do CCR. Diante disso, é necessária uma melhor compreensão da biologia do CCR para definir o tratamento mais eficiente e personalizado ou para desenvolver melhores medicamentos antineoplásicos. Os xenoenxertos derivados de pacientes (PDX) surgiram como uma das abordagens mais promissoras para isso. Assim, este projeto visa desenvolver uma plataforma PDX CCR para identificar novos biomarcadores para monitoramento e direcionamento terapêutico do CCR. As amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas de ressecções cirúrgicas de 90 pacientes do A.C.Camargo Cancer Center. Fragmentos tumorais foram implantados ortotopicamente (na cápsula renal) em camundongos imunodeficientes NOD Scid Gamma (NSG). Os animais foram monitorados por palpação abdominal, e quando os tumores apresentaram evidência de crescimento tumoral em torno de 1cm³ os animais foram anestesiados, o tumor foi retirado e reimplantado seriadamente (P2). Fragmentos tumorais foram criopreservados e parte foi submetida à análise histológica (imuno-histoquímica) e sequenciamento de DNA. Foram desenvolvidos 27 modelos PDX de CCR, dos quais 22 casos são carcinoma renal de células claras (81,5%), 4 casos são carcinoma renal papilar (14,8%) e 1 caso de carcinoma renal inclassificável (3,7%). Um caso de PDX de CCR de células claras recapitulou o fenótipo da extensão do trombo tumoral da veia cava que havia sido previamente diagnosticado no paciente. A taxa global de sucesso de enxertia foi de 30%, e o tempo para observar o crescimento do tumor variou de 1 a 13 meses. Os pacientes cujos fragmentos tumorais geraram PDX tiveram pior sobrevida global do que aqueles cujos fragmentos tumorais falharam ($p = 0,002$). Os dados também sugeriram um cenário semelhante de associação com a sobrevida livre de metástases ($p = 0,22$). A caracterização

por imuno-histoquímica indica que os PDXs preservam os fenótipos do CCR, incluindo a expressão de PAX8, Alfa-metil CoA racemase (AMCR), Anidrase Carbônica IX (CAIX) e Citoqueratina 7 (CK7). A caracterização molecular foi realizada de duas formas, por *target sequencing*, onde 20 casos foram caracterizados, e *whole exome sequencing*, onde outros 5 casos foram analisados. Os genes alterados com maior frequência foram *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *TP53*, *ATM*, *BAP1* e *KDM5C*. Os tratamentos com agentes antiangiogênicos, como sunitibe, e everolimus, e inibidor de HIF (belzutifan) promoveram redução do crescimento tumoral e maior sobrevida de camundongos com enxerto de CCR de células claras.

Palavras-Chave: 1. Carcinoma de Células Renais. 2. Vulnerabilidades Genéticas. 3. Xenoenxertos Derivados de Pacientes.

ABSTRACT

Beserra AO. **Characterization of composite xenografts from patients with renal cell carcinomas and assessment of sensitivity to antiangiogenic therapies.** São Paulo; 2025.

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for up to 90% of all kidney tumors, with 30% of patients presenting with metastases at diagnosis, while 20%-50% of those treated for localized, curable disease experience recurrence. In this scenario, 5-year overall survival is less than 10% for patients with metastatic disease, and 30%-50% for patients who experience CRC recurrence. Therefore, a better understanding of the biology of CRC is necessary to define the most efficient and personalized treatment or to develop better antineoplastic drugs. Patient-derived xenografts (PDX) have emerged as one of the most promising approaches for this. Therefore, this project aims to develop a PDX RCC platform to identify new biomarkers for monitoring and therapeutic targeting of RCC. The samples used in the present study were obtained from surgical resections of 90 patients at the A.C.Camargo Cancer Center. Tumor fragments were implanted orthotopically (in the renal capsule) into immunodeficient NOD Scid Gamma (NSG) mice. The animals were monitored by abdominal palpation, and when the tumors showed evidence of tumor growth of around 1cm³, the animals were anesthetized, the tumor was removed and serially reimplanted (P2). Tumor fragments were cryopreserved and part was subjected to histological analysis (immunohistochemistry) and DNA sequencing. 27 PDX models of RCC were developed, of which 22 cases are clear cell renal carcinoma (81.5%), 4 cases are papillary renal carcinoma (14.8%), and 1 case is renal carcinoma unclassifiable (3.7%). A PDX case of clear cell RCC recapitulated the phenotype of vena cava tumor thrombus extension that had previously been diagnosed in the patient. The overall graft success rate was 30%, and the time to observe tumor growth ranged from 1 to 13 months. Patients whose tumor fragments generated PDX had worse overall survival than those whose tumor fragments failed ($p = 0.002$). The data also suggested a similar scenario of association with metastasis-free survival ($p = 0.22$). Immunohistochemical characterization indicates that PDXs preserve CRC phenotypes, including expression of PAX8, Alpha-methyl CoA racemase (AMCR), Carbonic Anhydrase IX (CAIX) and Cytokeratin 7 (CK7). Molecular characterization was carried out in two ways, by target sequencing, where 20 cases were characterized, and

whole exome sequencing, where another 5 cases were analyzed. The most frequently altered genes were VHL, PBRM1, SETD2, TP53, ATM, BAP1 and KDM5C. Treatments with antiangiogenic agents, such as sunitib, everolimus, and HIF inhibitor (belzutifan) promoted a reduction in tumor growth and greater survival in mice with clear cell RCC grafts.

Keywords: 1. Renal Cell Carcinoma. 2. Genetic Vulnerabilities. 3. Patient-Derived Xenografts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Caracterização histológica dos diferentes fenótipos de CCR.....	24
Figura 2 – Critérios de estadiamento clínico baseados no tamanho do CCR, e na sua extensão.....	28
Figura 3 – Relação entre o estadiamento do CCR e a sobrevida global dos pacientes.....	30
Figura 4 – Representação da participação de VHL na regulamentação do HIF em condições de normóxia e hipóxia.....	37
Figura 5 – Passo a passo da padronização da técnica cirúrgica aplicada no implante ortotópico de carcinoma de células renais.....	48
Figura 6 – Fluxograma dos experimentos envolvendo as amostras obtidas dos implantes ortotópicos e ectópicos de carcinoma renal humano.....	49
Figura 7 – Desenho do estudo com terapias-alvo contra o carcinoma de células renais do tipo células claras.....	61
Figura 8 – Estabelecimento do modelo de xenoenxerto ortotópico de carcinoma renal humano.....	64
Figura 9 – Comparação entre a sobrevida global de pacientes que desenvolveram modelos PDX versus os pacientes que não desenvolveram.....	67
Figura 10 – Comparação entre a sobrevida livre de progressão de doença de pacientes que desenvolveram modelos PDX versus os pacientes que não desenvolveram.....	68

Figura 11 – Comparação entre a sobrevida livre de metástases entre os pacientes que desenvolveram modelos PDX versus os pacientes que não desenvolveram.....	69
Figura 12 – Caracterização histológica com Eosina e Hematoxilina (HE) e por imuno-histoquímica entre o tumor primário e PDX de carcinoma renal do tipo papilífero. Barra de calibração = 200um.....	72
Figura 13 – Caracterização histológica com HE e imuno-histoquímica entre o tumor primário e PDX de carcinoma renal do tipo papilífero. Barra de calibração = 200um.....	73
Figura 14 – Caracterização por HE e imuno-histoquímica entre o tumor primário e PDX de carcinoma renal do tipo células claras. Barra de calibração = 200um.....	74
Figura 15 – Confirmação histológica do estabelecimento de PDX de carcinoma renal de células claras com formação de trombos tumorais.....	76
Figura 16 – Ensaio de tumorigênese com cultura celular de Carcinoma Renal de Células Claras.....	77
Figura 17 – Caracterização histológica e por imuno-histoquímica das metástases observadas nos animais com carcinoma renal de células claras com trombo tumoral de veia cava inferior.....	78
Figura 18 – Caracterização histológica e por imuno-histoquímica de sucessivas passagens do carcinoma renal de células claras com a formação de trombo tumoral de veia cava inferior.....	79
Figura 19 – Efeito do tratamento terapêutico direcionado no modelo PDX/CCR.....	96

Figura 20 – Sobrevida global entre os diferentes grupos de tratamentos com terapias-alvo.....97

Figura 21 – Comparação macroscópica entre os tumores dos animais entre os diferentes grupos de tratamentos, após o 30º dia de tratamento contínuo.....98

Figura 22 – Comparação entre o peso médio dos tumores entre os diferentes grupos de tratamento.....99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios adotados na classificação do CCR de acordo com o sistema TNM.....	29
Tabela 2 – Principais vias e alvos moleculares envolvidos no CCR que podem ser alvejados farmacologicamente por terapia-alvo.....	39
Tabela 3 – Características dos anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica dos casos de CCR.....	51
Tabela 4 – Painel customizado, composto por 28 genes frequentemente alterados em pacientes com CCR.....	55
Tabela 5 – Painel comercial CCP, composto por 409 genes, frequentemente alterados em câncer.....	56
Tabela 6 – Características clínico-patológicas dos pacientes recrutados para o estabelecimento do modelo de xenotransplante de carcinoma renal humano no A.C.Camargo Cancer Center.....	65
Tabela 7 – Associação entre parâmetros clínico-patológicos com recidiva, metástases e óbito entre os 90 pacientes com Carcinoma de Células Renais utilizados no estudo.....	70
Tabela 8 – Caracterização por sequenciamento genômico, utilizando painel customizado composto por 28 genes. Realizado entre amostras de tumores primários e PDX no A.C.Camargo Cancer Center.....	80

Tabela 9 – Caracterização por sequenciamento genômico, utilizando o *Comprehensive Cancer Panel* (CCP), composto por 409 genes. Realizado entre amostras de tumores primários e PDX no A.C.Camargo Cancer Center.....83

Tabela 10 – Caracterização por sequenciamento de exoma, realizado entre amostras de tumores primários e PDX de ccCCR (ID 1) no A.C.Camargo Cancer Center.....86

Tabela 11 – Caracterização por sequenciamento de exoma, realizado entre amostras de tumores primários e PDX de ccCCR (ID 3) no A.C.Camargo Cancer Center.....89

Tabela 12 – Caracterização por sequenciamento de exoma, realizado entre amostras de tumores primários e PDX de ccCCR (ID 12) no A.C.Camargo Cancer Center.....89

Tabela 13 – Caracterização por sequenciamento de exoma, realizado entre amostras de tumores primários e PDX de pCCR (ID 2) no A.C.Camargo Cancer Center.....92

Tabela 14 – Caracterização por sequenciamento de exoma, realizado entre amostras de tumores primários e PDX de ccCCR (ID 13) no A.C.Camargo Cancer Center.....94

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AMACR	Alfa-metilacil coenzima A racemase
AP	Anatomia patológica
AR	<i>Androgen Receptor</i>
ARID1A	<i>AT-Rich Interaction Domain 1</i>
ATM	<i>Ataxia-Telangiectasia Mutated</i>
BAP1	<i>BRCA1-associated protein-1</i>
CA IX	Anidrase carbônica 9
ccCCR	Carcinoma de células renais do tipo células claras
CCP	<i>Comprehensive Cancer Panel</i>
CCR	Carcinomas de Células Renais
CDKN2A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
cfDNA	<i>Circulating free DNA</i>
chCCR	Carcinoma de células renais do tipo cromóforo
CIPE	Centro Internacional de Pesquisa e Ensino
CK7	Citoceratina 7
ctDNA	DNA tumoral circulante
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMT	Transição Epitélio-Mesênquima
EPO	<i>Erythropoietin</i>
ESMO	Sociedade Europeia de Oncologia Médica
EUA	Estados Unidos da América
FAT1	<i>FAT Atypical Cadherin 1</i>
FH	<i>Fumarato hidratase</i>
FLCN	<i>Fumarate Hydratase Domain Containing 1</i>
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks
HE	Eosina e hematoxilina
HGF	Fator de crescimento hepatócito

HIF	Fator induzido por hipóxia
ICIs	inibidores de <i>checkpoint</i> imunológico
IHQ	Imuno-histoquímica
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
KDM5C	<i>Lysine Demethylase 5C</i>
KDM6A	Lysine Demethylase 6A
Kg	Quilogramas
Lof	<i>Loss of function</i>
MET	<i>Mesenchymal-Epithelial Transition</i>
Mg	Miligramas
Mm	Milímetros
NF2	<i>Neurofibromin 2</i>
NFE2L2	<i>Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2</i>
NGS	<i>Deep Amplicon Sequencing</i>
NRF2	Fator de transcrição nuclear [eritroide-derivado 2]
NSG	<i>NOD scid gamma</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAX8	<i>Paired box gene 8</i>
PBRM1	<i>Polybromo 1</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pCCR	Carcinoma de células renais do tipo papilífero
PCF11	<i>Polymerase-Associated Factor 11</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PDGF-b	<i>Platelet-Derived Growth Factor Subunit B</i>
PDX	<i>Patient-Derived Xenografts</i> (Xenoinxertos derivados de pacientes)
pT	Estadiamento patológico
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
RNA	Ácido ribonucleico
sCCR	Carcinoma de células renais sarcomatoide
SETD2	Domínio SET contendo 2

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>Sister Telomere Associated Gene 2</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
tDNA	DNA tumoral
TGF-α	<i>Transforming Growth Factor Alpha</i>
TRC	Trombose relacionada ao câncer
TKIs	Inibidores da tirosina quinase
Ub	Ubiquitina
VEGF	<i>Fator de crescimento endotelial vascular</i>
VCI	Veia cava inferior
VEGFR	<i>Receptor do fator de crescimento endotelial vascular</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>
VO	Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Carcinoma de Células Renais	23
1.1.1 Diagnóstico e estadiamento do CCR	27
1.1.2 Tratamento do CCR	30
1.2 Classificação molecular do CCR	33
1.3 Vulnerabilidades genéticas em CCR	34
1.4 Modelos de Xenoenxertos Derivados de Pacientes (<i>Patient-Derived Xenografts</i> – PDX)	43
2 OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos	45
3 MATERIAIS & MÉTODOS	46
3.1 Casuística	46
3.1.1 Aprovação do projeto	47
3.2 Modelo experimental de xenoenxerto ortotópico de CCR	47
3.3 Imuno-histoquímica	50
3.4 Estabelecimento de cultura primária	51
3.5 Extração de DNA para sequenciamento genômico	52
3.5.1 Sequenciamento por painéis genômicos	54
3.5.2 Sequenciamento por painel customizado composto por 28 genes	54
3.5.3 Sequenciamento por painel comercial CCP composto por 409 genes	55
3.5.4 Sequenciamento de amplicon	57
3.5.5 Chamada de variantes somáticas em DNA de tecido tumoral	58
3.6 Preparo de biblioteca e sequenciamento de exoma	59
3.7 Ensaios pré-clínicos com terapias antiangiogênicas	60
3.8 Análise estatística	62

4 RESULTADOS.....	63
4.1 Estabelecimento do modelo experimental.....	63
4.2 Casuística dos pacientes.....	64
4.3 Análise da sobrevida dos pacientes.....	66
4.4 Estratificação de pacientes com maior risco de progressão e morte por CCR.....	70
4.5 Caracterização morfológica por imuno-histoquímica.....	71
4.6 Caracterização de carcinoma renal do tipo células claras com formação de trombos tumorais.....	75
4.7 Sequenciamento por painéis genômicos.....	79
4.8 Sequenciamento de exoma.....	85
4.8.1 Sequenciamento de exoma completo nos casos de ccCCR.....	85
4.8.2 Sequenciamento de exoma completo nos casos de pCCR.....	91
4.9 Tratamento com terapias antiangiogênicas.....	96
 5 DISCUSSÃO.....	 101
6 CONCLUSÕES.....	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	118

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa um conjunto de doenças, de patogênese multifatorial e heterogênea, caracterizado pela proliferação descontrolada de células do corpo, associado com alterações genéticas e epigenéticas (LEWANDOWSKA et al. 2019).

Em todo o mundo, o câncer apresenta incidência anual crescente, além de representar a segunda principal causa de morte. Somente em 2022, mais de 20 milhões de casos de câncer foram registrados, dos quais, cerca de 9,7 milhões pacientes foram a óbito (MAOMAO et al. 2022).

Somente no Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimam-se que para o triênio de 2023-2025, sejam diagnosticados aproximadamente 704 mil casos novos de câncer por ano, com destaque para as regiões Sul e Sudeste, que concentram cerca de 70% desta incidência (INCA, 2022).

Dados epidemiológicos apresentados por Bray e colaboradores (2024), sugerem que aproximadamente 1 em cada 5 homens ou mulheres desenvolve câncer ao longo da vida, enquanto cerca de 1 em cada 9 homens, e 1 em cada 12 mulheres morrem por razões oncológicas todos os anos (BRAY et al. 2024).

Por estes motivos, atualmente, o câncer é reconhecido como um importante problema social, econômico e de saúde pública em todo o mundo (MAOMAO et al. 2022).

Nas últimas décadas, importantes avanços foram alcançados na prática clínica envolvendo o diagnóstico e o tratamento do paciente oncológico, em consequência do advento do aperfeiçoamento de métodos diagnósticos, de melhorias das técnicas

cirúrgicas e do desenvolvimento de novas e modernas drogas anticâncer (INOUE et al. 2017).

Atualmente, o conhecimento sobre a biologia, patogênese e epidemiologia do câncer são essenciais para uma melhor compreensão da doença, bem como, para o estabelecimento de políticas públicas de saúde, e medidas de intervenção para os diferentes tipos de câncer (MAOMAO et al. 2022), e entre eles, o carcinoma de células renais.

1.1 CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

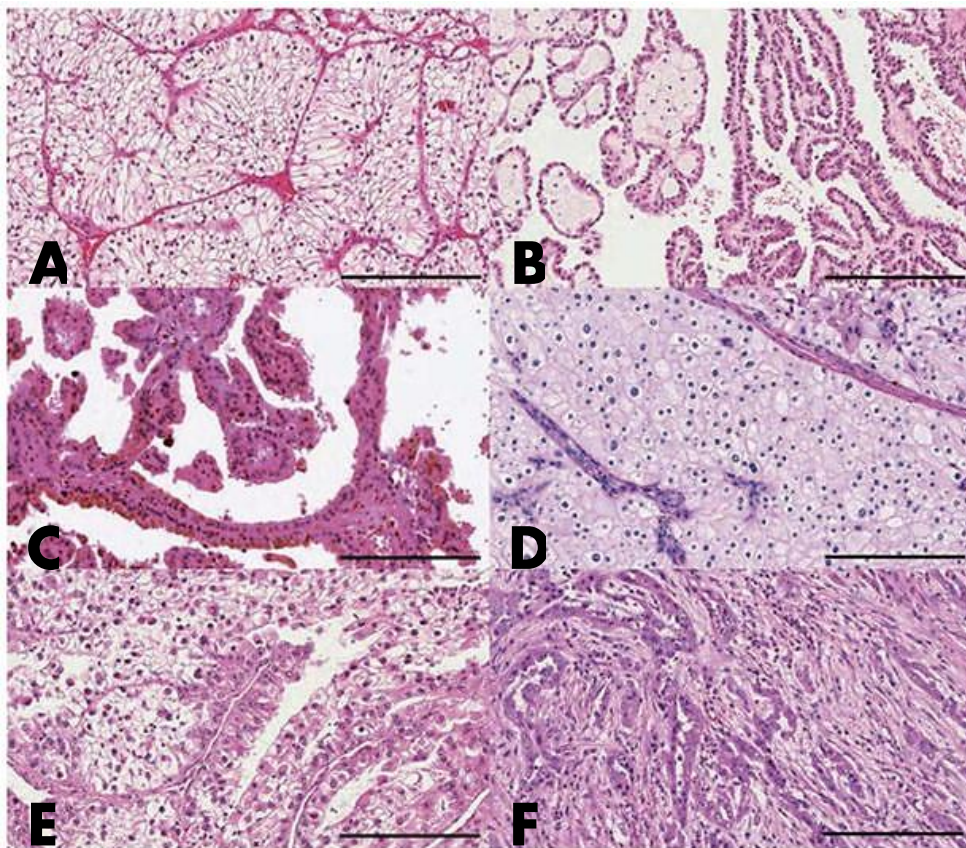
O Carcinoma de Células Renais (CCR) é a forma mais comum de câncer dos rins (BAHADRAM et al. 2022). Clinicamente, apresenta um comportamento agressivo e propensão para a formação de metástases (LJUNGBERG et al. 2011).

O CCR pode se desenvolver no córtex renal e nas células epiteliais dos túbulos renais, podendo representar até 90% de todos os cânceres dos rins em adultos (PADALA, KALLAM 2023; CÁRDENAS et al. 2024).

O CCR representa um grupo de tumores histopatologicamente e molecularmente heterogêneos (WHANG et al. 2024). A classificação mais recente para tumores renais, proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS), inclui vários subtipos histológicos, entre os quais, o CCR tipo Células Claras (ccCCR), que microscopicamente apresenta uma superfície amarela típica devido ao alto teor de lipídios e glicogênio (ROSE, KIM 2024; CHO, KAELIN 2016), e o CCR do tipo Papilífero (pCCR), são os subtipos histológicos mais comuns (GOSWAMI et al. 2024), enquanto

o CCR do tipo Cromóforo (chCCR), Oncocitoma renal e tumores do ducto coletor ocorrem em menor frequência (PADALA, KALLAM 2023; RIZZO et al. 2023; DAGHER et al. 2017).

Sabidamente, esses subgrupos histológicos de CCR diferem entre si, com base na biologia e comportamento (GRIGOLO, FILGUEIRA 2024). A caracterização histológica do CCR pode ser observada na **Figura 1**.



Fonte: Adaptado de HSIEH et al. (2017).

Figura 1: Caracterização histológica dos diferentes fenótipos de CCR. **(A)** ccCCR. **(B)** pCCR basofílico. **(C)** pCCR eosinofílico. **(D)** chCCR. **(E)** CCR associado com a translocação de MiT. **(F)** CCR de ducto coletor. Barra de escala = 200 μ m.

Alternativamente, a diferenciação sarcomatoide do CCR representa uma característica histopatológica observada em 5% a 20% de todos os CCRs, incluindo o ccCCR, o subtipo mais comum de câncer renal (ZARIF et al. 2024).

O CCR com diferenciação sarcomatoide (sCCR) exibe um fenótipo agressivo, sendo caracterizado pela transição epitélio-mesenquima (EMT), e responde mal aos inibidores da tirosina quinase do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR TKIs) em comparação ao CCR não sarcomatoide, também conhecido como CCR epitelióide (MOTZER et al. 2020; ZARIF et al. 2024).

Em todo o mundo, o CCR está entre as 10 neoplasias malignas mais comuns, sendo o responsável por aproximadamente 3% de todos os cânceres em adultos, e, com incidência anual crescente (WHANG et al. 2024).

Nos países mais desenvolvidos, o CCR representa o sétimo tipo de câncer mais comum em homens, e o nono mais comum em mulheres (RINI, CAMPBELL, ESCUDIER 2009; BINDAYI et al. 2018).

Atualmente, estima-se que aproximadamente 431.288 pessoas sejam diagnosticadas por ano com CCR, em todo o mundo (HSIEH et al. 2017; BUKAVINA et al. 2022). Além disso, este tipo de câncer está associado com cerca de 170.000 mortes ao ano (GUPTA et al. 2024; BRAY et al. 2024).

Somente nos Estados Unidos, estima-se que o número de casos notificados anualmente é de cerca de 64.000 casos, e a mortalidade chega a 14.000 (PADALA, KALLAM 2023). Já no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, estima-se que por ano aproximadamente 6.800 casos sejam diagnosticados (BRASIL, 2022). A

incidência atinge o pico dos 60 aos 80 anos de idade (BINDAYI et al. 2018; DEY et al. 2017).

Entre os tumores urológicos, o CCR se apresenta com a maior taxa de mortalidade, e a taxa de sobrevivência em até 5 anos, é inferior a 10% para pacientes com doença metastática, enquanto para os pacientes com a doença localmente avançada, a sobrevida fica em torno de 50% (ROSE, KIM 2024; SONG et al. 2020; GUO et al. 2015).

Clinicamente, uma característica do CCR é a sua capacidade de invadir a veia renal, e a veia cava inferior, estendendo-se intraluminalmente, através da formação de um trombo tumoral, podendo chegar até o átrio direito do coração (GAMBOA-HOIL et al. 2021).

Essa condição difere da trombose venosa profunda, por se tratar essencialmente de um trombo composto por células tumorais, com a capacidade de invadir vasos sanguíneos. A presença de trombos tumorais de CCR está associada com mal prognóstico, e se encontra em pacientes no estágio 3 da doença (GAMBOA-HOIL et al. 2021; WARSOW et al. 2018).

O trombo tumoral intravascular é observado em 10 a 40% dos pacientes CCR na veia renal, e em cerca de 4 a 19% desses casos, o trombo se estende para a veia cava inferior (VCI) (YANG, HAN, LI 2022; DASON et al. 2023; GOLD, TAYLOR, MARGULIS 2023). Entretanto, pouco ainda se sabe sobre a patogênese associada com a formação desse tipo de trombo tumoral em pacientes com CCR.

Diante desse cenário e, apesar dos avanços alcançados na prática clínica, em consequência do aperfeiçoamento técnico-cirúrgico, do aumento no diagnóstico

incidental da doença, cerca de 30% dos pacientes apresentam a forma metastática da doença no momento do diagnóstico (WANG et al. 2024).

Clinicamente, os locais mais frequentemente acometidos por metástases são pulmões, ossos, fígado e linfonodos, enquanto metástases cerebrais, de glândulas endócrinas, e do trato gastrointestinal são menos comuns (BIANCHI et al. 2012; GULATI et al. 2024). Além disso, o rim contralateral também pode ser acometido.

Embora pouco comum, CCR também tem potencial de metástase em locais atípicos, como por exemplo, seios paranasais (RALLI et al. 2017) e glândula salivar (GUPTA et al. 2024).

1.1.1 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DO CCR

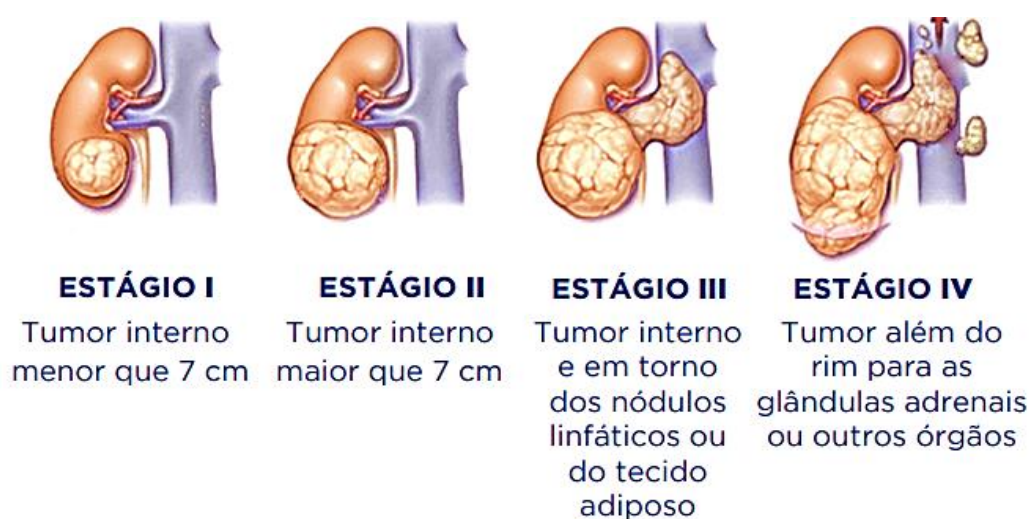
O diagnóstico do CCR envolve análise histológica. Esse tipo de análise, além de identificar o subtipo tumoral, leva em conta a avaliação do grau nuclear, presença de fenótipo sarcomatoide, rabdoide e necrose, além da presença de invasão e infiltração (AL-BAYATI et al. 2019).

Mais recentemente, a *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) publicou a 9ª edição do estadiamento do câncer, com o intuito de atualizar as terminologias de acordo com as características da patologia, buscando apresentar uma melhor compreensão dos parâmetros histológicos e fatores preditivos de forma criteriosa (PATEL et al. 2019).

Para o CCR as atualizações incluem implementação do sistema de classificação histológica e nuclear da Organização Mundial da Saúde e da Sociedade Internacional de Patologia Urológica OMS/ISUP, que se baseia em quatro níveis.

Histologicamente, esse sistema considera o grau de proeminência nuclear de 1 a 3, enquanto o grau 4 é atribuído aos casos em que existem a presença de células pleomórficas, além da presença de fenótipo sarcomatoide e rabdoide no tumor (PATEL et al. 2019; WARREN, HARRISON 2018). Clinicamente, a utilização de métodos de diagnóstico por imagem como a Tomografia Computadorizada (TC), vêm se tornando fortes aliados para a análise histopatológica de material obtido por meio de biópsias.

Segundo a AJCC, o estadiamento do câncer renal é realizado pelo sistema TNM, no qual: T se refere ao tamanho do tumor, e sua extensão local (**Figura 2**); N descreve a disseminação para linfonodos regionais; e M indica a presença de metástases (PORTA et al. 2019).



Fonte: Adaptado de BRISTOL (2018).

Figura 2: Critérios de estadiamento clínico baseados no tamanho do CCR, e na sua extensão.

Alternativamente, a **tabela 1** descreve os critérios utilizados para cada estadiamento do CCR.

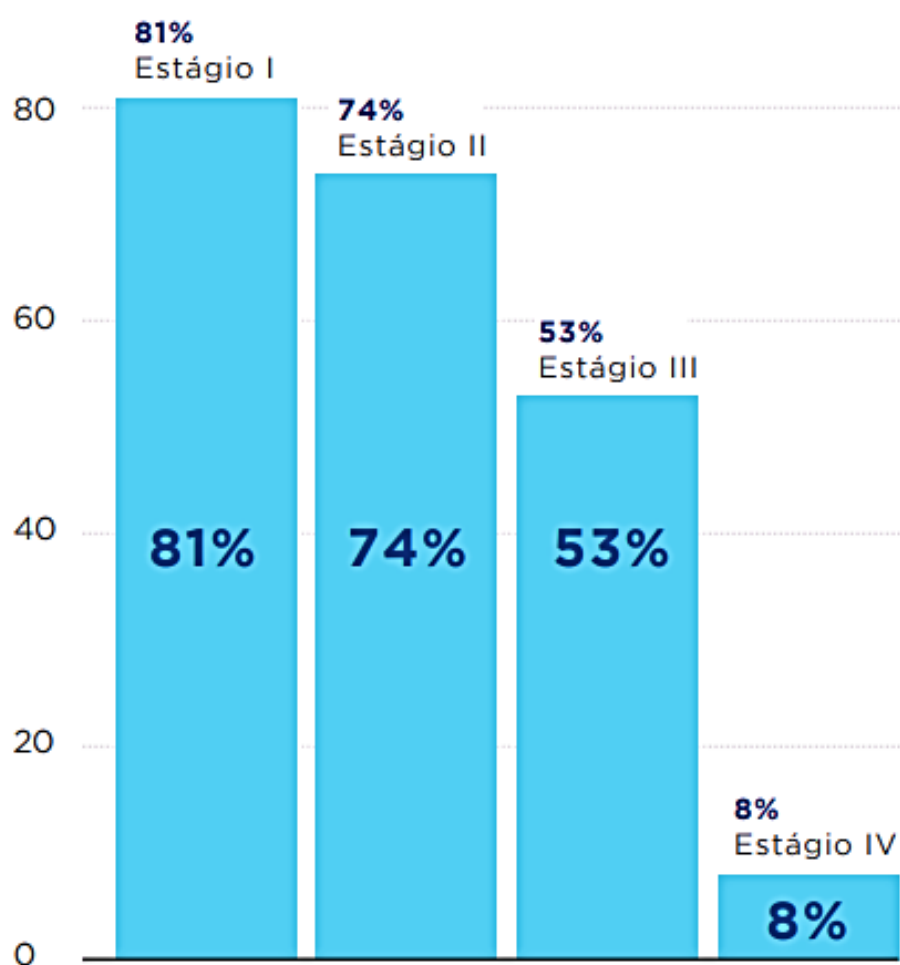
Tabela 1: Critérios adotados na classificação do CCR de acordo com o sistema TNM.

Classe	Graduação	Critérios
Tumor primário (T)	T0	Sem evidências de tumor primário.
	T1a	Tumor ≤ 4 cm e confinado ao rim.
	T1b	Tumor >4 cm e ≤ 7 cm, confinado ao rim.
	T2	Tumor >7 cm e confinado ao rim.
	T3a	Tumor invade glândula adrenal ou gordura perinéfrica, mas não além da fáscia de Gerota.
	T3b	Tumor se estende na veia renal ou na veia cava abaixo do diafragma.
	T3c	Tumor se estende na veia cava acima do diafragma ou invade as paredes da veia cava.
	T4	Tumor invade além da fáscia de Gerota.
Linfonodos regionais (N)	N0	Sem evidências de linfonodos comprometidos.
	N1	Metástase em um linfonodo regional.
	N2	Metástase em mais de um linfonodo regional.
Metástases distantes (M)	M0	Sem evidências de metástase em órgãos distantes.
	M1	Presença de metástase em órgãos distantes.

Fonte: Adaptado de AMIN et al. (2017); PATEL et al. (2019).

A identificação do estadiamento do CCR é fundamental para a escolha do tratamento adequado, bem como para o prognóstico do paciente. O CCR é frequentemente assintomático nos seus estádios iniciais, fazendo com que o diagnóstico precoce da doença dificultado.

Por conta disso, aproximadamente 30% dos pacientes já são diagnosticados em estádios mais avançados, ou no cenário metastático da doença. Cabe destacar ainda que a sobrevida global dos pacientes com CCR está intimamente relacionada com o estadiamento da doença, conforme pode-se observar na **Figura 3**.



Fonte: Adaptado de BRISTOL (2018).

Figura 3: Relação entre o estadiamento do CCR e a sobrevida global dos pacientes.

1.1.2 TRATAMENTO DO CCR

O tratamento de pacientes com CCR em estádios iniciais da doença, geralmente envolve a ressecção cirúrgica curativa como abordagem principal. Além disso, a vigilância ativa representa uma importante abordagem para pacientes com tumores pequenos, de crescimento lento, e especialmente para pacientes idosos, com comorbidades ou expectativa de vida reduzida (CAMPBELL 2021).

Nesses casos a vigilância ativa ajuda a evitar eventuais complicações associadas com a cirurgia, sendo nesses casos, uma estratégia mais vantajosa do que os métodos cirúrgicos (SEBASTIÀ 2020).

Além disso, técnicas pouco invasivas como a crioterapia e a ablação por radiofrequência têm se mostrado eficazes no tratamento de CCR nos seus estadios iniciais, especialmente em pacientes com condições clínicas específicas, como por exemplo, a presença de um único rim, ou situações que contraindiquem abordagens cirúrgicas mais invasivas. Essas abordagens oferecem boas chances de cura, menor morbidade, além de reduzir o impacto na fisiologia renal e no bem-estar geral dos pacientes (YATES et al. 2022).

Nos casos em que a intervenção cirúrgica é inevitável, são consideradas duas principais opções para o manejo dos pacientes: A cirurgia poupadora de néfrons (nefrectomia parcial) e a nefrectomia radical. A nefrectomia parcial é indicada com o intuito de se preservar a maior quantidade possível do tecido renal funcional. Por outro lado, a nefrectomia radical, que consiste na remoção completa do rim, normalmente é utilizada para tumores maiores e/ou mais agressivos, nos quais o comprometimento do rim é extenso (ATKINS, TANNIR 2018; ESCUDIER et al. 2016).

Nas últimas décadas, importantes avanços foram alcançados na oncologia clínica, com relação ao aperfeiçoamento do tratamento sistêmico para pacientes com a doença metastática, passando da terapia com altas doses de citocinas em combinação com a ressecção cirúrgica dos tumores renais, até o desenvolvimento de terapias direcionadas, como os inibidores da tirosina quinase (TKIs), que se destacam pela eficiência como agentes antiangiogênicos e que têm como alvo o fator de

crescimento endotelial vascular (VEGF), e o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), e os inibidores de *checkpoint* imunológico (ICIs) (VASAN, BASELGA, HYMAN 2019; RATTA et al. 2018).

Na diretriz de prática clínica da Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO), a imunoterapia dupla (ICI-ICI), ou uma combinação de imunoterapia com inibidor de tirosina quinase antiangiogênico (ICI-TKI) são recomendadas como as principais terapias de primeira linha para pacientes com ccCCR no cenário metastático da doença (WANG et al. 2024).

No entanto, a baixa eficiência dessas terapias em relação a uma melhor sobrevida global e sobrevida livre de progressão, associada a resistência medicamentosa que os pacientes desenvolvem com o passar do tempo, ainda representam importantes obstáculos para se alcançar o sucesso total dessa modalidade terapêutica para pacientes com CCR no cenário metastático da doença (LABRIOLA et al. 2019; VASAN, BASELGA, HYMAN 2019).

Nesse sentido, estudos que visem uma melhor compreensão da biologia do CCR, e em especial, que permitam estudar características únicas, como a disseminação do câncer por meio da formação de trombos tumorais, explorar as vulnerabilidades genéticas encontradas nos tumores dos pacientes, e estabeleçam um modelo de doença metastática, para, em conjunto, possibilitar o teste de terapias e/ou terapias direcionadas, são extremamente importantes.

1.2 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CCR

Sabidamente o CCR representa um conjunto de tumores molecularmente heterogêneos. Neste sentido, mais recentemente, foi proposta uma classificação molecular para os tumores renais.

Essa classificação baseia-se em alterações genéticas e nos perfis de expressão gênica característicos de cada subtipo histológico. Além disso, essas características moleculares podem influenciar na biologia do tumor, na resposta ao tratamento e no prognóstico do paciente (TRACERx, 2017).

Com base nas alterações genéticas identificadas nos CCR, têm sido possível classificá-los de várias formas. Casos de ccCCR de baixo risco, normalmente apresentam mutações em *PBRM1* e associadas com baixo grau histológico. Por outro lado, os casos de ccCCR de alto risco normalmente apresentam mutações em *BAP1*, *SETD2* além alterações cromossômicas mais extensas (CHEN et al. 2018).

Tumores com mutações em *BAP1* estão associados a maior agressividade, pior sobrevida global e maior risco de metástases. Nesse mesmo cenário, a perda da função de *SETD2* está relacionada a tumores de crescimento mais rápido e maior resistência a terapias sistêmicas, piorando o prognóstico (TURAJLIC et al. 2018; TRACERx, 2017).

Já nos casos de pCCR, prognósticos mais favoráveis têm sido relacionados com mutações em *MET*. No entanto, alguns pacientes podem apresentar tumores mais agressivos, associados com mutações em *FH*, e perda de *CDKN2A* e

consequentemente com maior potencial metastático (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2016; TRACERx, 2017).

Alternativamente, nos casos de chCCR estudos recentes indicam que esse subtipo histológico pode ser dividido em dois subgrupos moleculares, com implicações prognósticas: Prognóstico favorável, onde mutações em *TP53* são ausentes ou raras, são observadas menos alterações cromossômicas e maior sobrevida global dos pacientes; Pior prognóstico e potencialmente agressivo, onde são encontradas mutações em *TP53* e *PTEN*, maior instabilidade cromossômica, além de risco aumentado de progressão e metástases nesse grupo de pacientes (DAVIS et al. 2014).

Desse modo, esse projeto propõe a utilização de um modelo de estudo de CCR utilizando animais imunodeficientes (*Patient-Derived Xenografts* – PDX), para a caracterização genômica a fim de identificar vulnerabilidades genéticas no CCR que possam ser alvejadas farmacologicamente por terapia-alvo.

1.3 VULNERABILIDADES GENÉTICAS EM CCR

O câncer é essencialmente uma doença causada por mutações (germinativas ou somáticas) em um diverso grupo de genes associados à funções celulares também diversas (HANAHAHAN 2022; HANAHAHAN, WEINBERG 2011).

O ccCCR é frequentemente uma manifestação clínica da doença de *Von Hippel-Lindau* (VHL), uma síndrome de predisposição ao câncer com característica autossômica dominante e causada por mutações ou hipermetilação que inativam um

dos alelos do gene *VHL*, resultando na sua perda de função (MAZUMDER, HIGGINS, SAMARAKOON 2023).

O *VHL* é um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 3p25, que foi inicialmente descrito por Latif e colaboradores em 1993, e desde então, tem proporcionado uma melhor compreensão molecular sobre os mecanismos envolvidos na patogênese do CCR, especialmente do ccCCR (LATIF et al. 1993).

A inativação do *VHL* seja por mutações germinativas ou mutações somáticas resulta em um aumento da atividade de HIF, promovendo alterações celulares que contribuem para o desenvolvimento de diferentes tipos de tumores, entre eles o ccCCR (CINQUE 2022).

Quando a mutação em *VHL* é germinativa, ela está associada com a síndrome de *Von Hippel-Lindau*, uma condição genética e hereditária que está associada com o surgimento de múltiplos tumores.

Por outro lado, mutações somáticas em *VHL* ocorrem de forma esporádica em ccCCR, não estando relacionada com nenhuma síndrome hereditária (MOORE et al. 2011).

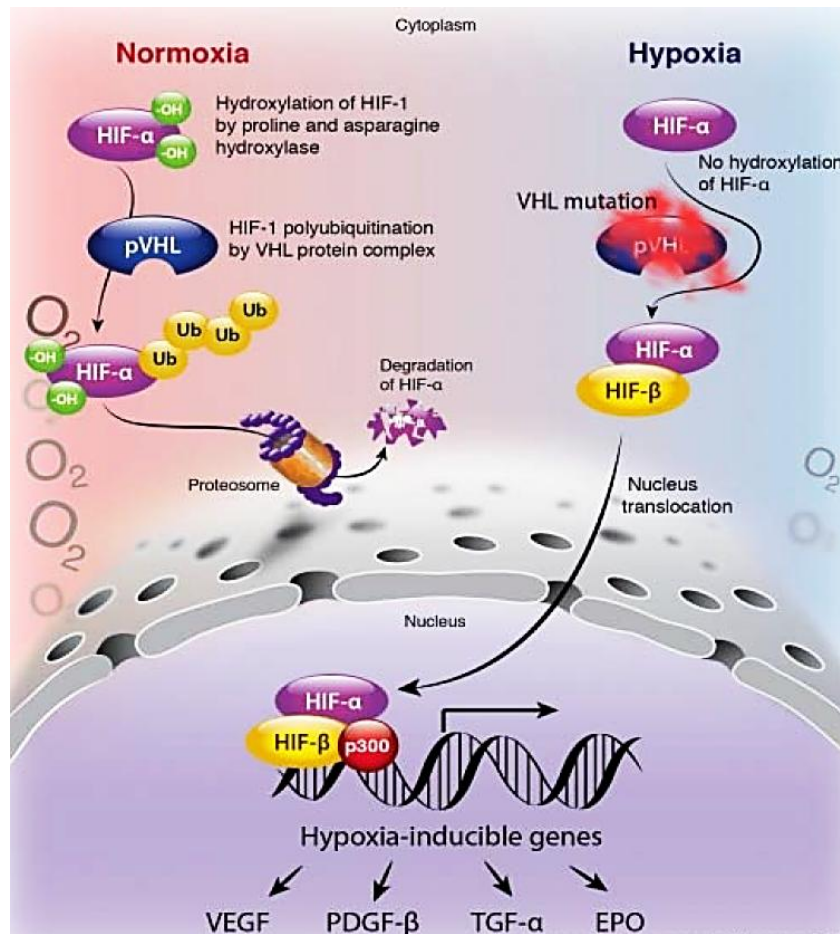
Atualmente, já é sabido que a síndrome de *VHL* é caracterizada por hemangioblastomas do cérebro, medula espinhal e retina, feocromocitoma e paraganglioma, cistos pancreáticos e tumores neuroendócrinos, tumores do saco endolinfático, e cistos do epidídimo, e do ligamento largo, bem como, pelo desenvolvimento de cistos renais e CCR (LEEUWAARDE et al. 2024).

Estruturalmente, a perda da região cromossômica 3p é uma característica que ocorre em mais de 90% dos pacientes diagnosticados com este subtipo histológico

de CCR. Este evento é considerado o condutor inicial do ccCCR esporádico, que ocorre em aproximadamente 95% dos casos quando comparado ao ccCCR hereditário (BATAVIA, SCHRAML, MOCH 2019).

O entendimento clínico de que o ccCCR é um câncer altamente vascular, e que a proteína *VHL* tem um papel importante no ccCCR esporádico tornou as estratégias antiangiogênicas uma abordagem atraente para pacientes com a doença metastática. No entanto, a resistência aos medicamentos continua sendo o principal fator limitante para alcançar o sucesso no tratamento sistêmico de pacientes com diversos tipos de câncer, entre eles, o ccCCR (VASAN, BASELGA, HYMAN 2019).

A perda do gene *VHL* está presente em aproximadamente 70% dos casos de ccCCR. Na ausência da proteína VHL, o fator induzido por hipóxia (HIF) é estabilizado e promove a transcrição de fatores relacionados com a angiogênese, como fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), e fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF) (BADOIU et al. 2023), conforme podemos observar na **Figura 4**.



Fonte: Adaptado de VAGGAS et al. (2017).

Figura 4: Representação da participação de VHL na regulamentação do HIF em condições de normóxia e hipóxia.

O VEGF atua como um potente indutor angiogênico durante a progressão do tumor e metástase e se liga aos receptores de tirosina quinase, incluindo *VEGFR1* ou *VEGFR2*, na superfície da célula endotelial vascular (RINI, SOSMAN, MOTZER 2005), nesse sentido, pacientes com ccCCR avançado e/ou metastático, com inativação de *VHL*, poderiam se beneficiar com o tratamento sistêmico com inibidores de VEGFR.

O gene *VHL* juntamente com os genes modificadores de cromatina *PBRM1*, *BAP1* e *SETD2*, estão próximos e na região do cromossomo 3p, portanto a perda desta

região cromossômica leva à depleção das proteínas codificadas por eles e ausência de função desses genes (MAZUMDER, HIGGINS, SAMARAKOON 2023).

O *PBRM1* codifica um componente do complexo de remodelação da cromatina *PBAF* da família *SWI / SNF*, que está envolvido na supressão de assinaturas transcricionais hipóxicas.

O *PBRM1* é o segundo gene mais comumente alterado em pacientes com ccCCR, com mutações somáticas de perda de função ocorrendo em aproximadamente 30-40% dos tumores (HE et al. 2024).

Entre as estratégias terapêuticas que exploram essas vias epigenéticas, destaca-se o uso de inibidores de PARP (PARPi). O uso de PARPi como olaparib tem mostrado eficácia em combinação com inibidores de ATR, como berzosertib, para induzir a morte celular em modelos de ccCCR com mutações em *PBRM1* (CHABANON 2021).

Além disso, existe uma literatura consolidada relacionando o potencial efeito de inúmeras terapias-alvo que são utilizadas na prática clínica, e que têm como principais alvos, vias e alvos moleculares sabidamente envolvidos na patogênese do CCR.

Os potenciais alvos moleculares que podem ser alvejados farmacologicamente por terapia-alvo e as principais vias envolvidas se encontram brevemente representados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Principais vias e alvos moleculares envolvidos no CCR que podem ser alvejados farmacologicamente por terapia-alvo.

TERAPIA	MECANISMO DE AÇÃO	ALVO	REF.
Sorafenibe	Inibidor de receptores de tirosina quinase	VEGFR, PDGFR, KIT, RET	ESCUДИER et al. 2007.
Sunitinibe		VEGFR, PDGFR	MOTZER et al. 2007.
Pazopanibe		VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, KIT	CHOU EIRI et al. 2013.
Lenvatinibe		VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, PDGFRα, KIT, RET	MOTZER et al. 2015.
Cabozantinibe		VEGFR, AXL, MET	CHOU EIRI et al. 2015.
Axitinibe		VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3	RINI et al. 2011.
Everolimus	Inibidor de mTOR	mTOR	MOTZER et al. 2015.
Tensirolimus		mTOR	HUDES et al. 2007.
Belzutifan	Inibidor de (HIF)-2 α	HIF-2α	DEEKS 2021.

Fonte: Adaptado de ESCUDIER et al. (2007); MOTZER et al. (2007); HUDES et al. (2007); CHOU EIRI et al. (2013); MOTZER et al. (2015); CHOU EIRI et al. (2015); RINI et al. (2011); DEEKS (2021).

Alternativamente, um estudo recente publicado por Fultang e colaboradores (2024), mostrou que a perda de *PBRM1* em ccCCR está associada a uma maior sensibilidade ao inibidor de MCL1, que induz a apoptose nas células tumorais (FULTANG et al. 2024).

No cenário sarcomatoide, os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação do sCCR ainda são mal compreendidos, em parte, devido à escassez de modelos de linhagem celular que recapitem a biologia do tumor.

Comparado ao ccCCR epitelióide, o sCCR é enriquecido para várias mutações e características transcricionais, como deleções de *CDKN2A* / *CDKN2B*, além do aumento da expressão de genes do ciclo celular, como *E2F7* (MOTZER et al 2020; ZARIF et al. 2024).

Além disso, a diferenciação sarcomatóide é heterogênea, e os componentes sCCR e CCR epitelióide frequentemente coexistem dentro de um mesmo tumor. Nesse sentido, a detecção do fenótipo sarcomatóide usando biópsia tumoral, ainda é desafiadora na prática clínica (KESKIN et al. 2027).

Já no cenário metastático, a perda de *PBRM1* confere efeitos favoráveis provavelmente devido ao efeito pró-angiogênico, que resulta na regulação positiva dos alvos de terapias direcionadas ao *VEGF*, como o *HIF*, sugerindo que o tratamento sistêmico com inibidores de *VEGFR*, ou inibidores de *mTOR* pode estar associado a melhores resultados em pacientes metastáticos com perda de *PBRM1* (HSIEH et al. 2017; KOTTECHA, MOTZER, VOSS 2019).

O pCCR corresponde ao segundo subtipo histológico mais frequente de CCR, onde grande parte do conhecimento prévio sobre os seus mecanismos moleculares é baseado no estudo do carcinoma de células renais papilares hereditário. Este tipo de câncer é caracterizado pela ativação de mutações da linha germinativa do proto-oncogene *MET* (o domínio da tirosina quinase *MET*, localizado no cromossomo 7) (LINEHAN et al. 2026).

O *MET* é o gene responsável por codificar o receptor do fator de crescimento hepatócito (HGF), e sua ativação pelo HGF pode desencadear diversas cascatas de

sinalização celular, incluindo as vias PI3K/AKT, MAPK/ERK e Wnt/ β -catenina (MORAES et al. 2023).

Essas vias, por sua vez, mecanisticamente estão associadas com processos de proliferação celular, migração, invasão, angiogênese, favorecendo o crescimento do tumor e a metastatização (XIE et al. 2026).

Por estes motivos, a via HGF/MET vêm sendo considerada uma via terapêutica importante no CCR. Nesse sentido, inibidores de *MET*, como o cabozantinibe, estão sendo usados para bloquear essa sinalização e reduzir o crescimento tumoral, mostrando eficácia em ensaios clínicos com pacientes que apresentam mutações no *MET* (XIE et al. 2026; MORAES et al. 2023).

Mutações somáticas do *MET* são encontradas em 13%-15% dos carcinomas de células renais papilares não hereditários (DURINCK et al. 2015). Além disso, mutações nos genes que regulam a via *NRF2/ARE*, também foram encontradas no carcinoma renal papilar esporádico.

O fator de transcrição nuclear [*eritroide-derivado 2*]-like 2 (*NRF2*), é uma consequência direta do acúmulo de fumarato intracelular, um resultado da inativação da fumarato hidratase (FH). No entanto, os mecanismos que levam a alteração de *NRF2* no pCCR esporádico ainda permanecem mal elucidados (OOI et al. 2013).

Sabidamente, *NRF2* regula a transcrição de muitos genes que constituem vias bioquímicas, incluindo metabolismo xenobiótico, metabolismo energético e regulação do ciclo celular (SHIBATA et al. 2011).

O gene *CDKN2A* (inibidor de cinase dependente de ciclina 2A), o gene *SETD2* (domínio SET contendo 2) - o domínio SET é um domínio proteico com atividade metiltransferase, e o gene *NRF2* (fator nuclear E2 relacionado ao fator 2) (WEBSTER, GOPAL, BALL, 2022).

Diversos fatores estão associados com a resistência aos medicamentos, entre eles: alterações físicas, e genéticas, a cinética do crescimento tumoral, o microambiente, entre outros fatores que biologicamente refletem a heterogeneidade tumoral (TANNOCK 2015).

Atualmente, uma das maneiras de avaliar a heterogeneidade presente nos tumores, é o sequenciamento genômico. As células tumorais adquirem alterações genômicas através de uma variedade de processos mutacionais que geram grande diversidade genética. Essa abordagem pode ser útil para o direcionamento terapêutico dos pacientes com CCR (KOTECHA, MOTZER, VOSS 2019).

Recentemente, Turajlic e colaboradores (2018), identificaram mutações secundárias e alterações cromossômicas envolvidas na evolução do tumor, evidenciando sua relevância clínica (TURAJLIC et al. 2018). Tumores com baixa heterogeneidade intratumoral, e baixa instabilidade genômica, geralmente, demonstram baixo potencial maligno.

Em tumores com alta instabilidade genômica, e alta heterogeneidade intratumoral, no entanto, as mutações secundárias de *PBRM1* são frequentemente seguidas pela ativação clonal das mutações secundárias de *PI3KCA* e *SETD2* (KOTECHA, MOTZER, VOSS 2019).

1.4 MODELOS DE XENOENXERTOS DERIVADOS DE PACIENTES (*PATIENT-DERIVED XENOGRAFTS – PDX*)

Modelos animais para estudos da biologia do câncer humano são essenciais para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento, e são amplamente usados em todo o mundo, em diferentes centros de pesquisa.

No entanto, foi somente a partir das últimas décadas esses modelos têm ganhado popularidade e destaque, por representarem com maior fidedignidade a individualidade do câncer humano (MALANEY, ICOSIA, DAVÉ 2014), proporcionando desta forma, uma melhor percepção dos aspectos biológicos, mecânicos, além de permitirem o teste de terapias anti-câncer (MONSMA et al. 2012; GARRALDA et al. 2014).

Mais recentemente, com a geração e a disponibilidade de novas linhagens de camundongos imunodeficientes, conhecidos como *NOD scid gamma* (NSG) (SHULTZ et al. 2005), fortaleceu os modelos de xenotransplante, uma vez que esses animais proporcionam taxas de crescimento mais elevadas e rápidas, permitindo estudar suas características únicas, incluindo a imprevisibilidade da progressão tumoral (APARICIO, HIDALGO, KUNG 2015).

Tecnicamente, esse modelo baseia-se na enxertia de fragmentos de tumor humano fresco em camundongos imunodeficientes. O fato de o animal ser imunodeficiente, permite a implantação e o crescimento do tumor, sem que haja rejeição (MORTON, HOUGHTON 2007).

A comparação molecular entre os enxertos e os tumores humanos fazem dos PDX bons preditores de resposta às terapias, uma vez que é preservada a maior parte das características dos tumores humanos, como por exemplo, características histológicas e moleculares (MONSMA et al. 2012; GARRALDA et al. 2014).

Outra grande vantagem dessa abordagem, é a criação exclusiva de bancos de xenoenxertos transplantáveis, que são valiosos para estudos futuros, e, sobretudo, para a comparação molecular entre os enxertos e os tumores humanos, bem como para a caracterização do tumor e uma melhor compreensão da biologia do câncer (LJUNGBERG et al. 2011).

Estrategicamente, o local mais comum de implante encontra-se na região subcutânea dorsal dos camundongos (implante ectópico), embora a implantação no mesmo órgão do tumor primário também possa ser uma opção (implante ortotópico) (HIDALGO et al. 2014).

Em conjunto, as dificuldades apresentadas no manejo dos pacientes com CCR localmente avançado e/ou metastáticos demandam a investigação de novas abordagens terapêuticas em modelos pré-clínicos robustos e que reproduzam de forma fidedigna as principais características moleculares da doença.

Portanto, este trabalho busca estabelecer uma plataforma de estudo completa, incluindo caracterização molecular dos CCRs, a fim de que possamos utilizar a informação molecular para, de forma individual e personalizada, personalizar terapias que possam vir a impactar o paciente com CCR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo central deste projeto foi realizar a caracterização molecular de diferentes subtipos de xenoenxertos derivados de pacientes com CCR para identificação de alterações genéticas que possam ser alvejadas farmacologicamente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar a comparação morfológica por imuno-histoquímica entre os tumores primários e os PDX para avaliar a preservação das características morfológicas tumorais nos modelos animais.
2. Realizar sequenciamento genômico dos tumores primários e os PDX para identificar as alterações genéticas comuns e PDX que sejam passíveis de intervenção farmacológica por drogas-alvo.
3. Realizar ensaios de crescimento tumoral em PDX tratados com inibidores e drogas-alvo direcionadas às alterações identificadas.

3 MATERIAIS & MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Para este estudo, foram recrutados 90 pacientes portadores de CCR de qualquer subtipo histológico que aceitaram participar do estudo ao assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**ANEXO 3**).

As regiões tumorais foram identificadas a partir da peça cirúrgica por um patologista, que ficou encarregado de separar fragmentos de até 1cm³ representativos da amostra tumoral.

As amostras foram transportadas resfriadas, acondicionadas em tubos estéreis com meio de cultura DMEM High, e antibiótico. Para este projeto, os critérios de inclusão e exclusão serão apresentados a seguir:

Critérios de inclusão: Para o estabelecimento dos xenotransplantes, foram utilizados fragmentos de CCR, obtidos de pacientes com estadiamento patológico tumores infiltrativos, invasivos, ou com formação de trombo de veia renal e/ou veia cava inferior, além dos casos de pacientes metastáticos provenientes de pacientes atendidos no A.C.Camargo Cancer Center que aceitarem participar do estudo.

Critérios de exclusão: Foram excluídos deste estudo os pacientes que tiveram diagnóstico de lesão benigna ou outra neoplasia.

3.1.1 APROVAÇÃO DO PROJETO

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antônio Prudente (FAP) (CEP: 2201/16) (**ANEXO 2**), e comitê de ética em pesquisa e uso animal (CEUA) sob o nº 075/16 (**ANEXO 4**).

3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE XENOENXERTO ORTOTÓPICO DE CCR

Os animais utilizados neste projeto foram camundongos NOD *Scid Gamma* (NSG), de ambos os sexos. Os animais foram adquiridos do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA).

Esses animais foram mantidos e fornecidos pelo Biotério do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE), do A.C.Camargo Cancer Center, e todos os procedimentos experimentais descritos neste trabalho foram submetidos ao CEUA da Fundação Antônio Prudente.

O estabelecimento do modelo experimental de xenoenxerto ortotópico de CCR já foi padronizado por nosso grupo (BESERRA et al. 2022), e encontra-se ilustrado na **Figura 5**.

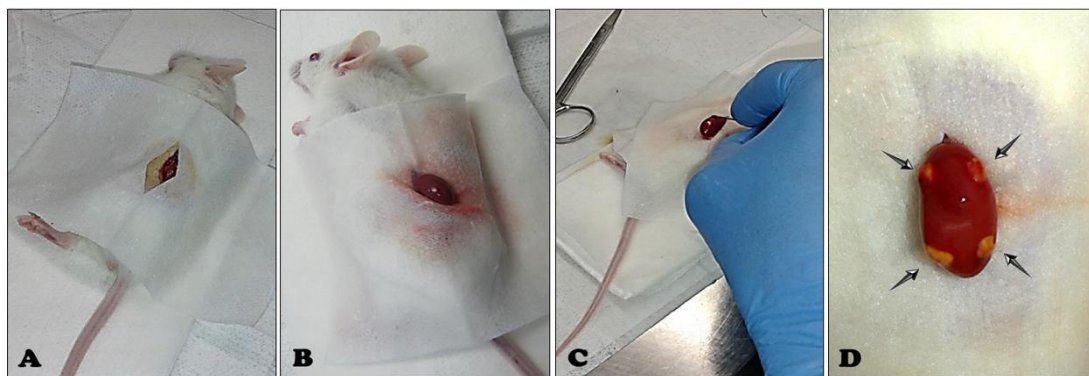


Figura 5: Passo a passo da padronização da técnica cirúrgica aplicada no implante ortotópico de carcinoma de células renais. **(A)** Lombotomia esquerda de aproximadamente 1cm e posicionamento do campo cirúrgico. **(B)** Externalização e isolamento do rim esquerdo. **(C)** Incisão transversal na cápsula renal de ~2mm. **(D)** Posicionamento de 4 fragmentos tumorais subcapsular no terço superior e inferior renal.

Os animais foram inicialmente pesados e anestesiados através da injeção intraperitoneal de Cetamina (Ketamin-S, Crisália) e Xilasina (Ronpun, Bayer) na concentração de 10ul/g/peso.

Em seguida, foi realizada a tricotomia, e assepsia da região lombar esquerda, com digliconato de clorexidina 4%, através de uma lombotomia longitudinal de aproximadamente 1 cm de comprimento, o rim foi isolado, e uma incisão transversal foi realizada na cápsula renal de aproximadamente 2 mm com auxílio de um bisturi.

Finalmente, a cápsula renal foi divulsionada do córtex renal, e fragmentos tumorais foram posicionados separadamente na região subcasular renal (até 4 fragmentos por animal).

Posteriormente, o rim foi devolvido para a cavidade abdominal, e foi realizada a sutura em dois planos, da camada muscular e da pele, utilizando fios Nylon 4.0.

Os animais foram monitorados periodicamente por palpação lombar esquerda, para constatar evidências de crescimento tumoral. Após verificar a existência de tumor, por meio de palpação, os animais continuaram sendo monitorados periodicamente, e quando os tumores alcançaram um tamanho de aproximadamente 1cm^3 , os animais foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia, em seguida, os tumores removidos e processados, conforme a distribuição da **Figura 6**.

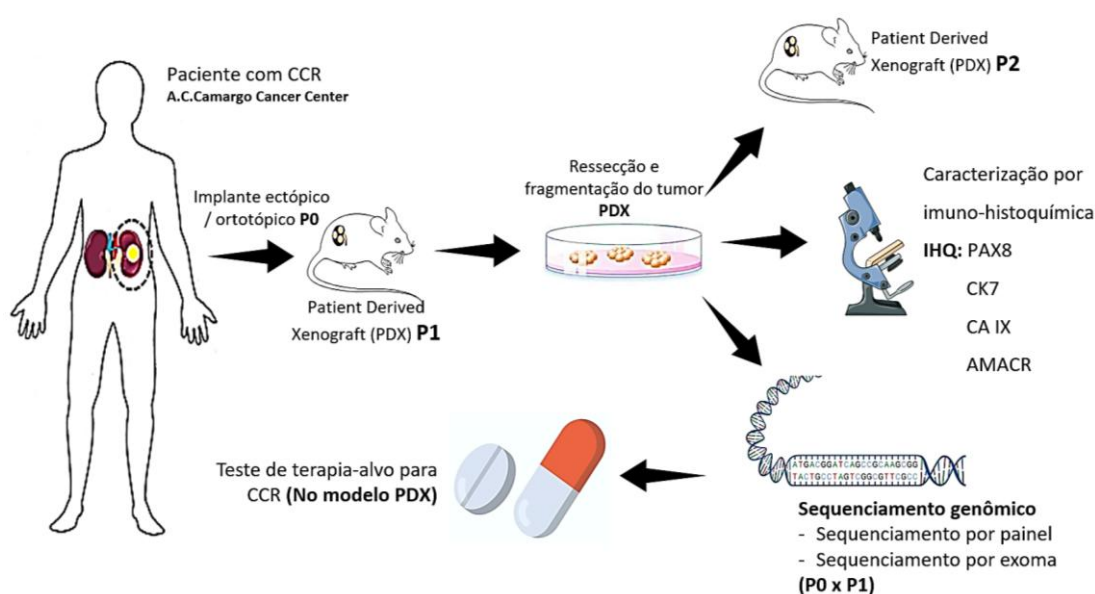


Figura 6: Fluxograma dos experimentos envolvendo as amostras obtidas dos implantes ortotópicos e ectópicos de carcinoma renal humano.

Parte dos tumores foi utilizada para a realização de uma nova passagem em um novo lote de animais, outra parte dos fragmentos tumorais foi utilizada para análise histológica e comparação morfológica por imuno-histoquímica, e outra parte

dos fragmentos foi utilizada para extração de DNA, para posteriormente ser realizado sequenciamento genômico entre os tumores primários e os tumores gerados no PDX, e, dessa forma podermos identificar as alterações genéticas de cada caso, e também termos a oportunidade de selecionar algumas alterações para o teste de terapias personalizadas, principalmente nos subtipos tumores menos frequentes entre os pacientes com CCR.

3.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os procedimentos de imuno-histoquímica e histologia foram realizados no Core Facility de Histologia-IHQ-TMA do AC Camargo.

Inicialmente as amostras foram seccionadas no micrótomo (Leica, RM2255) na espessura de 4 µm. Para as reações de imuno-histoquímica os tecidos tumorais foram avaliados para a expressão de PAX8, Citoceratina-7 (CK7), Anidrase Carbônica IX (CA IX) e Alfa-metilacil coenzima A racemase (AMACR), através do kit de detecção Ultraview (cat. 760-500, Ventana Medical Systems).

Esses marcadores são amplamente utilizados na rotina clínica da anatomia patológica para a identificação dos diferentes fenótipos de CCR.

As reações foram realizadas no sistema automatizado Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, as lâminas foram desparafinizadas utilizando a solução EZprep (cat. 950-102, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA).

A recuperação antigênica foi feita com os reagentes Cell Conditioning 1 - CC1 (cat. 950-224, Ventana Medical Systems, Inc.) a 95°C. A especificação do kit de

detecção, recuperação e titulação de cada anticorpo se encontra brevemente descrita na **Tabela 3**.

Tabela 3: Características dos anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica dos casos de CCR.

Anticorpo	Empresa	Diluição	Protocolo	Kit de detecção	Controle
CA IX	Epitomics	1:50	30 min CC1 + 60 minutos de incubação AB	Ultraview	ccCCR
PAX8	Cell Marque	1:100	30 min CC1 + 20 minutos de incubação AB	Ultraview	Rim
CK7	Sigma	1:200	30 min CC1 + 32 minutos de incubação AB	Ultraview	Pulmão

Após o ensaio de imuno-histoquímica, as lâminas foram montadas com meio de montagem Entellan (cat. 107961, Merck) e entregues para avaliação histopatológica.

3.4 ESTABELECIMENTO DE CULTURA PRIMÁRIA

Os fragmentos tumorais utilizados para o estabelecimento desta cultura primária foram provenientes de um caso PDX de ccCCR com formação de trombos tumorais. Esse protocolo foi estabelecido e padronizado pela pesquisadora de Pós-doutorando Ethiene Castelucci Estevam.

Os fragmentos tumorais obtidos do PDX foram lavados em solução salina

balanceada de Hanks (HBSS) e picotados em fragmentos menores submetidos aos seguintes protocolos de dissociação: 1) tripsina 0,01%, 30 min., 37°C; 2) tripsina 0,02%, 30 min, 37°C; 3) Tryple™ Select (Gibco) em placa de Petri, 30 min., 37°C; 4) Tryple™ Select (Gibco) em tubo, 30 min, 37°C; 5) Stempro® Accutase® Cell dissociation reagent (Gibco), 120 min., 25°C; 6) Colagenase IV 1,25mg/mL, 90 min, 37°C ou 7) colagenase IV 0,1% + tripsina 0,1%, 90 min., 37°C.

Após a neutralização das enzimas, o material foi passado através de *cell strainer* de 40µm, as células ressuspensas em DMEM High com 20% de soro fetal bovino e o pellet contendo células foi acondicionado em garrafas para cultura de células com coating de colágeno. A partir da 10ª passagem as células foram mantidas em 10% de soro fetal bovino.

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA PARA SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

Os tecidos tumorais congelados, foram inicialmente solicitados no Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, em seguida submetidos à análise histológica por um patologista qualificado para avaliar a porcentagem do tecido tumoral viável. Foram dissecadas manualmente amostras que continham tecidos não-neoplásico, fibrose, tecido adiposo ou outros materiais contaminantes.

Posteriormente, o tecido foi conduzido para extração no Banco de Macromoléculas de acordo com o protocolo operacional padrão interno. O tecido congelado (até 50mg) foi lavado com PBS (pH 7,5 1x), digerido com proteinase K (Qiagen, CA, EUA) e tratado com RNase A (Qiagen, CA, EUA).

A extração do DNA foi feita de forma automatizada no equipamento QIASymphony (Qiagen, CA, EUA) utilizando o kit QIASymphony DSP DNA Midi (Qiagen, CA, EUA). A pureza e concentração do DNA foram avaliadas nos equipamentos Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, DE, EUA) e Qubit QUANT-IT dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies), respectivamente.

A integridade foi determinada com equipamento Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, CA, EUA). O TapeStation gera uma nota de qualidade do DNA que vai de 0-10, sendo 10 o DNA na sua forma mais íntegra.

O DNA genômico (foi submetido primeiramente a uma reação de fragmentação de DNA utilizando adaptadores que se ligam às transposases; os passos de limpeza, amplificação, hibridação e validação das bibliotecas foram realizados. Os sinais de fluorescência foram lidos e interpretados, permitindo a construção de sequências.

As quantificações iniciais de DNA foram realizadas utilizando o Qubit Fluorometer, em conjunto com o kit Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher). Este método de quantificação, amplamente utilizado em estudos de biologia molecular, é baseado em fluorescência e emprega fluoróforos específicos que se ligam preferencialmente ao DNA de fita dupla.

A interação dos fluoróforos com o DNA resulta na emissão de luz fluorescente, cuja intensidade é proporcional à quantidade de DNA presente na amostra. Essa abordagem permite uma quantificação mais precisa e exata, especialmente em concentrações baixas de DNA, quando comparada a métodos tradicionais baseados em espectrometria.

3.5.1 SEQUENCIAMENTO POR PAINÉIS GENÔMICOS

A caracterização por painel foi realizada em duas etapas, em parceria com o grupo de genômica clínica do A.C. Camargo Cancer Center. Em cada uma das etapas foi utilizado um tipo de painel.

Essa mudança entre os painéis utilizados no estudo foi necessária em consequência do tipo de painel que o grupo de genômica clínica estava utilizando para a caracterização dos casos de CCR com o decorrer do tempo.

Os primeiros 13 casos de PDX de CCR estabelecidos foram caracterizados por meio de um painel customizado, composto por 28 genes frequentemente envolvidos na patogênese do câncer renal, descritos na literatura, e com base em dados presentes no banco de dados do Atlas do Genoma do Câncer (do inglês, *The Cancer Genome Atlas*) (TCGA).

3.5.2 SEQUENCIAMENTO POR PAINEL CUSTOMIZADO COMPOSTO POR 28 GENES

A construção desse painel foi realizada e padronizada anteriormente por MEIRA (2022). Os genes utilizados na construção desse painel, se encontram representados abaixo, na **Tabela 4**.

Tabela 4: Painei customizado, composto por 28 genes frequentemente alterados em pacientes com CCR.

PAINEL CUSTOMIZADO COMPOSTO POR 28 GENES						
<i>VHL</i>	<i>ARID1A</i>	<i>KDM6A</i>	<i>PBRM1</i>	<i>SMARCA4</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>BAP1</i>
<i>PCF11</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>SETD2</i>	<i>AR</i>	<i>STAG2</i>	<i>KDM5C</i>	<i>MET</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>PTEN</i>	<i>FAT1</i>	<i>FH</i>	<i>TP53</i>	<i>NF2</i>	<i>FLCN</i>
<i>MTOR</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>NRAS</i>	<i>BRAF</i>	<i>EGFR</i>	<i>KRAS</i>	<i>TCEB1</i>

Fonte: Adaptado de MEIRA (2022); BESERRA et al. (2022).

Os demais nove casos descritos neste trabalho foram sequenciados utilizando um painel comercial, composto por 409 genes, frequentemente encontrados alterados em câncer, o painel *Comprehensive Cancer Panel* (CCP) (da *Thermo Fischer Scientific*, EUA).

3.5.3 SEQUENCIAMENTO PELO PAINEL COMERCIAL CCP COMPOSTO POR 409 GENES

Para esta etapa da caracterização molecular, foi realizado o sequenciamento genômico utilizando o painel CCP (*Thermo Fischer Scientific*, EUA) que contém 409 genes encontrados frequentemente alterados em tumores sólidos em adultos, de acordo com as instruções do fabricante.

Os genes utilizados na construção desse painel, se encontram representados abaixo, na **Tabela 5**.

Tabela 5: Pannel comercial CCP, composto por 409 genes, frequentemente alterados em câncer.

PAINEL COMERCIAL - <i>COMPREHENSIVE CANCER PANEL (CCP)</i>								
MLH1	PAK3	RALGDS	TCF12	ABL2	BUB1B	DEK	FLT3	ITGB2
PALB2	RARA	TCF3	ACVR2A	CARD11	DICER1	FLT4	ITGB3	MLL2
RB1	TCF7L1	ADAMTS20	CASC5	DNMT3A	FN1	JAK1	MLL3	PAX3
TCF7L2	AFF1	CBL	DPYD	FOXL2	JAK2	MLLT10	PAX5	REL
AFF3	CCND1	DST	FOXO1	JAK3	MMP2	PAX7	RET	TET1
CCND2	EGFR	FOXO3	JUN	MN1	PAX8	RHOH	TET2	AKT1
ABL1	<i>BTK</i>	DDR2	FLT1	ITGA9	NOTCH1	PRKAR1A	SRC	XPA
EML4	FOXP1	KAT6A	MPL	PBRM1	RNASEL	TFE3	AKT2	CD79A
FOXP4	KAT6B	MRE11A	PBX1	RNF2	TGFBR2	AKT3	CD79B	EP400
KDM5C	MSH2	PDE4DIP	RNF213	TGM7	ALK	CDC73	EPHA3	G6PD
MSH6	PDGFB	ROS1	THBS1	APC	CDH1	EPHA7	GATA1	KDR
PDGFRA	RPS6KA2	TIMP3	AR	CDH11	EPHB1	GATA2	KEAP1	MTR
RRM1	TLR4	ARID1A	CDH2	EPHB4	CSMD3	FANCG	IKBKE	MAPK8
GATA3	KIT	MTRR	PER1	RUNX1	TLX1	ARID2	CDH20	EPHB6
KLF6	MUC1	PGAP3	RUNX1T1	TNFAIP3	ARNT	CDH5	ERBB2	GNA11
MUTYH	PHOX2B	SAMD9	TNFRSF14	ASXL1	CDK12	ERBB3	GNAQ	LAMP1
PIK3C2B	SBDS	TNK2	ATF1	CDK4	ERBB4	GNAS	LCK	MYC
SDHA	TOP1	ATM	CDK6	ERCC1	GPR124	LIFR	MYCL1	PIK3CB
TP53	ATR	CDK8	ERCC2	GRM8	LPHN3	MYCN	PIK3	CD
TPR	ATRX	CDKN2A	ERCC3	GUCY1A2	POT1	MYD88	PIK3CG	SDHD
AURKA	CDKN2B	ERCC4	HCAR1	LPP	MYH11	PIK3R1	SEPT9	TRIM33
CDKN2C	ERCC5	HIF1A	LRP1B	MYH9	PIK3R2	SETD2	TRIP11	AURKC
CEBRA	ERG	HLF	LTF	NBN	PIM1	SF3B1	TRRAP	AXL
ESR1	HNF1A	LTK	NCOA1	PKHD1	SGK1	TSC1	BAI3	CHEK2
HOOK3	MAF	NCOA2	PLAG1	SH2D1A	TSC2	BAP1	CIC	ETV1
MAFB	NCOA4	PLCG1	SMAD2	TSHR	BCL10	CKS1B	ETV4	HSP90AA1
NF1	PLEKHG5	SMAD4	UBR5	BCL11	CMPK1	EXT1	HSP90AB1	MAG1
PML	SMARCA4	UGT1A1	BCL11B	COL1A1	EXT2	ICK	MALT1	NFE2L2
SMARCB1	USP9X	BCL2	CRBN	EZH2	IDH1	MAML2	NFKB1	PMS2
VHL	BCL2L1	CREB1	FAM123B	IDH2	MAP2K1	NFKB2	POU5F1	SMUG1
BCL2L2	CREBBP	FANCA	IGF1R	MAP2K2	NIN	PRARG	SOCS1	WHSC1
CRKL	FANCC	IGF2	MAP2K4	NKX2-1	PTCH1	SOX11	WRN	BCL6
FANCD2	IGF2R	MAP3K7	NLRP1	PRDM1	SOX2	WT1	BCL9	CSF1R
IKBKB	RAD50	TAL1	BRIP1	DDIT3	FLI1	ITGA10	MITF	NUP98
PRKADC	SSX1	XPC	BIRC2	CTNNA1	FAZ	IKZF1	MARK1	NOTCH4
STK11	XPO1	BIRC3	CTNNB1	FBXW7	IL2	MARK4	NPM1	PTGS2
XRCC2	BIRC5	CYLD	FGFR1	IL21R	MBD1	NRAS	PTEN	SUFU
BLM	CYP2C19	FGFR2	IL6ST	MCL1	NSD1	PTGS2	SYK	ZNF521

CYP2D6	FGFR3	IL7R	MDM2	NTRK1	PTPN11	SYNE1	BMPR1A	DAXX
ING4	MDM4	NTRK3	PTPRD	TAF1	BRAF	DCC	FH	IRF4
NUMA1	PTPRT	TAF1L	BRD3	DDB2	FLCN	IRS2	MET	NUP214
MLL	TBX22	MEN1	FGFR4	BLNK	ZNF384	STK36	PSIP1	RAF1
PARP1	FANCF	CRTC1	BCL3	WAS	SMO	PMS1	NF2	MAGEA1
RECQL4	ETS1	MAPK1	TRIM24	SDHB	MYB	GDNF	PDGFRB	KDM6A
TCL1A	HRAS	CHEK1	AURKB	SDHC	PIK3CA	KRAS	NOTCH2	MTOR
AKAP9	FZR1	EP300	BCR	CCNE1				

Para confirmar o repertório mutacional encontrado no tumor do paciente no tumor do xenoinxerto, foi realizado o sequenciamento de amplicon.

3.5.4 SEQUENCIAMENTO DE AMPLICON

Após a identificação das variantes somáticas nos tumores de pacientes diagnosticados com CCR, foi realizado o desenvolvimento de primers específicos para cada alteração genética observada.

Para isso, foi feita uma avaliação detalhada do DNA extraído de amostras de CCR obtidos do PDX. O design dos *primers* foi efetuado utilizando a ferramenta online *Primer 3* (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), que permite a criação de sequências específicas para a amplificação de regiões-alvo do DNA. Para a amplificação dessas regiões de interesse, foi utilizado o *kit Qiagen Multiplex PCR Plus*, que possibilita a amplificação simultânea de várias sequências em uma única reação.

O DNA das amostras foi submetido a reações de *PCR Multiplex*, com

concentrações de DNA variando entre 5 e 10ng, de acordo com as recomendações do fabricante, garantindo a especificidade e eficiência da amplificação.

Os produtos gerados pelas reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com a utilização de *SybrSafe* (ThermoFisher) como corante, permitindo a visualização das bandas amplificadas.

Após a amplificação, as amostras passaram por um processo de purificação utilizando as Ampure XP Beads, que removem impurezas e fragmentos não desejados. Os produtos purificados foram então empregados na preparação da biblioteca de DNA, utilizando o *kit Ion Plus Fragment Library* (Thermo Fisher).

Finalmente, as bibliotecas de DNA foram sequenciadas na plataforma *Ion Proton* (Life Technologies), conforme as diretrizes fornecidas pelo fabricante, permitindo a análise das variantes somáticas presentes nas amostras dos pacientes com CCR.

Este processo integrado de amplificação, purificação e sequenciamento possibilita a análise detalhada das alterações genéticas associadas ao CCR, contribuindo para o entendimento das características moleculares dessa doença.

3.5.5 CHAMADA DE VARIANTES SOMÁTICAS EM DNA DE TECIDO TUMORAL

Para o sequenciamento do painel CCP, as variantes foram identificadas e anotadas usando o *plugin Ion Torrent Variant Caller* (Thermo Fischer Scientific, USA). Destas, possíveis variantes somáticas foram selecionadas através do software *VarSeq* (Golden Helix, USA) utilizando os seguintes critérios: I) variante presente em pelo

menos 5% dos *reads* no DNA de tumor e ausente no DNA de leucócito, II) variantes não-sinônimas em regiões codificantes (SNVs ou INDELs), III) ausência em bancos de dados populacionais (ExAC, dbSNP, 1000genomes) ou *minor allele frequency* (MAF) $\leq 0,01$. As variantes selecionadas foram visualmente verificadas utilizando o *software* IGV - *Integrative Genomics Viewer* (Broad Institute, USA).

Além da caracterização por painéis, realizamos a caracterização molecular utilizando o sequenciamento de exoma completo em cinco casos de CCR gerados no PDX, sendo três casos de ccCCR e dois casos de pCCR.

3.6 PREPARO DE BIBLIOTECA E SEQUENCIAMENTO DE EXOMA

A construção da biblioteca foi feita utilizando o *xGen DNA Library Prep kit* (IDT Technologies). Para a captura das regiões do exoma utilizamos as sondas xGen Exome Panel v1 (IDT Technologies), segundo as recomendações dos fabricantes.

Resumidamente, o DNA genômico foi fragmentado por digestão enzimática, em seguida, adaptadores e indexes específicos para a plataforma da Illumina foram ligados.

Os fragmentos foram amplificados utilizando 8 ciclos de PCR. As bibliotecas finais foram quantificadas usando o fluorímetro Qubit (Invitrogen) e tiveram o perfil avaliado através do equipamento bioanalyzer (Agilent).

Uma vez quantificadas, foram colocadas 200ng de cada uma das bibliotecas em 5 pools de 5 amostras para capturar a região do exoma. A captura das regiões do

exoma foi realizada com a hibridização dos pools com sondas biotiniladas que abrangem uma região de 39Mb do exoma. Após a hibridização, foi feita a captura das regiões de interesse utilizando beads magnéticas, e uma amplificação final com 11 ciclos.

As bibliotecas finais foram quantificadas utilizando o Qubit (Invitrogen) e o perfil, novamente avaliado pelo bioanalyzer (Agilent). Ao final, os pools foram diluídos a 1.8pM, e sequenciadas de acordo com a recomendação do fabricante.

O sequenciamento foi realizado na plataforma NextSeq 500 System (Illumina), utilizando o NextSeq 500/550 High Output Kit v2 (300 cycles).

3.7 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS COM TERAPIAS ANTIANGIOGÊNICAS

Para a avaliação do efeito de fármacos antitumorais, foi escolhido um caso de PDX com capacidade de desenvolvimento ectópico (subcutâneo), pois a avaliação da cinética de crescimento envolve a aferição diária das lesões com auxílio de um paquímetro digital.

Fragmentos tumorais medindo cerca de 2mm foram implantados na região lombar com auxílio de uma agulha grossa (*cancer implant needle 11G x 3-1/4" PB HUB*, Cadence Science) em camundongos NSG anestesiados.

Os animais passaram então a ser monitorados periodicamente, 3x/semana, e ao apresentarem sinais de crescimento tumoral, as lesões foram medidas, e quando alcançaram tamanho de 0,2 cm³, os animais foram randomizados nos seguintes

grupos: Grupo controle (n=5); Grupo Sunitinibe (inibidor de tirosina quinase (n=5); Grupo Everolimo (inibidor da via de mTOR (n=5); Grupo Belzutifan (inibidor de HIF) (n=5).

Todos os grupos experimentais recebiam seu tratamento por via oral com auxílio de sonda de gavagem estéril. O grupo controle consistia em animais que recebiam PBS, o grupo sunitinibe recebeu doses diárias de 50mg/kg (diluído em água milli-Q estéril), o grupo everolimus recebeu 10 mg/kg (diluído em água milli-Q estéril) e o grupo belzutifan recebeu 100mg/kg (diluído em água milli-Q estéril).

O tratamento ocorreu por 30 dias ou até os animais apresentarem tumores com 2 cm³, conforme ilustrado na **Figura 7**.

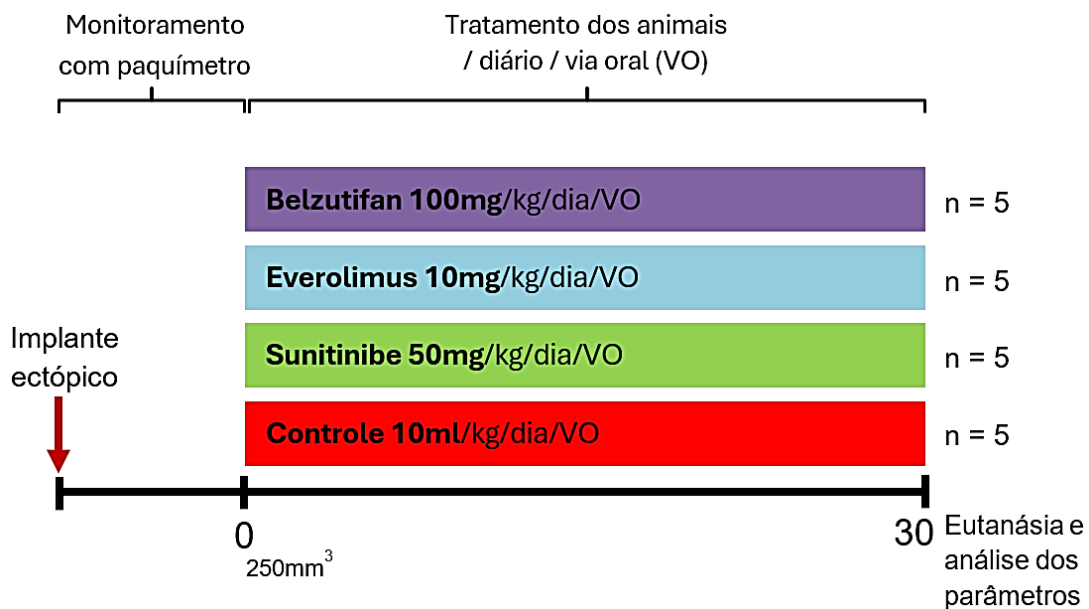


Figura 7: Desenho do estudo com terapias-alvo contra o carcinoma de células renais do tipo células claras.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de sobrevida foi calculada através do estimador de Kaplan e Meier para estimar a sobrevida global, sobrevida livre de progressão de doença e sobrevida livre de metástases dos pacientes que geraram modelos PDX, versus os pacientes que não desenvolveram o PDX. Quando mais superior for a curva no gráfico, maior é a sobrevida no grupo de pacientes.

A comparação entre as curvas foi realizada utilizando o teste não-paramétrico de Log Rank (Mantel-Cox), e o nível de significância adotado foi de 5%. O valor de $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A análise de sobrevida dos animais de acordo com a análise do crescimento tumoral durante 30 dias. Os animais que tiveram tumores equivalentes a 1cm^3 foram eutanasiados.

Quanto mais superior for a curva no gráfico, menor foi o crescimento tumoral em cada um dos grupos de tratamento utilizados no estudo. A comparação entre as curvas foi realizada utilizando o teste não-paramétrico de Log Rank (Mantel-Cox), e o nível de significância adotado foi de 5%. O valor de $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

O efeito do tratamento terapêutico direcionado no modelo PDX/CCR com 15 dias de tratamento foi realizado pelo teste estatístico Ordinary Two-way ANOVA através do software GraphPad Prism 8.2.1. Valores de $P < 0.05$ são considerados significativos e a representação é dada da seguinte maneira: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 ESTABELECIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL

Durante o estabelecimento do modelo experimental, a maior dificuldade encontrada ocorreu após a externalização e isolamento do rim do animal. Ainda durante as primeiras tentativas de separar a cápsula renal do córtex, ocorreu a ruptura da cápsula devido a fragilidade do tecido, ao ressecamento frequente da cápsula renal e a eventuais danos causados ao córtex durante a manipulação do órgão, que eventualmente resultavam em sangramentos e formação de coágulos, dificultando o implante dos fragmentos tumorais.

Entretanto, esses obstáculos foram superados ainda nas etapas iniciais, em consequência do aperfeiçoamento da técnica cirúrgica, além da utilização de uma solução estéril de PBS com EDTA para manter a superfície do rim umedecida durante o procedimento.

Com isso, foi possível evitar sangramentos, preservar a integridade da cápsula renal, além de minimizar os danos provocados no córtex e prevenir a formação de coágulos que pudessem comprometer o implante e o posicionamento dos fragmentos de CCR.

Com isso, foi possível estabelecer de forma exitosa o modelo experimental de xenotransplante ortotópico de CCR conforme pode-se perceber na **Figura 8**.

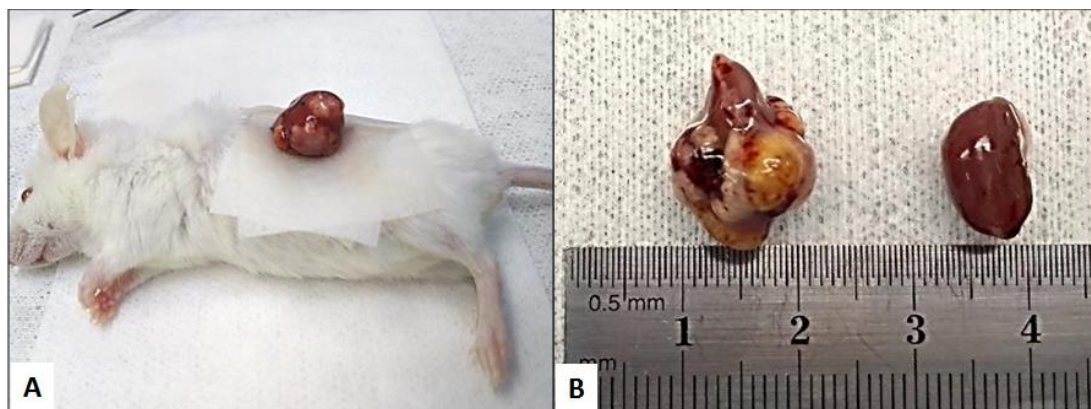


Figura 8: Estabelecimento do modelo de xenoenxerto ortotópico de carcinoma renal humano. **(A)** Evidência de crescimento tumoral após realização de lombotomia longitudinal esquerda. **(B)** Comparação entre o rim afetado pelo CCR, com o rim remanescente do animal.

4.2 CASUÍSTICA DOS PACIENTES

Para este trabalho, foram recrutados 90 pacientes com diversos subtipos histológicos de carcinoma renal, de ambos os sexos, com estadiamento patológico variado, e com baixo e/ou alto grau histológico.

Uma parte dos resultados apresentados a seguir já foi publicada, em um trabalho recente do grupo (BESERRA et al. 2022).

As atualizações são: aumento no número de casos implantados, aumento do tempo de seguimento e análise de sobrevida e incremento no número de casos caracterizados molecularmente.

Todos os 90 casos foram implantados de forma ortotópica nos animais, por via subcapsular, conforme passo a passo descrito na **Figura 5**.

Foi possível verificar evidências de crescimento tumoral (por palpação) em 27 casos, em 100% dos animais implantados, fazendo com que tenhamos obtido uma

taxa de sucesso de enxertia correspondente a 30% dos casos.

A caracterização da casuística de pacientes que tiveram suas amostras implantadas de forma ortotópica encontra-se brevemente descrita na **Tabela 6**.

Tabela 6: Características clínico-patológicas dos pacientes recrutados para o estabelecimento do modelo de xenotransplante de carcinoma renal humano no A.C.Camargo Cancer Center.

XENOENXERTOS ORTOTÓPICOS DE CCR			
SUCESSO DE ENXERTIA		SIM (N = 27)	Total (N = 90)
Sexo	Masculino	17	64
	Feminino	10	24
Idade	Média	61,2	58,0
	Mínimo	40	27
	Máximo	84	84
Crescimento tumoral (meses)	Média	6	-
	Mínimo	1	-
	Máximo	13	-
Subtipo Histológico de CCR	Células Claras	22	73
	Papilíferos	4	12
	Translocação MiT	0	2
	Não classificável	1	3
Estadiamento patológico	pT1a	5	27
	pT1b	5	27
	pT2	0	3
	pT3a	14	26
	pT3b	3	5
	pT4	0	2
Grau Histológico (ISUP)	1	0	4
	2	9	26
	3	10	39
	4	8	21

Componente Sarcomatoide	Presente	5	11
	Ausente	22	79
Componente Rabdoide	Presente	6	13
	Ausente	21	77
Necrose	Presente	11	31
	Ausente	16	59

4.3 ANÁLISE DA SOBREVIDA DOS PACIENTES

Adicionalmente, conseguimos demonstrar que os modelos de PDX de carcinomas renais vêm sendo eficazes na identificação de pacientes com maior risco de progressão e morte relacionada ao câncer.

Pacientes que têm suas respectivas amostras tumorais estabelecidas nos animais apresentam menor sobrevida global ($p = 0,02$), em comparação com o grupo de pacientes cujas amostras tumorais não se desenvolveram no modelo PDX, conforme podemos observar na **Figura 9**.

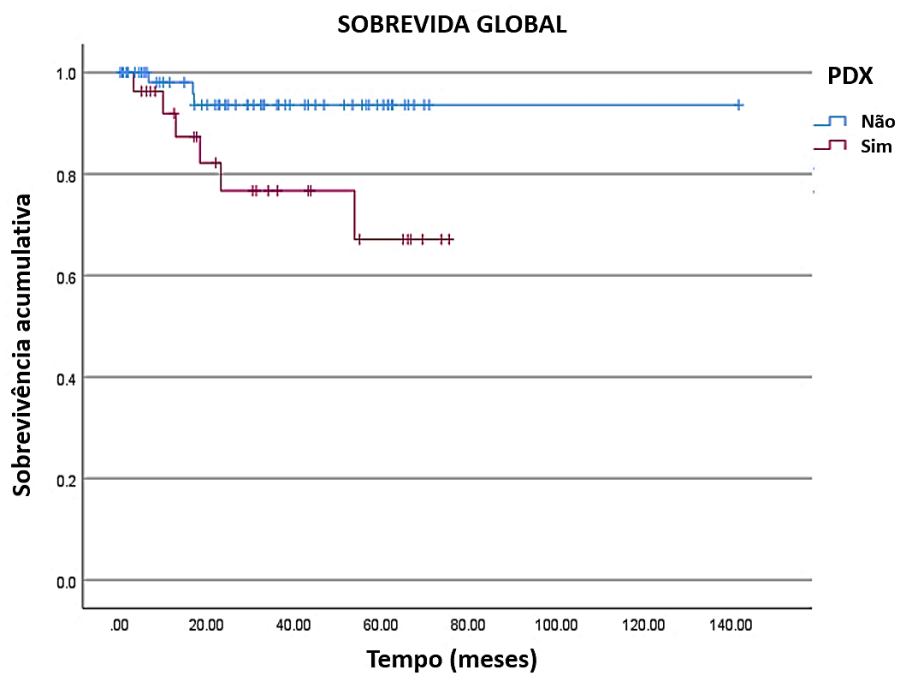


Figura 9: Comparação entre a sobrevida global de pacientes que desenvolveram modelos PDX (n = 27) versus os pacientes que não desenvolveram (n = 63). Log Rank (Mantel-Cox) (p = 0,02).

Resultados semelhantes foram observados ao comparar a sobrevida livre de progressão de doença entre os mesmos dois grupos de pacientes. Conseguimos demonstrar que pacientes que desenvolveram PDX apresentaram progressão de doença a longo prazo, como recidiva tumoral, disseminação metastática da doença e óbito, em comparação com o grupo de pacientes que não desenvolveram o modelo PDX (p = 0,02), conforme podemos observar na **Figura 10**.

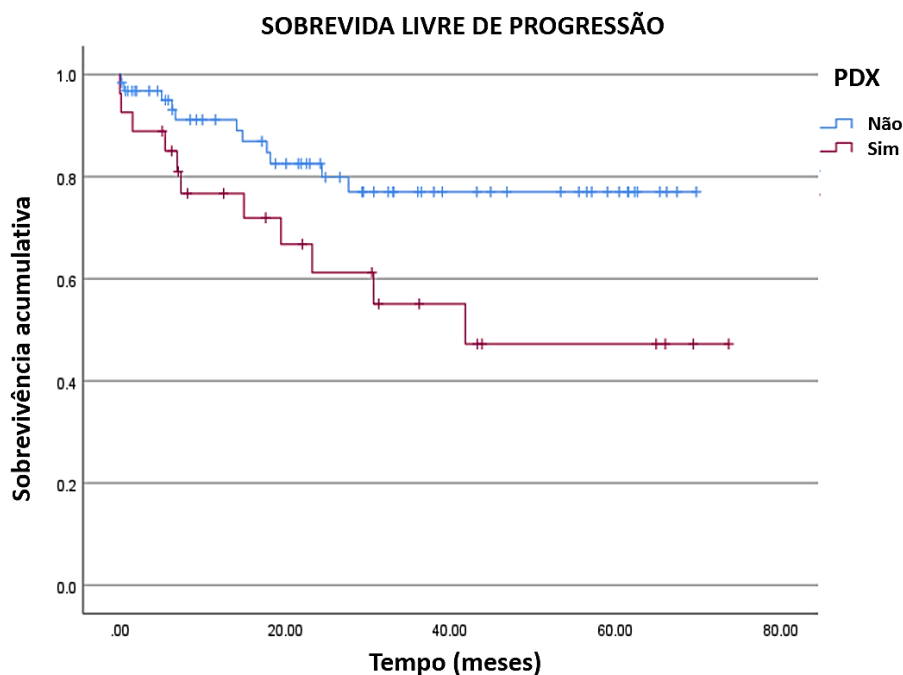


Figura 10: Comparação entre a sobrevida livre de progressão de doença de pacientes que desenvolveram modelos PDX (n = 27) versus os pacientes que não desenvolveram (n = 63). Log Rank (Mantel-Cox) (p = 0,02).

Resultados semelhantes a estes foram anteriormente publicados em um trabalho do nosso grupo (BESERRA et al, 2022). Nesse sentido, os resultados mostrados nesse trabalho representam uma atualização dos dados anteriormente mostrados no artigo (**ANEXO 1**), contemplando um número maior de pacientes e de casos de modelos PDX estabelecidos.

Além disso, a maioria dos tumores que geraram PDX são provenientes de pacientes com estadiamento patológico elevado (pT3 + pT4 = 63% dos casos). Entretanto, conseguimos gerar modelos PDX de pacientes com baixo estadiamento patológico (pT1 + pT2 = 37% dos casos). Esses dados sugerem que existe uma forte

associação entre o estadiamento patológico e o estabelecimento do modelo PDX ($p = 0,002$).

Apesar de os pacientes que desenvolveram PDX apresentarem uma menor sobrevida livre de metástases em comparação com os pacientes que não desenvolveram, não foi possível estabelecer uma associação entre esse parâmetro e os grupos de pacientes ($p = 0,22$), conforme podemos observar na **Figura 11**.

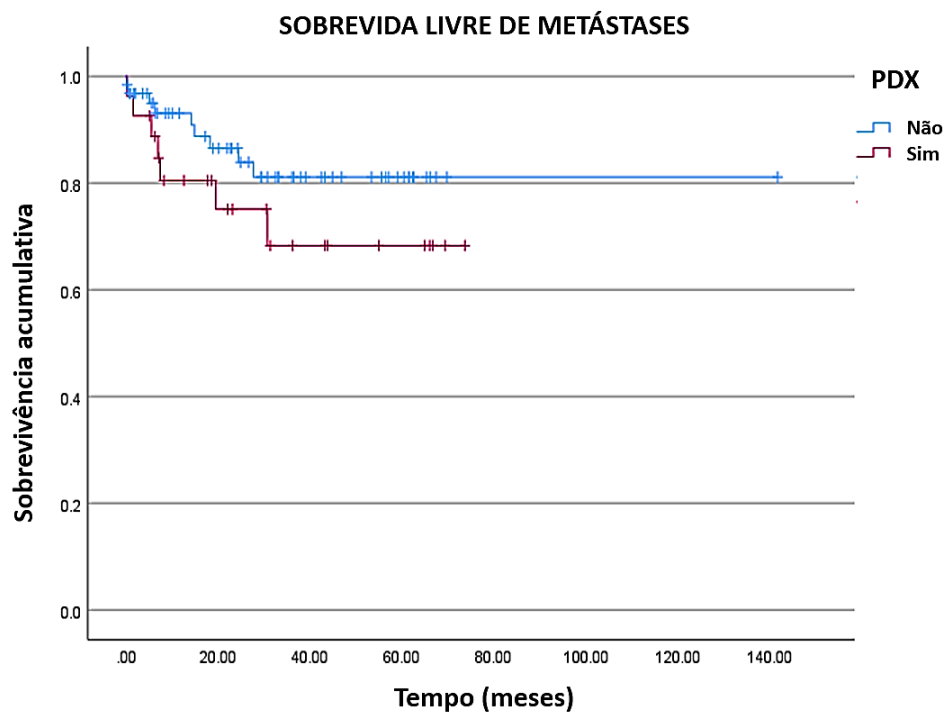


Figura 11: Comparação entre a sobrevida livre de metástases entre os pacientes que desenvolveram modelos PDX ($n = 27$) versus os pacientes que não desenvolveram ($n = 63$). Log Rank (Mantel-Cox) ($p = 0,22$).

4.4 ESTRATIFICAÇÃO DE PACIENTES COM MAIOR RISCO DE PROGRESSÃO E MORTE POR CCR

Além disso, ao considerar toda a nossa coorte de pacientes recrutados para o projeto, conseguimos demonstrar que existe uma associação entre a presença dos componentes sarcomatoide, rabdoide, e a presença de necrose no tumor com o desenvolvimento de metástases após o diagnóstico e óbito dos pacientes com CCR.

Não foi possível estabelecer uma associação desses parâmetros com recidiva dos pacientes, bem como, não foi possível associar o grau ISUP com nenhuma das condições descritas acima, conforme podemos observar na **Tabela 7**.

Tabela 7: Associação entre parâmetros clínico-patológicos com recidiva, metástases e óbito entre os 90 pacientes com Carcinoma de Células Renais utilizados no estudo.

Característica Histológica presente	RECIDIVA		METÁSTASES		ÓBITO	
	% de casos que tiveram recidiva	<i>P valor</i>	% de casos que apresentaram metástases	<i>P valor</i>	% de casos que evoluíram ao óbito	<i>P valor</i>
Componente Sarcomatoide	0%	1,00	72,7%	0,002	36,4%	0,01
Componente Rabdoide	0%	1,00	62%	0,001	30,8%	0,02
Necrose	0%	0,29	35,5%	0,003	22,6%	0,007
Estadiamento pT1 e pT2	3,5%	0,62	0%	0,001	0%	0,001
Estadiamento pT3 e pT4	6,1%		48,5%		27,3%	
Grau ISUP 1 e 2	3,3%	1,00	6,7%	0,07	3,3%	0,26

Grau ISUP 3 e 4	5%		23,3%		13,3%	
--------------------	----	--	-------	--	-------	--

Adicionalmente, com base nas características clínicas e histológicas dos pacientes, foi possível perceber que pacientes com maior risco de progressão de doença, geralmente desenvolvem o modelo PDX de forma mais rápida do que aqueles pacientes com baixo risco de progressão ($p = 0,05$).

4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Dentre os vinte e sete casos em que foram observados estabelecimento dos modelos PDX, 22 casos são de carcinoma renal do tipo células claras, quatro casos são de carcinoma renal do tipo papilíferos, e um caso é do tipo carcinoma renal não classificável.

A seguir, na **Figura 12** podemos observar a caracterização realizada nos casos de carcinoma renal do tipo papilífero, entre o tumor primário e o tumor gerado no PDX.

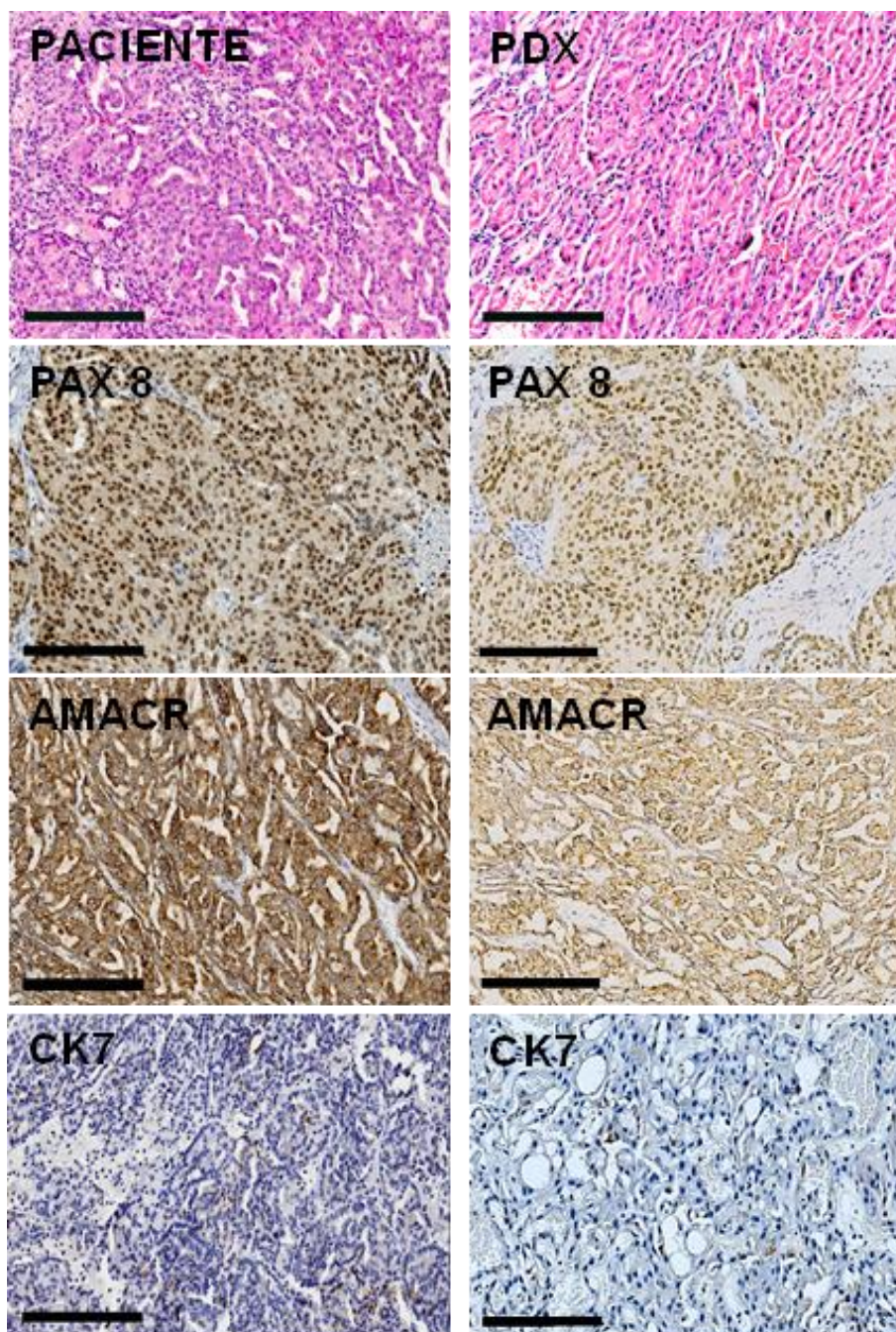


Figura 12: Caracterização histológica com Eosina e Hematoxilina (HE) e por imuno-histoquímica entre o tumor primário e PDX de carcinoma renal do tipo papilífero. Barra de calibração = 200um.

Para a caracterização destes casos, foram utilizados os seguintes marcadores:

Citoceratina 7 (CK7), PAX8 e Alfa-metilacil coenzima A racemase (AMACR).

Conforme esperado, a marcação para CK7 foi negativa, enquanto foi observada a marcação nuclear para PAX8, confirmando tratar-se de tecido renal, e expressão citoplasmática de AMCR, marcador específico para o subtipo Papilífero.

Devido a heterogeneidade histológica observada nos tumores renais, conseguimos estabelecer ainda, modelo de PDX de carcinoma renal papilífero, com marcação para CK7. Nestes casos, o subtipo histológico foi confirmado através da coloração de HE, associada positividade na expressão de CK7, tanto no tumor primário, quanto no PDX, conforme podemos observar na **Figura 13**.

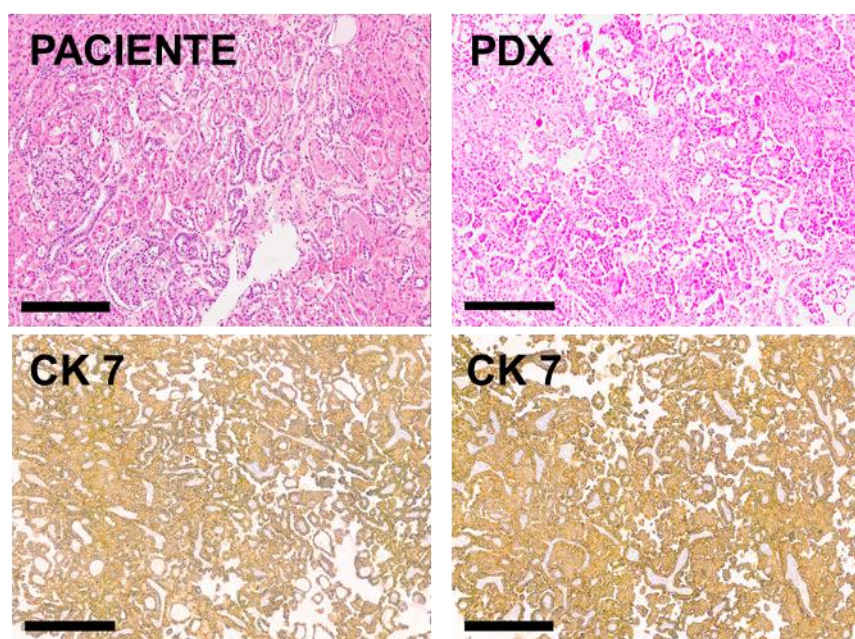


Figura 13: Caracterização histológica com HE e imuno-histoquímica entre o tumor primário e PDX de carcinoma renal do tipo papilífero. Barra de calibração = 200um.

Já nos casos de carcinoma renal do tipo células claras, foram utilizados os seguintes marcadores de diagnóstico: CK7, PAX8, e Anidrase Carbônica IX (CAIX).

Nestes casos, foi verificada a perda de expressão de CK7, associada a uma marcação positiva para CA IX e PAX 8, confirmando, portanto, o diagnóstico de carcinoma renal do tipo células claras, conforme podemos verificar na **Figura 14**.

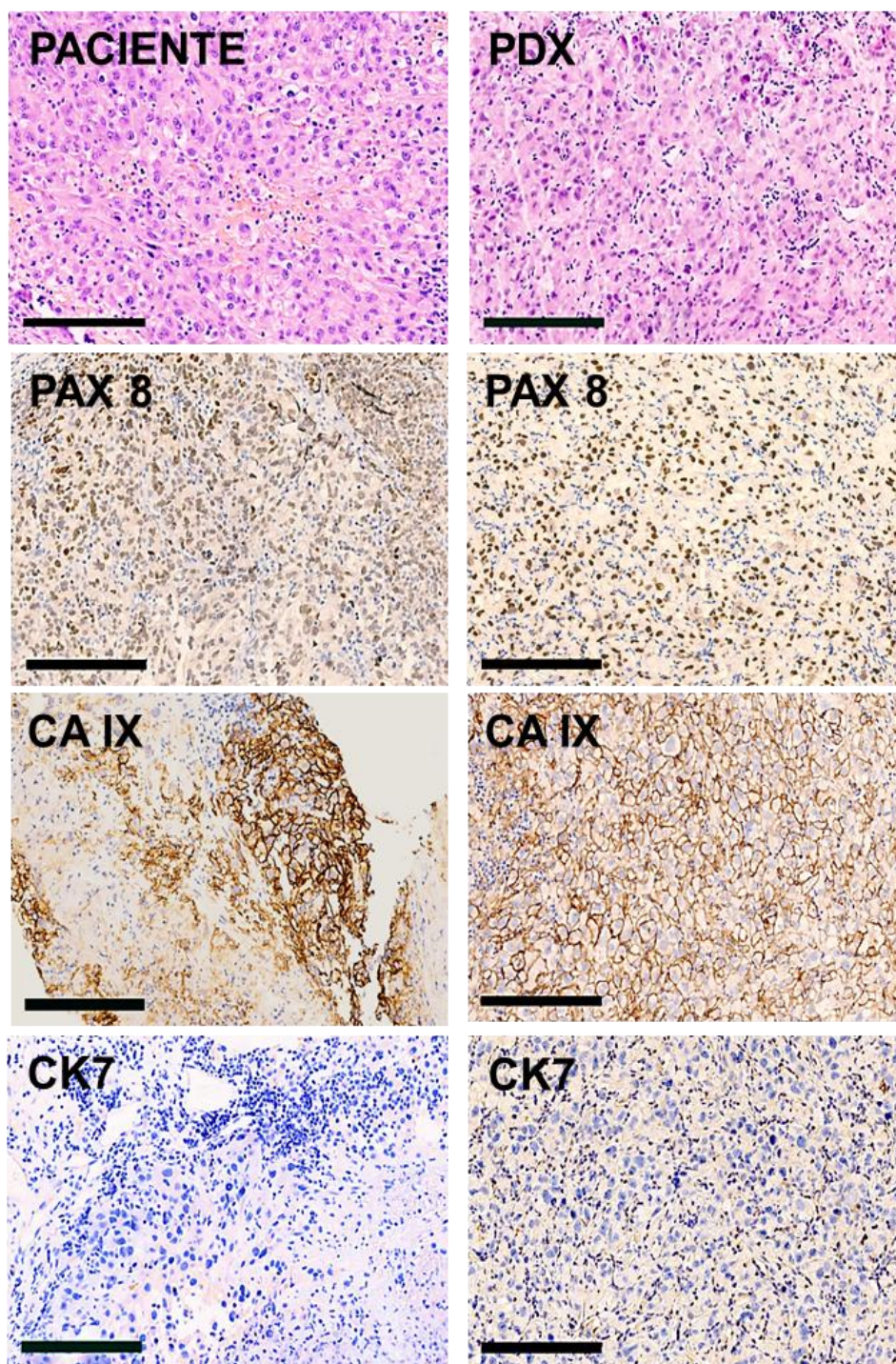


Figura 14: Caracterização por HE e imuno-histoquímica entre o tumor primário e PDX de carcinoma renal do tipo células claras. Barra de calibração = 200um.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DE CARCINOMA RENAL DO TIPO CÉLULAS CLARAS COM FORMAÇÃO DE TROMBOS TUMORAIS

A amostra de tumor primário utilizada para o estabelecimento deste modelo de estudo foi obtida a partir de uma paciente do sexo feminino, com 64 anos, que foi submetida a nefrectomia radical.

Clinicamente, a paciente foi diagnosticada com ccCCR, com grau de ISUP 4, estadiamento patológico pT3a, além da presença de necrose (60%), componente sarcomatoide (60%) e componente rabdoide (30%) da neoplasia.

Este caso, reflete um tumor extremamente agressivo, além das características descritas acima, a paciente apresentava infiltração da cápsula renal, gordura perirrenal e seio renal, associados com a invasão sanguínea e linfática.

Além disso, a paciente apresentou a formação de trombos tumorais em veia renal e artéria renal no momento do diagnóstico. Foi possível observar um rápido crescimento tumoral nos animais que receberam fragmentos oriundos deste tumor (um mês após a data de implante), em todos os animais implantados.

Durante a eutanásia e ressecção tumoral dos animais, foi observada a infiltração da veia renal e de um seguimento da veia cava inferior, culminando com oclusão vascular total em todos os animais implantados, conforme podemos observar na **Figura 15**.

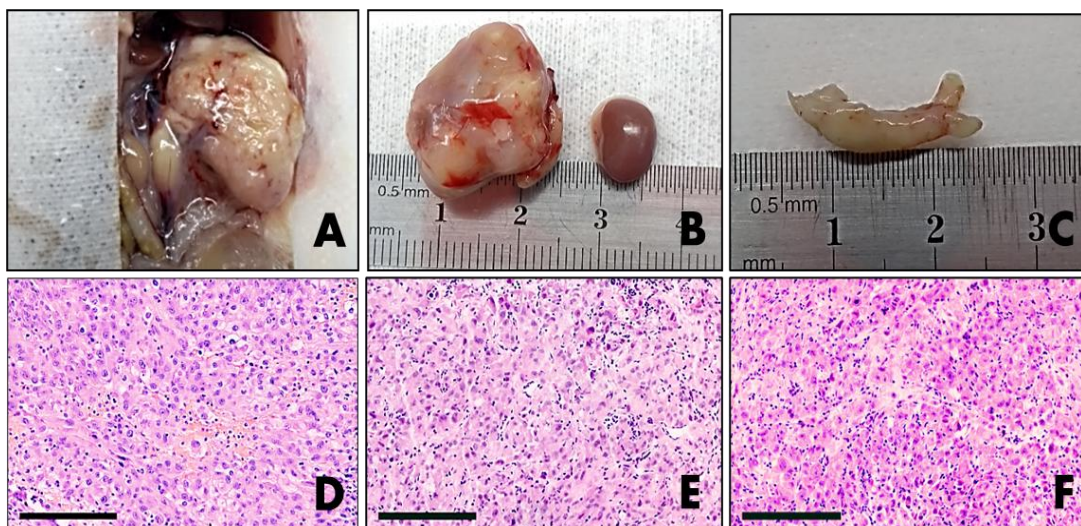


Figura 15: Confirmação histológica do estabelecimento de PDX de carcinoma renal de células claras com formação de trombos tumorais. **(A)** Evidência de crescimento tumoral com formação de trombo na veia cava inferior. **(B)** Comparação entre o rim afetado pelo tumor e o rim remanescente, na imagem, observa-se a oclusão de segmento da veia cava inferior. **(C)** Ressecção de veia cava inferior, e parte das íliacas, evidenciando a oclusão total do vaso pelo tumor. **(D)** Histologia (HE) realizada no tumor primário. **(E)** Histologia (HE) realizada no tumor do PDX. **(F)** Histologia (HE) realizada no trombo de veia cava inferior. Barra de calibração = 200µm.

Após a eutanásia dos animais, todas as amostras tumorais foram enviadas para análise histológica para fins confirmatórios.

Por se tratar de um tumor extremamente agressivo, e que se estabelece de forma rápida nos animais, foi possível estabelecer cultura primária a partir dos tumores gerados nos animais. Esta linhagem foi denominada CCR26 e foi estabelecida pela Pós-doutoranda Ethiene Castelucci Estevam.

Em seguida, foi possível realizar ensaios de tumorigênese com essa célula onde verificamos que tanto células de passagem baixa quanto alta são capazes de gerar tumores subcutâneos em animais NSG conforme ilustrado na **Figura 16**.



Figura 16: Ensaio de tumorigênese com cultura celular de Carcinoma Renal de Células Claras. **(A)** Evidência de crescimento tumoral. **(B)** Ressecção tumoral. **(C)** Análise histológica (HE) realizada para fins confirmatórios do fenótipo tumoral. Barra de calibração = 200um.

Os tumores gerados pela inoculação das células CCR26 apresentam a mesma morfologia observada nos tumores ortotópicos, e apresentam a mesma capacidade de invasão dos vasos sanguíneos e formar trombos tumorais em veia renal e veia cava inferior nos animais.

A paciente teve progressão de doença através da formação de metástases linfonodais, peritoneais e óssea, além da presença de nódulos bilaterais presentes no pulmão verificados por exame de tomografia computadorizada, compatíveis com metástase, evoluindo ao óbito, aproximadamente dois meses após a ressecção cirúrgica.

Tais características são classicamente associadas com mal prognóstico e sobrevida baixa entre os pacientes com CCR. Surpreendentemente, durante a eutanásia dos animais utilizados nesse caso, foi possível observar, ressecar e caracterizar todas as metástases presentes na paciente utilizada no estudo.

A caracterização das metástases macroscópicas observadas no PDX se deu por análise histológica e imuno-histoquímica, através da utilização de CAIX e PAX8, conforme pode-se observar na **Figura 17**.

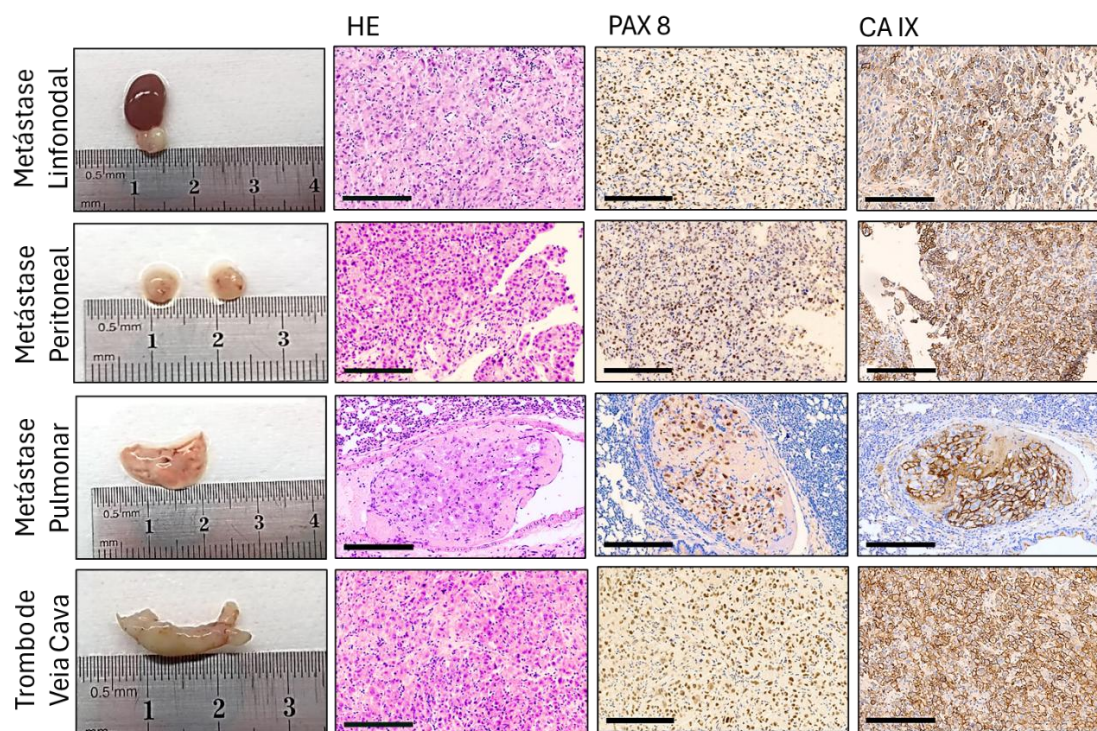


Figura 17. Caracterização histológica (HE) e por imuno-histoquímica das metástases observadas nos animais com carcinoma renal de células claras com trombo tumoral de veia cava inferior.

Devido a isso, realizamos sucessivas passagens dessa amostra tumoral com o intuito de verificar a manutenção dos fenótipos.

Foi possível perceber que mesmo em sucessivas passagens o PDX foi eficiente em recapitular a disseminação do tumor por meio da formação de trombos tumorais na veia renal e na cava inferior dos animais, assim como a formação de metástases macroscópicas.

O modelo PDX também preserva a manutenção do fenótipo imuno-histoquímico ao longo de sucessivas gerações, como podemos observar na **Figura 18**.

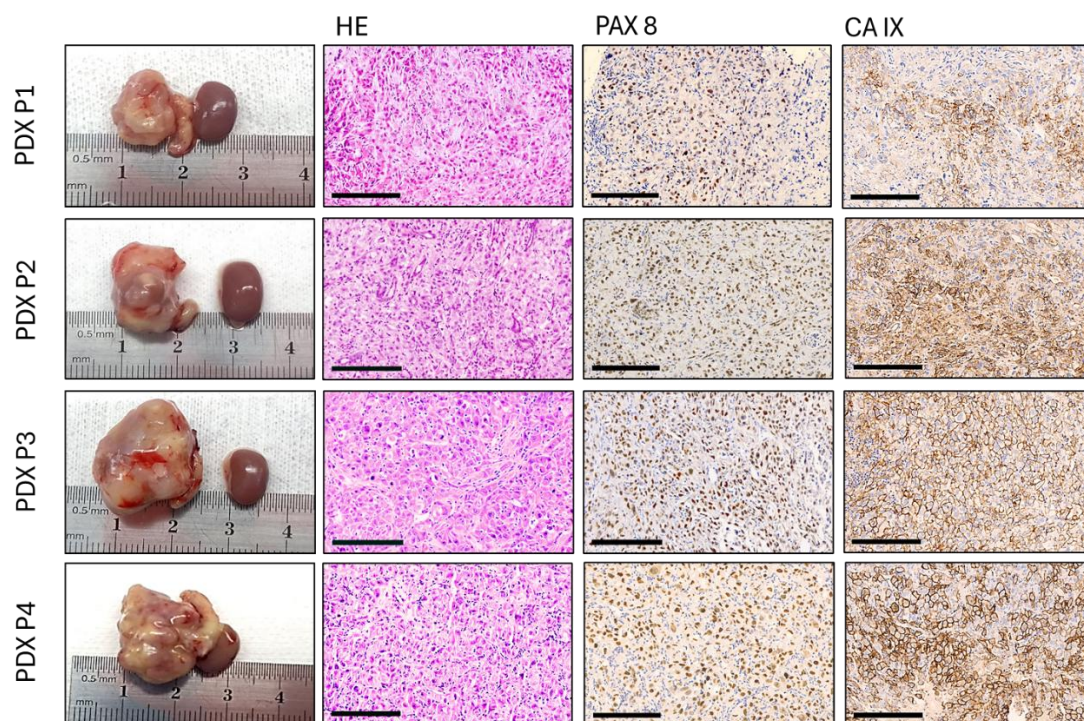


Figura 18. Caracterização histológica (HE) e por imuno-histoquímica de sucessivas passagens do carcinoma renal de células claras com a formação de trombo tumoral de veia cava inferior.

4.7 SEQUENCIAMENTO POR PAINÉIS GENÔMICOS

A caracterização por sequenciamento genômico dos 13 primeiros casos (ID 1 ao ID 13), foi realizada por meio de um painel customizado contendo 28 genes, encontrados frequentemente alterados em CCR.

Os resultados obtidos a partir desta caracterização encontram-se representados na **Tabela 8**.

Tabela 8: Caracterização por sequenciamento genômico, utilizando painel customizado composto por 28 genes. Realizado entre amostras de tumores primários e PDX no A.C.Camargo Cancer Center.

ID	Histologia	Estadiamento	Gene	HGVS c.	HGVS p.	Efeito	Frequência alélica (VAF) no tumor primário	Frequência alélica (VAF) no tumor do PDX
1	Células claras	pT1b	BAP1	c.517T >A	p.Tyr173Asn	Missense	10,0%	99,0%
			CDKN2A	c.262G>A	p.Glu88Lys	Missense	2,9%	ND
			TP53	c.711G>A	p.Met237Ile	Missense	10,9%	82,0%
			TP53	c.403delT	p.Cys135Alafs	LoF	6,7%	4,4%
2	Papilífero	pT3a N1	ARID1A	c.5904T >A	p.Cys1968Ter	LoF	42,0%	49,2%
			ARID1A	c.6781delA	p.Ile2261Serfs	LoF	42,8%	46,0%
3	Células claras	pT3a	VHL	c.344 345insC	p.Leu116Profs	LoF	28,5%	79,3%
			PBRM1	c.813+1G>A	p.spl?	LoF	31,8%	98,0%
			KDM5C	c.503delinsAG	p.Gln168Hisfs	LoF	47,0%	99,0%
4	Células claras	pT1a	VHL	c.349T >C	p.Trp117Arg	Missense	17,3%	ND
			PBRM1	c.457C>T	p.Gln153Ter	LoF	19,9%	ND
5	Células claras	pT1a	VHL	c.444delT	p.Phe148Leufs*11	LoF	46,1%	86,1%
			PBRM1	c.3253G>T	p.Glu1085Ter	LoF	50,5%	88,5%
			AR	c.170T >A	p.Leu57Gln	Missense	7,1%	2,4%
6	Células claras	pT3a	VHL	c.162 172delGGAGGCCGGGC	p.Glu55Alafs	LoF	53,3%	78,1%
			SETD2	c.4917+1G>A	p.spl?	LoF	54,2%	71,9%
			PBRM1	c.3079C>T	p.Arg1027Ter	LoF	50,3%	69,0%
7	Células claras	pT3b	SETD2	c.6837dupT	p.Val2280Cysfs*89	LoF	31,1%	68,1%
			KDM5C	c.1883 1903del	p.Gln628 Arg634del	Missense	26,9%	57,1%
8	Papilífero	pT1a	MET	c.3209T >C	p.Val1070Ala	Missense	51,5%	67,0%
			SMARCA4	c.3699G>A	p.Met1233Ile	Missense	37,8%	51,6%
9	Células claras	pT3a	VHL	c.280G>T	p.Glu94Ter	LoF	39,6%	99,1%
			SETD2	c.1265C>G	p.Ser422Ter	LoF	1,1%	ND
			PBRM1	c.1063A > T	p.Lys355Ter	LoF	0,0%	100,0%

9			PBRM1	c.778-1G>A	p.spl?	LoF	33.5%	ND
10	Células claras	pT3b	TP53	c.511G>A	p.Glu171Lys	Missense	32,8%	99,7%
11	Células claras	pT1a	VHL	c.287A >C	p.Gln96Pro	Missense	31,8%	99,9%
			PBRM1	c.447+1G>C	p.spl?	LoF	ND	99,9%
12	Células claras	pT3a	VHL	c.458T >C	p.Leu153Pro	Missense	21,2%	89,0%
			BAP1	c.38G>T	p.Gly13Val	Missense	19,8%	92,1%
			FAT1	c.5178delC	p.Phe1727Leufs*9	LoF	16,6%	ND
13	Papilífero	pT1a	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Legenda: Frequência alélica da variante (VAF); não detectado (ND); Perda de função (do inglês *loss of function* – LoF); Human Genome Variation Society (HGVS); Códon variante (HGVS c.); Proteína variante (HGVS p.); Xenoenxerto derivado do paciente (PDX).

As alterações encontradas nos respectivos tipos tumorais caracterizados até o momento, estão presentes em sua grande maioria, nos tumores primários e nos tumores gerados nos PDX.

O caso de ccCCR na **Tabela 8** corresponde ao ID 12 representa o caso de ccCCR com formação de trombos tumorais, caracterizado no item **4.6** e farmacologicamente testado no item **4.10** deste trabalho. Este mesmo caso foi caracterizado por sequenciamento de exoma, cujos resultados se encontram na **Tabela 12**.

Após a caracterização destes 13 casos iniciais, foi realizada a caracterização de outros 9 casos (ID 14 ao ID 22) utilizando o painel *Comprehensive Cancer Panel* (CCP) da *Thermo Fischer Scientific* composto por 409 genes.

Essa mudança entre os painéis utilizados no estudo foi necessária em consequência do tipo de painel que o grupo de genômica clínica utilizava para a caracterização dos casos de CCR com o decorrer do tempo.

Os resultados obtidos a partir desta caracterização se encontram brevemente descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9: Caracterização por sequenciamento genômico, utilizando o *Comprehensive Cancer Panel* (CCP), composto por 409 genes. Realizado entre amostras de tumores primários e PDX no A.C.Camargo Cancer Center.

ID	Histologia	Estadiamento	Gene	HGVS c.	HGVS p.	Efeito	Frequência alélica (VAF) no tumor primário	Frequência alélica (VAF) no tumor do PDX
14	Células claras	pT1b	CILK1	c.1106_1117delCAAGCCCGTTG	p.Pro369_Leu372del	Missense	29,0%	20,1%
			ATM	c.2119T>C	p.Ser707Pro	Missense	43%	41%
			ATM	c.2572T>C	p.Phe858Leu	Missense	33%	32%
15	Células claras	pT3a	VHL	c.287A>C	p.Gln96Pro	Missense	10,0%	ND
			ASXL1	c.3306G>T	p.Glu1102Asp	Missense	22%	ND
16	Não classificável	pT3a	MTOR	c.7280T>A	p.Leu2427Gln	Missense	14%	99,0%
			RECQL4	c.3622C>T	p.Arg1208Cys	Missense	50%	65,0%
			ATM	c.1229T>C	p.Val410Ala	Missense	39%	34%
			ERBB3	c.3518G>A	p.Arg1173Gln	Missense	36%	53%
17	Células claras	pT3a	PKHD1	c.9577G>A	p.Val3193Ile	Missense	43%	46,7%
			TNFAIP3	c.2254C>T	p.Pro752Ser	Missense	11,0%	ND
			MET	c.504G>T	p.Glu168Asp	Missense	11,0%	ND
			AMER1	c.876G>C	p.Lys292Asn	Missense	34,8%	30,9%
18	Células claras	pT3a	ADGRA2	c.958G>A	p.Val320Met	Missense	32,5%	ND%
19	Células claras	pT3a	TP53	c.844C>T	p.Arg282Trp	Missense	24,0%	0,0%
20	Células claras	pT3a	VHL	c.456_457delAC	p.Leu153Alafs*20	Lof	70,3%	84,8%
			PIK3CA	c.1633G>A	p.Glu545Lys	Missense	26,0%	36,1%
			ATM	c.8762C>T	p.Thr2921Met	Missense	45%	45,5%
21	Células claras	pT3a	EPHA3	c.2872G>A	p.Val958Met	Missense	1%	ND
			TET2	c.1924C>T	p.Gln642Ter	Lof	10,9%	ND
			EP400	c.6014G>A	p.Arg2005Gln	Missense	1%	ND

22	Células claras	pT3a	SETD2	c.2691_2692delCT	p.Leu898Glufs*17	<i>Lof</i>	14,5%	ND
----	-------------------	------	--------------	------------------	------------------	------------	-------	----

Legenda: Frequência alélica da variante (VAF); não detectado (ND); Perda de função (do inglês *loss of function* – LoF); Human Genome Variation Society (HGVS); Códon variante (HGVS c.); Proteína variante (HGVS p.); Xenoenxerto derivado do paciente (PDX).

4.8 SEQUENCIAMENTO DE EXOMA COMPLETO

Além da caracterização genômica realizada por *target sequencing*, também realizamos sequenciamento de exoma completo cinco casos, sendo três casos de ccCCR e dois casos de pCCR.

4.8.1 SEQUENCIAMENTO DE EXOMA COMPLETO NOS CASOS DE ccCCR

Os três casos de ccCCR, estão identificados como: ccCCR (ID 1), ccCCR (ID 2) e ccCCR (ID 12). A caracterização molecular por sequenciamento de exoma nos três casos de ccCCR se encontra descrita respectivamente na **Tabela 10**, **Tabela 11** e **Tabela 12**.

Tabela 10: Caracterização por sequenciamento de exoma, realizado entre amostras de tumores primários e PDX de ccCCR (ID 1) no A.C.Camargo Cancer Center.

Histologia ID	Estadiamento	Gene	HGVS c.	HGVS p.	Efeito	Frequência alélica (VAF) no tumor primário	Frequência alélica (VAF) no tumor do PDX
Células claras (ID 1)	pT1b	ADAMTS16	c.3653C>G	p.Thr1218Ser	<i>Missense</i>	7,40%	47,10%
		AP1M2	c.1129G>A	p.Gly377Arg	<i>Missense</i>	9,80%	41,70%
		ARHGEF19	c.482A>C	p.Glu161Ala	<i>Missense</i>	10,50%	64,50%
		BAP1	c.517T>A	p.Tyr173Asn	<i>Missense</i>	10,60%	100,00%
		BCOR	c.1726G>T	p.Ala576Ser	<i>Missense</i>	8,70%	39,40%
		CCHCR1	c.73T>A	p.Cys25Ser	<i>Missense</i>	9,80%	75,60%
		CD4	c.1171T>G	p.Ser391Ala	<i>Missense</i>	2,30%	8,00%
		CLDN24	c.607C>A	p.Gln203Lys	<i>Missense</i>	11,20%	37,30%
		CRB1	c.1469G>T	p.Gly490Val	<i>Missense</i>	9,40%	65,50%
		DDIT4	c.658A>C	p.Lys220Gln	<i>Missense</i>	9,20%	39,70%
		DNAJA3	c.1120G>C	p.Val374Leu	<i>Missense</i>	14,50%	44,20%
		EDEM1	c.8G>T	p.Trp3Leu	<i>Missense</i>	12,40%	96,40%
		FZD5	c.739T>C	p.Phe247Leu	<i>Missense</i>	6,30%	40,90%
		GTF2I	c.623T	p.Ile208Thr	<i>Missense</i>	5,80%	88,20%
		HOXD8	c.771_773delCAA	p.Asn257del	<i>Missense</i>	9,10%	56,00%
		INVS	c.823T>A	p.Leu275Ile	<i>Missense</i>	8,50%	35,70%
		IRF3	c.1169C>T	p.Thr390Ile	<i>Missense</i>	8,40%	56,90%
		KANSL3	c.458C>T	p.Ala153Val	<i>Missense</i>	11,20%	59,40%
		KCND3	c.136G>A	p.Val46Met	<i>Missense</i>	7,20%	67,00%
		KCNMA1	c.34_36delAGC	p.Ser12del	<i>Missense</i>	5,30%	2,60%
		KIF20A	c.1026_1027+9delAGGTAAAGGAA	p.?	<i>LoF</i>	3,80%	25,60%
		KLKB1	c.170G>C	p.Cys57Ser	<i>Missense</i>	7,70%	51,10%

Células claras (ID 1)	pT1b	KRT4	c.346C>A	p.Gln116Lys	<i>Missense</i>	8,00%	51,40%
		LGR4	c.673G>C	p.Asp225His	<i>Missense</i>	7,00%	33,30%
		MATN2	c.2094G>C	p.Gln698His	<i>Missense</i>	10,70%	36,60%
		MATN3	c.511G>C	p.Asp171His	<i>Missense</i>	13,70%	51,50%
		MKNK2	c.1393G>T	p.Ala465Ser	<i>Missense</i>	13,80%	47,00%
		MRPS31	c.707_720delCTGGCCAGGAGAAG	p.Pro236Hisfs*3	<i>LoF</i>	6,50%	40,00%
		MTIF3	c.424A>T	p.Arg142Trp	<i>Missense</i>	8,50%	74,10%
		MUC12	c.970T>A	p.Leu324Met	<i>Missense</i>	9,10%	38,80%
		MYCBP2	c.9112T>C	p.Phe3038Leu	<i>Missense</i>	6,60%	59,10%
		NLRC3	c.2381G>A	p.Gly794Asp	<i>Missense</i>	7,40%	61,90%
		NUP205	c.1150C>G	p.Gln384Glu	<i>Missense</i>	9,70%	61,30%
		NYAP2	c.846C>A	p.Asp282Glu	<i>Missense</i>	10,90%	54,20%
		OR5T2	c.833T>A	p.Ile278Asn	<i>Missense</i>	5,90%	54,00%
		PCDHA1	c.178G>C	p.Val60Leu	<i>Missense</i>	11,10%	27,90%
		PCDHA13	c.1702C>A	p.Pro568Thr	<i>Missense</i>	9,20%	34,00%
		PDE4DIP	c.236A>G	p.Asn79Ser	<i>Missense</i>	9,80%	18,50%
		PGR	c.494T>C	p.Met165Thr	<i>LoF</i>	14,60%	39,10%
		PHF2	c.2137G>A	p.Val713Met	<i>Missense</i>	13,30%	39,40%
		PRAM1	c.1957G>A	p.Asp653Asn	<i>Missense</i>	6,30%	37,00%
		RSPO2	c.454G>A	p.Glu152Lys	<i>Missense</i>	9,70%	33,30%
		SART3	c.295G>A	p.Glu99Lys	<i>Missense</i>	5,60%	48,30%
		SIPA1L2	c.179G>A	p.Gly60Asp	<i>Missense</i>	8,40%	57,60%
		SLC6A9	c.1535G>A	p.Gly512Asp	<i>Missense</i>	3,10%	60,50%
		SMAD3	c.382C>T	p.Gln128Ter	<i>LoF</i>	7,80%	51,00%
		SPEN	c.8920C>T	p.Gln2974Ter	<i>LoF</i>	9,70%	36,50%
		ST6GAL2	c.1421A>T	p.Asp474Val	<i>Missense</i>	13,70%	36,80%
		SYCP2L	c.1720G>A	p.Glu574Lys	<i>Missense</i>	8,00%	28,30%

Células claras (ID 1)	pT1b	TAF9B	c.263C>T	p.Pro88Leu	<i>Missense</i>	9,70%	41,50%
		TP53	c.711G>A	p.Met237Ile	<i>Missense</i>	3,80%	84,60%
		TRHDE	c.3064G>C	p.Glu1022Gln	<i>Missense</i>	11,60%	65,60%
		TRIM54	c.399G>C	p.Lys133Asn	<i>Missense</i>	7,70%	49,00%
		TRIM71	c.310G>A	p.Ala104Thr	<i>Missense</i>	11,80%	100,00%
		VPS13D	c.4932C>A	p.Ser1644Arg	<i>Missense</i>	1,30%	3,70%
		VSTM2B	c.198G>C	p.Trp66Cys	<i>Missense</i>	7,60%	45,50%
		YTHDF1	c.1372T>C	p.Tyr458His	<i>Missense</i>	9,60%	40,00%
		ZAN	c.3335A>G	p.Asn1112Ser	<i>Missense</i>	10,70%	37,30%
		ZNF100	c.941T>A	p.Val314Glu	<i>Missense</i>	6,00%	5,30%
		ZNF107	c.2116C>A	p.Gln706Lys	<i>Missense</i>	3,40%	8,20%
		ZNF117	c.1057G>T	p.Val353Leu	<i>Missense</i>	3,70%	7,30%
		ZNF117	c.966C>A	p.Asp322Glu	<i>Missense</i>	3,90%	3,60%
		ZNF43	c.2194C>A	p.Gln732Lys	<i>Missense</i>	6,00%	2,10%
		ZNF596	c.1290C>A	p.His430Gln	<i>Missense</i>	4,00%	1,90%
		ZNF675	c.1333C>A	p.Leu445Ile	<i>Missense</i>	8,30%	4,50%
		ZNF695	c.1191G>T	p.Gln397His	<i>Missense</i>	4,70%	12,10%
		ZNF850	c.2414C>A	p.Pro805Gln	<i>Missense</i>	3,30%	2,20%
		ZNF850	c.2191G>T	p.Gly731Cys	<i>Missense</i>	6,60%	11,30%
		ZNF99	c.1122C>A	p.Cys374Ter	<i>LoF</i>	6,60%	59,30%
		ZSWIM4	c.3170G>C	p.Gly1057Ala	<i>Missense</i>	10,20%	36,80%

Legenda: Identificação (ID); Frequência alélica da variante (VAF); não detectado (ND); Perda de função (do inglês *loss of function* – LoF); Human Genome Variation Society (HGVS); Códon variante (HGVS c.); Proteína variante (HGVS p.); Xenoenxerto derivado do paciente (PDX).

Tabela 11: Caracterização por sequenciamento de exoma, realizado entre amostras de tumores primários e PDX de ccCCR (ID 3) no A.C.Camargo Cancer Center.

Histologia ID	Estadiamento	Gene	HGVS c.	HGVS p.	Efeito	Frequência alélica (VAF) no tumor primário	Frequência alélica (VAF) no tumor do PDX
Células claras (ID 3)	pT3aN1	ADAM20	c.553delG	p.Glu185Serfs*10	<i>LoF</i>	23,90%	42,90%
		CFAP52	c.901G>A	p.Glu301Lys	<i>Missense</i>	46,40%	48,90%
		GMPR2	c.37A>G	p.Lys13Glu	<i>Missense</i>	48,30%	35,00%
		KCNN2	c.1857C>A	p.His619Gln	<i>Missense</i>	55,70%	55,70%
		KDM5C	c.503delinsTC	p.Gln168Leufs*10	<i>LoF</i>	44,30%	38,70%
		MFHAS1	c.1149G>T	p.Glu383Asp	<i>Missense</i>	36,50%	28,00%
		OR4K2	c.42G>C	p.Leu14Phe	<i>Missense</i>	15,30%	48,40%
		PBRM1	c.813+1G>A	-	<i>LoF</i>	61,50%	100,00%
		PLSCR3	c.613T>A	p.Leu205Met	<i>Missense</i>	18,20%	50,00%
		SLC7A2	c.1638G>T	p.Arg546Ser	<i>Missense</i>	40,70%	28,00%
		ST18	c.1097C>T	p.Thr366Ile	<i>Missense</i>	44,40%	100,00%
		VHL	c.346dupC	p.Leu116Profs*16	<i>LoF</i>	62,30%	62,30%
		WNK2	c.2072G>A	p.Cys691Tyr	<i>Missense</i>	57,50%	26,30%
		ZNF292	c.3496C>T	p.Pro1166Ser	<i>Missense</i>	18,60%	26,20%

Legenda: Identificação (ID); Frequência alélica da variante (VAF); não detectado (ND); Perda de função (do inglês *loss of function* – LoF); Human Genome Variation Society (HGVS); Códon variante (HGVS c.); Proteína variante (HGVS p.); Xenoinxerto derivado do paciente (PDX).

Tabela 12: Caracterização por sequenciamento de exoma, realizado entre amostras de tumores primários e PDX de ccCCR (ID 12) no A.C.Camargo Cancer Center.

Histologia ID	Estadiamento	Gene	HGVS c.	HGVS p.	Efeito	Frequência alélica (VAF) no tumor primário	Frequência alélica (VAF) no tumor do PDX
Células claras (ID 12)	pT3a	ANK3	c.12538A>T	p.Ile4180Phe	<i>Missense</i>	9,40%	66,70%
		ARHGAP22	c.686C>A	p.Ser229Tyr	<i>Missense</i>	10,50%	93,50%
		ARHGAP22	c.199T>G	p.Phe67Val	<i>Missense</i>	3,20%	27,30%
		ARSF	c.1670A>T	p.Gln557Leu	<i>Missense</i>	6,30%	52,00%
		BAG4	c.595C>G	p.Pro199Ala	<i>Missense</i>	33,30%	100,00%
		BAP1	c.38G>T	p.Gly13Val	<i>Missense</i>	20,80%	100,00%
		CCNT1	c.203G>C	p.Arg68Pro	<i>Missense</i>	6,90%	66,70%
		DKK1	c.685delC	p.His229Metfs*3	<i>LoF</i>	3,50%	25,00%
		EGR3	c.333G>C	p.Leu111Phe	<i>Missense</i>	20,80%	100,00%
		FANCF	c.541G>A	p.Glu181Lys	<i>Missense</i>	8,30%	59,50%
		HMCN1	c.11282C>A	p.Ser3761Tyr	<i>Missense</i>	100,00%	30,00%
		NEDD4L	c.1157G>C	p.Gly386Ala	<i>Missense</i>	3,70%	100,00%
		OR10Q1	c.153G>A	p.Trp51Ter	<i>LoF</i>	10,70%	51,30%
		SHLD2	c.218T>G	p.Leu73Arg	<i>Missense</i>	13,80%	54,20%
		TFE3	c.313G>A	p.Ala105Thr	<i>Missense</i>	0,70%	17,90%
		TOE1	c.1342G>C	p.Gly448Arg	<i>Missense</i>	4,00%	75,60%
		TRA2B	c.152G>T	p.Arg51Met	<i>Missense</i>	9,40%	74,10%
		UPF1	c.1442C>T	p.Thr481Ile	<i>Missense</i>	2,00%	42,90%
		VHL	c.458T>C	p.Leu153Pro	<i>Missense</i>	14,80%	100,00%

Legenda: Identificação (ID); Frequência alélica da variante (VAF); não detectado (ND); Perda de função (do inglês *loss of function* – LoF); Human Genome Variation Society (HGVS); Códon variante (HGVS c.); Proteína variante (HGVS p.); Xenoenxerto derivado do paciente (PDX).

Além desses casos de ccCCR caracterizados por sequenciamento de exoma, outros dois casos de pCCR também foram caracterizados.

4.8.2 SEQUENCIAMENTO DE EXOMA COMPLETO NOS CASOS DE pCCR

Os dois casos de pCCR, estão identificados como: pCCR (ID 2) e pCCR (ID 13). A caracterização molecular por sequenciamento de exoma nesses casos se encontra descrita respectivamente na **Tabela 13** e **Tabela 14**.

Tabela 13: Caracterização por sequenciamento de exoma, realizado entre amostras de tumores primários e PDX de pCCR (ID 2) no A.C.Camargo Cancer Center.

Histologia ID	Estadiamento	Gene	HGVS c.	HGVS p.	Efeito	Frequência alélica (VAF) no tumor primário	Frequência alélica (VAF) no tumor do PDX
Papilífero (ID 2)	pT3aN1	AMIGO2	c.302G>C	p.Arg101Pro	<i>Missense</i>	67,50%	28,20%
		ANHX	c.1370_1373dupAGTG	p.Cys458Ter	<i>LoF</i>	31,70%	50,80%
		ANO8	c.947T>C	p.Leu316Pro	<i>Missense</i>	42,30%	48,50%
		ANPEP	c.239T>C	p.Leu80Pro	<i>Missense</i>	44,00%	44,30%
		AP2A2	c.884A>G	p.Lys295Arg	<i>Missense</i>	45,70%	56,50%
		ARID1A	c.5904T>A	p.Cys1968Ter	<i>LoF</i>	42,90%	50,70%
		ARID1A	c.6781delA	p.Ile2261Serfs*6	<i>LoF</i>	46,40%	40,20%
		ATP5MF	c.348C>G	p.Asn116Lys	<i>Missense</i>	9,40%	14,30%
		BAHCC1	c.6146G>C	p.Arg2049Pro	<i>Missense</i>	63,20%	59,10%
		CARD6	c.1365C>G	p.Ile455Met	<i>Missense</i>	11,40%	24,70%
		CCT8L2	c.1303G>A	p.Gly435Arg	<i>Missense</i>	39,50%	7,40%
		CD248	c.1400C>T	p.Pro467Leu	<i>Missense</i>	41,80%	40,60%
		CDK17	c.946C>A	p.Pro316Thr	<i>Missense</i>	20,80%	51,10%
		CEP135	c.1832A>C	p.Glu611Ala	<i>Missense</i>	37,30%	16,70%
		CEP76	c.1370G>T	p.Gly457Val	<i>Missense</i>	35,40%	49,30%
		CFLAR	c.995C>A	p.Pro332His	<i>Missense</i>	46,20%	43,90%
		COL6A5	c.1553G>A	p.Gly518Glu	<i>Missense</i>	61,00%	68,50%
		CRACD	c.2263G>A	p.Glu755Lys	<i>Missense</i>	34,40%	43,90%
		DPP10	c.247G>T	p.Asp83Tyr	<i>Missense</i>	48,90%	52,40%
		ERBIN	c.1511G>T	p.Arg504Ile	<i>Missense</i>	43,50%	57,60%
		FBXL5	c.1531T>C	p.Ser511Pro	<i>Missense</i>	52,80%	42,90%
		HEG1	c.1055C>T	p.Pro352Leu	<i>Missense</i>	28,40%	33,10%

Papilífero (ID 2)	pT3aN1	HERC5	c.209G>T	p.Gly70Val	Missense	50,00%	36,80%
		IL17RE	c.19G>A	p.Ala7Thr	Missense	50,40%	62,50%
		KCNA4	c.1039C>T	p.His347Tyr	Missense	34,20%	57,60%
		KCNK2	c.87G>C	p.Gln29His	Missense	47,80%	44,10%
		KLF15	c.230T>C	p.Leu77Ser	Missense	22,00%	19,90%
		LAMA3	c.1501G>A	p.Glu501Lys	Missense	40,20%	49,70%
		LILRB1	c.538G>A	p.Ala180Thr	Missense	42,00%	1%
		LOC105373609	c.437A>G	p.Lys146Arg	Missense	39,60%	47,70%
		LPO	c.583delG	p.Val195Tyrfs*9	LoF	23,20%	51,60%
		MAP3K6	c.2257C>T	p.Arg753Cys	Missense	5,60%	38,20%
		MPO	c.851G>C	p.Ser284Thr	Missense	51,40%	44,10%
		MYO5B	c.1795G>A	p.Val599Ile	Missense	44,30%	56,90%
		MYO7B	c.1310A>G	p.Asp437Gly	Missense	35,50%	58,70%
		OPCML	c.263C>T	p.Pro88Leu	Missense	45,50%	66,70%
		OR2B6	c.930A>C	p.Leu310Phe	Missense	68,90%	43,40%
		OVOL1	c.523A>T	p.Lys175Ter	LoF	42,00%	43,50%
		PI4KA	c.487G>A	p.Gly163Ser	Missense	47,50%	12,70%
		PPFIA2	c.2549G>A	p.Arg850Gln	Missense	21,70%	27,60%
		PRELID2	c.398C>T	p.Ser133Leu	Missense	53,50%	68,80%
		PRICKLE3	c.1606G>T	p.Ala536Ser	Missense	81,00%	34,40%
		RPL3L	c.514C>T	p.Pro172Ser	Missense	28,80%	53,10%
		SLC22A11	c.1430T>C	p.Met477Thr	Missense	28,40%	50,00%
		SLC22A7	c.209C>A	p.Pro70His	Missense	48,10%	22,50%
		SRCAP	c.8242C>T	p.Arg2748Ter	LoF	48,80%	68,10%
		SYT9	c.599C>G	p.Pro200Arg	Missense	43,80%	60,90%
		TMEM129	c.217G>A	p.Gly73Ser	Missense	44,00%	28,60%
		TRIM33	c.431C>A	p.Pro144His	Missense	38,60%	33,30%

Papilífero (ID 2)	pT3aN1	TSC22D4	c.935C>G	p.Ser312Cys	Missense	17,30%	40,20%
		WDR33	c.112A>G	p.Met38Val	Missense	29,40%	55,60%
		XIRP2	c.1263G>T	-	Missense	33,30%	57,60%
		XRCC5	c.1219G>A	p.Val407Met	Missense	53,00%	57,40%
		ZKSCAN4	c.501_519del	p.Ser167Argfs*37	LoF	31,20%	47,10%

Legenda: Identificação (ID); Frequência alélica da variante (VAF); não detectado (ND); Perda de função (do inglês *loss of function* – LoF); Human Genome Variation Society (HGVS); Códon variante (HGVS c.); Proteína variante (HGVS p.); Xenoenxerto derivado do paciente (PDX).

Tabela 14: Caracterização por sequenciamento de exoma, realizado entre amostras de tumores primários e PDX de ccCCR (ID 13) no A.C.Camargo Cancer Center.

Histologia	Estadiamento	Gene	HGVS c.	HGVS p.	Efeito	Frequência alélica (VAF) no tumor primário	Frequência alélica (VAF) no tumor do PDX
Papilífero (ID 13)	pT1a	ARFGAP2	c.484C>G	p.Pro162Ala	Missense	39,60%	55,70%
		BCAT1	c.884T>C	p.Leu295Pro	Missense	43,30%	80,80%
		COL11A2	c.3260G>A	p.Gly1087Asp	Missense	52,10%	53,80%
		COL12A1	c.1226G>T	p.Gly409Val	Missense	49,70%	41,90%
		FADS6	c.943C>T	p.Gln315Ter	LoF	60,90%	37,30%
		GAD1	c.639-1453G>T	-	Missense	37,00%	47,30%
		GRIN2C	c.1728C>A	p.Tyr576Ter	LoF	24,90%	60,80%
		ISL1	c.219-2delA	-	LoF	40,00%	50,70%
		ISL2	c.704T>A	p.Ile235Asn	Missense	42,50%	41,40%
		ISX	c.323A>G	p.Asp108Gly	Missense	34,30%	31,70%
		LDB3	c.1171C>T	p.Pro391Ser	Missense	40,70%	50,60%
		LPCAT1	c.1402A>C	p.Lys468Gln	Missense	36,50%	49,60%

Papilífero (ID 13)	pT1a	MYCT1	c.556delA	p.Thr186Leufs*17	<i>LoF</i>	38,00%	44,60%
		OR10K1	c.795T>G	p.Asn265Lys	<i>Missense</i>	41,20%	45,60%
		OR4F15	c.819T>G	p.Ile273Met	<i>Missense</i>	44,20%	25,00%
		PCDHGA7	c.1868C>T	p.Thr623Met	<i>Missense</i>	37,20%	48,30%
		PTPRR	c.588A>C	p.Gln196His	<i>Missense</i>	40,40%	51,80%
		RNF213	c.12008A>T	p.Asp4003Val	<i>Missense</i>	29,70%	46,50%
		SAMD11	c.2356C>T	p.Pro786Ser	<i>Missense</i>	36,30%	47,10%
		SKOR2	c.198G>T	p.Gln66His	<i>Missense</i>	45,40%	29,80%
		SLC25A23	c.1301T>G	p.Leu434Arg	<i>Missense</i>	38,90%	45,10%
		SLMAP	c.2206G>T	p.Glu736Ter	<i>LoF</i>	34,10%	50,80%
		SNCAIP	c.1513T>A	p.Cys505Ser	<i>Missense</i>	40,80%	33,30%
		STAT1	c.1960A>C	p.Met654Leu	<i>Missense</i>	47,10%	50,50%
		TPCN1	c.308C>A	p.Ala103Glu	<i>Missense</i>	31,50%	44,60%
		TRPV6	c.1971delG	-	<i>LoF</i>	64,90%	56,00%
		WDR46	c.748C>A	p.Leu250Met	<i>Missense</i>	40,30%	53,80%

Legenda: Identificação (ID); Frequência alélica da variante (VAF); não detectado (ND); Perda de função (do inglês *loss of function* – LoF); Human Genome Variation Society (HGVS); Códon variante (HGVS c.); Proteína variante (HGVS p.); Xenoenxerto derivado do paciente (PDX).

4.9 TRATAMENTO COM TERAPIAS ANTIANGIOGÊNICAS

Para a avaliação do efeito de terapias-alvo, foi escolhido um caso de PDX com ccCCR de alto grau histológico e alto estadiamento patológico, com a capacidade de desenvolvimento ectópico (subcutâneo), pois a avaliação da cinética de crescimento envolve a aferição diária das lesões com auxílio de um paquímetro.

Além da caracterização genômica também foi realizado ensaios de crescimento tumoral *in vivo*, para o teste de terapias alvo. As mutações identificadas no tumor primário foram mutações em *VHL*, *BAP1* e *FAT1*, das quais, as mutações em *VHL* e *BAP1* estavam presentes também no tumor do PDX. Essas análises foram confirmadas por meio de sequenciamento por painel (**Tabela 8, ID 12**), sequenciamento por exoma completo (**Tabela 12, ID 12**).

O esquema terapêutico utilizado está ilustrado na **Figura 7**. Com 15 dias de tratamento, já foi possível notar atividade antitumoral óbvia do sunitinibe, em comparação com o grupo controle.

Essa avaliação inicial com 15 dias de tratamento foi realizada porque foi o momento que os tumores do grupo controle começaram a atingir 1 cm³, sendo possível, neste momento, observar diferenças estatísticas com os grupos tratados com sunitinibe e belzutifan, conforme podemos observar na **Figura 19**.

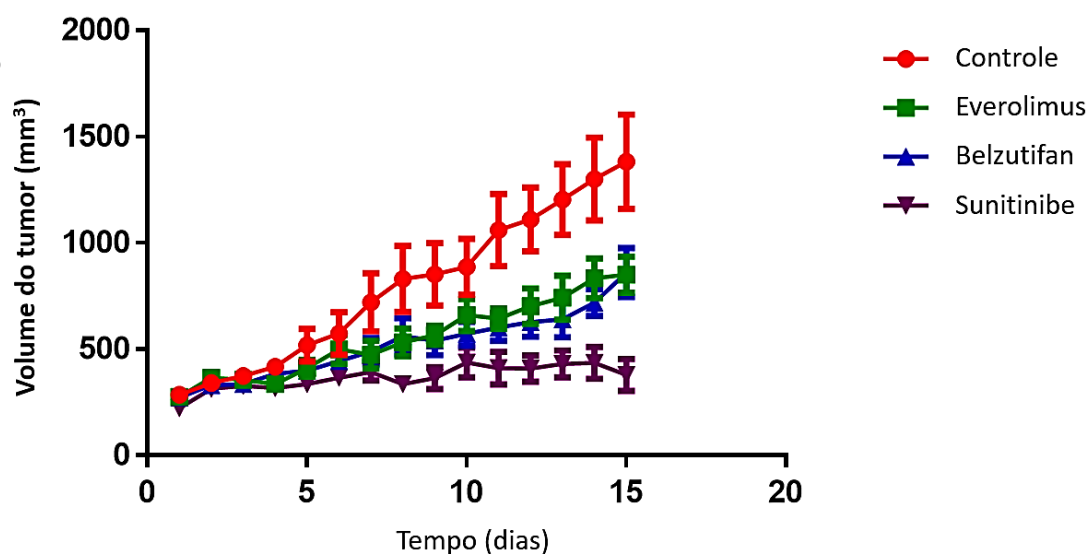


Figura 19: Efeito do tratamento terapêutico direcionado no modelo PDX/CCR. Com 15 dias de tratamento, já é possível perceber a atividade antitumoral óbvia para o sunitinibe em comparação ao grupo controle ($p = 0,001$). Foi observada uma redução significativa no volume do tumor com o tratamento com Belzutifan ($p = 0,05$). Não houve diferença significativa no tratamento com everolimus em comparação com o grupo controle. O gráfico mostra diferença significativa entre os grupos tratados com sunitinibe e belzutifan, através do teste estatístico Ordinary Two-way ANOVA seguido de comparação múltipla de Bonferroni. $P < 0,05$; $P < 0,001$.

A **Figura 20** mostra a sobrevida dos camundongos tratados, o desfecho primário foi o dia que um tumor atinge 1 cm^3 , onde foi possível observar que todos os tratamentos estão associados ao aumento da sobrevida dos animais.

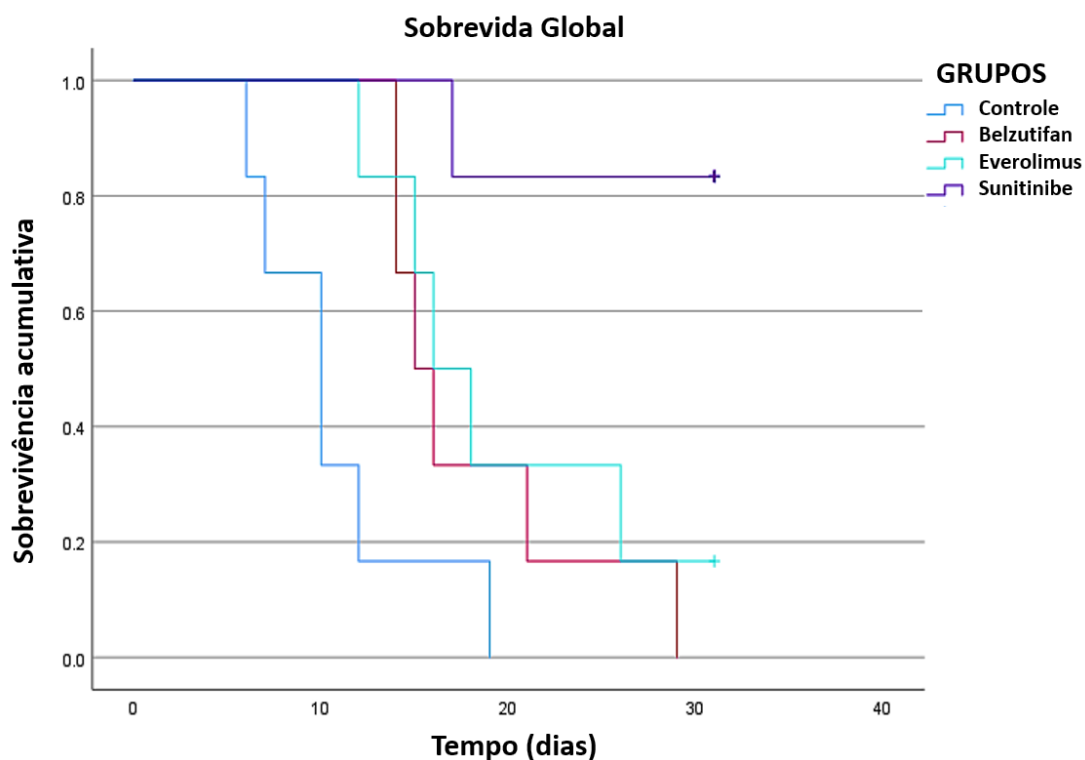


Figura 20: Sobrevida global entre os diferentes grupos de tratamentos com terapias-alvo ($n = 5$). O tratamento com everolimus ($p = 0,02$), e sunitinibe ($p = 0,01$) estão relacionados com maior sobrevida global entre os animais, em comparação com o grupo controle. Não foi observada melhora na sobrevida dos animais tratados com Belzutifan ($p = 0,06$).

Após o tratamento, os animais foram eutanasiados, os tumores foram ressecados e pesados. Morfologicamente, é possível perceber a diferença entre os efeitos dos tratamentos em cada um dos grupos do estudo, conforme podemos observar na **Figura 21**.

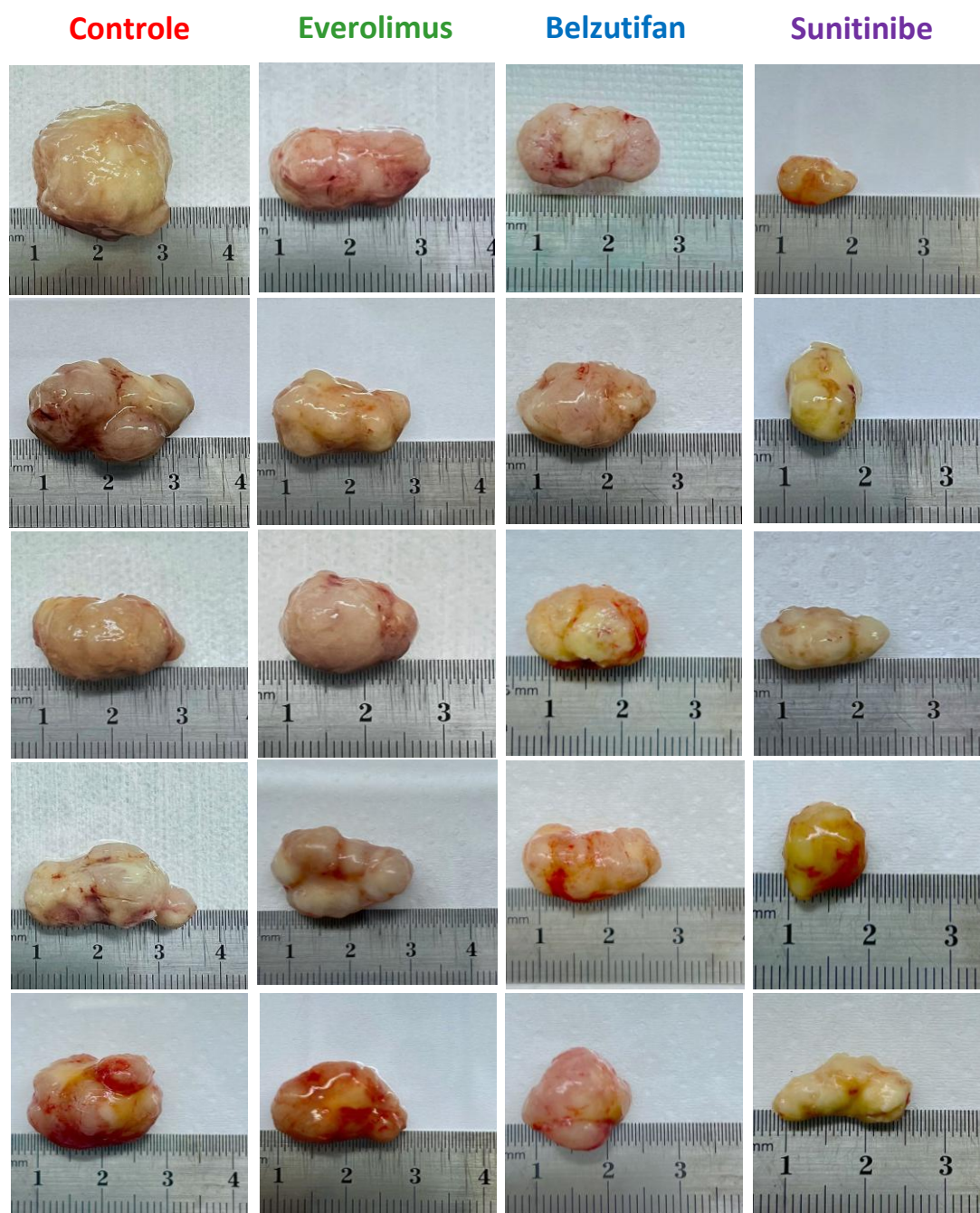


Figura 21: Comparação macroscópica entre os tumores dos animais, entre os diferentes grupos de tratamentos, após o 30º dia de tratamento contínuo.

Além disso, no final dos experimentos, os tumores dos animais foram pesados. Foi possível perceber a diferença entre o peso médio dos tumores dos

animais em cada um dos grupos de tratamento, conforme podemos observar na

Figura 22.

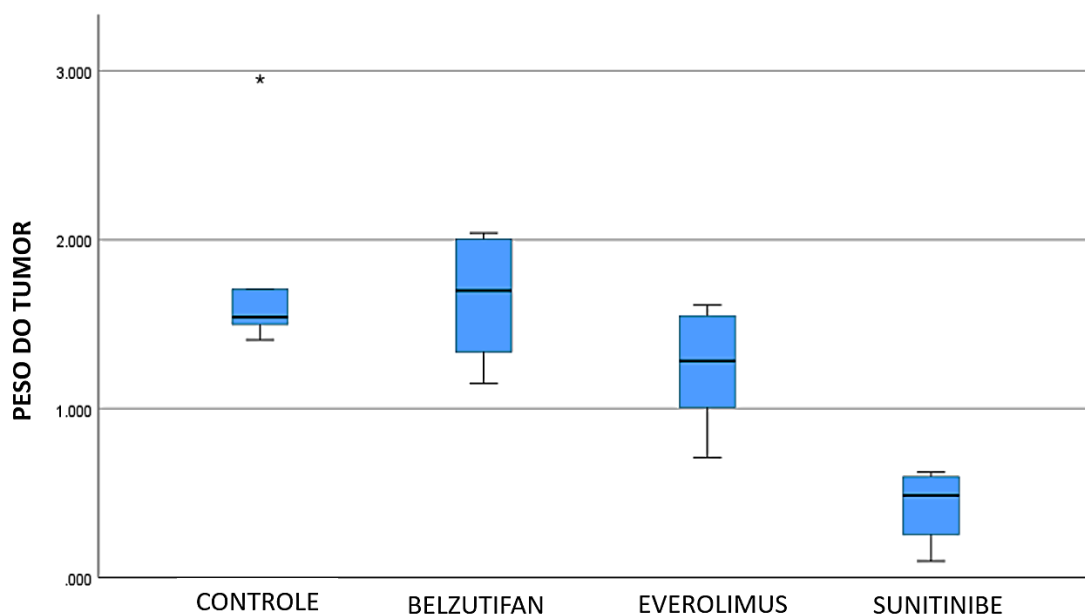


Figura 22: Comparação entre o peso médio dos tumores entre os diferentes grupos de tratamento. Existe associação entre o tipo de tratamento e o peso dos tumores ($p = 0,002$). Os animais tratados com sunitinibe apresentaram um menor peso tumoral quando comparados com os animais do grupo controle ($p = 0,004$), e com o grupo belzutifan ($p = 0,008$). Não foi observada uma associação entre os tratamentos com sunitinibe e everolimus ($p = 0,16$).

5 DISCUSSÃO

O carcinoma de células renais humano (CCR) representa cerca de 3% dos cânceres em adultos, e tem sido amplamente reconhecido como uma doença heterogênea, que abrange diferentes subtipos histológicos, dentre os quais o carcinoma renal do tipo células claras (ccCCR) é o mais comum, podendo representar até 80% de todos os casos de CCR (WANG et al. 2024).

Além do ccCCR, os subtipos histológicos de CCR papilíferos (pCCR), cromófobos (chCCR), oncocitomas, e os tumores do ducto coletor, aparecem em menor frequência (PADALA, KALLAM 2023).

Para este projeto, foram recrutados 90 pacientes com CCR, tratados cirurgicamente no A.C.Camargo Cancer Center. Destes casos, 73 são do tipo células claras, 12 são tipo papilífero, 3 casos são de tumores renais não classificável, e 2 casos são de CCR associado com a translocação de MiT.

Em nosso laboratório, conseguimos estabelecer um modelo de estudo *in vivo* que nos permitiu estudar e caracterizar os diferentes fenótipos de CCR, a partir do estabelecimento desses tumores em animais imunodeficientes (*Patient-Derived Xenografts* - PDX).

Modelos PDX vêm sendo utilizados em todo o mundo para a caracterização de diferentes tipos de câncer, entre eles o CCR. Esse modelo representa com maior fidedignidade a heterogeneidade tumoral, e têm se mostrado bastante promissor para identificação das alterações moleculares presentes no câncer, bem como, para o teste de terapias-alvo.

Tecnicamente, esse modelo consiste no implante de fragmentos tumorais frescos, obtidos cirurgicamente e/ou por biópsia de pacientes humanos com CCR. Esse implante pode ser realizado de duas formas, a forma ectópica, mais comum, e a forma ortotópica.

O implante ectópico dos fragmentos, também chamado de implante heterotópico, comumente é realizado no flanco dos animais, ou seja, distante do sítio primário do CCR. As vantagens desse tipo de modelo são: facilidade de implantação e monitoramento da cinética de crescimento dos tumores; baixo custo associado com alta reprodutibilidade. No entanto, esse modelo também oferece desvantagens, como por exemplo: microambiente não específico do tumor (BESERRA et al. 2022), e menor representatividade clínica das características presentes no tumor primário (ROQUE-LIMA et al. 2019; DOBROLECKI et al. 2016).

Por outro lado, o implante ortotópico, é realizado diretamente no rim, por via subcasular. Da mesma forma que o implante ectópico, no modelo ortotópico são encontradas vantagens e desvantagens. Entre as vantagens oferecidas por este modelo, pode-se destacar: presença de um microambiente tumoral fisiologicamente relevante e possibilidade do estudo de disseminação metastática da doença. Em conjunto, essas vantagens oferecem uma maior fidedignidade clínica em comparação com a forma ectópica (YU et al. 2024; DOBROLECKI et al. 2016).

Entretanto, o modelo ortotópico também apresenta algumas desvantagens, como por exemplo: complexidade da técnica de implante dos fragmentos tumorais; maior dificuldade no monitoramento dos tumores e da cinética de crescimento

desses tumores; custo mais elevado associado com um tempo maior de duração do experimento (OKANO et al. 2020; BESERRA 2019; DOBROLECKI et al. 2016).

Dos 90 pacientes recrutados para o projeto, foi possível gerar 27 modelos PDX de diferentes subtipos histológicos. Entre os quais, 22 casos (81,5%), são de ccCCR, 4 casos (14,8%) são pCCR, e 1 caso (3,7%) é de tumor renal não classificável.

Todos esses casos foram gerados a partir do implante ortotópico de CCR nos animais. Em um trabalho anterior publicado por Beserra e colaboradores (2022), foi possível demonstrar a eficiência do modelo de xenoenxerto ortotópico de CCR, em comparação com o modelo ectópico, onde não foi observada a enxertia dos tumores (BESERRA et al. 2022).

Tumores renais papilíferos e inclassificáveis são considerados tumores raros, uma vez que aparecem em uma menor frequência na população em geral. Essa baixa frequência associada com a heterogeneidade molecular da doença ainda representa um importante obstáculo para a prática clínica, para se obter sucesso no manejo terapêutico dos pacientes com a forma metastática da doença.

Por estes motivos, o desenvolvimento e o estabelecimento de modelos pré-clínicos para o estudo e a caracterização desses tipos de CCR são extremamente necessários, uma vez que esses modelos permitem estudar os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese desse tipo de tumor, bem como, a participação dessas alterações moleculares em diferentes vias de sinalização tumoral, além de permitirem o teste de terapias anticâncer que possam beneficiar os pacientes com esse tipo de CCR (BRUGAROLAS 2014; HERVÉ LANG et al, 2016).

Em um estudo recente, publicado por nosso grupo de pesquisa, conseguimos estabelecer e demonstrar a eficiência do modelo PDX ortotópico na caracterização morfológica e genômica de diferentes fenótipos de CCR (BESERRA et al. 2022).

Em todo o mundo grupos de pesquisa que utilizaram o modelo ortotópico de PDX para estudar o carcinoma renal, relatam a dificuldade no estabelecimento do modelo experimental, tendo em vista, a baixa taxa de enxertia dos tumores, que, normalmente, fica em torno de 5% -10% dos casos (PAVÍA-JIMÉNEZ, TCHEUYAP, BRUGAROLAS 2014; HERVÉ LANG et al, 2016).

No entanto, essa viabilidade pode aumentar se as amostras utilizadas forem de pacientes com alto estadiamento patológico e/ou metastáticos. Neste trabalho, demonstramos uma taxa de enxertia que corresponde a 30% (27 modelos PDX gerados a partir de 90 casos implantados).

Entre as 27 amostras de pacientes que geraram o modelo PDX, a maioria delas (17 casos - 63%), são derivadas de pacientes com alto estadiamento patológico (pT3a e pT3b).

No entanto, conseguimos demonstrar a partir deste projeto, que amostras oriundas de pacientes com baixo estadiamento (pT1a e pT1b), também podem gerar os modelos PDX (10 casos - 37%). Com isso, é possível dizer que existe uma associação entre o tipo de estadiamento do paciente e o estabelecimento do modelo PDX ($p = 0,002$).

Além disso, apesar dos casos pT1 serem curáveis, a sobrevida global desses pacientes em 5 anos não é 100%. Nesses casos, existem situações em que os pacientes podem apresentar progressão de doença, além de as chances de recidiva

nesse grupo ainda serem altas. Nesse sentido, gerar um modelo pré-clínico a partir de pacientes com tumores de baixo estadiamento é extremamente importante dada necessidade de se estratificar, estudar e identificar casos de CCR pT1 com potencial de progressão para estadios mais graves, como explorado em carcinoma ductal *in situ* de mama (HUTTEN et al. 2023).

Um trabalho já publicado por nosso grupo de pesquisa ainda sugere que a sobrevida global e sobrevida livre de metástases é menor no grupo de pacientes cujas amostras desenvolvem modelos PDX, em comparação com os pacientes que não desenvolvem o PDX (BESERRA et al. 2022).

Nesse mesmo cenário, este trabalho demonstra que a sobrevida global ($p = 0,02$), e a sobrevida livre de progressão de doença ($p = 0,02$), são menores no grupo de pacientes onde foi possível observar a enxertia do tumor, em comparação com o grupo de pacientes cujos tumores não se estabeleceram nos animais.

Além disso, propomos ainda que a presença de componentes sarcomatoide ($p = 0,002$), rabdoide ($p = 0,001$), e necrose ($p = 0,003$), estão associados com a progressão do CCR para a doença metastática após o diagnóstico, corroborando com resultados semelhantes publicados anteriormente em outros trabalhos (GÖKDEN et al. 2000; YANG et al. 2015).

Neste mesmo trabalho, conseguimos demonstrar que a presença de componentes sarcomatoide ($p = 0,01$), rabdoide ($p = 0,02$), e necrose ($p = 0,007$) também estão associados com a mortalidade dos pacientes com CCR. Clinicamente, existe uma associação entre a presença de componentes sarcomatoide, rabdoide e

necrose tumoral com um prognóstico desfavorável e aumento da mortalidade em pacientes com CCR (ADENIRAN, SHUCH, HUMPHREY 2024; YANG et al. 2015)

Entre os casos gerados a partir do PDX, foi realizada a caracterização por imuno-histoquímica utilizando-se marcadores diagnósticos clássicos, que são amplamente utilizados na rotina diagnóstica da anatomia patológica para identificação e caracterização dos diferentes fenótipos de CCR.

Para os casos de ccCCR, foi verificada a perda de expressão de CK7, associada a uma marcação positiva para CA IX e PAX 8. Enquanto, nos casos de pCCR a marcação para CK7 pode ser tanto negativa, quanto positiva, estando associada com a expressão nuclear de PAX8, confirmando tratar-se de tecido renal, e expressão citoplasmática de AMCR, marcador específico para o subtipo papilífero (MOCH et al. 2022).

Esse fenótipo histológico foi observado tanto nos tumores primários, quanto nos tumores derivados dos modelos PDX, fomentando a hipótese de que o modelo recapitula fielmente o perfil imuno-histoquímico dos tumores primários (ELIAS et al. 2021; BESSERA et al. 2022; BESERRA 2019).

Mais recentemente, entre os casos gerados no PDX, um deles, reproduz uma característica muito peculiar do CCR, cuja patogênese ainda permanece mal esclarecida, a formação de trombos tumorais em veia renal e veia cava inferior (YUAN 2022; LABBATE et al., 2019; REESE, WHITSON, & MENG, 2013).

A amostra utilizada neste caso foi obtida por meio da ressecção cirúrgica de uma paciente do sexo feminino, do Sistema Único de Saúde (SUS), do A.C.Camargo Cancer Center, com ccCCR.

A paciente da nossa casuística, possuía um ccCCR de alto grau histológico (ISUP 4), e alto estadiamento patológico (pT3a), associado com a presença dos componentes sarcomatoide (60% da neoplasia), rabdoide (30% da neoplasia) e necrose (60% da neoplasia), foi submetida a uma nefrectomia radical (retirada total do rim esquerdo), e apresentou um tumor extremamente agressivo, infiltrativo e invasivo.

Esse caso foi previamente selecionado devido a sua capacidade de desenvolver tumores de forma subcutânea nos animais. Além disso, a paciente apresentou invasão tumoral, por meio da formação de trombos tumorais em veia e artéria renal no momento do diagnóstico. Além disso, a paciente teve progressão de doença com a formação de metástases, e veio a óbito, dois meses depois da cirurgia. As metástases observadas no paciente acometeram: linfonodo, peritônio e osso, além da presença de nódulos bilaterais presentes nos pulmões verificados por TC, compatíveis com metástase. Diante desse cenário, a paciente evoluiu ao óbito, aproximadamente dois meses após a ressecção cirúrgica.

Após o implante dos fragmentos deste tumor nos animais, foi observado um rápido crescimento tumoral, em cerca de um mês e meio em todos os animais implantados.

Conhecida a cinética de crescimento tumoral, os animais foram randomicamente distribuídos nos grupos experimentais e tratados diariamente por quatro semanas ou até os tumores atingirem 1 cm³.

A capacidade de crescimento tumoral na forma subcutânea, é extremamente importante para esta etapa do projeto, pois proporciona uma análise mais concreta

sobre a cinética de crescimento tumoral, utilizando o paquímetro como ferramenta para medir os tumores nos animais.

Neste momento, optamos por utilizar como estratégias de tratamento, drogas que já são comumente utilizadas para o tratamento de pacientes com carcinoma renal no cenário metastático da doença, foram elas o sunitinibe, o everolimus, e o belzutifan (VASAN, BASELGA, HYMAN 2019; RATTA et al. 2018).

Durante a eutanásia e remoção dos tumores, foi possível observar que os animais apresentaram o mesmo fenótipo observado na paciente, a invasão da veia renal e veia cava inferior, por meio da formação de extenso trombo tumoral. A mimetização deste fenótipo de CCR *in vivo* até o momento é um feito inédito, não tendo sido relatada anteriormente por nenhum grupo de pesquisa na literatura.

As pesquisas sobre trombos gerados por tumores, conhecidos como trombos tumorais, são raras, uma vez que os modelos animais de trombose, e a formação de trombos são restritos a lesões em artérias e vasos, sem considerar a presença de um tumor anterior. Essa condição também é chamada de trombose relacionada ao câncer (TRC).

O trombo tumoral intravascular é observado em 10 a 40% dos pacientes CCR na veia renal, e em cerca de 4 a 19% desses casos, o trombo se estende para a veia cava inferior (VCI) (YANG, HAN, LI 2022; DASON et al. 2023; GOLD, TAYLOR, MARGULIS 2023).

Nesses casos, a extensão do trombo é um sinal de prognóstico negativo, com uma sobrevida média de apenas 6 meses em pacientes que não recebem tratamento (CAÑO et al. 2021; QUENCER et al. 2017; YANG, HAN, LI 2022).

Entretanto, os reais mecanismos envolvidos na patogênese do CCR com formação de trombos tumorais permanecem mal esclarecidos, por este motivo, o estabelecimento de um modelo de estudos que mimetize esse fenótipo *in vivo*, se torna extremamente relevante.

Na caracterização molecular dos tumores, optamos por realizar inicialmente o sequenciamento genômico por painéis customizados. Os primeiros 13 casos foram caracterizados por meio um painel customizado contendo 27 genes mais frequentemente alterados em CCR, sendo que, 10 desses casos são de ccCCR e 2 casos são pCCR.

As mutações mais comuns nos casos de ccCCR foram no *VHL* (7/13 casos), seguidas da mutação em *PBRM1* (5/13 casos); *SETD2* (3/13casos) e *KDM5C*, *BAP1* e *TP53*, todas essas últimas presentes em 2/13 casos.

Mecanicamente, o ccRCC é caracterizado pela inativação do gene *von-Hippel-Lindau* (*VHL*). A disfunção do *VHL* leva à hiperativação do fator induzível por hipóxia (*HIF*), resultando na superexpressão de muitos outros genes sabidamente envolvidos em angiogênese, metabolismo, regulação do ciclo celular, e que representam alvos terapêuticos importantes para o tratamento de pacientes com ccRCC (RUF et al, 2015).

Além disso, a inativação de *VHL* acaba resultando em aumento da suscetibilidade a vários tipos de câncer, principalmente ccRCC (KIM 2004). Nesse cenário, mutações em *VHL* podem estar presentes em até 82% de todos os casos esporádicos de ccRCC, tornando-o o oncogene mais comumente alterado neste tipo de câncer (COWEY, RATHMELL 2009).

Alternativamente, no ccRCC, o processo de remodelação alterada da cromatina é uma consequência da perda do cromossomo 3p. Neste mesmo braço cromossômico localizam-se os genes moduladores da remodelação da cromatina *PBRM1*, *SETD2* e *BAP1* (PEZZICOLI et al., 2018).

Por este motivo, estes genes também são encontrados frequentemente alterados em pacientes com ccCCR. Mutações em *PBRM1* por exemplo, são muito comuns no e sua frequência varia entre 30% e 40% dos casos de ccCCR (RICKETTS et al., 2018).

Da mesma forma que o *PBRM1*, o gene *BAP1* também está localizado no cromossomo braço curto do cromossomo 3, então sua perda é frequentemente associada à perda do *PBRM1* e do gene *VHL*. Mutações *BAP1* estão presentes em 5–15% dos casos de ccRCC (TAN et al., 2020). Além disso, mutação em *BAP1* demonstraram estar associadas com pior desfecho clínico, relacionando-se com a doença metastática, alta graduação histológica, e presença de necrose no tumor (JOSEPH et al., 2023; RICKETTS et al., 2018).

Nesse cenário, o PDX validou 82,7% das mutações encontradas nos tumores primários (24/29 mutações), fomentando a ideia de que o modelo é adequado para identificação e estratificação de alvos moleculares em CCR.

Os outros 8 casos que foram sequenciados com o painel CCP, composto por 409 genes, tiveram como mutações mais frequentes *ATM* (3/8 casos), *VHL* (2/8 casos), seguidas das mutações em *TP53*, *SETD2*, *EP400*, *TET2*, *EPHA3*, *PIK3CA*, *ADGRA2*, *AMER1*, *MET*, *TNFAIP3*, *PKHD1*, *ERBB3*, *RECQL4*, *MTOR*, *ASXL1* e *CILK1*. Essas

últimas foram menos frequentes, se fazendo presentes em apenas um dos casos caracterizados.

Da mesma forma, o PDX recapitulou 59% das mutações observadas nos tumores primários (13/22 mutações). Estrategicamente, outros cinco casos foram submetidos a caracterização molecular por sequenciamento de exoma completo. Nesta etapa do trabalho, foram caracterizados tumores obtidos do PDX e seus respectivos tumores primários, diferentes subtipos histológicos de CCR, com baixo e alto grau histológico, com baixo e alto estadiamento patológico foram sequenciados.

Foi possível demonstrar a eficiência do PDX em recapitular alterações moleculares observadas nos tumores primários.

Ao identificar os alvos moleculares presentes nos tumores, o próximo passo do trabalho foi selecionar casos para o tratamento com terapia-alvo e quais tratamentos seriam utilizados. Diante disso, optamos por selecionar o caso da paciente com formação de trombos tumorais, uma vez que, esse tumor cresce na forma ectópica de implante, o que facilitaria o acompanhamento da cinética de crescimento do tumor com o passar do tempo, além de o fato de ser um tumor com crescimento rápido e comportamento bastante agressivo.

Ao analisar as mutações encontradas neste caso, foi identificado que se tratava de mutações relacionadas com angiogênese. A paciente apresentou mutações em *VHL*, *MAB1* e *FAT1*, e duas das três mutações foram validadas no PDX (as mutações em *VHL* e *BAP1*). Sabidamente, essas mutações conferem efeito pró-angiogênico ao tumor.

Assim, optamos por comparar o efeito de diferentes terapias-alvo sobre o ccCCR com as mutações em *VHL*, *BAP1* e *FAT1*. Foram selecionados como opções de terapia-alvo: Sunitinibe, Everolimus e o Belzutifan.

O sunitinibe é um medicamento amplamente utilizado na oncologia clínica para o tratamento de diferentes tipos de câncer, entre eles o CCR. Mecanicamente, o sunitinibe possui a capacidade de inibir a ação enzimas envolvidas no crescimento e na proliferação de células, conhecidas como tirosina quinase (PRUIS et al. 2019; MOTZER et al. 2009).

Essas enzimas estão associadas a receptores específicos na superfície das células, como o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR). Ao bloquear esses receptores, o sunitinibe interfere na formação de novos vasos sanguíneos e consequentemente, no fornecimento de nutrientes às células tumorais, dificultando seu desenvolvimento e disseminação.

Essa abordagem torna o medicamento uma ferramenta eficaz no combate a tumores que dependem desses processos para crescer (JIN et al. 2023; VASAN, BASELGA, HYMAN 2019;).

Em um estudo conduzido por Motzer e colaboradores (2009), foi possível observar que os pacientes tratados com sunitinibe apresentaram uma sobrevida global mais duradura. Além disso, foi possível perceber uma melhora na sobrevida livre de progressão dos pacientes com CCR metastático (MOTZER et al. 2009).

O everolimus é um medicamento que atua como um inibidor da proteína quinase mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), essa proteína é essencial na via

de sinalização celular que regula processos importantes, como o crescimento, a proliferação e a sobrevivência das células.

Essa via desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase celular, mas pode ser desregulada em diversas condições, especialmente no câncer, contribuindo para o desenvolvimento e a progressão tumoral (MESKAWI et al., 2015; MOTZER et al. 2010).

Ao bloquear a atividade da mTOR, o everolimus ajuda a desacelerar a proliferação descontrolada de células malignas e pode também interferir nos processos que sustentam o tumor, como o metabolismo celular e a angiogênese. Por essa razão, é amplamente utilizado no tratamento de certos tipos de câncer, entre eles o CCR (HASSKARL 2018; PORTA, PAGLINO, MOSCA 2014).

Nesse sentido, Motzer e colaboradores (2008), demonstraram que o tratamento com everolimus prolonga a sobrevida livre de progressão em relação ao placebo em pacientes com CCR metastático. Resultados semelhantes também foram publicados por Motzer e colaboradores (2010), em um estudo de fase 3. Por este motivo, o tratamento com everolimus pode representar uma importante estratégia de tratamento para o ccCCR.

Já o belzutifan é um medicamento administrado por via oral que atua como um inibidor seletivo do fator induzível por hipóxia (HIF)-2 α , uma proteína envolvida na regulação de processos celulares em condições de hipóxia.

Essa proteína desempenha um papel central na sobrevivência e proliferação de células tumorais, especialmente em cânceres associados a mutações que desregulam a resposta celular à hipóxia. Ao inibir especificamente o HIF-2 α , o

belzutifan oferece uma abordagem terapêutica inovadora, com potencial para melhorar os resultados do tratamento de pacientes com ccCCR (CURRY, SOLEIMANI 2024; DEEKS 2021).

A sinalização de hipóxia tem um papel fundamental no câncer renal, particularmente dentro do subtipo mais prevalente, o ccCCR. Mecanicamente, a hipóxia tem se mostrado capaz de promover vários processos patológicos cruciais para a carcinogênese, como por exemplo, ativação do fator induzível por hipóxia (HIF), angiogênese, proliferação, reprogramação metabólica e resistência a medicamentos, todos esses processos sabidamente contribuem de forma significativa para o desenvolvimento, para o crescimento, ou para a formação de metástase do CCR (ZHANG et al., 2019).

Geneticamente o ccCCR se caracteriza pela perda de função do *VHL*, o que consequentemente, resulta no acúmulo de proteínas HIF, especialmente HIF2 α , um impulsor crucial do ccRCC (LIAO, HU, ZHANG 2024).

Nesse cenário, estratégias terapêuticas visando a sinalização pVHL–HIF foram exploradas no ccRCC, culminando no desenvolvimento bem-sucedido de antagonistas específicos de HIF2 α , como o belzutifan, utilizado neste projeto.

Não foi observada associação entre o tratamento com belzutifan e uma redução do crescimento tumoral ($p = 0,06$), nem com melhora na sobrevida global dos animais. Nessas condições, pode-se pensar em redesenhar o experimento com número maior de animais, associado com o aumento da dose de tratamento, a fim de se verificar efeitos mais intensos e duradouros do tratamento com o belzutifan.

Esses dados sugerem que para este tipo de câncer o tratamento com sunitibe e everolimus poderiam representar alternativas terapêuticas importantes.

Diante de todo esse cenário, e apesar dos resultados e toda a caracterização aqui mostrados, a maioria dos casos de PDX apresentam um crescimento lento, especialmente, aqueles casos derivados de pacientes com tumores de baixo estadiamento patológico e baixo grau histológico.

No entanto, demonstramos uma eficiência do modelo PDX maior do que aquela observada em vários estudos já publicados (PAVÍA-JIMÉNEZ, TCHEUYAP, BRUGAROLAS 2014; HERVÉ LANG et al, 2016).

Ainda que o modelo tenha reproduzido a maioria das mutações observadas nos tumores primários, existem poucas opções de terapias-alvo para o CCR, nesse sentido, seria interessante uma complementação desses dados com outras metodologias, como por exemplo, estudos de expressão gênica, além disso, demonstrar o efeito do belzutifan em casos de ccCCR com *VHL* selvagem também seriam atrativos, para poder comparar os efeitos do tratamento com esse tipo de terapia em ccCCR com diferentes perfís moleculares.

6 CONCLUSÕES

Em conjunto, esses resultados indicam que o modelo de PDX ortotópico de CCR foi padronizado com sucesso e representa uma ferramenta robusta para o estudo da biologia do tumor e para o desenvolvimento de novas terapias, uma vez que foi eficaz em preservar as características do tumor primário humano.

A caracterização entre os tumores humanos e os tumores obtidos dos PDX demonstra similaridade entre os tumores, na morfologia, expressão de marcadores imuno-histoquímicos e alterações genéticas.

A taxa de enxertia do CCR foi correspondente a 30%, maior do que em outros trabalhos já publicados, por outros grupos de pesquisas. Tumores mais agressivos, de pacientes com alto estadiamento e alta graduação histológica tendem a se estabelecer mais facilmente no PDX.

Pacientes que tiveram seus tumores estabelecidos no PDX apresentaram menor sobrevida global e menor sobrevida livre de progressão de doença em comparação com o grupo de pacientes cujos tumores não desenvolveram o PDX.

A análise de expressão gênica por sequenciamento identificou alterações que são frequentemente encontradas em pacientes com CCR. Tais alterações foram validadas

nos tumores obtidos a partir dos modelos PDX. Mutações em *VHL*, *PBRM1*, *SETD2* e *BAP1* são mutações comuns em ccCCR.

Um caso de PDX foi eficaz em recapitular a formação de trombos tumorais e metastatização, representando uma importante ferramenta para o estudo dos mecanismos por trás da formação de trombos tumorais em CCR.

O PDX preserva o perfil de agressividade dos renais, preservando o fenótipo sarcomatoide, rabdoide e presença de necrose, e tem se mostrado um modelo eficaz na identificação de pacientes com maior risco de recorrência ou morte por carcinoma de células renais no A.C.Camargo Cancer Center.

Os tratamentos com sunitinibe e everolimus foram eficientes em estabilizar o crescimento do tumor, bem como, em proporcionar uma melhor sobrevida global aos animais, em comparação com o tratamento com belzutifan.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeniran AJ, Shuch B, Humphrey PA. Sarcomatoid and Rhabdoid Renal Cell Carcinoma: Clinical, Pathologic, and Molecular Genetic Features. **Am J Surg Pathol** 2024; 48(7): 65-88.

Al-Bayati O, Hasan A, Pruthi D, Kaushik D, Liss MA. Systematic review of modifiable risk factors for kidney cancer. **Urol Oncol** 2019; 37(6): 359-371.

Amin MB, Greene FL, Edge SB, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. **CA Cancer J Clin** 2017; 67(2): 93-99.

Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:311-16.

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

Badoiu SC, Greabu M, Miricescu D, Stanescu-Spinu II, Ilinca R, Balan DG, et al. PI3K/AKT/mTOR Dysregulation and Reprogramming Metabolic Pathways in Renal Cancer: Crosstalk with the VHL/HIF Axis. **Int J Mol Sci** 2023; 24(9): 8391.

Bahadoram S, Davoodi M, Hassanzadeh S, Bahadoram M, Barahman M, Mafakher L. Renal cell carcinoma: an overview of the epidemiology, diagnosis, and treatment. **G Ital Nefrol** 2022; 39(3): 1-16.

Batavia A.A., Schraml P., Moch H. Clear cell renal cell carcinoma with wild-type von Hippel-Lindau gene: A non-existent or new tumour entity? **Histopathology** 2019; 74:60–67.

Beserra AO, Estevan EC, Bezerra SM, et al. Patient-Derived Renal Cell Carcinoma Xenografts Capture Tumor Genetic Profiles and Aggressive Behaviors. **Kidney Cancer** 2022; 6:11-22.

Beserra AO. Estabelecimento de uma plataforma de estudos em carcinoma de células renais baseados em xenoenxertos em animais imunodeficientes. 2019. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). **Fundação Antônio Prudente**. São Paulo. 2019.

Bianchi M, Sun M, Jeldres C, et al. Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis. **Ann. Oncol** 2012; 23:973–80.

Bindayi A, Hamilton ZA, McDonald ML, et al. Neoadjuvant therapy for localized and locally advanced renal cell carcinoma. **Urol Oncol** 2018; 36:31-37.

Bitler BG, Wu S, Park PH, et al. ARID1A-mutated ovarian cancers depend on HDAC6 activity. **Nat Cell Biol** 2017; 19:962-73.

Brasil. Instituto Nacional de Câncer. IN: CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS EM NÚMEROS. [Internet]. **Bristol-Myers Squibb**. 2021. Disponível em: https://www.bms.com/assets/bms/brazil/documents/Infográfico_Câncer_Renal.pdf. Acesso em: 10 dez. 2024.

Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin** 2024; 74(3):229-263.

Bristol M. Carcinoma de células renais em números. 2018. **Bristol-Myers Squibb**. Disponível em:

<https://www.bms.com/assets/bms/brazil/documents/Infogr%C3%A1fico%20C%C3%A2ncer%20Renal.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2024.

Bukavina L, Bensalah K, Bray F, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma: 2022 Update. **Eur Urol** 2022; 82:529-542.

Campbell SC, Uzzo RG, Karam JA, Chang SS, Clark PE, Souter L. Renal Mass and Localized Renal Cancer: Evaluation, Management, and Follow-up: AUA Guideline: **Part II. J Urol** 2021; 206(2): 209-218.

Cancer Genome Atlas Research Network; Linehan WM, Spellman PT, Ricketts CJ, Creighton CJ, Fei SS, Davis C, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. **N Engl J Med** 2016; 374(2): 135-45.

Caño Velasco J, Polanco Pujol L, Hernandez Cavieres J, et al. Controversies in the diagnosis of renal cell carcinoma with tumor thrombus. Controversias en el diagnóstico del carcinoma de células renales con trombosis venosa asociada. **Actas Urol Esp (Engl Ed)**. 2021; 45(4): 257-263.

Cardenas LM, Sigurdson S, Wallis CJD, Lalani AK, Swaminath A. Advances in the management of renal cell carcinoma. **CMAJ** 2024; 196(7): 235-240.

Chabanon RM, Morel D, Eychenne T, et al. PBRM1 Deficiency Confers Synthetic Lethality to DNA Repair Inhibitors in Cancer. **Cancer Res** 2021; 81(11): 2888-2902.

Chen X, Zhou Z, Hannan R, Thomas K, Pedrosa I, Kapur P, et al. Reliable gene mutation prediction in clear cell renal cell carcinoma through multi-classifier multi-objective radiogenomics model. **Phys Med Biol** 2018; 63(21): 215008.

Cho H, Kaelin WG. Targeting HIF2 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 2016; 81:113-121.

Cinque A, Minnei R, Floris M, Trevisani F. The Clinical and Molecular Features in the VHL Renal Cancers; Close or Distant Relatives with Sporadic Clear Cell Renal Cell Carcinoma?. **Cancers (Basel)** 2022; 14(21): 5352.

Cowey CL, Rathmell WK. VHL gene mutations in renal cell carcinoma: role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy. **Curr Oncol Rep** 2009; 11(2): 94-101.

Curry L, Soleimani M. Belzutifan: a novel therapeutic for the management of von Hippel-Lindau disease and beyond. **Future Oncol** 2024; 20(18): 1251-1266.

Dagher J, Kammerer-Jacquet SF, Dugay F, et al. Clear cell renal cell carcinoma: a comparative study of histological and chromosomal characteristics between primary tumors and their corresponding metastases. **Virchows Arch** 2017; 471:107-15.

Dason S, Mohebbi J, Blute ML, Salari K. Surgical Management of Renal Cell Carcinoma with Inferior Vena Cava Tumor Thrombus. **Urol Clin North Am** 2023; 50(2): 261-284.

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(3): 319-330.

Deeks ED. Belzutifan: First Approval. **Drugs** 2021; 81(16): 1921-1927.

Dey S, Peabody HN, Noyes SL, Lane BR. Neoadjuvant Targeted Molecular Therapy Before Renal Surgery. **Urol Clin North Am** 2017; 44:289-303.

Dobrolecki LE, Airhart SD, Alferez DG, et al. Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research. **Cancer Metastasis Rev** 2016; 35(4): 547-573.

Durinck S, Stawiski EW, Pavía-Jiménez A, et al. Spectrum of diverse genomic alterations define non-clear cell renal carcinoma subtypes. **Nat Genet** 2015; 47(1): 13-21.

El Zarif T, Semaan K, Eid M, Seo JH, Garinet S, Davidsohn MP, et al. Epigenomic signatures of sarcomatoid differentiation to guide the treatment of renal cell carcinoma. **Cell Rep** 2024; 43(6): 1-19.

Escudier B, Porta C, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol** 2017; 28(4): 167-168.

Espana-Agusti J, Warren A, Chew SK, Adams DJ, Matakidou A. Loss of PBRM1 rescues VHL dependent replication stress to promote renal carcinogenesis. **Nat Commun** 2017; 8: 1-11.

Fultang N, Schwab AM, McAneny-Droz S, et al. PBRM1 loss is associated with increased sensitivity to MCL1 and CDK9 inhibition in clear cell renal cancer. **Front Oncol** 2024; 14: 1-11.

Gamboa-Hoil SI, Martínez-Cornelio A, Hernández-Toríz N, et al. Outcomes in Renal Cell Carcinoma with Inferior Vena Cava Thrombus Treated with Surgery. **Curr Health Sci J** 2021; 47:96-100.

Garralda E, Paz K, López-Casas PP, et al. Integrated next-generation sequencing and avatar mouse models for personalized cancer treatment. **Clin Cancer Res** 2014; 20:2476-84.

Geiman TM, Robertson KD. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? **J Cell Biochem** 2002; 87:117-25.

Gessner KH, Kim WY, Zambrano IA. Genomic Meta-analysis of Clear-cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC): Aggregating Tumors to Resolve the Complexity of ccRCC. **Eur Urol** 2022; 81(4): 362-363.

Gökden N, Nappi O, Swanson PE, et al. Renal cell carcinoma with rhabdoid features. **Am J Surg Pathol** 2000; 24(10): 1329-1338.

Gold S, Taylor J, Margulis V. Renal cell carcinoma with inferior vena cava thrombus: did we make progress in oncologic outcomes and complications?. **Curr Opin Urol** 2023; 33(2): 142-146.

Goswami PR, Singh G, Patel T, Dave R. The WHO 2022 Classification of Renal Neoplasms (5th Edition): Salient Updates. **Cureus** 2024; 16(4): 1-8.

Grigolo S, Filgueira L. Immunotherapy of Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. **Cancers (Basel)** 2024; 16(11): 1-16.

Gulati S, Barata PC, Elliott A, Bilen MA, Burgess EF, Choueiri TK, et al. Molecular analysis of primary and metastatic sites in patients with renal cell carcinoma. **J Clin Invest** 2024; 134(14): 1-11.

Guo J, Ma J, Sun Y, et al. Chinese guidelines on the management of renal cell carcinoma (2015 edition). **Ann Transl Med** 2015; 3:1-24.

Gupta S, Alruwaili KHA, Escobedo RLO, et al. Renal cell carcinoma metastasizing to salivary glands: Systematic review. **Natl J Maxillofac Surg** 2024; 15(1): 3-17.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144(5): 646-674.

Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov** 2022; 12(1): 31-46.

Hasskarl J. Everolimus. **Recent Results Cancer Res** 2018; 211: 101-123.

He D, Ma T, Yi N, Zhang S, Ding G. Significance of PBRM1 mutation in disease progress and drug selection in clear cell renal cell carcinoma. **Biotechnol Genet Eng Rev** 2024; 40(4): 3901-3915.

Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. **Cancer Discov** 2014; 4: 998-1013.

Hsieh JJ, Chen D, Wang PI, et al. Genomic Biomarkers of a Randomized Trial Comparing First-line Everolimus and Sunitinib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. **Eur Urol** 2017; 71: 405-414.

Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, et al. Renal cell carcinoma. **Nat Rev Dis Primers** 2017; 3:1-19.

Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. **Eur Urol** 2016; 70: 106-19.

Hutten SJ, de Bruijn R, Lutz C, et al. A living biobank of patient-derived ductal carcinoma in situ mouse-intraductal xenografts identifies risk factors for invasive progression. **Cancer Cell** 2023; 41(5): 986-1002.

Inoue T, Terada N, Kobayashi T, Ogawa O. Patient-derived xenografts as in vivo models for research in urological malignancies. **Nat Rev Urol** 2017; 19:1-17.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025. Rio de Janeiro: **INCA**, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>. Acesso em: 13 dez. 2024.

Jin J, Xie Y, Zhang JS, et al. Sunitinib resistance in renal cell carcinoma: From molecular mechanisms to predictive biomarkers. **Drug Resist Updat** 2023; 67: 1-25.

Joseph RW, Kapur P, Serie DJ, Eckel-Passow JE, Parasramka M, Ho T, Cheville JC, Frenkel E, Rakheja D, Brugarolas J, et al. Loss of BAP1 protein expression is an independent marker of poor prognosis in patients with low-risk clear cell renal cell carcinoma. **Cancer** 2013; 120: 1059–1067.

Keskin SK, Msaouel P, Hess KR, et al. Outcomes of Patients with Renal Cell Carcinoma and Sarcomatoid Dedifferentiation Treated with Nephrectomy and Systemic Therapies: Comparison between the Cytokine and Targeted Therapy Eras. **J Urol** 2017; 198(3): 530-537.

Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. **J Clin Oncol** 2004; 22(24): 4991-5004.

Kotecha RR, Motzer RJ, Voss MH. Towards individualized therapy for metastatic renal cell carcinoma. **Nat Rev Clin Oncol** 2019; 16: 621-633.

Labbate C, Hatogai K, Werntz R, et al. Complete response of renal cell carcinoma vena cava tumor thrombus to neoadjuvant immunotherapy. **J Immunother Cancer** 2019; 7(1): 1-6.

Labriola MK, Batich KA, Zhu J, et al. Immunotherapy Is Changing First-Line Treatment of Metastatic Renal-Cell Carcinoma. **Clin Genitourin Cancer** 2019; 17: 513-521.

Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. **Science** 1993; 260(5112): 1317-20.

Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer - review paper. **Ann Agric Environ Med** 2019; 26(1): 1-7.

Linehan WM, Spellman PT, Ricketts CJ, Creighton CJ, Fei SS, Davis C, Wheeler DA, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. **N Engl J Med** 2016; 374(2): 135-45.

Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2011; 60: 615–21.

Malaney P, Nicosia SV, Davé V. One mouse, one patient paradigm: new avatars of personalized cancer therapy. **Cancer Lett** 2014; 344: 1-12.

Maomao C, He L, Dianqin S, et al. Current cancer burden in China: epidemiology, etiology, and prevention. **Cancer Biol Med** 2022; 19(8): 1121–1138.

Mazumder S, Higgins PJ, Samarakoon R. Downstream Targets of VHL/HIF- α Signaling in Renal Clear Cell Carcinoma Progression: Mechanisms and Therapeutic Relevance. **Cancers (Basel)** 2023; 15(4): 1-23.

Meira ITJ. Utilização de biópsia líquida baseada em detecção de DNA tumoral em urina e plasma em pacientes com carcinoma renal de células claras. 2022. 95f. Tese (Doutorado em ciências da saúde). **Fundação Antônio Prudente**. São Paulo. 2022.

Meskawi M, Valdivieso R, Dell'Oglio P, Trudeau V, Larcher A, Karakiewicz PI. The Role of Everolimus in Renal Cell Carcinoma. **J Kidney Cancer VHL** 2015; 2(4): 187-194.

Moch H, Amin MB, Berney DM, et al. The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. **Eur Urol** 2022; 82(5): 458-468.

Monsma DJ, Monks NR, Cherba DM, et al. Genomic characterization of explant tumorgraft models derived from fresh patient tumor tissue. **J Transl Med** 2012; 10: 125.

Moore LE, Nickerson ML, Brennan P, et al. Von Hippel-Lindau (VHL) inactivation in sporadic clear cell renal cancer: associations with germline VHL polymorphisms and etiologic risk factors. **PLoS Genet** 2011; 7(10): 1-13.

Moraes FCA, Vilbert M, Alves VFC, et al. Mesenchymal-Epithelial Transition Kinase Inhibitor Therapy in Patients with Advanced Papillary Renal-Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Int J Mol Sci** 2023; 24(24): 17582.

Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. **Nat Protoc** 2007; 2: 247-50.

Motzer RJ, Banchereau R, Hamidi H, Powles T, McDermott D, Atkins MB, et al. Molecular Subsets in Renal Cancer Determine Outcome to Checkpoint and Angiogenesis Blockade. **Cancer Cell** 2020; 38(6): 803-817.

Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. **Lancet** 2008; 372(9637): 449-456.

Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma: final results and analysis of prognostic factors. **Cancer** 2010; 116(18): 4256-4265.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2009; 27(22): 3584-3590.

Okano M, Oshi M, Butash A, et al. Orthotopic Implantation Achieves Better Engraftment and Faster Growth Than Subcutaneous Implantation in Breast Cancer Patient-Derived Xenografts. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2020; 25(1): 27-36.

Ooi A, Dykema K, Ansari A, et al. CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma. **Cancer Res** 2013; 73(7): 2044-2051.

Padala SA, Kallam A. Clear Cell Renal Carcinoma. StatPearls [Internet] 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557644/>. [2024a fevereiro 28].

Patel HV, Srivastava A, Shinder B, Sadimin E, Singer EA. Strengthening the foundation of kidney cancer treatment and research: revising the AJCC staging system. **Ann Transl Med** 2019; 7(Suppl 1): 1-5.

Pavía-Jiménez A, Tcheuyap VT, Brugarolas J. Establishing a human renal cell carcinoma tumorgraft platform for preclinical drug testing. **Nat Protoc** 2014; 9:1848-59.

Pezzicoli G, Ciciriello F, Musci V, Salone F, Ragno A, Rizzo M. Genomic Profiling and Molecular Characterization of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **Curr Oncol** 2023; 30(10): 9276-9290.

Porta C, Cosmai L, Leibovich BC, Powles T, Gallieni M, Bex A. The adjuvant treatment of kidney cancer: a multidisciplinary outlook. **Nat Rev Nephrol** 2019; 15(7): 423-433.

Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. **Front Oncol** 2014; 4: 64.

Pruis SL, Aziz MIA, Pearce F, Tan MH, Wu DB, Ng K. Cost-Effectiveness Analysis of Sunitinib versus Interferon-Alfa for First-Line Treatment of Advanced and/or Metastatic Renal Cell Carcinoma in Singapore. **Int J Technol Assess Health Care** 2019; 35(2): 126-133.

Quencer KB, Friedman T, Sheth R, Oklu R. Tumor thrombus: incidence, imaging, prognosis and treatment. **Cardiovasc Diagn Ther** 2017; 7(3): 165-177.

Ralli M, Altissimi G, Turchetta R, Rigante M. Metastatic Renal Cell Carcinoma Presenting as a Paranasal Sinus Mass: The Importance of Differential Diagnosis. **Case Rep Otolaryngol** 2017; 2017: 1-8.

Ratta R, Verzoni E, Di Maio M, et al. Exposure to Multiple Lines of Treatment and Survival of Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Real-world Analysis. **Clin Genitourin Cancer** 2018; 16(4): 735-742.

Reese AC, Whitson JM, Meng MV. Natural history of untreated renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. **Urol Oncol** 2013; 31(7): 1305-1309.

Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H, et al. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. **Cell Rep** 2018; 23(12): 3698.

Rini B.I., Sosman J.A., Motzer R.J. Therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: Biology, clinical results and future development. **BJU Int** 2005; 96: 286–290.

Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. **Lancet** 2009; 373: 1119-32.

Rizzo M, Calìò A, Brunelli M, et al. Clinico-pathological implications of the 2022 WHO Renal Cell Carcinoma classification. **Cancer Treat Rev** 2023; 116:1-6.

Roque-Lima B, Roque CCTA, Begnami MD, et al. Development of patient-derived orthotopic xenografts from metastatic colorectal cancer in nude mice. **J Drug Target** 2019; 27(9): 943-949.

Rose TL, Kim WY. Renal Cell Carcinoma: A Review. **JAMA** 2024; 332(12): 1001-1010.

Ruf M, Mittmann C, Nowicka AM, et al. pVHL/HIF-regulated CD70 expression is associated with infiltration of CD27+ lymphocytes and increased serum levels of soluble CD27 in clear cell renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2015; 21(4): 889-898.

Sebastià C, Corominas D, Musquera M, Paño B, Ajami T, Nicolau C. Active surveillance of small renal masses. **Insights Imaging** 2020; 11(1): 63.

Shibata T, Kokubu A, Saito S, et al. NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer. **Neoplasia** 2011; 13(9): 864-873.

Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. **J Immunol** 2005; 174: 6477-89.

Song XD, Tian YN, Li H, Liu B, Zhang AL, Hong Y. Research progress on advanced renal cell carcinoma. **J Int Med Res** 2020; 48(6): 1-10.

Takeda T, Banno K, Okawa R, et al. ARID1A gene mutation in ovarian and endometrial cancers. **Oncol Rep** 2016; 35: 607-13.

Tan G, Xuan Z, Li Z, et al. The critical role of BAP1 mutation in the prognosis and treatment selection of kidney renal clear cell carcinoma. **Transl Androl Urol** 2020; 9(4): 1725-1734.

Tannock IF. Cancer: Resistance through repopulation. **Nature** 2015; 517: 152-153.

TRACERx Renal consortium. TRACERx Renal: tracking renal cancer evolution through therapy. **Nat Rev Urol** 2017; 14(10): 575-576.

Turajlic S, Xu H, Litchfield K, Rowan A, Chambers T, Lopez JI, et al. Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. **Cell** 2018; 173(3): 581-594.

van Leeuwen RS, Ahmad S, van Nesselrooij B, Zandee W, Giles RH. Von Hippel-Lindau Syndrome. **GeneReviews**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1463/>.

Varela I, Tarpey P, Raine K, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. **Nature** 2011; 469: 539-42.

Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. **Nature** 2019; 575: 299-309.

Vavvas DG, Thanos A, Patel AV, Miller JW. Basic mechanisms of pathologic retinal and choroidal angiogenesis. In: Schachat AP, editor. Ryan's retina. 6th ed. Edinburgh: **Elsevier** 2017. p.638-55.

Wang Y, Suarez ER, Kastrunes G, et al. Evolution of cell therapy for renal cell carcinoma. **Mol Cancer** 2024; 9: 23-28.

Warren AY, Harrison D. WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. **World J Urol** 2018; 36(12): 1913-1926.

Warsow G, Hübschmann D, Kleinheinz K, et al. Genomic features of renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. **Sci Rep** 2018; 8: 1-12.

Webster BR, Gopal N, Ball MW. Tumorigenesis Mechanisms Found in Hereditary Renal Cell Carcinoma: A Review. **Genes (Basel)** 2022; 13(11): 2122.

Xie Z, Lee YH, Boeke M, et al. MET Inhibition in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **J Cancer** 2016; 7(10): 1205-1214.

Yang Q, Han X, Li J. Renal cell carcinoma with extensive tumor thrombus. **Am J Med Sci** 2022; 364(6): 81-82.

Yang X, Xi C, Jin J, et al. Adult renal cell carcinoma with rhabdoid differentiation: incidence and clinicopathologic features in Chinese patients. **Ann Diagn Pathol** 2015; 19(2): 57-63.

Yates TA, McGilvray M, Razo N, et al. Efficacy of a Novel Bipolar Radiofrequency Clamp: An Acute Porcine Model. **Innovations (Phila)** 2022; 17(5): 409-415.

Yu Y, Li Y, Zhou L, Cheng X, Gong Z. Hepatic stellate cells promote hepatocellular carcinoma development by regulating histone lactylation: Novel insights from single-cell RNA sequencing and spatial transcriptomics analyses. **Cancer Lett** 2024; 604: 217243.

Yuan SM. Surgical treatment of renal cell carcinoma with inferior vena cava tumor thrombus. **Surg Today** 2022; 52(8): 1125-1133.

Zhang Q, Yan Q, Yang H, Wei W. Oxygen sensing and adaptability won the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine. **Genes Dis** 2019; 6(4): 328-332.

ANEXO 1 – Artigo de BESERRA e colaboradores (2022).

Kidney Cancer 6 (2022) 11–22
DOI 10.3233/KCA-210011
IOS Press

11

Research Report

Patient-Derived Renal Cell Carcinoma Xenografts Capture Tumor Genetic Profiles and Aggressive Behaviors

Adriano O. Beserra^{a,b}, Ethiene C. Estevan^{a,b}, Stephania M. Bezerra^c, Giovana T. Torrezan^{a,b}, Amanda Ikegami^{a,b}, Humberto Dellê^d, Isabela W. Cunha^e, Isabella T. Meira^{a,b}, Dirce M. Carraro^{a,b}, Primo N. Lara, Jr.^f, Stenio C. Zequi^{b,g,h}, Vilma R. Martins^{a,b} and Tiago G. Santos^{a,b,*}

^aInternational Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

^bNational Institute for Science and Technology in Oncogenomics and Therapeutic Innovation, São Paulo, Brazil

^cDepartment of Anatomic Pathology, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

^dGraduate Program in Medicine, Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brazil

^eInstitute of Pathology, Rede D'OR-São Luiz and D'Or Institute for Research and Education (IDOR), São Paulo, Brazil

^fUniversity of California Davis Comprehensive Cancer Center, Sacramento, CA, USA

^gReference Center of Urology, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

^hLARCG -Latin American Renal Cancer Group

Received 10 December 2021

Accepted 23 February 2022

Pre-press 7 March 2022

Published 15 March 2022

Abstract.

BACKGROUND: Patient-derived xenografts (PDX) have emerged as one of the most promising model systems to study cancer biology and to develop new antineoplastic drugs. Renal cell carcinoma (RCC) represents up to 90% of all kidney tumors, exhibits aggressive behavior, and has a propensity for metastasis. At diagnosis, 30% of patients with RCC have metastases, while up to 50% of those with localized disease treated with curative protocols experience recurrence.

OBJECTIVE: This study aimed to establish an RCC PDX platform to identify novel clinical and molecular biomarkers of recurrence risk in order to facilitate precision medicine.

METHODS: Tumor samples were obtained from surgical specimens of 87 RCC patients; fragments were implanted in immunodeficient NOD/SCID/gamma (NSG) mice. 17 Fragments were implanted subcutaneously in an initial group while a second group of 70 samples were implanted orthotopically in the subcapsular space.

RESULTS: A total of 19 PDX developed only after orthotopic implantation, and included 15 cases of clear cell RCC subtype, 3 cases of papillary subtype, and 1 unclassifiable tumor. 1 PDX of clear cell RCC recapitulated the phenotype of vena caval tumor thrombus extension that had been diagnosed in the source patient. PDX characterization by immunohistochemistry and targeted sequencing indicated that all PDXs preserved RCC identity and major molecular alterations. Moreover, the capacity of tumor engraftment was a strong prognostic indicator for patients with locally advanced disease.

*Correspondence to: Tiago Góss dos Santos, Clinical and Functional Genomics Group, International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center. Rua Tagua 440, Liberdade, 01508-010

São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 2189 5000 /Ext.:2943; E-mail: tsantos@accamargo.org.br.

CONCLUSION: Taken together, these results suggest that the orthotopic xenograft model of RCC represents a suitable tool to study RCC biology, identify biomarkers, and to test therapeutic candidates.

Keywords: Preclinical models, biomarkers, target therapy, adjuvant therapy, drug development

INTRODUCTION

Renal cell carcinoma (RCC) represents the most common kidney tumor, and exhibits aggressive behavior with a propensity for metastasis [1]. Worldwide, RCC is among the 10 most common malignancies, having caused an estimated 430,000 incident cases and 180,000 deaths during 2020 [2]. In a large Latin American cohort, the 5- and 10-year cancer-specific survival rates were 89.9% and 81.8%, respectively [3]. RCC comprises a group of morphologically and molecularly heterogeneous tumors that include several histological subtypes [4]. The most common are clear cell (ccRCC) and papillary (pRCC) RCCs [4, 5]. Formerly used classifications placed pRCC into two subgroups, papillary types 1 and 2, based upon morphological characteristics that are currently not recommended for histologic diagnosis [5]. The most recent studies show that the so-called type 1 pRCC includes a homogeneous group of tumors, with typical morphologic, immunohistochemical, and molecular features that do not occur in type 2 tumors, which are a heterogeneous group of neoplasms that include fumarate hydratase (FH)-deficient RCC, microphthalmia-associated transcription factor family translocation RCC, and other subtypes [6].

Most renal tumors are initially limited to the kidney. Surgery is the first treatment option [1]. However, despite significant improvements in surgical techniques and curative resection, hematogenous metastasis occurs in approximately 30% of patients [7]. The most frequent sites of distant metastases are lungs, bones, brain, adrenal glands, contralateral kidney, and liver [8]. In approximately 4% to 25% of patients with RCC, the primary tumor spreads by infiltrating the renal vein and inferior vena cava, and can extend to the right atrium, usually through the formation of a large tumor thrombus that portends a poor prognosis [9]. Systemic therapy is indicated for advanced and metastatic disease. Immune checkpoint inhibitor therapy (CTLA-4 plus PD-1 monoclonal antibodies) alone or in combination with anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors is the most effective therapeutic option; however, many patients

do not respond to these treatments and also suffer from significant drug toxicities [10]. Recently, adjuvant pembrolizumab therapy significantly improved disease-free survival in patients at high risk for recurrence [11]. However, longer follow-up will be critical to assess the effect of pembrolizumab on overall survival [12]. Furthermore, more reliable biomarkers for recurrence risk should be identified to inform patient enrolment in clinical trials [13].

To overcome these uncertainties, experimental models that accurately capture the idiosyncrasies of RCC genetics, biochemistry, and pharmacology are essential to improve the predictive power of preclinical testing to determine the safety and efficacy of new therapeutic approaches. Consequently, patient-derived xenografts (PDX) are emerging as a relevant model system to translate new technology from the bench to the bedside [14, 15]. The most pronounced advantages of PDX arise from the fact that in addition to maintaining the 3D architecture of the original tumors, this model system may also capture systemic features that can only be recapitulated *in vivo*, such as metastasis [16, 17].

Herein, we present a comprehensive characterization of a cohort of RCC PDX. Morphologic and genetic tests confirmed that PDX preserved histology and intra- and intertumoral heterogeneity even after successive *in vivo* passages. Our results also demonstrated that *in vivo* tumor growth capacity is associated with a worse prognosis for patients with locally advanced disease.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Patients with primary renal lesions were recruited after providing signed informed consent and undergoing partial or total nephrectomy. Tumor regions were identified in surgical specimens by a pathologist, and fresh fragments of up to 1 cm³ were separated and individually prepared for tumor implantation or DNA extraction and formalin fixation. Pathologic subtyping and staging were determined after tumor inoculation, occasionally

resulting in the implantation of benign tumors, such as oncocytomas, renal cysts, and angiomyolipoma; and also RCCs other than ccRCC and pRCC, such as chromophobe RCC, which usually behave as indolent lesions. Such cases were excluded from the analysis, resulting in 87 patients with confirmed malignancies. Only one case of pT4 in which a biopsy specimen was used to inoculate NSG. This study was approved by Fundação Antonio Prudente, A.C. Camargo Cancer Center Institutional Review Board (process number 2201/16).

Animals

Male and female 2–4 months old NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl} mice, herein designated NOD/SCID/gamma or NSG mice, were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). NSG colonies were maintained in the A.C. Camargo animal facility following the National Institutes of Health (USA) and institutional guidelines for animal welfare and experimental conduct [18]. This study was approved by the Animal Care and Use Committee of Fundação Antonio Prudente, A.C. Camargo Cancer Center (process number 075/16).

Tumor implantation

Ectopic: Tumor fragments of 1 to 3 mm were prepared from surgical specimen and implanted subcutaneously on the dorsum of NSG mice previously anesthetized with Ketamine/Xylasin cocktail. One to five fragments were implanted using a 11 G x 3-1/4" needle (Cadence Science) in each animal. Animals were monitored periodically for tumor growth for up to 15 months.

Orthotopic: Animals were anesthetized with Ketamine/Xylasin cocktail. The left lumbar region was trichotomized, followed by longitudinal lumbotomy of approximately 1 cm. Using small forceps, the left kidney was externalized and a transverse incision (2 mm) was made in the renal capsule. The capsule was dissected from the renal cortex with a blunt forceps, and 1 mm tumor fragments were gently positioned separately in subcapsular renal poles (2 to 4 fragment for each animal). The kidney was then returned to the abdominal cavity, and the lumbotomy incision was sutured. Animals were monitored to evaluate tumor growth using palpation. Monitoring was carried out up to 15 months. Animals that presented evidence of tumor growth were euthanized; tumors were removed and divided for reimplantation,

cell culture, cryopreservation, DNA extraction, and histological evaluation.

Cryopreservation

We used two different protocols for cryopreservation: slow freezing and vitrification. Slow freezing is the conventional method used in living biobanks, and uses 10% dimethyl-sulfoxide (DMSO), 50% fetal bovine serum, and 40% culture medium. Cryotubes with tumor samples were transferred to freezing containers with slow cooling rates. Tubes were rapidly thawed at 37°C, and tumor fragments were washed twice in cold PBS and implanted. The vitrification method consisted of rapid freezing of tumor tissue in liquid nitrogen using a solution with basal medium, 0.5M sucrose + 10% fetal bovine serum (FBS). For thawing, successive washes were performed in three steps, first with a solution containing 80% DMEN, 20% FBS, and 0.5M sucrose for 45 min in orbital shaking at 4°C. In the second step, sucrose concentration was decreased to 0.25M. Fragments were incubated with sucrose-free medium during the third step [19].

Primary Cultures

Tumor fragments from PDX were minced into small pieces with the aid of a scalpel in 100 mm Petri dishes in cold Hank's balanced salt solution and centrifuged for two minutes at 1500 rpm. The pellet was resuspended in a mixture of 0.1% collagenase II or IV and 0.1% trypsin in orbital shaking (600 rpm) at 37°C for 90 min. Enzymatic activity was neutralized with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with high glucose plus 20% FBS. Tubes were centrifuged for 2 minutes at 1500 rpm, and pellets were resuspended in DMEM with high glucose. Cells were filtered through a 40-µm filter to remove non-dissociated cell clumps. The single cell suspension was then cultured in DMEM with 20% fetal bovine serum and 1% gentamicin on culture dishes in a modified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Immunohistochemical staining was performed in the Ventana Discovery XT automated system (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) using commercially available antibodies against PAX8 (clone MRQ-50-Ventana/Cell Marque), cytokeratin-7 (CK7, clone SP52-Ventana/Cell Marque), carbonic

anhydrase IX (CAIX, clone EP161 Cell Marque), and alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR, clone 13H4, Cell Marque). Images were acquired by using a Aperio Imagescope (Leica Biosystems). Cultured cells were fixed for immunofluorescence with 4% paraformaldehyde for 20 min, washed twice with PBS, and incubated overnight with primary antibodies followed by incubation with fluorescent-conjugated AlexaFluor 488 antibodies. Images of cultured cells were obtained by using a Leica SP5 TCS SP II confocal microscope.

Targeted next-generation sequencing

Samples were provided by the A.C. Camargo Cancer Center Biobank. DNA extraction from fresh frozen or formalin-fixed paraffin-embedded patient tumors was performed in the QIASymphony platform (Qiagen, CA, EUA), following standard procedures. Purity and quantification were evaluated in the Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, DE, USA) and the Qubit QUANT-IT dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies, CA, USA), respectively. DNA integrity was determined in Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, CA, USA). DNA libraries were generated using QIAseq Targeted DNA Custom Panel and QIAseq 96-Index I Set A kit, following the manufacturer's instructions and sequenced in the NextSeq 500 Illumina platform. The custom panel consisted of the complete coding regions of 21 frequently mutated genes in kidney cancer: *VHL*, *ARID1A*, *KDM6A*, *PBRM1*, *SMARCA4*, *SMARCB1*, *BAP1*, *PCF11*, *NFE2L2*, *SETD2*, *AR*, *STAG2*, *KDM5 C*, *MET*, *CDKN2A*, *PTEN*, *FAT1*, *FH*, *TP53*, *NF2*, and *FLCN*. This panel also included hotspot regions in *MTOR*, *PIK3CA*, *NRAS*, *BRAF*, *EGFR*, *KRAS*, and *TCEB1*.

To determine whether the mutational repertoires of patient tumors were present in the respective xenograft tumors, we performed either amplicon sequencing or sequencing of the custom gene panel in DNA extracted from PDXs at passage one. Amplicon libraries were generated using the Ion Plus Fragment Library kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol, and sequencing was performed on the Ion Proton platform (Thermo Fisher Scientific). Gene panel sequencing was performed as described for patients' tumors. For the gene panel, variant calling and annotation were performed with GeneGlobe software (Qiagen) and Varsseq software (Golden Helix), respectively. Variants were filtered based on variant allele frequency (>3%), variant cov-

erage (100X), absence from leucocyte DNA pools (from 4 to 5 patients) and minor allele frequency <1%. For amplicon sequencing, visual inspection of base calling and absolute base frequencies annotation were performed using Integrative Genome Viewer (IGV) [20]. The mutation was considered present if the variant allele frequency was >3%, with a minimum coverage depth of 500X.

Statistical analysis

Pathologic stage was assigned according to the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual and histologic grade from International Society of Urological Pathology, which is currently recommended by the World Health Organization. Associations were assessed with χ^2 tests or Fisher's exact test to compare histopathologic features between patients whose tumors were successfully vs. unsuccessfully engrafted as PDX, or between orthotopic and ectopic implantation, with a significance level of 5%. The Kaplan–Meier method was used to evaluate metastasis-free survival and overall survival, with the log-rank test used for comparison. Statistical analysis was performed using the SPSS 25.0 software package (SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

The initial attempt to establish RCC PDX was conducted by using ectopic (subcutaneous) transplantation in the dorsal region of NSG mice. Seventeen patients with tumors of different stages and subtypes were recruited. Three patients developed post-transplantation lymphoproliferative disease unrelated to RCC (data not shown). No tumor growth was observed following ectopic implantation. PDX were obtained only following orthotopic implantation in the renal subcapsular space. Tumor fragments from 70 patients gave rise to 19 PDX consisting of 15 clear cell, three papillary, and one unclassifiable subtype. The overall take rate was 27% and the time to observe tumor growth varied from 1 to 13 months. All PDX were reinoculated in second and third passages with 100% of take rate and no alterations in tumor growth time.

PDX take rate was unrelated to tumor size ($p=0.071$). However, an association between tumor growth and take rate was suggested by increasing take rates of 18%, 36%, and 100% among pT1 (pT1a + pT1b), pT3a (invasion of perinephric fat

Table 1
Clinical characteristics of patients and tumor implantation route influencing PDX take rate

PDX engraftment		Orthotopic		P	Ectopic Total N = 17
		Yes N = 19	Total N = 70		
Gender	Male	12	48	0.76	10
	Female	7	22		7
Age	Mean	59.5	56.9		63
Time to growth (months)	Mean	6	–		–
	Minimum	1	–		
	Maximum	13	–		
Subtype	Clear cell	15	55	1.00	13
	Papillary	3	10		3
	MIT family translocation	0	2		0
	Unclassifiable	1	3		1
Staging	pT1a	5	24	0.09	11
	pT1b	4	21		3
	pT2a	0	2		0
	pT3a	7	19		3
	pT3b	3	3		0
	pT4	0	1		0
Histologic grade	1	0	3	0.49	0
	2	6	24		6
	3	7	29		8
	4	6	14		3
Sarcomatoid	Yes	5	9	0.05	0
	No	14	61		17
Rhabdoid	Yes	6	11	0.05	0
	No	13	59		17
Necrosis	Yes	8	23	0.393	5
	No	11	47		12

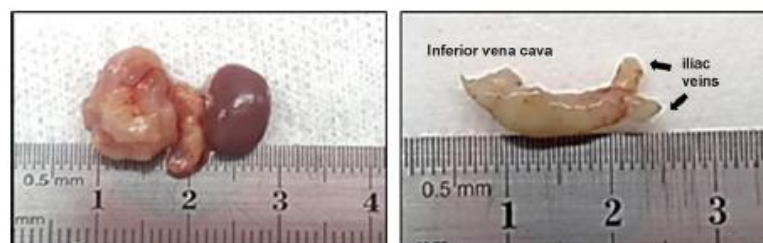


Fig. 1. Vena caval thrombosis in orthotopic PDX model. Left image shows nephrectomy with vena cava. Right image shows the isolated inferior vena cava with complete obstruction caused by tumor thrombus.

and renal vasculature), and pT3b (invasion of renal vein and inferior vena cava) stage tumors, respectively (Table 1). Interestingly, the PDX derived from a patient with vena caval tumor thrombus extension (ID 55) resulted in the same phenotype (Fig. 1). In this specific case, we obtained ectopic implants after passage 1. We observed only one case of pT4, in which a biopsy was used to inoculate NSG mice, and no tumor growth was observed. Histologic grade and the presence of necrosis were unrelated to PDX take rate. However, the presence of either sarcomatoid or rhabdoid cells, which also characterize grade 4, was

associated with PDX growth ($p = 0.019$ and $p = 0.036$, respectively).

Demographic and clinical characteristics were similar between patients whose tumors were implanted ectopically or orthotopically. There were no differences in gender ($p = 0.567$), age ($p = 0.106$), subtype ($p = 0.539$), staging ($p = 0.62$), histologic grade ($p = 1.000$), the presence of necrosis ($p = 1.000$), or the presence of sarcomatoid or rhabdoid cells ($p = 0.195$ and 0.112 , respectively) between the two groups. These findings did not identify any differences that could explain the absence of tumor

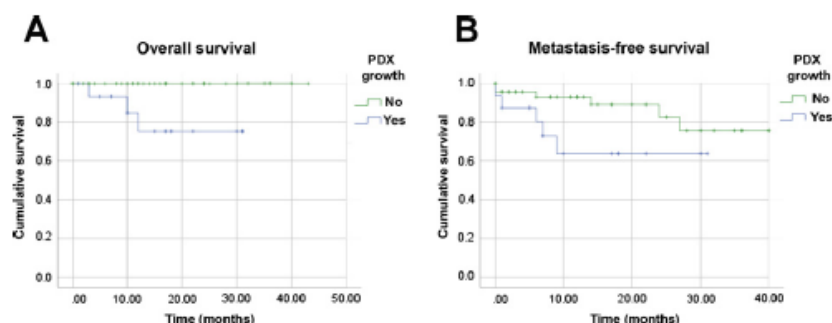


Fig. 2. Tumor engraftment capacity is a prognostic factor in RCC. Kaplan-Meier analyses of overall (A) and metastasis-free (B) survivals of 70 RCC patients related to engraftment of orthotopic PDX. All histologic subtypes and clinical stages were included.

growth in the ectopic cohort and strongly suggest that the site of implantation is a major determinant of tumor growth. All information is summarized in Table 1 and the individual compilation of clinical characteristics is available in Supplementary Table 1.

Due to the similarities between patients' tumors and their derived xenografts, we investigated whether PDX growth capacity could represent a prognostic factor for RCC (Fig. 2). Patients whose tumor fragments engrafted experienced worse overall survival (OS) than those whose tumor fragments that did not engraft ($p=0.003$). Our data also suggested a similar association with metastasis-free survival (MFS) ($p=0.063$) that may be further evaluated in a larger cohort. Only one pT1 patient whose tumor yielded a PDX experienced disease progression (ID 43). All other patients who developed metastasis who died were at the pT3 stage. The median MFS for patients with successful PDX was 21.6 months (95% CI: 14.9, 28.3), compared to a median of 34.4 months (95% CI: 30.4, 38.5 $p=0.003$) among PDX engraftment-negative patients. These findings suggest that tumor engraftment capacity can identify patients at increased risk of relapse or death. Furthermore, pT1 stage tumors with the ability to engraft could also facilitate the identification of risk factors related to the rare pT1 cases with disease progression.

RCC PDX were characterized by immunohistochemistry and next-generation sequencing. Figure 3 shows representative images of PDX of clear cell and papillary subtypes. Carbonic Anhydrase IX (CAIX) and Paired Box 8 (PAX8) positivity associated with cytokeratin 7 (CK7) status were used to determine the clear cell phenotype. The combined use of Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) and CK7 was used to determine papillary RCCs. The similarity of

tumor and PDX immunotypes was demonstrated in all cases.

An essential aspect of PDX, in the case of RCC, is high-quality cryopreservation maintenance in a biobank. In our experience, slow freezing protocols, such as those used to cryopreserve primary cells, compromise PDX viability and impair tumor growth (data not shown). We currently use a vitrification method to cryopreserve PDX fragments that, after thawing and reimplantation, exhibit growth rates similar to those of the original tumors.

To complement the PDX platform with *in vitro* models, we derived early passage primary cultures from all PDX and performed immunofluorescence to demonstrate the fidelity of tumor cells to their subtypes (Fig. 4). The large majority of cultures presented a limited number of passages (4 to 6) before entering senescence. An immortalized lineage was generated by serial passaging in only one case (clear cell), and exhibited tumorigenic activity in NSG mice (data not shown).

To characterize the somatic tumor mutation repertoire of our PDX cohort, we used a customized target sequencing panel containing the most frequently mutated genes in RCC. From the total of 19 PDX, we compared the sequences of 13 patients' tumor samples with their respective PDX. In most patients (92% - 11/13), at least one mutation in patients' tumor was identified in the PDX (Table 2). No alterations were identified in only one case (ID 52). The most frequently mutated genes were *VHL* (50% - 6/12) and *PBRM1* (41.7% - 5/12), followed by *SETD2* (25% - 3/12), *BAP1* and *KDM5C* (both 16.7% - 2/12), and *ARID1A* (8.3% - 1/12). Interestingly, most of the matching mutations (83.3% - 20/24) presented a higher variant allele frequency (VAF) in the PDX than in the respective tumors, with several

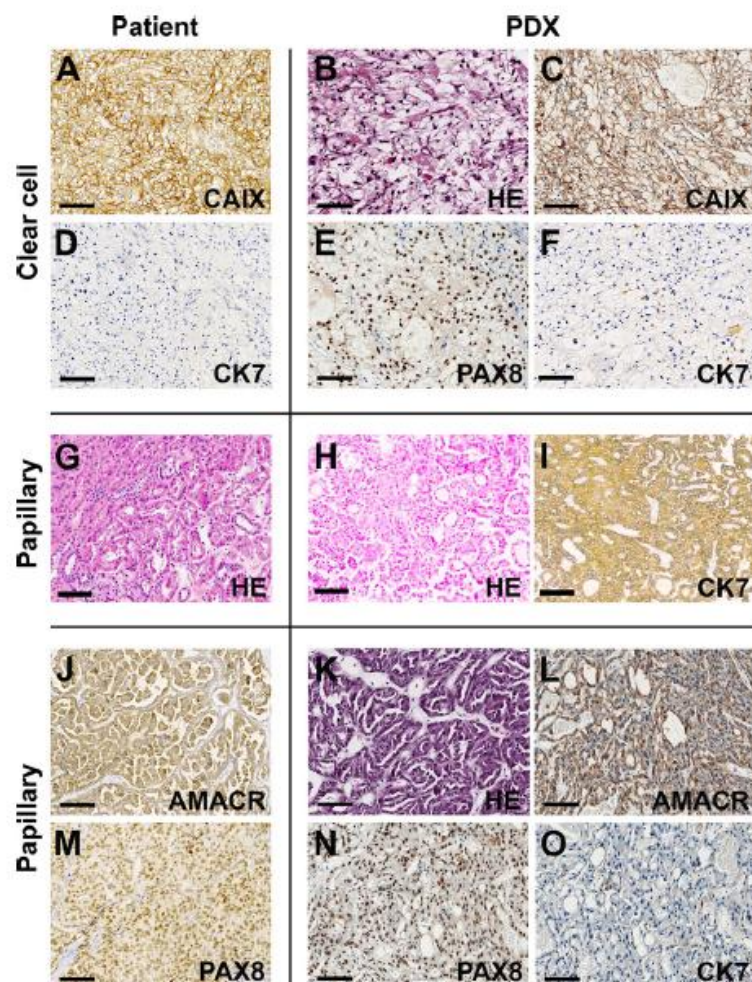


Fig. 3. Patient-derived xenografts preserve the major morphologic characteristics and molecular markers of RCC. Representative images from clear cell (A-F) and papillary (G-O) cases comparing the presence of RCC markers in patient tumors (left panels) and their respective PDX (right panels). Calibration bars = 100 μ m. AMACR – Alpha-methylacyl-CoA racemase; CAIX – Carbonic anhydrase XI; CK7 – Cytokeratin 7; HE – hematoxylin and eosin; PAX8 – Paired box 8.

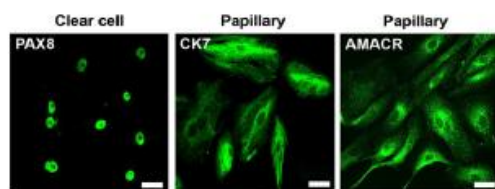


Fig. 4. Primary cultures from PDX maintain RCC characteristics. Immunofluorescence of representative cell cultures of clear cell and papillary cases expressing PAX8, CK7 and AMACR, respectively. Calibration bars = 50 μ m.

PDX exhibiting VAFs compatible with loss of heterozygosity (VAFs > 65%).

Of the ten sequenced ccRCC cases, seven had *VHL* mutations, two had *BAP1* mutations, and one had concomitant *VHL* and *BAP1* mutations (ID 55). Two ccRCC patients who died had both *VHL* and *PBRM1* mutations, while the third death was of a pRCC patient with an *ARID1A* mutation. One pRCC case (ID 59) had an *MET* mutation, while the other case no displayed no alterations. We performed panel sequencing of two areas of one patient tumor (ID 64). Three mutations in *VHL*, *PBRM1* (c.778-1 G > A)

Table 2
Somatic mutations identified in tumors from patients and PDX

ID	Histology	pT Stage	Gene	Effect	Information Ref Seq		Variant protein	Patient Allele freq. (%)	PDX Allele freq. (%)
					Variant codon				
43	Clear cell	pT1a	VHL	Missense	c.287A>C		p.Gln96Pro	31.8%	99.9%
48	Clear cell	pT1a	PBRM1	LoF	c.447+1G>C		p.spl?	n.d	99.9%
			VHL	Missense	c.349T>C		p.Trp117Arg	17.3%	0.0%
			PBRM1	LoF	c.457C>T		p.Gln153Ter	19.9%	0.0%
50	Clear cell	pT1a	VHL	LoF	c.444delT		p.Phe148Leufs*11	46.1%	86.1%
			PBRM1	LoF	c.3253G>T		p.Glu1085Ter	50.5%	88.5%
52	Papillary Papillary	pT1a	AR	Missense	c.170T>A		p.Leu57Gln	7.1%	2.4%
			—	—	—		—	—	—
59	Papillary	pT1a	MET	Missense	c.3209T>C		p.Val1070Ala	51.5%	67.0%
			SMARCA4	Missense	c.3699G>A		p.Met1233Ile	37.8%	51.6%
27	Clear cell	pT1b	BAP1	Missense	c.517T>A		p.Tyr173Asn	10.0%	99.0%
			CDKN2A	Missense	c.262G>A		p.Glu88Lys	2.9%	n.d.
			TP53	Missense	c.711G>A		p.Met237Ile	10.9%	82.0%
32	Papillary	pT3a N1	ARID1A	LoF	c.403delT		p.Cys135Alafs	6.7%	4.4%
			ARID1A	LoF	c.5904T>A		p.Cys1968Ter	42.0%	49.2%
35	Clear cell	pT3a	VHL	LoF	c.6781delA		p.Ile2261Serfs	42.8%	46.0%
			PBRM1	LoF	c.344_345insC		p.Leul16Profs	28.5%	79.3%
51	Clear cell	pT3a	KDM5C	LoF	c.813+1G>A		p.spl?	31.8%	98.0%
			VHL	LoF	c.503delinsAG		p.Gln168Hisfs	47.0%	99.0%
			SETD2	LoF	c.162_172delGGAGCCCGGGC		p.Glu55Alafs	53.3%	78.1%
55	Clear cell	pT3a	PBRM1	LoF	c.4917+1G>A		p.spl?	54.2%	71.9%
			VHL	LoF	c.3079C>T		p.Arg1027Ter	50.3%	69.0%
64	Clear cell	pT3a	BAP1	Missense	c.458T>C		p.Leu153Pro	21.2%	89.0%
			FAT1	LoF	c.38G>T		p.Gly13Val	19.8%	92.1%
			VHL	LoF	c.5178delC		p.Phe1727Leufs*9	16.6%	n.d.
53	Clear cell	pT3a	PBRM1	LoF	c.280G>T		p.Glu94Ter	39.6% (FF);	99.1%
			SETD2	LoF	c.778-1G>A		p.spl?	44.0% (FFPE)	n.d.
			PBRM1	LoF	c.1265C>G		p.Ser422Ter	33.5% (FF);	n.d.
68	Clear cell	pT3b	PBRM1	LoF	c.1063A>T		p.Lys355Ter	2.8% (FFPE)	100.0%
			SETD2	LoF	c.6837dupT		p.Val2280Cysfs*89	11.0% (FF);	68.1%
68	Clear cell	pT3b	KDM5C	Missense	c.1883_1903del		p.Gln628_Arg634del	1.7% (FFPE)	57.1%
			TP53	Missense	c.511G>A		p.Glu1711Lys	0.0% (FF);	99.7%

and *SETD2* were identified in both regions of the tumor, but with striking differences in VAF for the *PBRM1* mutations. Additionally, one *PBRM1* mutation (c.1063A>T) was identified only in one lesion, and with a high VAF (42%). In the PDX, only the *VHL* and *PBRM1* (c.1063A>T) mutations were identified. This case illustrates the intratumor molecular heterogeneity of ccRCC tumors.

DISCUSSION

Herein, we report a workflow to generate patient-derived RCC xenografts with high take rates. PDX tumors preserved the major biological features of the respective patient tumors, including histological and molecular markers and the potential to disseminate in a venous tumor thrombus. Tumor engraftment indicated a poor patient prognosis.

Low-passage patient-derived tumor models are currently the best tools to translate knowledge from basic cancer research to clinical practice [21]. These models may be established *in vitro* as patient-derived organoids (PDO) and *in vivo* as PDX. Both models have their pros and cons, and may be used as complementary methods. While PDO are generated without animals and preserve the tumor microenvironment (including immune infiltration) and tumor heterogeneity, this model system is limited by its inability to recapitulate clinical features that entail whole organs, multiple organ systems, and distant anatomic sites; such as metastasis [16, 22] or systemic dissemination as observed in one case from our cohort. Consequently, PDX models are still necessary to fully understand tumorigenesis and also to evaluate antineoplastic drug candidates [23, 24]. The restoration of the immune systems of immunodeficient mice with human immune cells (humanized models) brings PDX even closer to human tumors [25, 26].

We obtained PDX only from fresh human tumor tissue using the orthotopic route, suggesting that the organ microenvironment is necessary for tumor growth [17, 27]. Only in one case were we able to obtain a secondary ectopic implant, but this case was unique in terms of aggressiveness, with prominent sarcomatoid and rhabdoid features, perinephric fat invasion, and extensive tumor dissemination through the vena cava. These features are biomarkers for tumor relapse [28–31] and are important to guide follow-up, but frequently fail to predict outcomes [32]. Consequently, the development of animal

models that recapitulate the micro- and macroscopic characteristics of RCC is imperative. The 27% take rate observed in our cohort is higher than those of previous studies [33, 34]. Our cohort included less aggressive tumors, such as pT1 stage and histologic grade 2 lesions, indicating that our PDX cohort was not biased by tumors with greater potential for growth in NSG mice. These findings also have prognostic value, since the capacity to generate tumors in immunodeficient mice indicated poor overall and metastasis-free survivals. Similar results were reported in other studies of RCC [33] and also of head and neck [35], mesothelioma [36], melanoma [37], breast [38, 39], lung [40] and pancreatic [41] cancers. Our results could also facilitate the identification of biomarkers to guide adjuvant therapy of pT3 cases. The use of immune checkpoint inhibitors as adjuvant therapy was recently reported [11], but the combination of immune checkpoint inhibitors with tyrosine kinase inhibitors to improve disease-free survival remains a clinical challenge [42]. Thus, the discovery of more reliable biomarkers is urgently needed to enable patients and their oncologists to adhere to this therapeutic modality. Novel biomarkers of high recurrence risk could be sought in patients with increased capacity to generate PDX.

An important aspect observed in our cohort was the cryopreservation of PDX tissue. Cryopreservation methods that are efficient in maintaining cellular viability are essential to establish a PDX biorepository that maintains primary tumor characteristics, especially those related to tumor heterogeneity. Many studies have used methods similar to those used for *in vitro* cell preservation, with the use of cryopreservation agents, such as DMSO [27,43]. In our lab conditions, this method is ineffective, and limited to very aggressive tumors. Instead, we used vitrification that utilized rapid freezing of tumor tissue (in the presence of cryopreservation agents) in liquid nitrogen [44]. The primary advantage of this technique is the solidification of living cells in the form of glass, which obviates the formation of ice crystals that are cytotoxic during freezing and thawing [45]. The use of slow or rapid freezing may have pros and cons in different tumor types. For example, slow-freezing of prostate PDX is recommended over rapid-freezing [46]. The eventual differences in cryopreservation methods should be better characterized for kidney tissue and other urologic cancers.

Another point of intense discussion is murine-specific intratumoral evolution that can occur during PDX development [47, 48]. Our data demonstrate that

the majority of PDX carry the same mutations found in the respective patient's tumor; however, higher variant allele frequencies (VAFs) are found in 83% of PDX, which is compatible with loss of heterozygosity (LoH) [47]. Nonetheless, it is important to note that the molecular characterizations of our PDX cohort could also be influenced by multi-region heterogeneity [32, 49]. In advanced cases treated with total nephrectomy, regional differences of molecular alteration can also cause discrepancies in PDX VAFs. A recent study demonstrated that copy number alteration evolution during PDX engraftment and passaging is similar to the variation observed in different samples from the same patient, preserving molecular fidelity to the patient's tumor, thus favoring the use of PDX as a preclinical drug testing tool [48].

As demonstrated in multiple studies, PDX from RCC are predictive models for therapeutic responses to anti-angiogenic agents, mTOR (mammalian Target of Rapamycin) inhibitors [33, 34, 50, 51] and new anti-tumoral agents, such as HIF-2 inhibitors [52, 53]. Together, these findings support the use of PDX for a variety of studies, because the modeling of aspects of RCC basic tumor biology that still elude other translational initiatives will culminate in patient benefits through either the development of new therapeutic strategies or the use of these models as precision medicine tools.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Dr. Marilene Lopes and Dr. José Augusto Rinck for critically reading the manuscript and helpful discussions.

FUNDING

This work was supported by Sao Paulo State Research Support Foundation (FAPESP, grant numbers 2014/50943-1, 2015/50428-2 and 2018/25541-8), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant number 465682/2014-6) and Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON). Fellowships from Higher Education Improvement Coordination (CAPES) to A.O.B, E.C.E, A.I and I.T.M. FAPESP fellowship to E.C.E. PNL was supported by NCI Cancer Center Support Grant P30 CA093373.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.O.B performed the experimental mouse work, contributed to data interpretation and manuscript writing. E.C.E and A.I performed cell culture experiments and manuscript writing. S.M.B conducted pathological analysis, contributed to data interpretation and manuscript writing. H.D contributed to mouse work. I.W.C contributed to pathological analysis and manuscript writing. G.T.T coordinated genetic analysis and contributed to manuscript writing. I.T.M. performed genetic analysis. D.M.C contributed in data interpretation and manuscript writing. P.N.L developed the hypothesis and contributed to manuscript writing. S.C.Z developed the hypothesis, interpreted the data and contributed to manuscript writing. V.R.M developed the hypothesis, interpreted the data and contributed to manuscript writing. T.G.S developed the hypothesis, led the project, interpreted the data and wrote the manuscript.

COMPETING INTERESTS

AOB, ECE, AI, SMB, HD, IWC, GTT, ITM, DMC, PNL, SCZ, VRM, TGS declare no competing interests. Dr. Primo N. Lara, Jr. is co-Editor-in-Chief and Dr. Stenio C. Zequi is an Editorial Board Member of this journal, but they were not involved in the peer-review process of this paper, nor had access to any information regarding its peer-review.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The supplementary material is available in the electronic version of this article: <https://dx.doi.org/10.3233/KCA-210011>.

REFERENCES

- [1] Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. *The Lancet*. 2016;387(10021):894-906.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
- [3] Zequi S de C, Mourão TC, de Oliveira MM, Curado MP, Gueglio G, da Costa WH, et al. Predictors of Survival Outcomes in Non-Metastatic Renal Cell Carcinoma in Latin America and Spain: A Multicentric Analysis. *Kidney Cancer*. 2019;3(4):253-61.
- [4] 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;70(1):93-105.
- [5] Trpkov K, Hes O, Williamson SR, Adeniran AJ, Agaimy A, Alaghebandan R, et al. New developments in existing WHO entities and evolving molecular concepts: The Genitourinary Pathology Society (GUPS) update on renal neoplasia. *Modern Pathology*. 2021;34(7):1392-424.
 - [6] Linehan WM, Ricketts CJ. The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications. *Nature Reviews Urology*. 2019;16(9):539-52.
 - [7] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(1):7-30.
 - [8] Bianchi M, Sun M, Jeldres C, Shariat SF, Trinh Q-D, Briganti A, et al. Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23(4):973-80.
 - [9] Reese AC, Whitson JM, Meng M V. Natural history of untreated renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. *Urologic Oncology*. 2013;31(7):1305-9.
 - [10] Motzer RJ, Banchereau R, Hamidi H, Powles T, McDermott D, Atkins MB, et al. Molecular Subsets in Renal Cancer Determine Outcome to Checkpoint and Angiogenesis Blockade. *Cancer Cell*. 2020;38(6):803-817.e4.
 - [11] Choueiri TK, Tomczak P, Park SH, Venugopal B, Ferguson T, Chang Y-H, et al. Adjuvant Pembrolizumab after Nephrectomy in Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(8):683-94.
 - [12] McKay RR. The Promise of Adjuvant Immunotherapy in Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(8):756-8.
 - [13] Gul A, Rini BI. Adjuvant therapy in renal cell carcinoma. *Cancer*. 2019;125(17):2935-44.
 - [14] Byrne AT, Alferez DG, Amant F, Annibaldi D, Arribas J, Biankin A V, et al. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nature Reviews Cancer*. 2017;17(4):254-68.
 - [15] Sun H, Cao S, Mashl RJ, Mo C-K, Zaccaria S, Wendl MC, et al. Comprehensive characterization of 536 patient-derived xenograft models prioritizes candidates for targeted treatment. *Nature Communications*. 2021;12(1):5086.
 - [16] Grisanzio C, Seeley A, Chang M, Collins M, Di Napoli A, Cheng S-C, et al. Orthotopic xenografts of RCC retain histological, immunophenotypic and genetic features of tumours in patients. *The Journal of Pathology*. 2011;225(2):212-21.
 - [17] Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15(8):451-2.
 - [18] Brown MJ, Pearson PT, Tomson FN. Guidelines for animal surgery in research and teaching. AVMA Panel on Animal Surgery in Research and Teaching, and the ASLAP (American Society of Laboratory Animal Practitioners). *American Journal of Veterinary Research*. 1993;54(9):1544-59.
 - [19] Lunardi FO, de Aguiar FLN, Apolloni LB, Duarte ABG, de Sá NAR, Leal ÉSS, et al. Sheep Isolated Secondary Follicles Are Able to Produce Metaphase II Oocytes After Vitrification and Long-Term In Vitro Growth. *Biopreservation and Biobanking*. 2017;15(4):321-31.
 - [20] Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*. 2011;29(1):24-6.
 - [21] Bleijs M, Wetering M, Clevers H, Drost J. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *The EMBO Journal*. 2019;38(15).
 - [22] Metildi CA, Kaushal S, Hoffman RM, Bouvet M. *In vivo* serial selection of human pancreatic cancer cells in orthotopic mouse models produces high metastatic variants irrespective of Kras status. *The Journal of Surgical Research*. 2013;184(1):290-8.
 - [23] Malaney P, Nicosia SV, Davé V. One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Letters*. 2014;344(1):1-12.
 - [24] Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15(5):311-6.
 - [25] Chen Q, Wang J, Liu WN, Zhao Y. Cancer Immunotherapies and Humanized Mouse Drug Testing Platforms. *Translational Oncology*. 2019;12(7):987-95.
 - [26] Wang M, Yao L, Cheng M, Cai D, Martinek J, Pan C, et al. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *The FASEB Journal*. 2018;32(3):1537-49.
 - [27] Pavia-Jiménez A, Tcheuyap VT, Brugarolas J. Establishing a human renal cell carcinoma tumorigraft platform for preclinical drug testing. *Nature Protocols*. 2014;9(8):1848-59.
 - [28] Bakouny Z, Braun DA, Shukla SA, Pan W, Gao X, Hou Y, et al. Integrative molecular characterization of sarcomatoid and rhabdoid renal cell carcinoma. *Nature Communications*. 2021;12(1):808.
 - [29] da Costa WH, Moniz RR, da Cunha IW, Fonseca FP, Guimaraes GC, de Cássio Zequi S. Impact of renal vein invasion and fat invasion in pT3a renal cell carcinoma. *BJU International*. 2012;109(4):544-8.
 - [30] Zhang BY, Thompson RH, Lohse CM, Leibovich BC, Boorjian SA, Cheville JC, et al. A novel prognostic model for patients with sarcomatoid renal cell carcinoma. *BJU International*. 2015;115(3):405-11.
 - [31] Leibovich BC, Lohse CM, Cheville JC, Potretzke TA, Tsivian M, Shah PH, et al. Renal Cell Carcinoma with Inferior Vena Cava Extension: Can Classification Be Optimized to Predict Perioperative Outcomes? *Kidney Cancer*. 2020;4(2):111-5.
 - [32] 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(3):595-610.e11.
 - [33] Sivanand S, Peña-Llopis S, Zhao H, Kucejova B, Spence P, Pavia-Jimenez A, et al. A validated tumorigraft model reveals activity of dovitinib against renal cell carcinoma. *Science Translational Medicine*. 2012;4(137):137ra75.
 - [34] Lang H, Béraud C, Bethry A, Danilin S, Lindner V, Coquard C, et al. Establishment of a large panel of patient-derived preclinical models of human renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(37):59336-59.
 - [35] Karamboulas C, Bruce JP, Hope AJ, Meens J, Huang SH, Erdmann N, et al. Patient-Derived Xenografts for Prognostication and Personalized Treatment for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cell Reports*. 2018;25(5):1318-1331.e4.
 - [36] Wu L, Allo G, John T, Li M, Tagawa T, Opitz I, et al. Patient-Derived Xenograft Establishment from Human Malignant Pleural Mesothelioma. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(4):1060-7.
 - [37] Némati F, Sastre-Garau X, Laurent C, Couturier J, Mariani P, Desjardins L, et al. Establishment and Characterization of a Panel of Human Uveal Melanoma Xenografts Derived from Primary and/or Metastatic Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(8):2352-62.

- [38] DeRose YS, Wang G, Lin Y-C, Bernard PS, Buys SS, Ebbert MTW, et al. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nature Medicine*. 2011;17(11):1514-20.
- [39] McAuliffe PF, Evans KW, Akcakanat A, Chen K, Zheng X, Zhao H, et al. Ability to Generate Patient-Derived Breast Cancer Xenografts Is Enhanced in Chemoresistant Disease and Predicts Poor Patient Outcomes. Coleman WB, editor. *PLOS ONE*. 2015;10(9):e0136851.
- [40] John T, Kohler D, Pintilie M, Yanagawa N, Pham N-A, Li M, et al. The Ability to Form Primary Tumor Xenografts Is Predictive of Increased Risk of Disease Recurrence in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(1):134-41.
- [41] Garrido-Laguna I, Uson M, Rajeshkumar NV, Tan AC, de Oliveira E, Karikari C, et al. Tumor Engraftment in Nude Mice and Enrichment in Stroma-Related Gene Pathways Predict Poor Survival and Resistance to Gemcitabine in Patients with Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(17):5793-800.
- [42] Kazarian AG, Chawla NS, Muddasani R, Pal SK. Adjuvant Therapy in Renal Cell Carcinoma: Current Status and Future Directions. *Kidney Cancer*. 2021;5(1):9-20.
- [43] Kimple RJ, Harari PM, Torres AD, Yang RZ, Soriano BJ, Yu M, et al. Development and Characterization of HPV-Positive and HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(4):855-64.
- [44] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 1998;51(1):53-8.
- [45] Wietcovsky L, Til D, Salvador RA, Amaral NLL, Senn AP, Amaral VLL. Ovarian tissue vitrification and heterotopic autologous transplantation in prepubertal Wistar rats. *JBRA Assisted Reproduction*. 2018;
- [46] Porter LH, Lawrence MG, Wang H, Clark AK, Bakshi A, Obinata D, et al. Establishing a cryopreservation protocol for patient-derived xenografts of prostate cancer. *The Prostate*. 2019;79(11):1326-37.
- [47] Ben-David U, Ha G, Tseng Y-Y, Greenwald NF, Oh C, Shih J, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nature Genetics*. 2017;49(11):1567-75.
- [48] Woo XY, Giordano J, Srivastava A, Zhao Z-M, Lloyd MW, de Bruijn R, et al. Conservation of copy number profiles during engraftment and passaging of patient-derived cancer xenografts. *Nature Genetics*. 2021;53(1):86-99.
- [49] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(10):883-92.
- [50] Dong Y, Manley BJ, Becerra MF, Redzematovic A, Casascelli J, Tennenbaum DM, et al. Tumor Xenografts of Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma But Not Corresponding Cell Lines Recapitulate Clinical Response to Sunitinib: Feasibility of Using Biopsy Samples. *European Urology Focus*. 2017;3(6):590-8.
- [51] Jiménez-Valerio G, Martínez-Lozano M, Bassani N, Vidal A, Ochoa-de-Olza M, Suárez C, et al. Resistance to Antiangiogenic Therapies by Metabolic Symbiosis in Renal Cell Carcinoma PDX Models and Patients. *Cell Reports*. 2016;15(6):1134-43.
- [52] Cho H, Du X, Rizzi JP, Liberzon E, Chakraborty AA, Gao W, et al. On-target efficacy of a HIF-2 α antagonist in preclinical kidney cancer models. *Nature*. 2016;539(7627):107-11.
- [53] Chen W, Hill H, Christie A, Kim MS, Holloman E, Pavia-Jimenez A, et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature*. 2016;539(7627):112-7.

ANEXO 2 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

[acProjects] Projeto 2201/16 aprovado

Assunto: [acProjects] Projeto 2201/16 aprovado

De: noreply@cipe.accamargo.org.br

Data: 09/08/2016 15:02

Para: tsantos@cipe.accamargo.org.br

acProjects - Sistema de Gerência de Projetos

Caro(a) Sr.(a)

Informamos que o projeto citado abaixo foi aprovado pela comissão responsável:

Alias: TGdS1997

Código de Ética: 2201/16

Título: Xenoenxertos tumorais como uma abordagem para identificar biomarcadores tumorais em vesículas extracelulares circulantes – carcinoma de células renais como modelo de estudo.

Atenciosamente,

CIFE

Centro Internacional de Pesquisa e Ensino - A. C. Camargo Cancer Center

ANEXO 3 – 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:
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

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

II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Xenotransplantes tumorais como uma abordagem para identificar biomarcadores tumorais em vesículas extracelulares circulantes em carcinoma de células renais.

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Tiago Góss dos Santos

3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:

- Vilma Regina Martins – Centro Internacional de Pesquisa – A. C. Camargo Cancer Center
- Isabela Werneck da Cunha – Departamento de Anatomia Patológica – A. C. Camargo Cancer Center
- Stênio de Cássio Zéqui – Núcleo de Urologia – A.C. Camargo Cancer Center
- Walter da Costa – Núcleo de Urologia – A.C. Camargo Cancer Center
- Gláucia Hajj – Centro Internacional de Pesquisa – A. C. Camargo Cancer Center
- Stephania Bezerra – Departamento de Anatomia Patológica – A. C. Camargo Cancer Center
- Stefano Piatto Clerici – Centro Internacional de Pesquisa – A.C. Camargo Cancer Center
- Maria Nirvana Formiga – Departamento de Oncologia Clínica – A.C. Camargo Cancer Center
- Jefferson Luiz Gross – Núcleo de Pulmão e Tórax – A.C. Camargo Cancer Center
- Chiang Jen Tyng – Núcleo de Diagnóstico por Imagem – A.C. Camargo Cancer Center

4. DURAÇÃO DA PESQUISA:

24 meses

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

Versão 5 – Jul/22

Página 1 de 6

Rubrica do pesquisador

Rubrica do
participante



O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Xenoinxertos tumorais como uma abordagem para identificar biomarcadores tumorais em vesículas extracelulares circulantes em carcinoma de células renais”, que será realizada no A.C. Camargo Cancer Center.

O convite para a participação no presente estudo está sendo realizado após sua consulta com o Núcleo de Urologia do A.C. Camargo Cancer Center, onde serão esclarecidas todas as questões referentes ao seu diagnóstico e tratamento.

IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivos principais estabelecer novos métodos de estudo de tumores baseados em *Patient Derived Xenograft* ou PDX, e em *Patient Derived Organoids* ou PDO, em português, Enxerto (tumor) Derivado de Paciente e Organoides (estrutura tridimensional tumoral) Derivado de Paciente, respectivamente. Os PDX são produzidos em camundongos através do transplante de uma pequena parte de seu tumor no animal. Essa pequena parte do tumor transplantada no animal irá formar um novo tumor, semelhante ao que se desenvolveu em você. O PDX faz com que o tumor de um paciente agora possa ser estudado e tratado em um camundongo. O PDX mantém grande parte das características do tumor do paciente, sendo extremamente útil para pesquisa de biomarcadores da doença (moléculas que indicam acontecimentos biológicos no organismo). Por sua vez, os PDOs, são estruturas tridimensionais produzidas e mantidas em ambiente laboratorial. Pequenos fragmentos do seu tumor são fragmentados e cultivados em meios de cultura específicos de forma a originar pequenos “mini tumores” em laboratório com semelhanças estruturais e genéticas ao tumor que se desenvolveu em você. Este projeto tem como objetivo estudar o crescimento tumoral e as semelhanças tanto dos enxertos quanto dos organoides com os tumores originais dos pacientes. Os biomarcadores serão pesquisados no sangue dos camundongos PDX, de onde serão isoladas as vesículas extracelulares (VE). Estas vesículas são pequenas estruturas produzidas e liberadas por todas as células que podem chegar até o sangue. No sangue, elas podem ser separadas e estudadas, pois elas carregam inúmeros biomarcadores que precisam ainda ser identificados. Estes biomarcadores poderão ser utilizados para desenvolver novas drogas contra o câncer e também podem ajudar na decisão do melhor tratamento do paciente. Para este estudo ocorrer, será necessário utilizar pequenos fragmentos do seu tumor, que serão retirados do material da cirurgia. Estes fragmentos serão implantados nos camundongos seguindo normas éticas internacionais e aprovados previamente pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da instituição. Os animais serão cuidados e, no momento que o tumor-PDX chegar a um tamanho de 1 centímetro, o animal será anestesiado, o tumor será removido para avaliação e o sangue será coletado para análise. Todos os procedimentos realizados no animal serão realizados dentro das melhores condições, o animal não sofrerá e não será submetido a nenhum procedimento que lhe cause dor ou qualquer desconforto. Tanto os tumores dos animais quanto os organoides serão utilizados para estudar detalhes da doença. Os organoides também poderão ser utilizados como plataformas para explorar os efeitos de drogas em uso ou outros compostos de interesse. As células tumorais são consideradas imortais, ou seja, podem ser mantidas por tempo indeterminado em condições laboratoriais específicas. Devido a essa característica, essas células podem ser utilizadas em estudos futuros. Ao aderir a este projeto você tem o direito de optar em ser consultado a cada nova pesquisa onde as suas células possam ser utilizadas. A instituição assegura o sigilo de sua identidade na utilização de sua informação genética e garante que as suas células não serão utilizadas para fins comerciais. O carcinoma de células renais (tipo de tumor de acomete os rins) foi selecionado devido a sua importância nas doenças urológicas. O tratamento primário desta doença é cirúrgico, onde é



realizada a retirada do rim afetado, sendo assim, você não terá que passar por novos procedimentos decorrentes do presente estudo.

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

O estudo de biomarcadores no sangue de pacientes com câncer é um objetivo que tem sido perseguido por inúmeros cientistas. Eles são úteis para avaliar o efeito do tratamento oncológico e podem influenciar o desenvolvimento de novas terapias. As vesículas extracelulares (VEs) podem ser encontradas no sangue e são úteis para identificar e estudar biomarcadores de câncer. Porém, hoje não existem métodos que sejam bons o suficiente para isolar somente as VEs de tumores, elas se confundem com as demais VEs que são produzidas por outras células do corpo e são pouco informativas. Portanto, o uso de camundongos PDX irá ajudar no processo de isolamento e irá auxiliar na descoberta de novos biomarcadores de resposta à terapia oncológica.

VI – DESENHO DA PESQUISA

Pacientes portadores de carcinoma de células renais serão convidados a participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O material de sua cirurgia ou biópsia será analisado por patologista que irá identificar regiões com células viáveis do tumor. O material será imediatamente acondicionado em meio de cultura estéril que preserva o tecido e favorece o desenvolvimento das células e transportados até as instalações de laboratórios da instituição. O tecido será fragmentado em frações de 1 a 5 mm e serão implantados na região subcapsular do rim dos camundongos, previamente anestesiados. Os animais serão monitorados periodicamente para a observação do crescimento tumoral. As amostras de tumores humanos e dos PDX também serão processadas em paralelo para obtenção de culturas primárias (células do tumor que serão cultivadas em laboratório).

Para os PDOs, o tecido tumoral será imediatamente acondicionado em meio de cultura estéril que preserva o tecido e favorece o desenvolvimento das células e transportados até as instalações de laboratórios da instituição. O tecido tumoral será fragmentado em pequenas frações e cultivados em meio de cultura específico e incubados em hidrogeis para a formação dos organoides. Os organoides também serão processados para estudos de mecanismos da doença e para testagem de drogas antitumorais de interesse.

O sangue de camundongos será coletado e as VEs tumorais serão separadas utilizando substâncias específicas que reconhecem somente componentes humanos (tumor), eliminando os elementos de origem dos camundongos que não são tumorais.

Os animais serão mantidos no biotério do A. C. Camargo Cancer Center e todos os procedimentos experimentais serão avaliados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais – CEUA onde todas as medidas de cuidado e bem-estar dos animais serão respeitadas.

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Caso o(a) senhor(a) aceite participar do estudo, uma parte do material obtido na cirurgia será utilizada para implantação em camundongo e a outra parte será utilizada para a formação dos organoides. Nessa análise, serão utilizadas técnicas para implantação de tecido tumoral em modelo animal (com camundongos) e exames para identificar biomarcadores, nos quais serão avaliados como possíveis alvos terapêuticos e de resposta a medicamentos. Uma amostra de seu sangue (8 ml) será coletada, momentos antes da cirurgia, logo após a indução da anestesia. Esse procedimento só será realizado mediante a sua autorização. O sangue será



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

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

Os riscos potenciais estão relacionados às possíveis complicações do procedimento cirúrgico para retirada do tumor ou biópsia, como infecção ou hematomas. Participar desse estudo não causará nenhum desconforto ou risco adicional a você. As amostras de sangue serão coletadas por profissionais especialmente treinados, o que diminui as chances de complicações, e ocorrerão durante a cirurgia, após a anestesia.

Também há um risco mínimo de perda de confidencialidade. Porém, a nossa instituição tem mecanismos que garantem que seus dados permaneçam confidenciais e protegidos. O hospital possui uma Política de Segurança da Informação e uma Norma de Gestão e Segurança de Base de Dados que definem o uso correto e seguro dos dados gerados na instituição e estabelece, de maneira objetiva e transparente, as responsabilidades e condutas dos usuários que tem acesso aos seus dados. A Norma foi concebida com base na Lei Geral de Proteção de Dados brasileira (LGPD), aprovada no Congresso Nacional no dia 17/07/2018 como emenda à Lei nº 12.965, de 23 de abril de 2014 e que entrou em vigor em 18/09/2020. A Norma dispõe sobre a autorização para criação de banco de dados de pesquisa, na classificação das variáveis por graus de confidencialidade, níveis de acesso dos usuários e ferramentas de criptografia. Os dados serão única e exclusivamente de conhecimento dos pesquisadores do estudo e tratados de forma anônima e confidencial.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Não há benefício direto previsto para os participantes desse estudo. No entanto, ao identificar marcadores genéticos envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença, esperamos que outras pessoas possam vir a se beneficiar futuramente de critérios melhor definidos para a indicação do tratamento.

X - CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e os pesquisadores do projeto 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.

XI - 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.

XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

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

Rubrica do pesquisador

Rubrica do participante



participação neste projeto, entrar em contato com Tiago Góss dos Santos.(011) 2189-5000 – ramal: 2977, de segunda à sexta das 8:00 às 18:00 horas.

XIII. 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 (CONEP). 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:

- () Autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa.
 () Não autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa. Desta forma, compreendo que o excedente será inutilizado pelo Biobanco da instituição.

Em caso da utilização das suas amostras em outras pesquisas, favor assinalar uma das seguintes opções:

- () Quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C. Camargo Cancer Center.
 () Não quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C. Camargo Cancer Center. Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa.

Em casos de óbito ou condições incapacitantes, o (a) senhor (a) tem a possibilidade de ceder os direitos sobre sua amostra biológica armazenada aos seus sucessores ou outras pessoas de sua confiança. Para isso, pedimos que expresse a sua vontade com base nas opções abaixo:

- () Autorizo o uso e armazenamento de minhas amostras biológicas nas situações acima referidas.

Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Os dados fornecidos, coletados e obtidos neste protocolo de pesquisa, poderão ser utilizados em estudos futuros. A partir de seu material biológico armazenado, futuras pesquisas poderão realizar novas abordagens científicas com o intuito de, por exemplo, investigar a ocorrência de outras alterações em seu DNA;

Rubrica do pesquisador

Rubrica do
participante



Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa por em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

XIII. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dr. Tiago Góss dos Santos
Departamento de Biologia Celular e Molecular do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino do A.C. Camargo Cancer Center - São Paulo.
Telefones para contato: (11) 2189-5000 ramal 2943
Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo / Rua Taguá, 440 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações / esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

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

Eu,

declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

_____/_____/_____
Data

Assinatura do pesquisador

_____/_____/_____
Data

ANEXO 4 – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

São Paulo, 26 de agosto de 2016.

Ao Dr. Tiago Góss dos Santos

Ref.: Projeto de Pesquisa no. 075/2016

Título: “Xenoinxertos de carcinoma de células renais como uma abordagem para identificar biomarcadores tumorais em vesículas extracelulares”.

Prezado (a) Doutor (a)

O projeto de pesquisa acima mencionado, foi apreciado pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da fundação Antônio Prudente– Cancer Center, em sua reunião de 26 de agosto de 2016. Os membros desta comissão **aprovaram 50 animais**, para a realização deste estudo nos moldes apresentados no formulário e projeto de pesquisa encaminhada para análise.

Descrição dos animais aprovados (linhagem/quantidade/sexo):

NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ

50 animais (25 machos e 25 fêmeas)

Atenciosamente,

Dra. Glauca Hajj

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais