

**USO DE URINA COMO BIÓPSIA LÍQUIDA PARA  
DETECÇÃO DE DNA TUMORAL LIVRE EM PACIENTE  
COM TUMOR DE WILMS: ESTRATÉGIA NÃO  
INVASIVA PARA DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO  
DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA**

**ANA CAROLINA KEREKES MIGUEZ**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do título de Mestre  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro**

**São Paulo**

**2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Miguez, Ana Carolina Kerekes

**Uso de urina e plasma como biópsia líquida para detecção de DNA tumoral livre em paciente com Tumor de Wilms: estratégia não invasiva para monitoramento de recorrência e de resposta à quimioterapia** / Ana Carolina Kerekes Miguez - São Paulo, 2018.

87p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. Neoplasias Renais/Kidney Neoplasms. 2. Tumor de Wilms/Wilms Tumor. 3. Tratamento Farmacológico .4. Avaliação de Resultado de Intervenções Terapêuticas/Evaluation of Results of Therapeutic Interventions. 5. Urina/Urine. 6. Biópsia/Biopsy. 7. DNA/DNA.

*"People should pursue what they're passionate about. That will make them  
happier than pretty much anything else."*

Elon Musk

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a todos os que de alguma forma me ajudaram em minha transição entre diferentes áreas profissionais, e que me fizeram compreender que, sem dúvida alguma, fiz a escolha certa. Esse trabalho representa a concretização de um sonho e a descoberta e afirmação de uma paixão sem limites pela ciência.

De forma igualmente importante, dedico esse trabalho a todos os pacientes da oncologia pediátrica e seus familiares - especialmente aos que tiveram participação neste estudo. Vocês estiveram sempre em mente durante a realização desse trabalho e foram uma grande fonte de motivação. A vocês, minha eterna gratidão e respeito!

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, meus sinceros agradecimentos à minha mãe, Jane, meu alicerce e meu exemplo de vida, por todo o apoio, pelo amor, pelo cuidado, pela paciência, pelos ensinamentos, por ser minha melhor amiga e minha melhor definição de "família"! Aproveito para agradecer também o Pitomba (*in memoriam*), Timóteo (*in memoriam*), Pakko e Beatriz, meus bebês caninos queridos, pelo amor sincero e incondicional, e pelos inúmeros momentos em que vocês tornaram a minha rotina mais leve.

Agradeço também a minha orientadora, Dra. Dirce Maria Carraro, por ter me acolhido em seu grupo quando eu não tinha nenhuma experiência laboratorial e por todas as incríveis oportunidades dadas a mim desde a minha Iniciação Científica! Obrigada pela confiança, por toda a valiosa sabedoria compartilhada e por ser um exemplo impecável de integridade profissional. Os alunos amadurecem aos moldes de seus professores, por isso tenho certeza de que estou em boas mãos nesta jornada.

Aos médicos do departamento de oncologia pediátrica do A.C.Camargo Cancer Center e de outros departamentos que participaram deste estudo, toda a minha gratidão pela colaboração e pelas valorosas discussões! Dra. Cecília Lima, Dra. Paula Barbosa, Dr. Nevi Filho, Dra. Maria Lucia, Dra. Viviane Sonaglio e Dra Isabela Werneck - muito obrigada!

Muita gratidão também às enfermeiras Fernanda dos Santos e Maria de Fátima pela importante ajuda com as coletas de material biológico, pela atenção e pela disponibilidade em auxiliar no que fosse necessário.

Às funcionárias do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center - Eloisa Olivieri, Ana Paula Suenaga e Louise Motta - minha gratidão não só pelo apoio com o material biológico, mas também pela amizade! Gratidão

também a todos da Pós-Graduação, da Biblioteca e aos profissionais de Bioinformática pelo apoio durante todo o período de realização desse trabalho.

Aos meus colegas e ex-colegas de grupo, que são como uma segunda família, agradeço de coração pelo conhecimento compartilhado, pela valiosa amizade fora e dentro do laboratório, pela companhia e por todo o apoio: Cláudia, Adriana, Elisa, Bruna, Giovana, Carol, Vanina, Rafael, Rodrigo, Fidalgo, Anna, Vanessa, Isabella, Pablo, Kivvi, Mariana, Karina, Juliana e Natália. Não posso deixar de agradecer também à Jennice, Ester e Vanessa - obrigada por todo o apoio, pela ajuda em lidar com questões administrativas e pela amizade!

Obrigada também ao A.C.Camargo Cancer Center, ao qual hoje eu tenho como minha segunda casa, por toda a incrível infraestrutura disponibilizada para a realização de ciência de ótima qualidade, além do enorme apoio institucional. Sinto um grande orgulho por fazer parte dessa Instituição.

Por último, porém não menos importante, agradeço de coração às bravas jovens pacientes que participaram desse estudo e seus familiares. Obrigada pelo material biológico, pelo acesso aos seus dados clínicos e por me permitir acompanhar a jornada de cada uma de vocês neste momento tão delicado logo no início de suas vidas.

## RESUMO

Miguez ACK. **Uso de urina como biópsia líquida para detecção de DNA tumoral livre em paciente com Tumor de Wilms: Estratégia não invasiva para diagnóstico e monitoramento de resposta à quimioterapia.** São Paulo; 2018. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

A caracterização das alterações genéticas e moleculares do tumor de Wilms (TW) contribuem para a compreensão do processo tumorigênico e para o desenho de terapias alvo. As alterações genéticas específicas do tumor, atualmente, têm ainda um valor adicional no monitoramento de resposta desses pacientes ao tratamento, e sua detecção em fluidos corpóreos (FC) por biópsia líquida (BL) pode ser útil para monitorar a resposta à terapia e monitorar a recidiva. Assim, o objetivo desse estudo foi contribuir com a definição do catálogo de genes mutados em TW e estabelecer uma plataforma para detecção de DNA tumoral (ftDNA, do inglês “*free tumor DNA*”) em componentes da urina e comparar com o plasma de pacientes com TW para fins de monitoramento de resposta à quimioterapia. Metodologia: Seis pacientes com TW foram incluídos e monitorados por BL. Um total de 37 amostras de TW foram usadas para avaliação da frequência de mutação em novos genes identificados. A identificação de mutações foi realizada através de sequenciamento de próxima geração (NGS, do inglês “*Next Generation Sequencing*”) na plataforma Ion. Para busca das mutações somáticas o DNA de leucócitos e de tecidos tumorais foram avaliados utilizando painel de 17 genes e por sequenciamento de exoma completo (WES, do inglês “*Whole Exoma Sequencing*”) para os casos que nenhuma mutação somática foi identificada no painel. Para rastreamento das mutações nos FCs o sequenciamento foi realizado por amplicon. Resultados: A paciente P01 foi diagnosticada aos 5 anos de idade com TW e 9 meses depois teve diagnóstico de metástase pulmonar. No tumor foram identificadas duas mutações somáticas em dois genes, *INTS1* e *TNRC18*

detectadas pelo WES. A incidência de mutações nesses genes verificada numa coorte independente revelou a frequência de 5,4% em *INTS1* e 8% em *TNRC18*. Na metástase foram detectadas 2 novas mutações nos genes *KRT80* e *TTI1* além das duas já identificadas. As 4 mutações específicas do DNA tumoral foram rastreadas nos FC coletados antes e durante o tratamento. Antes do tratamento as mutações dos genes *INTS1*, *TNRC18* e *TTI1* foram detectadas na urina. Após todos os ciclos de tratamentos quimioterápicos a mutação em *TTI1* pode ser detectada em dois momentos em frequências baixas no plasma. Para os 5 outros casos (P02-P06) as mutações somáticas foram rastreadas antes, durante e depois do tratamento quimioterápico em 4 casos. Foi possível detectar ftDNA em ao menos um dos FCs antes do início do tratamento para todos os pacientes. Para todos os pacientes houve diminuição significativa de ftDNA na primeira coleta depois do início do tratamento neoadjuvante. Para dois pacientes, ftDNA não foi detectado nas coletas de FC ao longo do monitoramento. No entanto, para outros dois pacientes, as marcas tumorais persistiram nos fluidos corpóreos durante o tratamento neoadjuvante e mesmo depois da cirurgia, concordando com os aspectos clínicos. Um deles é um caso bilateral que passou por nefrectomia parcial e o outro um caso com desfecho clínico desfavorável. Os demais pacientes não apresentam característica de progressão. Assim, de forma geral, o estudo mostrou o grande potencial da utilização de plasma e urina em conjunto para detecção de ftDNA em pacientes com TW. Além disso, com a introdução dos genes *INTS1* e *TNRC18* ao painel de genes, a sensibilidade para detecção de mutação somática passou de 50% para 61,5%. Com esses resultados contribuimos com o estabelecimento de uma plataforma de detecção de ftDNA em FC e contribuimos com a definição do repertório de genes mutados nesta neoplasia.

## SUMMARY

Miguez ACK. **[Use of urine as liquid biopsy for the detection of free tumor DNA in Wilms' Tumor patients: Noninvasive strategy for diagnosis and monitoring of response to chemotherapy]**. São Paulo, 2018. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The characterization of genetic and molecular changes of Wilms' tumor (WT) contribute to the understanding of the tumorigenic process and to the design of target therapies. Currently, tumor-specific genetic alterations still have an additional value in monitoring the response of these patients to treatment, and their detection in body fluids (BF) by liquid biopsy (LB) may be useful for monitoring response to therapy and monitoring relapse. Thus, the objective of this study was to contribute to the definition of the catalog of genes mutated in WT and to establish a platform for detecting tumor free tumor DNA (ftDNA) in urine components and to compare it with the plasma of patients with WT for the purpose of monitoring response to chemotherapy. **METHODS:** Six patients with WT were included and monitored by LB. A total of 37 WT samples were used to assess mutation frequency in newly identified genes. Mutation identification was performed through Next Generation Sequencing (NGS) on the Ion platform. In order to search for somatic mutations, the leukocyte DNA and tumor tissue DNA were evaluated using a panel of 17 genes and whole exome sequencing (WES) for cases where no mutation was identified in the panel. For screening of the mutations in the BFs amplicon sequencing was performed. **Results:** Patient P01 was diagnosed at 5 years of age with WT and 9 months later had a diagnosis of pulmonary metastasis. In the tumor, two somatic mutations were identified in two genes, INTS1 and TNRC18, detected by WES. The incidence of mutations in these genes in an independent cohort revealed a frequency of 5.4% for INTS1 and 8% for TNRC18. In the metastasis, 2 new mutations were detected in the KRT80 and TTI1 genes in addition to the two mutations

already identified. The 4 specific mutations of the tumor DNA were screened in the BFs collected before and during treatment. Prior to treatment, the mutations of the INTS1, TNRC18 and TTI1 genes were detected in urine. After all cycles of chemotherapeutic treatments the mutation in TTI1 can be detected in two moments at low frequencies in the plasma. For the 5 other cases (P02-P06) somatic mutations were screened before, during and after the chemotherapy treatment for 4 cases. It was possible to detect ftDNA in at least one of the BFs prior to initiation of treatment for all patients. For all patients there was a significant decrease of ftDNA at the first collection after the initiation of the neoadjuvant treatment. For two patients, ftDNA was not detected in the BF collections throughout the monitoring. However, for two other patients, tumor markers persisted in body fluids during neoadjuvant treatment and even after surgery, in agreement with the clinical aspects. One is a bilateral case that underwent partial nephrectomy and the other a case with an unfavorable clinical outcome. The other patients did not present progression characteristics. Thus, in general, the study showed the great potential of using plasma and urine together for detection of ftDNA in patients with WT. In addition, with the introduction of the INTS1 and TNRC18 genes into the gene panel, the sensitivity for detection of somatic mutation increased from 50% to 61.5%. With these results we contribute to the establishment of a platform of detection of ftDNA in BFs and contribute to the definition of the repertoire of mutated genes in this neoplasia.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Morfologia do TW e do rim embrionário humano.....	3
<b>Figura 2</b>	Via de biogênese do miRNA. Representação esquemática da atuação das principais proteínas envolvidas no processamento de miRNAs.....	15
<b>Figura 3</b>	Via de sinalização canônica Wnt.....	17
<b>Figura 4</b>	As diferentes origens do DNA encontrado em fluidos corpóreos e sua presença nos componentes de urina e sangue.....	20
<b>Figura 5</b>	Pontos de coleta de amostras de fluidos corpóreos e tumor antes, durante e após o tratamento para TW.....	28
<b>Figura 6</b>	Detecção de mutações somáticas em 40 de 65 amostras de TW através do painel de genes, com adição dos genes <i>INTS1</i> e <i>TNRC18</i> .....	46
<b>Figura 7</b>	Mutações somáticas da paciente P01 nos DNAs do tumor primário, da metástase e dos fluidos corpóreos coletados antes do início do tratamento (AT) .....	48
<b>Figura 8</b>	Pontos de coleta de amostras de fluidos corpóreos e tumor da paciente P01.....	49
<b>Figura 9</b>	Avaliação seriada das mutações somáticas identificadas no tumor primário e metástase da paciente P01 nos fluidos corpóreos antes, durante e após o tratamento.....	51

<b>Figura 10</b>	Pontos de coleta de amostras de fluidos corpóreos e tecido tumoral das pacientes com TW.....	54
<b>Figura 11</b>	Avaliação seriada de ftDNA em fluidos corpóreos antes, durante e após o tratamento.....	62

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	Dados gerais da casuística.....	39
<b>Tabela 2</b>	Mutações somáticas no tumor primário e metástase da paciente P01 identificadas através de WES.....	41
<b>Tabela 3</b>	Características clínico-patológicas das 37 amostras de TW que foram submetidas ao sequenciamento dos genes <i>INTS1</i> e <i>TNRC18</i> .....	42
<b>Tabela 4</b>	Mutações nos genes <i>INTS1</i> e <i>TNRC18</i> identificadas em um subgrupo de amostras de TW.....	44
<b>Tabela 5</b>	Comparação de resultados entre os métodos NGS e ddPCR para detecção de ftDNA em amostras de componentes de urina.....	52
<b>Tabela 6</b>	Mutações somáticas identificadas via Painel de Genes e/ou WES.....	56
<b>Tabela 7</b>	Detecção de ftDNA em amostras seriadas de fluidos corpóreos.....	61
<b>Quadro 1</b>	Critérios para estadiamento do tumor de Wilms segundo os protocolos SIOP e NWTSG.....	7
<b>Quadro 2</b>	Nomenclatura das amostras de fluidos corpóreos.....	8
<b>Quadro 3</b>	Classificação de risco para TW com tratamento pré-cirúrgico.....	8
<b>Quadro 4</b>	Nomenclatura das amostras de fluidos corpóreos.....	28

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>bp</b>	do inglês "Base Pairs"
<b>ceDNA</b>	do inglês "cellular DNA"
<b>cfDNA</b>	do inglês "circulating free DNA"
<b>COG</b>	do inglês "Children's Oncology Group"
<b>ddPCR</b>	do inglês "Digital Droplet PCR"
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	do inglês "Ethylene Diamine TetrAcetic Acid"
<b>ftDNA</b>	do inglês "free tumor DNA"
<b>miRNA</b>	micro RNA
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>ng</b>	Nanograma
<b>NGS</b>	do inglês "Next Generation Sequencing"
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NWTSG</b>	do inglês "National Wilms Tumor Study Group"
<b>PCR</b>	do inglês "Polimerase Chain Reaction"
<b>PG</b>	Painel de genes
<b>pM</b>	Picomolar
<b>PPT</b>	do inglês "Plasma Preparation Tube"
<b>pre-miRNA</b>	precursor de micro RNA
<b>pri-miRNA</b>	micro RNA primário
<b>qRT-PCR</b>	do inglês "Quantitative Reverse Transcriptase-PCR"
<b>rcf</b>	do inglês "Relative Centrifuge Force"
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico

<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RT-PCR</b>	do inglês "Reverse Transcriptase-PCR"
<b>SIOP</b>	do francês "Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique"
<b>TW</b>	Tumor de Wilms
<b>TWs</b>	Tumores de Wilms
<b>WES</b>	do inglês "Whole Exome Sequencing"

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologia .....	2
1.2	Características histológicas .....	2
1.3	Grupos de estudo e protocolos atuais de tratamento .....	4
1.4	Aspectos genéticos e moleculares .....	8
1.5	Processamento de micrnas e via WNT-duas vias importantes em TW .....	14
1.6	O uso de fluidos corpóreos como biópsia líquida em oncologia .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1	Objetivo geral .....	23
2.2	Objetivos específicos .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1	Casuística.....	24
3.2	Delineamento experimental .....	25
3.3	Coleta e extração do dna de amostras biológicas .....	26
3.4	Nomenclatura do DNA.....	30
3.5	Sequenciamento paralelo do painel de genes.....	31
3.6	Sequenciamento completo de exoma (WES).....	32
3.7	Sequenciamento de amplicon .....	33
3.8	Chamada de variantes e seleção de mutações somáticas.....	34
3.9	Validação de mutações somáticas .....	35
3.10	Validação da sensibilidade do NGS por digital droplet PCR (ddPCR)37	
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	Apresentação da casuística do estudo e identificação de novos genes associados a TW .....	38
4.2	Validação da sensibilidade do método ngs para detecção de	

	mutações em baixa frequência.....	51
4.3	Investigação de mutações somáticas nos fluidos corpóreos para monitoramento de resposta a quimioterapia neoadjuvante e de progressão tumoral em pacientes com TW .....	53
5	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>

## **ANEXO**

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

## **APÊNDICES**

**Apêndice 1** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**Apêndice 2** Termo de Assentimento (TA)

## 1 INTRODUÇÃO

O tumor de Wilms (TW), um tumor renal pediátrico, é uma neoplasia embrionária originada a partir de erros no processo de diferenciação celular em células primitivas durante estágios precoces do desenvolvimento do rim (BECKWITH 1982; LI et al. 2002; HOHENSTEIN et al. 2015).

O primeiro espécime conhecido de TW e confirmado histologicamente é um caso de nefroblastoma bilateral que data do fim do século XVIII, identificado na época por John Hunter e exposto atualmente no *Hunterian Museum* da Faculdade Real de Cirurgiões, em Londres (BECKWITH 1986). Na década seguinte foram relatados casos semelhantes, mas somente em 1899 o cirurgião alemão Max Wilms descreveu detalhadamente esse tumor em uma monografia intitulada “Tumores mistos do rim” (do alemão “*Die Mischgeschwulste der Niere*”), esclarecendo suas origens e corrigindo equívocos metodológicos da análise histológica praticada na época.

Hugo Ribbert, professor de patologia em Zurique, usou o termo “*Wilms Tumoren*” em uma revisão publicada no ano seguinte, em janeiro de 1900, na qual afirma que Max Wilms contribuiu para um avanço significativo da teoria da gênese desse tumor e creditando à ele o nome dessa neoplasia (RAFFENSPERGER 2015).

## **1.1 EPIDEMIOLOGIA**

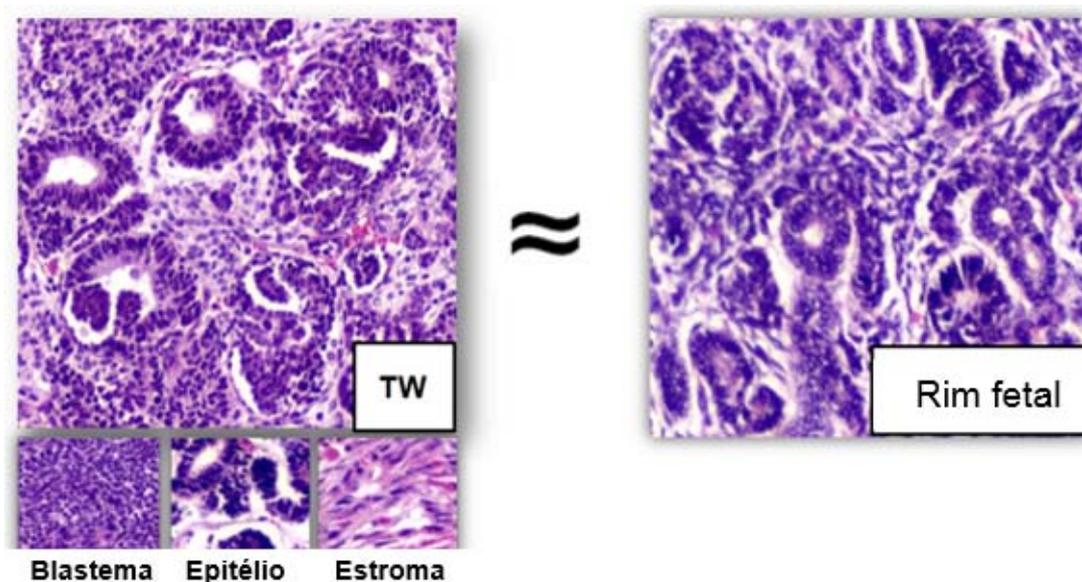
A estimativa para o ano de 2018 prevê a ocorrência de 12.500 casos novos de câncer em crianças e adolescentes até os 19 anos de idade no Brasil (Ministério da Saúde 2017). Em 2015 ocorreram 2.704 óbitos por câncer em crianças e adolescentes (Ministério da Saúde 2016), ocupando a segunda posição como causa de óbito nessa faixa etária, ultrapassada somente pelos óbitos por causas externas como acidentes de trânsito e violência doméstica (Ministério da Saúde 2014).

O TW, especificamente, apresenta pico de incidência entre 2 e 5 anos de idade, é o segundo câncer intra-abdominal mais comum da infância e a quinta maior malignidade pediátrica em geral (BRESLOW et al. 1993; PASTORE et al. 2006). Representa aproximadamente 6% de todos os cânceres pediátricos e mais de 95% de todos os tumores renais nessa faixa etária, resultando em uma incidência de 1 a cada 10.000 crianças mundialmente (BIRCH e BRESLOW 1995). Cerca de 7% dos casos de TW apresentam doença bilateral, os quais costumam ser diagnosticados mais precocemente do que os casos com doença unilateral e geralmente estão associados a anomalias congênitas (PRITCHARD-JONES 2002).

## **1.2 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS**

O TW pode conter componentes de tecido em até três morfologias diferentes, caracterizando seu tipo histológico: componente

mesenquimatoso ou estromal, que se assemelha ao mesênquima fetal primitivo; componente epitelial, que se assemelha a túbulos e glomérulos renais fetais; e componente blastematoso, constituído por aglomerados de células blásticas (Figura 1). Os diferentes componentes do TW recapitulam os diferentes estágios de diferenciação celular durante o complexo processo de desenvolvimento renal na embriogênese (BECKWITH 1982; LI et al. 2002; HOHENSTEIN et al. 2015), demonstrando que o TW se origina de uma falha desse processo.



**Figura 1 - Morfologia do TW e do rim embrionário humano.** O TW pode conter até 3 componentes histológicos, blastema, epitélio e estroma, que se assemelham aos componentes histológicos identificados no rim fetal, durante o desenvolvimento embrionário.

### 1.3 GRUPOS DE ESTUDO E PROTOCOLOS ATUAIS DE TRATAMENTO

Em países subdesenvolvidos, as taxas de sobrevida para pacientes com TW variam entre 20% e 50% (WILDE et al. 2010; NJUGUNA et al. 2016). A alta mortalidade nesses países é decorrente de fatores como a falta de instalações para tratamento, abandono do tratamento e falta de uma abordagem multidisciplinar para o manejo dos pacientes (ATANDA et al. 2015a, b; NJUGUNA et al. 2016).

Já em países desenvolvidos, as taxas de sobrevivência melhoraram de 20% na década de 1960 para cerca de 90% atualmente, enquanto os países em desenvolvimento têm taxas de sobrevivência um pouco menor, de aproximadamente 75% (DOME et al. 2013; GLEASON et al. 2014; RABEH et al. 2016; VERMA e KUMAR 2016). Esta melhoria dramática na sobrevivência deve-se, em parte, à maneira sistemática em que a abordagem terapêutica evoluiu devido ao trabalho de dois grandes grupos cooperativos que estudam TWs: o grupo norte-americano *National Wilms Tumor Study Group* (NWTSG) e o grupo europeu *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* (SIOP). No Brasil, segue-se o protocolo SIOP para tratamento de TW, alcançando cerca de 75% de taxa de sobrevida (PROVENZI et al. 2014), o que vai de acordo com o observado em outros países em desenvolvimento.

O Brasil conta com um grupo próprio de estudos para esse tumor, o *Brazilian Wilms' Tumor Study Group*, que contribuiu de forma significativa no

entendimento do TW em diversos aspectos. Entre os estudos realizados por esse grupo, estão a verificação da efetividade do uso de carboplatina como linha de tratamento para casos com recaída (DE CAMARGO et al. 1994), um estudo randomizado verificando o uso de dose única versus dose fracionada de actinomicina D no tratamento do TW (DE CAMARGO e FRANCO 1994), além de estudos de caráter epidemiológico, como a influência do uso de pesticidas (SHARPE et al. 1995), do uso de dipirona durante a gravidez (SHARPE e FRANCO 1996) e da idade dos pais (SHARPE et al. 1999) no risco da prole ser acometida por TW.

Os esforços dos grupos NWTSG e SIOP geraram protocolos de tratamento nos quais a principal diferença na abordagem terapêutica é o momento cirúrgico. O NWTSG recomenda a nefrectomia inicial seguida por quimioterapia adjuvante, e a SIOP aconselha a realização de quimioterapia pré-operatória/neoadjuvante, a fim de reduzir o tamanho e estadiamento do tumor para cirurgia. Por conta disso, existem diferenças no estadiamento do TW entre os dois grupos (Quadro 1). No protocolo SIOP, o TW ainda é classificado quanto ao subtipo (Quadro 2) e quanto ao risco (Quadro 3).

Normalmente, o componente blastematoso é o mais responsivo aos agentes quimioterápicos, sendo considerado um indicativo de prognóstico favorável quando identificado como componente histológico predominante nos pacientes tratados pelo protocolo NWTSG. Por outro lado, nos pacientes tratados de acordo com o protocolo SIOP, que passam por quimioterapia neoadjuvante antes da cirurgia, a predominância do componente blastematoso indica que a doença é de alto risco, pois sugere que esse

componente é resistente à quimioterapia (VUJANIĆ et al. 2002). Os casos em que as regiões blastematosas do tumor encontram-se necróticas e com poucas células reconhecíveis após tratamento quimioterápico neoadjuvante indicam resposta ao tratamento e prognóstico favorável (WEIRICH et al. 2001).

Outros indicadores de mau prognóstico utilizados na prática clínica atualmente em ambos os protocolos de tratamento são a presença de anaplasia difusa (FARIA et al. 1996) e perda de heterozigotidade nos cromossomos 1p e/ou 16q (GRUNDY et al. 1994). Estudos recentes revelaram que o ganho do cromossomo 1q em TW tratados sob ambos os protocolos está correlacionado a um desfecho clínico adverso (CHAGTAI et al. 2016; GRATIAS et al. 2016). A frequência relativamente alta de ganho de 1q torna este marcador particularmente atraente para uso potencial na estratificação de risco. Esse marcador foi incluso no estudo UMBRELLA da SIOP, aberto em 2017 (VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al. 2017). O protocolo UMBRELLA apoia a pesquisa integrada de biomarcadores e exames de imagem, com um foco particular na avaliação do valor prognóstico independente das alterações genômicas no tumor (ganho cromossômico de 1q e da extensão de sua heterogeneidade intratumoral) e no volume do componente blastematoso que resiste à quimioterapia pré-operatória.

**Quadro 1** - Critérios para estadiamento do tumor de Wilms segundo os protocolos SIOP e NWTSG.

	<b>Protocolo SIOP</b>	<b>Protocolo NWTSG</b>
<b>Estadio I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O tumor é limitado ao rim ou está rodeado por uma pseudocápsula fibrosa se estiver fora do contorno renal normal.</li> <li>- O tumor pode apresentar uma protusão no sistema pélvico e no ureter, mas não está infiltrando suas paredes.</li> <li>- O seio renal (seus vasos e tecidos moles) não está envolvido.</li> <li>- Vasos intrarrenais podem estar envolvidos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O tumor é limitado ao rim e é completamente retirado em cirurgia.</li> <li>- O tumor não foi rompido antes ou durante a remoção cirúrgica.</li> <li>- Os vasos do seio renal não estão envolvidos além de 2 mm.</li> <li>- Não há tumor residual aparente além das margens da excisão.</li> </ul>
<b>Estadio II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O tumor penetra através da cápsula renal ou pseudocápsula fibrosa na gordura perirrenal.</li> <li>- O tumor infiltra tecidos moles ou vasos linfáticos do seio renal.</li> <li>- O tumor infiltra-se no tecido perirrenal.</li> <li>- O tumor infiltra-se na parede pélvica do ureter.</li> <li>- O tumor infiltra-se em órgãos ou veia cava adjacentes.</li> <li>- Critério obrigatório: o tumor é completamente ressecado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O tumor se estende além do rim, mas é completamente retirado cirurgicamente.</li> <li>- Nenhum tumor residual é aparente em (ou além das) margens cirúrgicas.</li> <li>- Presença de trombo tumoral em vasos fora do rim com trombo removido em bloco com o tumor.</li> </ul>
<b>Estadio III</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tumor viável ou não viável presente nas margens da ressecção.</li> <li>- Todos os nódulos linfáticos abdominais estão envolvidos.</li> <li>- Ruptura tumoral pré ou intra-operatória (independentemente de outros critérios de estadiamento).</li> <li>- Penetração de tumor através da superfície peritoneal.</li> <li>- Implantes de tumor são encontrados na superfície peritoneal.</li> <li>- Trombos tumorais presentes nas margens da ressecção de vasos extra-renais.</li> <li>- Tumor foi submetido a biópsia cirúrgica antes da quimioterapia pré-operatória ou cirurgia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tumor detectado nos linfonodos no hilo renal ou nas cadeias periaórticas.</li> <li>- Contaminação peritoneal difusa pelo tumor.</li> <li>- Implantes tumorais são encontrados nas superfícies peritoneais.</li> <li>- O tumor ultrapassa as margens cirúrgicas, seja microscopicamente ou macroscopicamente.</li> <li>- O tumor não é completamente ressecável devido à infiltração local em estruturas vitais.</li> </ul>
<b>Estadio IV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Metástases hematógenas (pulmão, fígado, ossos, cérebro, etc.) ou metástases nos linfonodos fora da região abdominopélvica.</li> </ul>	
<b>Estadio V</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tumor renal bilateral ao diagnóstico.</li> </ul>	

Fonte: Adaptado de VUJANIĆ e SANDSTEDT (2010) e SARIN e BHATNAGAR (2012).

**Quadro 2** - Subtipos de TW (SIOP WT 2001).

Subtipo tumoral	Características histológicas (% de tumor)			
	AIQ*	Epitelial	Estromal	Blastemal
Completamente necrótico	100%	0%	0%	0%
Regressivo	>66%	0-33%	0-33%	0-33%
Misto	<66%	0-65%	0-65%	0-65%
Epitelial	<66%	66-100%	0-33%	0-10%
Estromal	<66%	0-33%	66%-100%	0-10%
Blastemal	<66%	0-33%	0-33%	66-100%

\*AIQ: Alterações induzidas por quimioterapia.

**Quadro 3** - Classificação de risco para TW com tratamento pré-cirúrgico.

<b>Baixo risco:</b>
. CPDN (Nefroma cístico parcialmente diferenciado)
. Completamente necrótico
. Nefroma mesoblástico
<b>Risco intermediário:</b>
. Não anaplásico e variantes
. Tipo Epitelial
. Tipo estromal
. Tipo misto
. Tipo Regressivo
. Anaplasia focal Focal
<b>Alto Risco:</b>
. Blastema
. Anaplasia Difusa

## 1.4 ASPECTOS GENÉTICOS E MOLECULARES

Cerca de 10% dos TWs são associados a mutações germinativas e/ou anomalias congênitas, como as causadas por mutações em *WT1* (Síndromes de WAGR e Denys-Dash) (PELLETIER et al. 1991), desregulações de imprinting genômico em 11p15 (Síndrome de Beckwith-Wiedemann) (OHLSSON et al. 1993), mutações em *DIS3L2* (Síndrome de

Perlman) (ASTUTI et al. 2012) e mutações em *DICER1* na síndrome do blastoma pleuropulmonar (FOULKES et al. 2011).

Os outros 90% dos casos de TW são esporádicos, sendo resultado de mutações somáticas, isto é, restritas ao tecido tumoral. O TW, assim como outros tumores pediátricos, contém uma média de alterações não sinônimas e somáticas consideravelmente menor do que tumores em adultos, apresentando menor instabilidade genética (VOGELSTEIN et al. 2013).

Entre as alterações genéticas pontuais mais comuns em TW, mutações somáticas em *WTX* (RIVERA et al. 2007), *WT1* (VARANASI et al. 1994; HUFF et al. 1995;) e *CTNNB1* (KOESTERS et al. 1999) correspondem a cerca de 30% dos TWs (RUTESHOUSER et al. 2008), indicando que a via Wnt está intimamente envolvida com a tumorigênese do TW. *CTNNB1*, por exemplo, encontra-se mutado em 7,5% dos TWs em TORREZAN et al. (2014) e em 6,5% dos TWs em GADD et al. (2017). Já os genes *TP53* (BARDEESY et al. 1994), *DIS3L2* (ASTUTI et al. 2012), *DICER1* (WU et al. 2013), *FBXW7* e *MYCN* (WILLIAMS et al. 2010) também já foram descritos como mutados nesse tumor, no entanto são raramente identificados.

A definição do repertório de genes mutados em TW é um aspecto de grande importância para a identificação de novas vias alteradas nesta neoplasia. Estas vias podem ser testadas como alvo terapêutico por agentes quimioterápicos específicos. Assim, com o objetivo de contribuir com a definição do repertório mutacional do TW, muitos grupos têm se dedicado a estudos nesse sentido. Em 2014, nosso grupo foi pioneiro ao identificar em TW uma mutação recorrente (p.E1147K) em *DROSHA*, um gene primordial

envolvido no processamento de microRNAs, em 10% dos TW. Esta mutação afeta o domínio RNase IIIb, alterando o perfil de microRNAs destes pacientes e causando diminuição na expressão de microRNAs maduros. Nesse mesmo estudo também foram identificadas mutações não-recorrentes em outros genes desta mesma via em cerca de 17% dos TWs (TORREZAN et al. 2014). Esses achados foram também publicados por outro grupo (RAKHEJA et al. 2014) fortalecendo essas evidências e comprovando a importância da via de biogênese de microRNAs no desenvolvimento do TW.

Além de *DROSHA*, outros genes da via de processamento de microRNAs foram identificados como mutados em TW. O gene *DGCR8* foi descrito como mutado em 10,3% das amostras de TW analisadas por WEGERT et al. (2015) e em 9% das amostras analisadas por TORREZAN et al. (2014). *DICER1* encontra-se mutado em 4,5% dos TWs em TORREZAN et al. (2014) e em 3,7% em GADD et al. (2017), demonstrando novamente o importante envolvimento desta via no desenvolvimento do TW.

Do ponto de vista dos aspectos morfológicos, TWs com componente blastematoso predominante foram relacionados a mutações nos genes *SIX1/2*, bem como a mutações em genes da via de microRNAs, como *DROSHA* e *DGCR8* (WALZ et al. 2015; WEGERT et al. 2015). O componente estromal predominante, por outro lado, está relacionado a mutações germinativas em *WT1* (SCHUMACHER et al. 1997).

De modo geral, cerca de 50% dos TWs apresentam mutação somática nos genes já descritos como mutados nesta neoplasia (TORREZAN et al. 2014).

Quanto aos aspectos moleculares do TW, sabe-se que a nefrogênese e a tumorigênese de Wilms compartilham padrões de regulação da expressão gênica. LI et al. (2002) realizaram uma análise da expressão gênica em TWs, identificando 357 genes como diferencialmente expressos entre TWs e rins fetais. Esse conjunto continha 124 correspondências a genes em uma análise de STUART et al. (2001) que identificaram genes com expressão específica no estágio de desenvolvimento renal de camundongos. Ao realizar uma clusterização, foi identificado um subgrupo menor de 27 genes que foram altamente expressos em TWs em comparação aos tumores de rim fetal e tecidos normais. De modo geral, esse estudo mostra que células em TWs são acometidas em um estágio inicial do desenvolvimento do rim fetal. As identidades do subgrupo menor enfatizam a alta expressão em TWs de genes que são essenciais para a formação do rim durante a embriogênese e que tem atuação comprometida na transição epitélio-mesênquima.

Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo foi realizada a análise dos componentes histológicos do TW separadamente. A expressão de genes do componente blastematoso do TW foi comparado à expressão em rins fetais e maduros. Foi identificada uma assinatura de 25 genes modulados durante o desenvolvimento renal capaz de discriminar os rins fetais dos TW, que por sua vez estão discriminados dos rins maduros. Entre esses genes encontram-se dois pertencentes à via Wnt, *APC* e *PLCG2*, que em TWs mostraram a recapitulação dos primeiros estágios de desenvolvimento renal, confirmando a ativação da via Wnt no tumor pela

positividade nuclear de *APC* e pela ausência de expressão de *PLCG2* (MASCHIETTO et al. 2008) e demonstrando que o componente blastematoso do TW é o que mais representa os primeiros estágios da nefrogênese.

Outro aspecto bastante estudado em TW é em relação à definição das características genéticas e moleculares que são úteis para prognóstico, como forma de classificar pacientes que necessitam de mínima terapia e aqueles que necessitam de um regime terapêutico modificado, alcançando assim maiores índices de sucesso com menores efeitos colaterais. Apesar de geralmente estar associado a um bom prognóstico, os pacientes com TW apresentam recaída em cerca de 15% dos casos (SHAMBERGER et al. 1999; REINHARD et al. 2008), necessitando de tratamento adicional e aumentando as chances de efeitos colaterais tardios.

Vários estudos avaliaram padrão de expressão gênica e chegaram a genes associados com recidiva. Um estudo anterior do grupo (MASCHIETTO et al. 2011a) teve como objetivo identificar marcadores prognósticos moleculares que são preditivos da sensibilidade à quimioterapia na recidiva tumoral. Amostras de TW enriquecidas para componente blastematoso com estadiamento III e IV, de pacientes com ou sem recidiva, foram analisadas para 4608 genes através de uma plataforma de cDNA personalizada. Foram identificados 69 genes diferencialmente expressos entre os dois grupos de amostras. Entre esses, os nove principais genes foram avaliados por qRT-PCR nas amostras de TW. *TSPAN3*, *NCOA6*, *CDO1*, *MPP2* e *MCM2* foram confirmados como sendo regulados

negativamente nos casos de recidiva, e *TSPAN3* e *NCOA6* também foram validados em um grupo independente de amostras. A expressão proteica de *MCM2* e *NCOA6* foi observada em 38% e 28% de amostras independentes de estágio III e IV, respectivamente, sem associação com recaída. No entanto, uma associação significativa entre coloração positiva para *MCM2* e quimioterapia como primeiro tratamento sugere o envolvimento de *MCM2* com o metabolismo de drogas em células blastematosas de TW.

Mutações pontuais também já foram relacionadas a prognóstico, como mutações em genes da via de microRNAs concomitantes com mutações em genes da via *SIX1/2*, que foram associadas à ativação de *RAS* e maior incidência de recidiva (WALZ et al. 2015; WEGERT et al. 2015), assim como perdas de ambos 1p e 16q (MESSAHEL et al. 2009). Mutações em *DROSHA* e *DGCR8* também foram associadas a um prognóstico desfavorável, estando presentes em 18% dos casos do tipo blastematoso de TW (WEGERT et al. 2015).

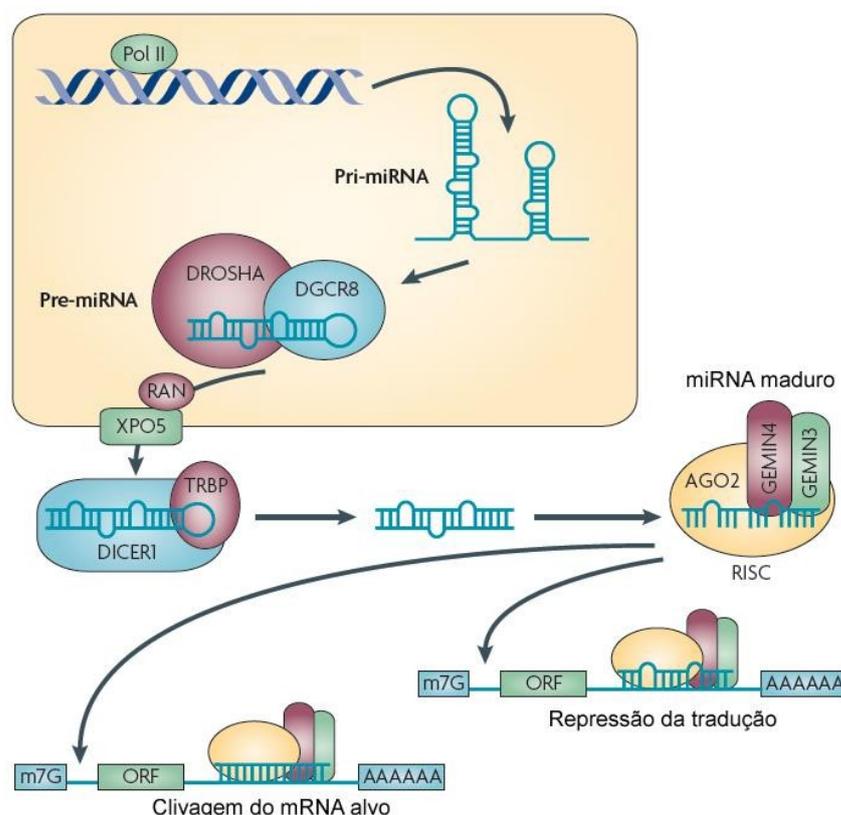
Entretanto, nenhum desses candidatos chegou a ser utilizado na prática clínica até o momento. Atualmente, tanto no protocolo SIOP quanto no NWTSG, somente são avaliados como indicadores de prognóstico a presença de anaplasia difusa (FARIA et al. 1996) e perda de heterozigotidade nos cromossomos 1p e/ou 16q (GRUNDY et al. 1994).

## 1.5 PROCESSAMENTO DE microRNAs E VIA Wnt - DUAS VIAS IMPORTANTES EM TW

O processamento de miRNAs e a via de sinalização Wnt são vias envolvidas com o desenvolvimento embrionário, estando frequentemente alteradas em TW.

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA dupla fita que agem como importantes reguladores pós-transcricionais celulares, através da degradação ou repressão da tradução dos RNAs mensageiros (mRNAs). Além da participação destas moléculas como reguladores-chave de diversos processos celulares, como desenvolvimento embrionário e a diferenciação celular, alterações em miRNAs já foram associadas a diversas patologias, incluindo o câncer (KIM 2005). No núcleo celular, os genes que codificam os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II em longos microRNAs primários (pri-miRNA) que, ainda no núcleo, são clivados por um complexo proteico do qual fazem parte a Drosha e sua proteína parceira DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*). Essa clivagem resulta em moléculas de RNA com cerca de 70 pares de bases, denominadas precursores de miRNAs (pre-miRNA), que apresentam um trecho de fita dupla e uma alça de fita simples, formando uma estrutura denominada *hairpin*. O pre-miRNA é exportado para o citoplasma pela exportina-5 (XPO5) e por RAN, onde é clivado pela RNase III Dicer, junto com seu parceiro TARBP2, gerando um miRNA maduro com cerca de 22 nucleotídeos de comprimento. Uma das fitas do miRNA é então incorporada ao complexo denominado RISC (*RNA-*

*Induced Silencing Complex*), formado por proteínas Argonautas (Ago1 e/ou Ago2) e outros parceiros, como GEMIN4 e DDX20 (conhecida também como GEMIN3). O complexo RISC permite o pareamento entre a fita do miRNA incorporada e a região homóloga do mRNA-alvo por complementaridade de bases, para que então ocorra sua degradação ou repressão da tradução (KIM 2005; KROL et al. 2010; AMERES e ZAMORE 2013). Além disso, outras proteínas de ligação a miRNAs podem influenciar esse processamento, como as proteínas codificadas pelos genes *LIN28A* e *LIN28B*, que induzem a degradação de miRNAs, em especial da família Let-7 (LIU et al. 2011; PISKOUNOVA et al. 2011) (Figura 2).



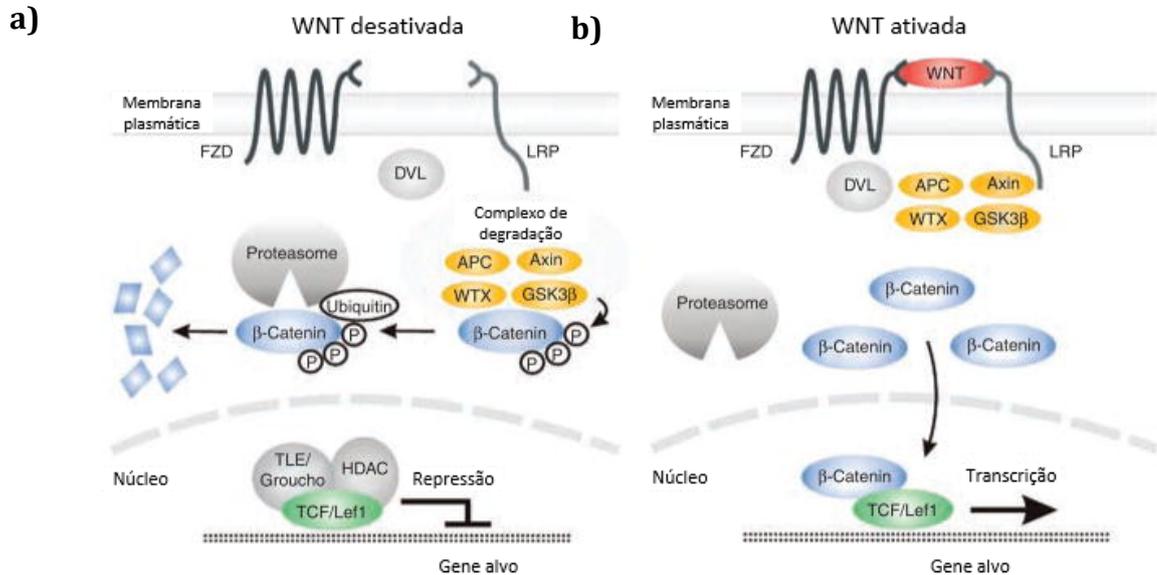
**Fonte:** Modificado de RYAN et al. (2010).

**Figura 2 - Via de biogênese do miRNA.** Representação esquemática da atuação das principais proteínas envolvidas no processamento de miRNAs.

A repressão da maturação de miRNA através da inibição da expressão de genes desta via prejudica a diferenciação precisa do rim (SHI et al. 2008; ZHDANOVA et al. 2011) e promove a tumorigênese em várias linhas celulares (KUMAR et al. 2007), podendo então contribuir para o início do TW.

Outra importante via relacionada ao TW e outros tumores embrionários é a via Wnt/ $\beta$ -catenina (SCHMIDT-OTT e BARASCH 2008; GHAAHARI e BABASHAH 2015). Esta via é responsável pela homeostase dos tecidos e pela manutenção do fenótipo das células epiteliais, apresentando um papel crucial na embriogênese e no câncer. O braço canônico da via Wnt, que opera com o envolvimento de  $\beta$ -catenina (codificada pelo gene *CTNNB1*), encontra-se ativo durante a embriogênese, levando à inibição da atuação do complexo de destruição e conseqüentemente impedindo que a  $\beta$ -catenina seja degradada no proteossomo (POLAKIS 2007). Assim, quando a via Wnt encontra-se ativa, ocorre a translocação da  $\beta$ -catenina do citoplasma para o núcleo através de uma cascata de eventos, onde ela passa a exercer seu papel de fator de transcrição, regulando a expressão de diversos genes envolvidos em processos celulares como diferenciação, adesão, sinalização e proliferação. Já em células diferenciadas, esse braço da via Wnt encontra-se inativo e a  $\beta$ -catenina se acumula no citoplasma e na membrana plasmática, sendo recrutada pelo complexo de destruição formado por *GSK3 $\beta$* , *AXIN1/2*, *APC* e *WTX* e mantendo seus níveis dentro da célula (ABERLE et al. 1997) (Figura 3). Porém, a reativação desse processo após a embriogênese pode levar a

tumores onde uma forma indireta de observar sua ativação é pela localização nuclear da  $\beta$ -catenina, que reassume seu papel de transcrição.



**Fonte:** Modificado de SCHMIDT-OTT e BARASCH (2008)

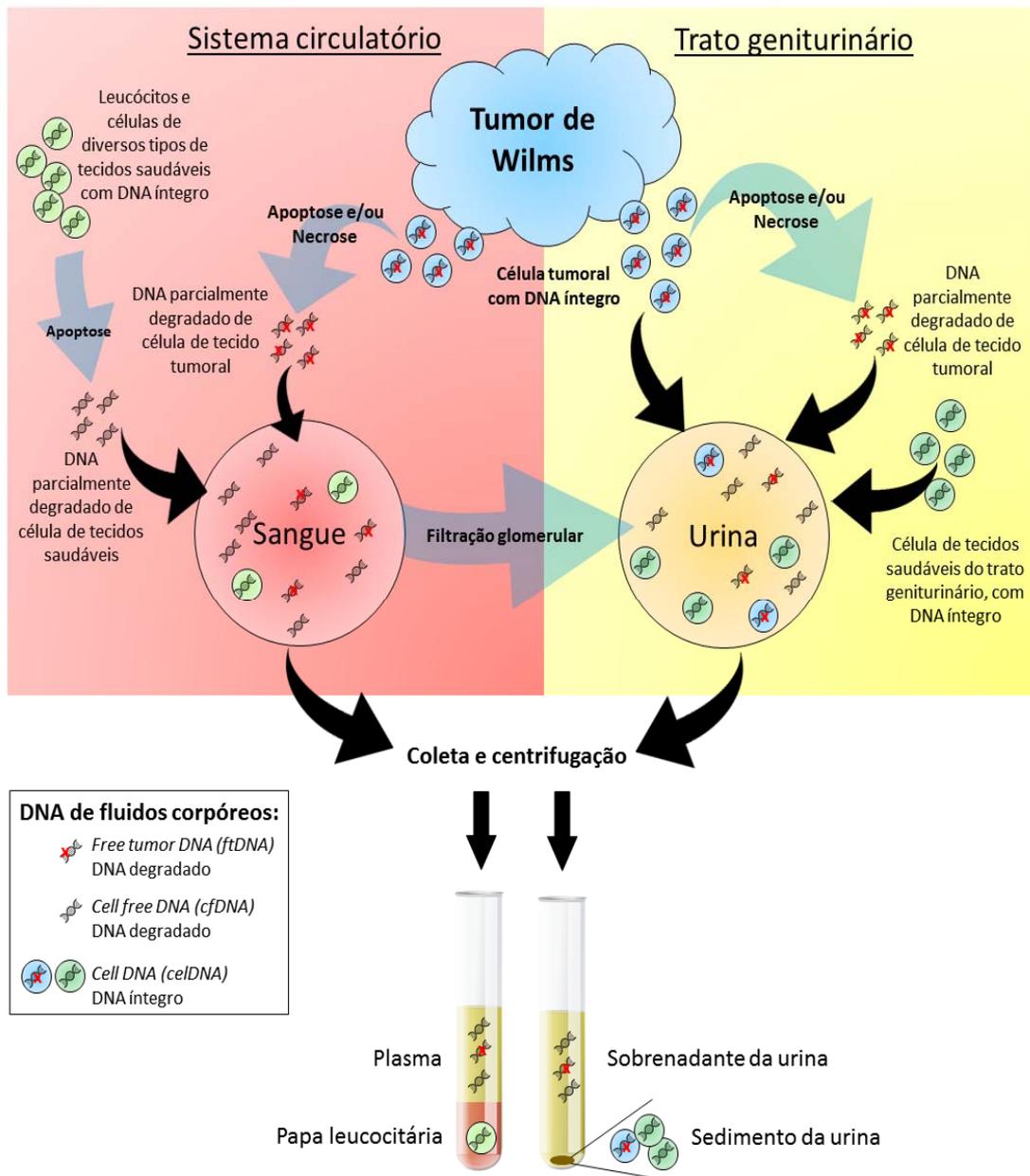
**Figura 3 - Via de sinalização canônica Wnt.** a) Representação esquemática da via Wnt ativada, normalmente durante a embriogênese, onde ocorre a translocação da  $\beta$ -catenina do citoplasma para o núcleo através de uma cascata de eventos e ela passa a exercer seu papel de fator de transcrição, regulando a expressão de diversos genes envolvidos em processos celulares. B) Via Wnt desativada, onde a  $\beta$ -catenina se acumula no citoplasma e na membrana plasmática, sendo recrutada pelo complexo de destruição e mantendo seus níveis dentro da célula.

## 1.6 O USO DE FLUIDOS CORPÓREOS COMO BIÓPSIA LÍQUIDA EM ONCOLOGIA

Atualmente está bem estabelecido que pacientes com diferentes tipos de câncer, independente do estadiamento clínico, apresentam maiores níveis de DNA circulante livre (cfDNA, do inglês “*circulating free DNA*”) em fluidos corpóreos do que indivíduos saudáveis. O cfDNA pode ser visto em fluidos corpóreos como o plasma e sobrenadante da urina (LI et al. 2002; DIEHL et al. 2008; SCHWARZENBACH et al. 2011; PERKINS et al. 2012; BETTEGOWDA et al. 2014; MURTAZA et al. 2015; FERREIRA et al. 2016; RIEDIGER et al. 2016). No sedimento da urina também é possível obter DNA de células epiteliais que se desprendem do trato geniturinário (celDNA, do inglês “*cellular DNA*”) (BOTEZATU et al. 2000; SU et al. 2004b; MILLHOLLAND et al. 2012; BIRKENKAMP-DEMTRÖDER et al. 2016; GUO et al. 2016; TOGNERI et al. 2016).

Em pacientes oncológicos, há evidências de que entre as moléculas de DNA identificadas no cfDNA e celDNA, há moléculas de DNA tumoral (ftDNA, do inglês “*free tumor DNA*”), que pelo repertório mutacional observado são claramente representativas do genoma do tumor. O ftDNA é resultado da apoptose e/ou necrose de células tumorais e, portanto, apresentam-se tipicamente em estado fragmentado (160-180bp) (JAHR et al. 2001; MOULIERE et al. 2011). No caso do TW, que tem localização renal e pode estar em contato direto com a urina, pode ocorrer ainda a liberação de células tumorais devido à instabilidade tecidual. Estas células acabam

diluídas na urina juntamente com as células saudáveis, originadas do processo natural de esfoliação e apoptose do tecido epitelial do trato geniturinário. Além disso, outros estudos mostram que também no sobrenadante da urina é possível identificar ftDNA altamente degradado, proveniente da circulação após filtração glomerular (BOTEZATU et al. 2000; SU et al. 2004a). Já no sedimento da urina encontra-se celDNA em estado mais íntegro, proveniente das células do trato geniturinário (SU et al. 2004b) (Figura 4).



**Figura 4** - As diferentes origens do DNA encontrado em fluidos corpóreos e sua presença nos componentes de urina e sangue. Durante o processo de apoptose ou necrose das células tumorais, o tDNA é liberado no sangue junto com o DNA de células saudáveis que também passaram pelo processo de apoptose. Esse DNA pode, ainda, passar por filtração glomerular nos rins, indo parar na urina. A urina também conta com células epiteliais do trato geniturinário devido à esfoliação desses tecidos, assim como tecido de tumores nesta região, como o TW. Após coleta, o sangue e a urina seguem para centrifugação para a separação dos componentes do sangue (plasma, leucócitos e eritrócitos) e da urina (sobrenadante e sedimento).

Nesse contexto, é observada alta correlação entre a frequência destas mutações específicas do tumor detectadas em ftDNA com a progressão da doença em diferentes tipos de câncer (DAWSON et al. 2013; MURTAZA et al. 2015). Esses relatos abrem perspectivas reais da investigação do ftDNA em cfDNA extraído de fluidos corpóreos como ferramenta de monitoramento de resposta ao tratamento. A aplicação desta abordagem nos pacientes oncológicos através da busca de mutações específicas do tumor em ftDNA de plasma e outros fluidos corpóreos vem constituindo um novo paradigma em oncologia. A detecção precisa da marca tumoral que sinaliza a presença de ftDNA está sendo usada para várias aplicações em diversos tipos de câncer, como identificação de mutações acionáveis que guiam terapias dirigidas, detecção de presença de doença residual, avaliação de resposta ao tratamento, para monitoramento de recidivas em pacientes considerados curados, para o estudo dinâmico da resistência a tratamentos, entre outras (MURTAZA et al. 2015, 2013; CARPINETTI et al. 2015; CHEDGY et al. 2016; FERREIRA et al. 2016; BRAIG et al. 2016). Para a última aplicação, estudos mais abrangentes, como painéis de mutações ou mesmo avaliação do exoma completo podem ser usados em amostras seriadas de cfDNA de fluidos corpóreos na busca por ftDNA, permitindo caracterizar, de forma ampla, a dinâmica da expansão clonal somática e evolução tumoral frente a tratamentos específicos.

Sendo assim, a possibilidade da detecção de ftDNA em fluidos corpóreos dos pacientes com TW pode vir a ser uma ferramenta para diagnóstico e principalmente para monitoramento de recidiva e de resposta à

quimioterapia neoadjuvante. Esse monitoramento poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos de resistência ao tratamento e, no futuro, auxiliar no estabelecimento de protocolos terapêuticos com o mínimo de terapia possível, diminuindo assim os possíveis efeitos colaterais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Contribuir com a definição do repertório de genes mutados em TW e estabelecer uma plataforma para detecção de ftDNA em componentes da urina e plasma de pacientes com tumor de Wilms para fins de monitoramento de resposta ao tratamento e de recidiva.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Contribuir com a consolidação de um painel de genes associados ao TW com alta sensibilidade para detecção de mutação somática nessa neoplasia, através de sequenciamento completo do exoma de DNA de tecido tumoral para identificação de novos genes.
- Testar urina como biópsia líquida para detecção de DNA tumoral em pacientes com TW e comparar com os resultados obtidos em plasma.
- Correlacionar a frequência de mutações somáticas detectadas no DNA de coletas seriadas de fluidos corpóreos de pacientes com TW com o desfecho clínico.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 CASUÍSTICA**

Para a análise de biópsia líquida, foram incluídos nesse estudo seis pacientes portadores de TW provenientes do serviço de pediatria oncológica do A.C.Camargo Cancer Center através de estreita colaboração com a Dra. Cecilia Costa, diretora do Núcleo de Oncologia Pediátrica, durante o período de 2014 a 2016. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética do A.C.Camargo Cancer Center sob o número 2222/16 (Anexo 1). Esses pacientes aceitaram o termo de assentimento e os responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndices 1 e 2).

Para a análise de novos genes mutados em TW, foram utilizadas 37 amostras de TW, sendo 12 amostras do BioBanco do A.C.Camargo Cancer Center e 25 amostras do Children's Oncology Group (COG). Para as 12 amostras do A.C.Camargo Cancer Center, foram avaliados os DNAs de tecido tumoral e leucócito, permitindo a definição da natureza da mutação (somática ou germinativa). Para as 25 amostras do COG, só foi possível avaliar o DNA de tecido tumoral. As amostras do COG são enriquecidas para o componente blastematoso, estágios III e IV, já que foram selecionadas para estudos prévios que tinham como objetivo estudar esse componente histológico (MASCHIETTO et al. 2011a; MASCHIETTO et al.

2011b) e usadas em outros estudos do grupo (TORREZAN et al. 2014; KREPISCHI et al. 2016).

### **3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Para identificação das mutações somáticas presentes no tecido tumoral utilizamos o painel contendo os genes frequentemente mutados em TW de um estudo anterior (TORREZAN et al. 2014) e avaliamos os DNAs do tumor e da papa leucocitária para filtrar as variantes germinativas. No caso de ausência de detecção de mutação somática nos genes contidos no painel, os DNAs foram submetidos ao sequenciamento do exoma que possibilita a detecção de mutações somáticas em outros genes.

As mutações somáticas identificadas em cada paciente foram rastreadas por sequenciamento de *amplicon* nos DNAs do sobrenadante da urina (cfDNA) e das células do sedimento da urina (ceIDNA) das amostras coletadas, e também nos DNAs extraídos do plasma (cfDNA). Os dados de detecção de DNA tumoral livre (ftDNA) obtidos foram então correlacionados com os dados clínicos dos pacientes.

Os novos genes identificados como mutados em TW pela análise das sequências do exoma completo foram incluídos no painel gênico, para que com o sequenciamento dos genes do painel seja possível detectar mutações somáticas em maior percentual de TWs.

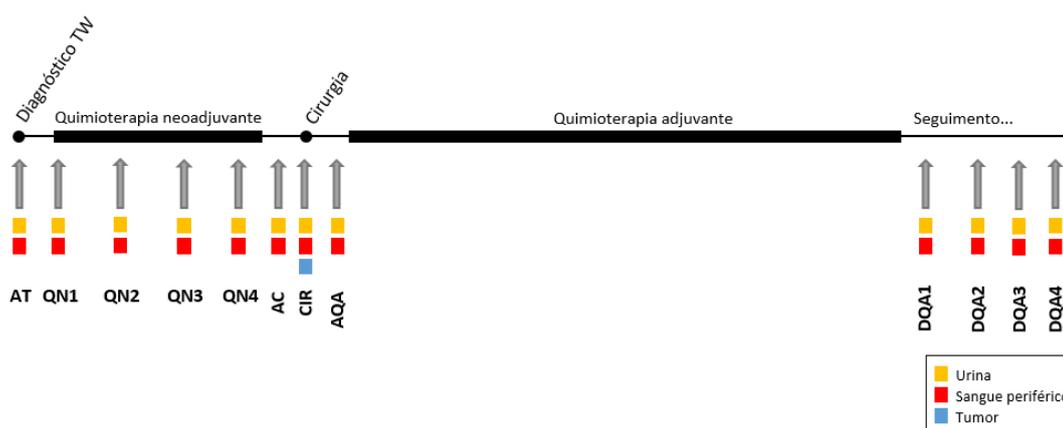
### 3.3 COLETA E EXTRAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Os tecidos congelados dos tumores selecionados foram retirados do Biobanco de Tumores A.C.Camargo Cancer Center e submetidos à análise histológica por um patologista para avaliar a porcentagem do tecido de interesse. As amostras que continham tecido não neoplásico, fibrose, tecido adiposo ou outros contaminantes foram dissecadas manualmente. Resumidamente, o processo de extração do DNA consistiu em digerir o tecido em 600 µL de uma solução contendo 25 mM EDTA pH 8; 7.5 µL do decylsulphate 20%, NaCl 100 mM; 100 mM Tris-HCl e 300 µg proteinase K e incubar a 55 °C por 18h agitando num termomixer. O DNA genômico foi separado da fase orgânica por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1) usando um tubo Phase Lock Gel - PLG (Eppendorf), precipitado em etanol absoluto e eluído em Tris-EDTA (pH 8,0). A quantidade e a pureza do DNA foram avaliadas por meio Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) e a integridade por eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR-Safe DNA gel stain (10.000X concentrated in DMSO - Invitrogen Life Technologies).

Sangue periférico para extração de DNA de leucócitos foi coletado em tubo EDTA e centrifugado à 1000 rcf por 10 minutos em temperatura ambiente. Os glóbulos vermelhos, juntamente com a camada de leucócitos, foram transferidos para um tubo cônico de 50 ml. Adicionamos 40 ml de Tris-EDTA buffer pH 8.0 (1x) para a lise dos glóbulos vermelhos e para

purificação dos leucócitos. Após intenso vortex e centrifugação do tubo a 3500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado. 25 ml de Tris-EDTA buffer pH 8.0 (1x) foi adicionado ao tubo de 50 ml para remoção dos restos de glóbulos vermelhos. Após vortex e nova centrifugação a 3500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi novamente retirado. O sedimento de leucócitos formado no fundo do tubo cônico de 50 ml foi dissolvido no volume restante e o volume total foi ajustado para 300 µL com tampão Tris-EDTA pH 8.0 (1x). O leucócito dissolvido (~ 300 µl) foi cuidadosamente transferido para um microtubo de 2,0 ml e inserido no equipamento de extração automatizado para purificação de DNA. A extração de DNA foi realizada no equipamento QIASymphony SP (QIAGEN, Hilden, Alemanha) usando o QIASymphony DNA Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center.

As coletas de fluidos corpóreos (sangue e urina) dos pacientes selecionados para esse estudo foram realizadas por profissionais no núcleo de pediatria do A.C.Camargo Cancer Center em diferentes momentos do tratamento: antes do início do tratamento neoadjuvante (AT), durante as sessões de quimioterapia neoadjuvante (QN), dias antes da cirurgia (AC), no dia da cirurgia (CIR), antes das sessões de quimioterapia adjuvante (AQA), depois a quimioterapia adjuvante (DQA) (Quadro 4 e Figura 5).



**Figura 5** - Pontos de coleta de amostras de fluidos corpóreos e tumor antes, durante e após o tratamento para TW. A primeira coleta foi realizada antes do início do tratamento (AT), seguido por coletas realizadas durante o período de quimioterapia neoadjuvante (QN1-QN4), uma coleta realizada nos dias entre o fim da quimioterapia neoadjuvante e a cirurgia (AC), no dia da cirurgia (CIR), antes do início da quimioterapia adjuvante (AQA) e após o período de quimioterapia neoadjuvante, durante o seguimento clínico do paciente (DQA1-DQA4).

#### Quadro 4 - Nomenclatura das amostras de fluidos corpóreos.

Nome da amostra	Período em que a coleta foi realizada
AT	Antes do início do tratamento para TW.
QN	Durante a quimioterapia neoadjuvante.
AC	Antes da cirurgia.
CIR	No dia da cirurgia para retirada do TW.
AQA	Antes do início da quimioterapia adjuvante.
DQA	Depois do fim do tratamento para TW - durante o seguimento clínico.

Para o primeiro paciente do estudo (paciente P01) foram coletas amostras de sangue e urina antes do tratamento, no momento da cirurgia para remoção do TW e amostras consecutivas após 9 meses. Para essa paciente, não foram coletadas amostras durante o tratamento quimioterápico neoadjuvante e adjuvante. Assim, só foram coletadas amostras AT e DQA para o monitoramento pós tratamento. Para os demais pacientes foram coletadas amostras nas diferentes visitas dos mesmos ao hospital para realização do tratamento neoadjuvante.

Sangue periférico para extração de DNA de plasma foi coletado em tubo PPT e submetido a centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos em temperatura ambiente. O plasma foi cuidadosamente transferido para um tubo cônico de 15 ml e submetido a outra centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos em temperatura ambiente para remover os leucócitos remanescentes. O plasma foi cuidadosamente recuperado em um tubo cônico de 15 ml, depois armazenado a -80 °C até a purificação do DNA. A extração de DNA foi realizada usando o QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) do Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center.

As amostras de urina foram coletadas em um tubo cônico de 50 ml e depois centrifugadas a 3000 g durante 10 minutos em temperatura ambiente. Os sobrenadantes de urina foram transferidos para outros tubos cônicos de 50 ml. O sedimento celular (juntamente com um volume residual de urina de aproximadamente 100 µl) foi transferido para um tubo de 1,5 ml. Ambos os sedimentos e sobrenadantes foram congelados imediatamente a -80 °C para posterior purificação de DNA.

Os sedimentos de urina foram descongelados à temperatura ambiente e depois foram adicionados 20 µl de Proteinase K 20 mg/ml (QIAGEN, Hilden, Alemanha), 20 µl de B-Mercaptoetanol (Sigma Aldrich Corporations, Missouri, USA) e 1000 µl do tampão de lise ATL (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Esta solução foi homogeneizada no vortex durante um minuto e mantida a 56 °C durante 2 horas a 900 rpm para lise inicial do material.

Os sobrenadantes de urina também foram descongelados à temperatura ambiente e uma alíquota de 1100 µl foi usada diretamente para purificação de DNA.

O sedimento de urina com pré-tratamento e uma alíquota de amostra de sobrenadante de urina foram cuidadosamente transferidos para microtubos de 2,0 ml e inseridos no equipamento de extração automatizado para purificação de DNA. A extração de DNA foi realizada no equipamento QIASymphony SP (QIAGEN, Hilden, Alemanha) usando o QIASymphony DNA Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) do Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center.

A concentração e a pureza dos DNAs provenientes do plasma, sedimento de urina e do sobrenadante de urina foram avaliadas por espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, US).

### **3.4 NOMENCLATURA DO DNA**

O DNA isolado do sedimento de urina foi identificado como DNA celular (ceDNA, do inglês "*cell DNA*") e o DNA no sobrenadante de urina e no plasma como DNA livre de células (cfDNA, do inglês "*cell free DNA*"). O DNA isolado a partir de componentes de plasma ou urina que tenha mutações somáticas, indicando que se originam especificamente de células tumorais, foram identificados como DNA tumoral livre (ftDNA, do inglês "*free tumor DNA*").

### 3.5 SEQUENCIAMENTO PARALELO DO PAINEL DE GENES

A metodologia de sequenciamento por *Target Sequencing* se baseia na amplificação da região de interesse (toda a região codificante de cada gene), através de PCR multiplex, permitindo a amplificação de centenas de alvos em paralelo em uma única reação.

A preparação das bibliotecas das amostras foi realizada individualmente para as amostras DNA de leucócito e tumor, utilizando o Ion AmpliSeq™Library Kit 2.0 (Thermo Fischer Scientific, EUA), segundo as instruções do fabricante. De forma resumida, reações de PCR multiplex foram realizadas para cada amostra a partir de 10 ng de DNA genômico. Em seguida, foram adicionados adaptadores contendo identificadores únicos (*barcodes*) permitindo o sequenciamento paralelo de diferentes amostras.

As amostras foram sequenciadas na plataforma Ion Proton (Thermo Fischer Scientific, EUA), que se baseia na detecção da variação de pH por um chip semicondutor. O chip Ion PI™v3 contém 165 milhões de poços, e em cada poço é depositada uma esfera contendo múltiplas cópias de um fragmento de DNA originado a partir de uma PCR em emulsão. Resumidamente, durante o sequenciamento as quatro bases nitrogenadas do DNA são dispensadas de maneira cíclica e quando há a incorporação de uma base ocorre a liberação de uma molécula de hidrogênio, alterando assim o pH da solução e indicando que determinada base foi incorporada. Caso a base dispensada no ciclo seguinte não seja complementar à molécula de DNA molde, não haverá alteração no pH da solução. As

principais vantagens desta plataforma são o baixo custo por base sequenciada e a rapidez na geração de dados de sequenciamento.

O painel de genes é oriundo de um estudo anterior do nosso grupo (TORREZAN et al. 2014) e é constituído de genes descritos como mutados em TW, sendo 10 genes da via de biogênese de microRNAs (*DROSHA*, *DGCR8*, *RAN*, *XPO5*, *DICER1*, *TARBP2*, *AGO1*, *AGO2*, *GEMIN4* e *DDX20*), genes da via Wnt (*APC*, *CTNNB1*, *WTX*) e outros três genes de outras vias (*TP53*, *WT1*, *DIS3L2*, e *FBXW7*).

### **3.6 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE EXOMA (WES)**

O WES foi realizado no DNA de tumor e de leucócito usando a plataforma Ion Proton (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Uma região compreendendo 37 Mb da região de codificação foi avaliada utilizando o kit Ion TargetSeq™ Exome Enrichment (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A biblioteca foi construída de acordo com as instruções do fabricante.

As bibliotecas para WES foram quantificadas usando a técnica qPCR com o Ion Library Quantification kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), para usar 100 pM da biblioteca como modelo para PCR em emulsão (ePCR). O ePCR e o enriquecimento foram realizados usando o ION PI Template OT2 Kit v3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

O sequenciamento foi realizado utilizando o Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3 com um Ion PI Chip v3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

### 3.7 SEQUENCIAMENTO DE *AMPLICON*

As amostras de DNA de fluidos corpóreos tiveram seu volume seco em 50% no SpeedVac (Thermo Fischer Scientific, USA) para serem usadas para a confecção das bibliotecas.

O sequenciamento dos *amplicons* foi feito por *Target Amplicon Sequencing*, no qual adaptadores com *barcodes* são ligados à produtos de PCR amplificados que flanqueiam as alterações de interesse. Para isso, pares de *primers* que geram amplicon de 95 a 150bp foram desenhados com a ferramenta Primer3 ([http:// http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0)), a fim de amplificar a região específica da mutação no cfDNA extraído de fluidos corpóreos. A reação de PCR foi realizada utilizando a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fischer Scientific, USA), de acordo com as instruções do fabricante. No caso de mais de 2 mutações somáticas no mesmo paciente, para otimização das amostras de fluidos corpóreos, foi realizada uma PCR multiplex com o Multiplex PCR Kit (QIAGEN, EUA). Os produtos amplificados foram verificados em gel de agarose 3%.

Para a ligação dos *barcodes*, foi utilizado o kit Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Thermo Fischer Scientific, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram sequenciadas utilizando o chip Ion PI™ ChipV3 na plataforma Ion Proton (Thermo Fischer Scientific, USA).

O número mínimo de leituras para considerar uma amostra negativa para traços de ftDNA foi de 20.000x, número já estabelecido pelo grupo e que garante alta sensibilidade na detecção de ftDNA em fluidos corpóreos.

### **3.8 CHAMADA DE VARIANTES E SELEÇÃO DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS**

Para o sequenciamento de exoma as variantes nos DNAs de tumor e leucócito foram identificadas e anotadas com o plugin Ion Torrent's Variant Caller (v5.0.4.0), e possíveis mutações somáticas foram selecionadas através do software VarSeq (v1.4.6) (Golden Helix, USA).

Para WES, os critérios para a seleção de variantes foram: i) variantes não-sinônimas em regiões codificantes (SNVs ou INDELS), ii) não reportadas no dbSNP ou com MAF <1%, iii) presente em pelo menos 10% dos reads no DNA de tumor e ausente no DNA de leucócito, iv) *quality depth* maior do que 2, v) *strand bias* < 0.8, vi) cobertura mínima de 30x.

Para o sequenciamento de painel de genes, a ferramenta Ion Reporter (v5.2) foi utilizada para identificação, anotação e seleção de variantes. Para essa análise, foram utilizados os seguintes critérios: i) cobertura mínima de 400x, ii) variante presente em pelo menos 10% dos reads no DNA de tumor e ausente no DNA de leucócito, iii) variantes não-sinônimas em regiões codificantes (SNVs ou INDELS), iv) não reportadas no dbSNP ou com MAF <1%. Variantes selecionadas foram visualmente verificadas utilizando o software Genomics Workbench (CLCBio, Denmark).

Para o sequenciamento de *amplicon* das amostras de fluidos corpóreos, os arquivos BAM gerados após sequenciamento foram carregados na ferramenta Ion Reporter (v5.2) e analisados através de *workflows* customizados com os seguintes critérios para chamada de variantes: i) *downsample to coverage*: 20,000x; ii) frequência mínima do alelo mutado: 1%; iii) cobertura mínima para o alelo mutado: 5x. *Hotspots* foram definidos nos *workflows* para cada uma das mutações somáticas.

A fim de definir o nível de ruído por artefato de sequenciamento, realizamos o sequenciamento do cfDNA de amostras de plasma e componentes de urina cedidos por indivíduos saudáveis como controle negativo para as duas mutações da paciente P01, nos genes *INTS1* e *TNRC18*. Observamos que o maior ruído nas posições de interesse foram de 0,15% para a mutação c.3349delG no gene *TNRC18* e 0,12% para a mutação c.2257G>A no gene *INTS1*. Sendo assim, definimos um *cutoff* de 1% para limite mínimo de detecção destas mutações.

### **3.9 VALIDAÇÃO DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS**

Para a validação das mutações somáticas identificadas por sequenciamento de painel ou sequenciamento de exoma foi realizado o sequenciamento Sanger ou sequenciamento de *amplicon* por NGS utilizando ~10 ng de DNA genômico de tecido tumoral congelado e a mesma quantia de DNA genômico do leucócito.

Para sequenciamento Sanger a PCR foi feita com GoTaq Green Master Mix (Promega, USA) ou KAPA2G Fast HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems, USA), e o produto de PCR foi purificado com CleanSweep PCR Purification Reagent (Applied Biosystems, USA), e sequenciado na plataforma ABI 3130xl DNA Sequencer (Thermo Fisher Scientific, USA). As seqüências geradas foram alinhadas ao genoma de referência utilizando o software CLCBio Genomics Workbench (CLCBio, Denmark). Esse procedimento foi realizado para validar até 2 mutações identificadas em um mesmo paciente.

Para sequenciamento de *amplicon* por NGS, foi realizada uma reação de PCR multiplex com o Multiplex PCR Kit (QIAGEN, EUA) conforme as instruções do fabricante. O produto seguiu para ligação de adaptadores e barcodes utilizando o kit Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) e foi sequenciado na plataforma ION Proton (Thermo Fisher Scientific, EUA). Esse procedimento foi utilizado para validar mais de 3 mutações identificadas em um único paciente, como forma de otimizar o uso do material biológico.

### **3.10 VALIDAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO NGS POR DIGITAL DROPLET PCR (ddPCR)**

Para validar o método NGS para detecção de mutações somáticas encontradas no DNA de tecido tumoral congelado, foi utilizado o método de Digital Droplet PCR (ddPCR) em ambos os componentes da urina de um paciente da nossa casuística. O ddPCR é considerado um método padrão ouro com alta sensibilidade que realiza contagem absoluta de moléculas de DNA marcadas como selvagens ou mutadas através de fluorescência.

As reações foram realizadas em triplicata para cada amostra. Cada reação tem um volume final de 20 µl, contendo 10 µl de 2x ddPCR SuperMix for Probes (noUDTP) (Bio-Rad), 1 µl (20x) de mix contendo primers e sonda selvagens (HEX), 1 µl (20x) de mix contendo primers e sondas mutados (FAM), 8 µl de template (cfDNA) e de água livre de nucleases UltraPure Distilled Water (Invitrogen) quando necessário. As reações foram transferidas para cartuchos DG8 (Bio-Rad) junto com 7 µl de Droplet Generation Oil for Probes (Bio-Rad) para cada amostra, para a geração de gotículas na plataforma QX100/QX200 Droplet Generator (Bio-Rad). Para cada reação foram geradas cerca de 20 mil gotículas de emulsão água-óleo. Os droplets foram transferidos para uma placa de 96 poços (Eppendorf), que foi selada na plataforma PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad) para reação de amplificação no T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Após amplificação, a placa foi carregada na plataforma QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) e os resultados foram verificados no software QuantaSoft 1.7.4 (Bio-Rad). Os primers e sondas foram sintetizados pela IDT (Iowa, USA).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 APRESENTAÇÃO DA CASUÍSTICA DO ESTUDO E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS GENES ASSOCIADOS A TW**

Nesse estudo foram avaliados 6 pacientes com TW, todos do sexo feminino, com idade ao diagnóstico variando de 8 meses a 5 anos e 11 meses. Três pacientes apresentaram metástase (P01, P02 e P04), e uma delas (P04) evoluiu a óbito.

Das 6 pacientes, uma (P03) apresentou tumor bilateral metacrônico. O primeiro tumor diagnosticado foi tratado em outra instituição onde a paciente foi submetida à nefrectomia radical. Para a retirada do segundo tumor, já tratado nesta instituição, foi realizada nefrectomia parcial. Os dados gerais da casuística estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados gerais da casuística.

ID	Sexo	Idade ao diagnóstico	Estadio	Subtipo	Risco	Metástase	Observações	Tempo de seguimento neste estudo
P01	F	5 a, 11 m	II	Regressivo	Intermediário	Pulmão, recaída 9 meses após diagnóstico de TW	Desfecho clínico favorável. Paciente em acompanhamento.	1089 dias
P02	F	3 a, 11 m	IV	Misto	Intermediário	Pulmão, ao diagnóstico de TW	Desfecho clínico favorável. Paciente em acompanhamento.	316 dias
P03	F	3 a, 5 m	V	Misto	Intermediário	Não	TW bilateral metacrônico. Primeiro tumor tratado em outra instituição. Desfecho clínico favorável. Paciente em acompanhamento.	596 dias
P04	F	2 a, 3 m	IV	Misto	Intermediário	Pulmão, ao diagnóstico de TW	Evoluiu a óbito.	199 dias
P05	F	8 m	II	Estromal	Intermediário	Não	Desfecho clínico favorável. Paciente em acompanhamento.	294 dias
P06	F	1 a, 2 m	II	Estromal	Intermediário	Não	Desfecho clínico favorável. Paciente em acompanhamento.	245 dias

A primeira paciente do nosso estudo (P01) foi diagnosticada com TW aos 5 anos, tumor de subtipo regressivo, risco intermediário, estadiamento II e sofreu recaída com diagnóstico de metástase pulmonar 9 meses após o diagnóstico de TW.

Inicialmente os DNAs do tumor primário e do leucócito foram submetidos ao sequenciamento para identificação de mutações somáticas nos 17 genes contidos no painel (*DROSHA*, *DGCR8*, *RAN*, *XPO5*, *DICER1*, *TARBP2*, *AGO1*, *AGO2*, *GEMIN4*, *DDX20*, *APC*, *CTNNB1*, *TP53*, *WTX*, *WT1*, *DIS3L2* e *FBXW7*). Como não foi detectada nenhuma mutação somática para ser usada como marca tumoral nestes genes, ambos os DNAs, do tumor e do leucócito, foram submetidos ao sequenciamento completo do exoma (WES). Duas mutações somáticas foram identificadas: uma mutação missense em *INTS1* (c.2257G> A, p.Gly753Ser) detectada em uma frequência alélica de 50% e uma deleção *frameshift* de base única em

*TNRC18* (c.3499delG, p.Glu1167Argfs\*40) em uma frequência alélica de 37,3% (Tabela 2).

Em seguida, o DNA do tecido metastático da paciente P01 foi submetido ao WES permitindo a detecção das duas mutações somáticas do tumor primário, *INTS1* (c.2257G> A, p.Gly753Ser) e *TNRC18* (c.3499delG, p.Glu1167Argfs\*40). As frequências alélicas das duas mutações se mostraram aumentadas no tecido metastático (de 50% no tumor primário para 86,2% na metástase para a mutação em *INTS1* e de 37,3% no tumor primário para 87,5% para a mutação em *TNRC18*). Além disso, foram identificadas duas novas mutações somáticas: a mutação (c.932C>T, p. Ser311Phe) no gene *KRT80* em uma frequência alélica de 38,8% e a mutação (c.1516G>A, p. Asp506Asn) no gene *TTI1* em uma frequência alélica de 38,7% (Tabela 2).

Para verificar se as duas mutações identificadas exclusivamente na metástase estavam presentes em baixa frequência alélica no tumor primário, reavaliamos o DNA do tumor primário utilizando sequenciamento de *amplicon* e repetimos o sequenciamento com alta cobertura. Nenhuma das mutações foi detectada no DNA extraído do tumor primário (643.021x de cobertura para a mutação em *KRT80* e 855.210x de cobertura para a mutação em *TTI1*).

**Tabela 2** - Mutações somáticas no tumor primário e metástase da paciente P01 identificadas através de WES.

Tecido	Gene	Tipo de mutação	Alteração no cDNA	Alteração protéica	Frequência alélica no tumor	Cobertura no tumor	Frequência alélica no leucócito	Cobertura no leucócito
Tumor primário	<i>INTS1</i>	Missense	c.2257G>A	p.Gly753Ser	50%	34x	0%	44x
	<i>TNRC18</i>	Frameshift Del	c.3349delG	p.Glu1167Argfs*40	37%	59x	0%	89x
Metástase	<i>INTS1</i>	Missense	c.2257G>A	p.Gly753Ser	85,2%	27x	0%	44x
	<i>TNRC18</i>	Frameshift Del	c.3349delG	p.Glu1167Argfs*40	87,5%	8x	0%	89x
	<i>KRT80</i>	Missense	c.932C>T	p.Ser311Phe	38,8%	49x	0%	124x
	<i>TTI1</i>	Missense	c.1516G>A	p.Asp506Asn	38,7%	47x	0%	122x

Assim, como *INTS1* e *TNRC18* eram genes novos e pouco caracterizados em TW, verificamos a frequência de mutação nestes genes em uma coorte de 37 amostras de TW através de sequenciamento completo da região codificadora pelo método *target sequencing* em NGS. Das 37 amostras de TW, para 12 delas havia DNA de leucócito disponíveis no Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, e para 25 amostras de TW individuais oriundas de uma parceria com o *Children's Oncology Group* (COG) somente o DNA do tecido tumoral estava disponível.

As características clínicas e patológicas das 37 amostras estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Características clínico-patológicas das 37 amostras de TW que foram submetidas ao sequenciamento dos genes *INTS1* e *TNRC18*.

<b>Amostra</b>	<b>Origem</b>	<b>Estadiamento</b>	<b>Histologia predominante</b>	<b>Mutação detectada</b>
TW1T	AC Camargo Biobank	V	Epitélio	
TW4T	AC Camargo Biobank	V	Blastema	
TW13T	AC Camargo Biobank	II	Estroma	
TW15T	AC Camargo Biobank	III	Blastema	
TW17T	AC Camargo Biobank	V	Blastema	
TW19T	AC Camargo Biobank	IV	Epitélio	
TW20T	AC Camargo Biobank	III	Blastema	
TW21T	AC Camargo Biobank	III	Blastema	
TW23T	AC Camargo Biobank	III	Blastema	
TW28T	AC Camargo Biobank	III	Blastema	<i>INTS1</i> : c.6046C>T, p.Arg2016*
TW29T	AC Camargo Biobank	I	Blastema	
TW30T	AC Camargo Biobank	III	Blastema	
P6011	COG	III	Blastema	
P341	COG	II	Blastema	
P1070	COG	IV	Blastema	
P4181	COG	III	Blastema	
P353	COG	III	Blastema	
P246	COG	III	Blastema	
P277	COG	II	Blastema	
P329	COG	IV	Blastema	
P342	COG	IV	Blastema	
P420	COG	III	Blastema	
P970	COG	III	Blastema	
P1088	COG	III	Blastema	
P1104	COG	I	Blastema	
P1232	COG	III	Blastema	
P1290	COG	III	Blastema	<i>TNRC18</i> : c.3860C>T, p.Ser1287Phe
P001	COG	III	Blastema	
P201	COG	III	Blastema	
P1060	COG	IV	Blastema	
P1124	COG	III	Blastema	
P2182	COG	III	Blastema	<i>INTS1</i> : c.1759C>T, p.Arg587Trp
P4305	COG	III	Blastema	<i>TNRC18</i> : c.2293C>T, p.Pro765Ser
P2081	COG	III	Blastema	<i>TNRC18</i> : c.3530C>T, p.Ser1177Leu
P2113	COG	IV	Blastema	
P4272	COG	III	Blastema	
P6000	COG	III	Blastema	

Duas amostras apresentaram mutação no gene *INTS1*. Uma delas apresentou a mutação (c.6046C>T, p.Arg2016\*), de natureza somática. Esta mutação consta no dbSNP com frequência populacional de 0,04%. Outra amostra apresentou uma mutação *missense* (c.1759C>T, p.Arg587Trp), para a qual a natureza da mutação não pode ser confirmada por não ter disponibilidade do DNA de leucócito. As duas amostras apresentaram uma frequência alélica de 74,4% e 96,2%, respectivamente,

Em três amostras de tumores foram identificadas mutações no gene *TNRC18* sendo todas elas mutações *missenses*: (c.3860C>T, p.Ser1287Phe); (c.3530C>T, p.Ser1177Leu); (c.2293C>T, p.Pro765Ser), em frequências alélicas de 30,3%, 70,3% e 51,95%, respectivamente (Tabela 4). Para nenhuma delas foi possível verificar a natureza somática ou germinativa da mutação pela não disponibilidade do DNA do leucócito, representativo de linhagens germinativas. Nenhuma destas mutações consta no dbSNP, sugerindo que aquelas para as quais não pudemos avaliar a natureza da mutação sejam realmente mutações somáticas ou variantes genéticas raras. A mutação (c.2293C>T, p.Pro765Ser) da amostra P4305 consta no banco de dados COSMIC como mutação somática em câncer de próstata e rabdomyosarcoma, um outro tipo de tumor embrionário.

**Tabela 4** - Mutações nos genes *INTS1* e *TNRC18* identificadas em um subgrupo de amostras de TW.

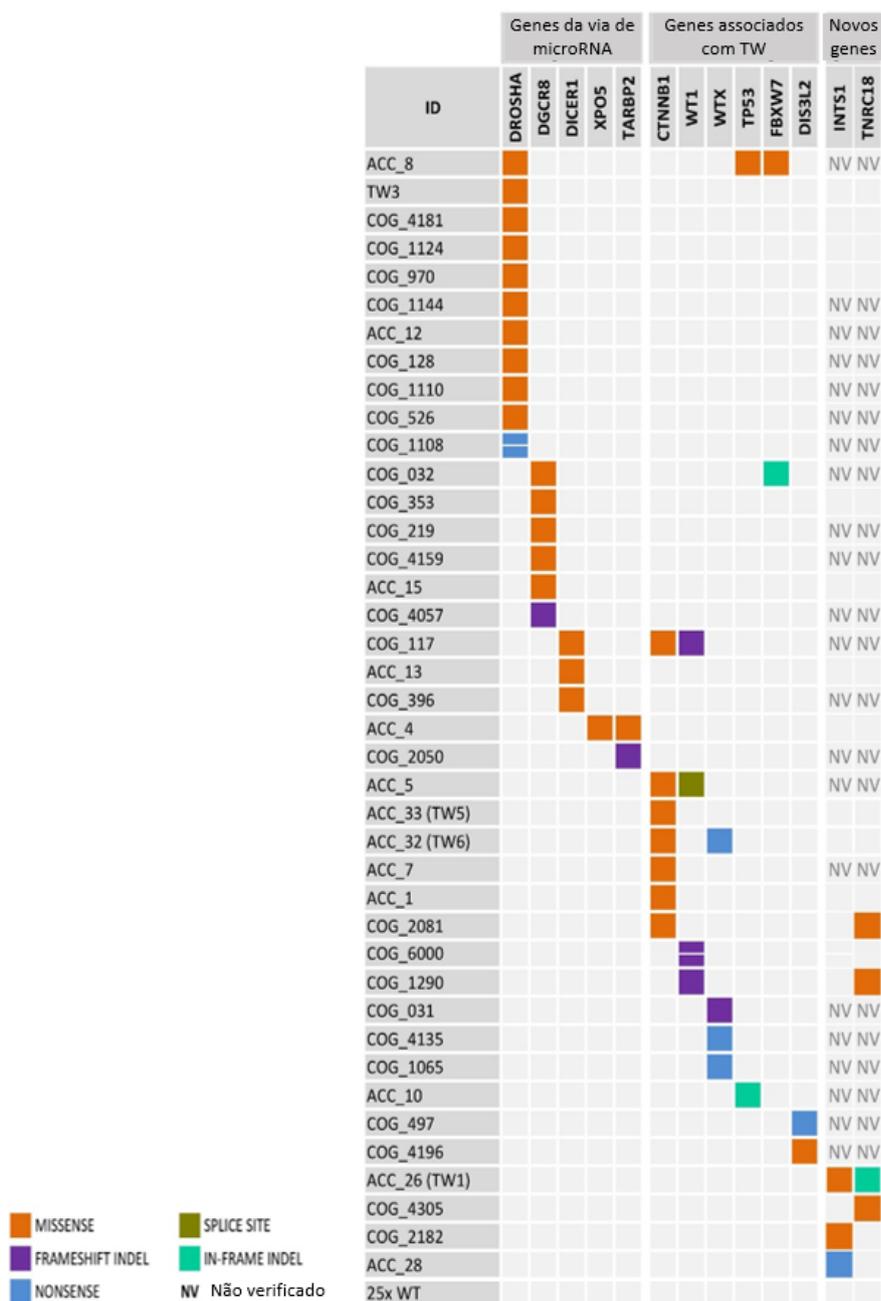
<i>Amostra</i>	<i>Gene</i>	<i>Tipo de variante</i>	<i>Alteração no cDNA</i>	<i>Alteração proteica</i>	<i>Freq Alélica (%)</i>	<i>Cov (X)</i>	<i>dbSNP_RS</i>	<i>dbSNP MAF</i>	<i>COSMIC</i>	<i>Polyphen</i>	<i>Mutation taster</i>	<i>PROVEAN</i>	<i>SIFT</i>	<i>Natureza da mutação</i>
TW28T	<i>INTS1</i>	<i>Nonsense</i>	c.6046C>T	p.Arg2016*	74,4	8842	rs201412367	0,04%	-	-	-	-	-	Somática
P2182	<i>INTS1</i>	<i>Missense</i>	c.1759C>T	p.Arg587Trp	96,2	9978	-	-	-	POD	DC	DEL	T	Indeterm.
P1290	<i>TNRC18</i>	<i>Missense</i>	c.3860C>T	p.Ser1287Phe	30,3	1997	rs61745241	0,08%	-	PD	DC	DEL	D	Indeterm.
P2081	<i>TNRC18</i>	<i>Missense</i>	c.3530C>T	p.Ser1177Leu	70,3	2680	rs142945460	0,48%	-	PD	P	DEL	D	Indeterm.
P4305	<i>TNRC18</i>	<i>Missense</i>	c.2293C>T	p.Pro765Ser	51,9	947	rs200992316	-	COSM241979	POD	DC	DEL	D	Indeterm.

POD, possibly damaging; PD, probably damaging; DC, disease causing; P, polymorphism; DEL, deleterious; T, tolerated; D, damaging; Indeterm., indeterminada.

Assim, considerando a coorte de 37 amostras de TW avaliada, as frequências de mutação nestes dois genes foram de 5,4% (2/37) para o gene *INTS1* e de 8% (3/37) para o gene *TNRC18*.

Esses dois genes, *INTS1* e *TNRC18*, foram incluídos na avaliação dos demais pacientes fazendo parte de nosso painel de genes associados a TW.

A sensibilidade da nova versão do painel em detectar mutação em amostras de TW, com a inclusão dos dois novos genes (*DROSHA*, *DGCR8*, *RAN*, *XPO5*, *DICER1*, *TARBP2*, *AGO1*, *AGO2*, *GEMIN4*, *DDX20*, *APC*, *CTNNB1*, *TP53*, *WTX*, *WT1*, *DIS3L2*, *FBXW7*, *INTS1* e *TNRC18*), passou de 50% (TORREZAN et al. 2014) para 61,5% (40/65). Na figura 6 estão apresentadas as mutações identificadas nos genes do painel que foram avaliados em 65 amostras de TW. As amostras em que os genes *INTS1* e *TNRC18* não foram avaliados estão marcadas como NV (não verificado).



Fonte: Adaptado de TORREZAN et al. (2014).

**Figura 6** - Detecção de mutações somáticas em 40 de 65 amostras de TW através do painel de genes, com adição dos genes *INTS1* e *TNRC18*.

As mutações somáticas da paciente P01, tanto do tumor primário quanto da metástase pulmonar, foram então rastreadas nos fluidos corpóreos coletados antes do tratamento (AT) com a finalidade de detectar a

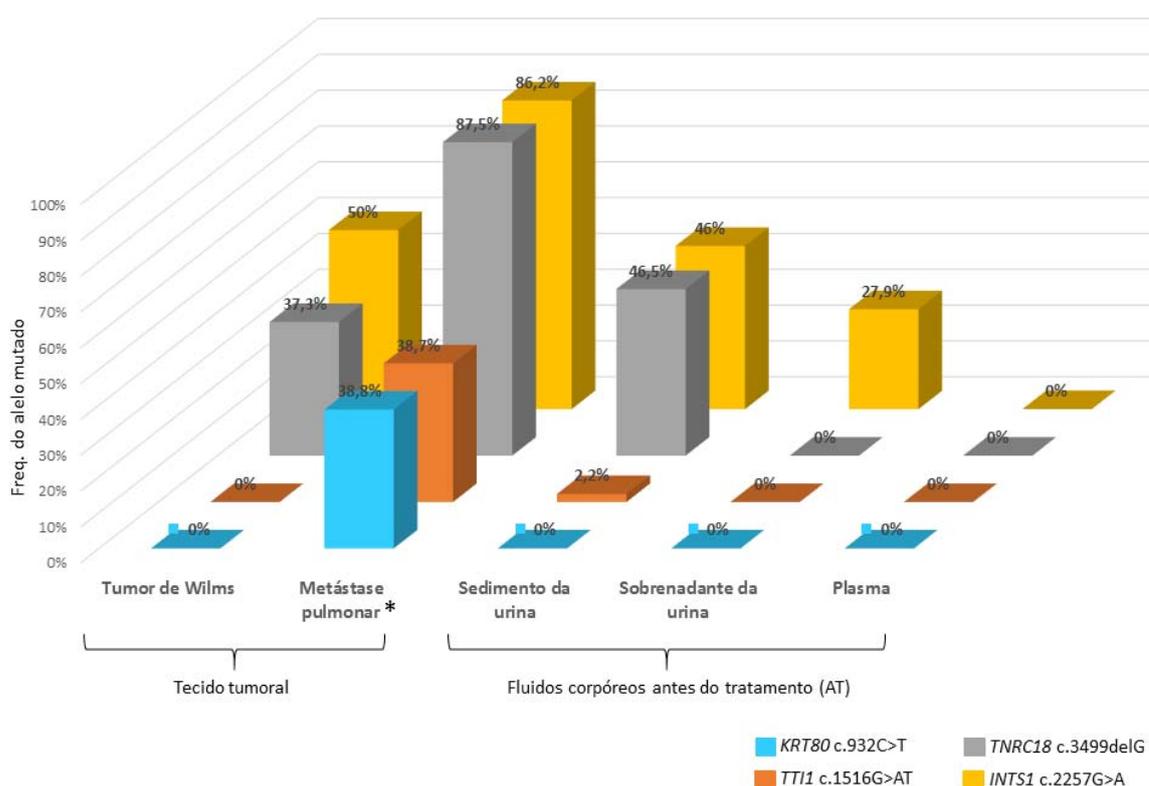
presença de ftDNA e posteriormente para monitorar progressão da doença e recidiva.

Assim, realizamos o sequenciamento de *amplicon* usando o cfDNA das amostras de fluidos corpóreos AT (do plasma e dos dois componentes da urina: sedimento e sobrenadante) para verificar a presença das quatro marcas tumorais identificadas no tumor primário e/ou metástase dessa paciente.

As mutações presentes no tumor primário foram detectadas somente nos dois componentes da urina e não no plasma. Interessante notar que no sedimento da urina, a mutação do gene *INTS1* (c.2257G> A, p.Gly753Ser) foi detectada na frequência alélica de 46%, semelhante à frequência alélica observada no tumor primário (50%). O DNA do sobrenadante de urina apresentou a mutação em frequência alélica menor (27,9%). Por outro lado, a mutação do gene *TNRC18* (c.3499delG, p.Glu1167Argfs\*40) foi detectada no sedimento da urina com uma frequência alélica de 46,5%, superior à frequência de 37,3% encontrada no tecido tumoral. A princípio, esses dados sugeriam que a urina, mais do que o plasma, poderia ser um fluido corpóreo útil na detecção de ftDNA em pacientes com TW.

Em relação às mutações identificadas exclusivamente na metástase, elas foram verificadas nas amostras de fluidos corpóreos da coleta AT, realizada 9 meses antes. A mutação *KRT80* (c.932C>T, p. Ser311Phe) não foi detectada em nenhum dos fluidos corpóreos coletados antes do tratamento. No entanto, surpreendentemente, a mutação *TTI1* (c.1516G>A, p. Asp506Asn) foi detectada no sedimento de urina AT com frequência

alélica de 2,2%, mesmo estando ausente no DNA da fração do tumor primário que foi avaliada. Esse achado sugere que essa mutação poderia estar presente em outras regiões do TW, e não na fração cujo DNA foi investigado, indicando uma heterogeneidade tumoral e confirmando que a biópsia líquida pode ser mais representativa do tumor como um todo. A Figura 7 mostra a frequência alélica das mutações somáticas nos tecidos do tumor primário e da metástase, e também no plasma e nos componentes da urina da coleta de fluidos corpóreos AT.

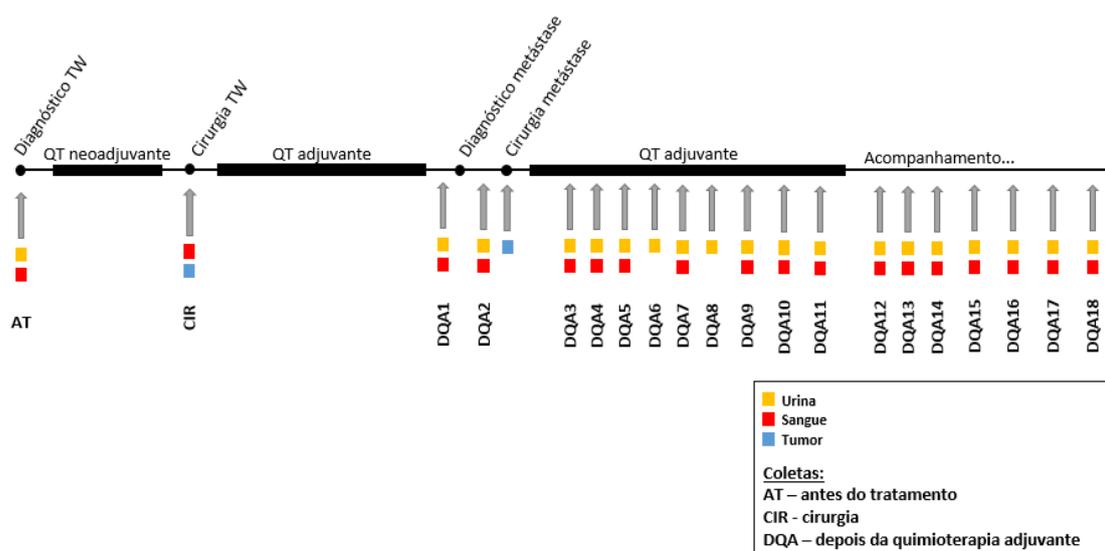


**Figura 7** - Mutações somáticas da paciente P01 nos DNAs do tumor primário, da metástase e dos fluidos corpóreos coletados antes do início do tratamento (AT). \*As mutações exclusivas da metástase pulmonar, *KRT80* (c.932C>T, p. Ser311Phe) e *TTI1* (c.1516G>A, p. Asp506Asn) foram verificadas na amostra de urina e de plasma AT 9 meses após a coleta destas amostras, quando as mutações da metástase foram identificadas.

Assim, a detecção dessas marcas tumorais na urina da paciente antes do início do tratamento abriu a possibilidade de utilizar esse fluido corpóreo para monitoramento da doença, como ferramenta complementar de grande utilidade clínica.

Dessa forma, as quatro marcas foram usadas para rastreamento de traços de ftDNA em amostras coletadas ao longo do tratamento da paciente P01. Essa paciente foi acompanhada através de avaliações seriadas de ftDNA em fluidos corpóreos por um período de 1089 dias após a primeira coleta.

Durante esse período, foram coletadas amostras de fluidos corpóreos (urina e plasma) em diferentes momentos, conforme apresentado na Figura 8. Ao todo, foram realizadas 20 coletas no período de seguimento de 1089 dias.

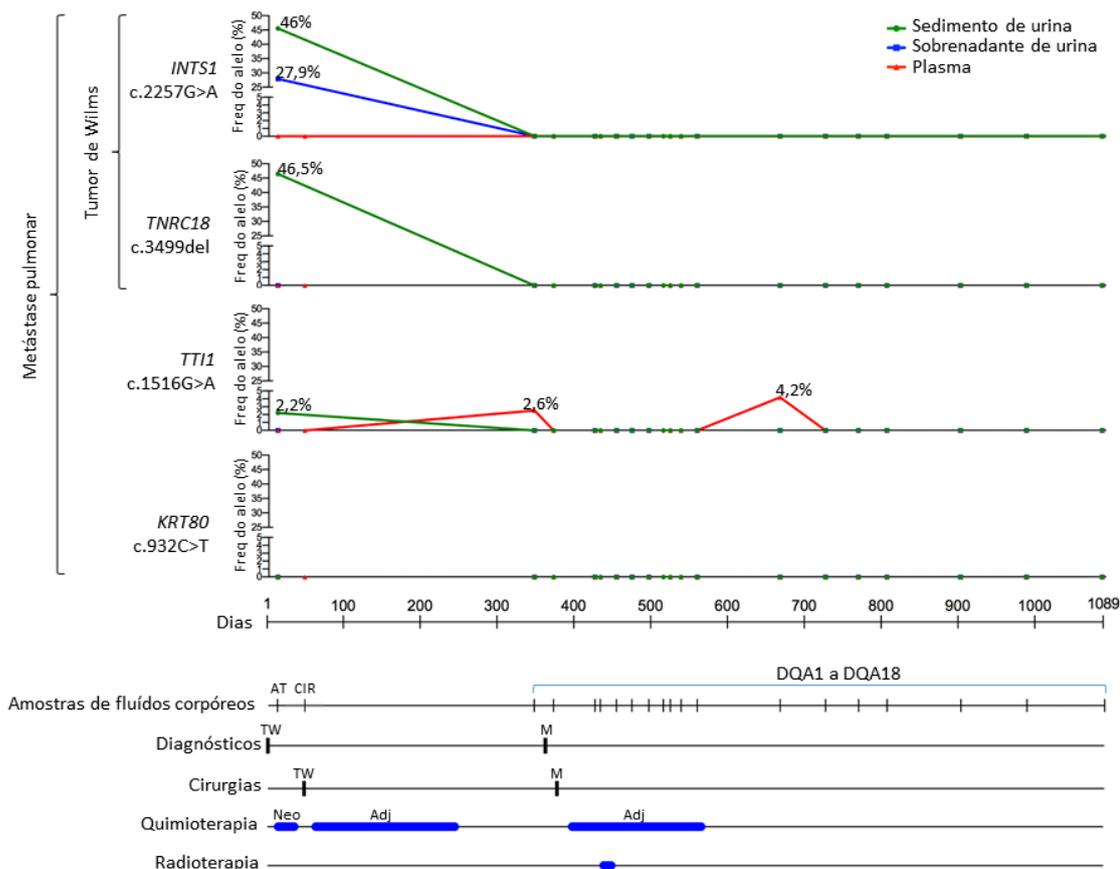


**Figura 8** - Pontos de coleta de amostras de fluidos corpóreos e tumor da paciente P01. Para a paciente P01, foram coletadas amostras somente no momento do diagnóstico de TW, na cirurgia para TW, após o tratamento adjuvante para TW e durante o tratamento da metástase pulmonar.

Uma amostra de plasma (CIR) foi coletada 48 dias após a primeira coleta de fluidos corpóreos antes do tratamento (AT). A próxima coleta de urina e plasma foi realizada 300 dias depois (DQA1), após o final do tratamento adjuvante para TW. A partir desse ponto, realizamos coletas mais frequentes para monitoramento de recidiva nessa paciente.

As mutações do tumor primário, *INTS1* (c.2257G> A, p.Gly753Ser) e *TNRC18* (c.3499delG, p.Glu1167Argfs\*40), e a mutação *KRT80* (c.932C>T, p. Ser311Phe), identificada na metástase, não foram detectadas em nenhum dos componentes da urina e nem no plasma em nenhum momento do seguimento. Já a mutação do gene *TTI1* (c.1516G>A, p. Asp506Asn) foi detectada em dois momentos do seguimento em amostras de plasma, com frequências alélicas de 2,6% e 4,2%, respectivamente (Figura 9).

Curiosamente, a mutação *TTI1* (c.1516G>A, p. Asp506Asn) foi detectada no plasma nas primeiras coletas após finalização dos dois ciclos de quimioterapia adjuvante. O que esse achado representa do ponto de vista clínico ou biológico ainda não pode ser definido. Até o momento, essa paciente teve um desfecho clínico favorável e continua em acompanhamento clínico. Assim, se essa mutação tem alguma implicação clínica ainda é um aspecto que precisa ser investigado.



TW, tumor de Wilms; M, metástase pulmonar; Neo, quimioterapia neoadjuvante; Adj, quimioterapia adjuvante.

**Figura 9** - Avaliação seriada das mutações somáticas identificadas no tumor primário e metástase da paciente P01 nos fluidos corpóreos antes, durante e após o tratamento. Representação das mutações somáticas do TW e da metástase e sua detecção em fluidos corpóreos ao longo do tempo, alinhado com os momentos de diagnóstico, cirurgias, quimioterapia e radioterapia da paciente P01. Após o tratamento para TW, as mutações nos genes *INTS1* e *TNRC18* tornaram-se indetectáveis. A mutação no gene *KRT80* não foi detectada em nenhuma das amostras de fluidos corpóreos. Já a mutação no gene *TTI1* foi identificada em baixa frequência no sedimento da urina antes do início do tratamento para TW e também no plasma em 2 momentos que seguem as terapias adjuvantes para o TW e para a metástase pulmonar.

## 4.2 VALIDAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO MÉTODO NGS PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES EM BAIXA FREQUÊNCIA

Para verificar a sensibilidade do NGS para a detecção de mutação em cfDNA de fluidos corpóreos, como forma de avaliar se as mutações

detectadas no tumor e metástase realmente não estavam presentes nos fluidos corpóreos analisados durante o tratamento da paciente P01, avaliamos uma das mutações, *INTS1* (c.2257G> A, p.Gly753Ser), usando a metodologia de Digital Droplet PCR (ddPCR), considerada uma das mais sensíveis para esse tipo de aplicação.

Verificamos as 20 amostras de componentes da urina da paciente P01 através desse método de alta sensibilidade. Foi possível detectar o alelo mutante em ambos os componentes da urina das amostras coletadas antes do início do tratamento (AT), mas, surpreendentemente em uma frequência mais baixa do que a detectada pelo método NGS: 19% no celDNA do sedimento de urina e 14% no cfDNA de sobrenadante de urina (46% e 28% no sedimento e sobrenadante da urina por NGS, respectivamente). Por outro lado, a mutação *INTS1* (c.2257G> A, p.Gly753Ser) não foi detectada em nenhuma amostra seriada dos fluidos corpóreos coletados durante o tratamento usando o método de ddPCR, confirmando nossos resultados deo NGS e demonstrando grande concordância entre as metodologias (Tabela 5).

**Tabela 5** - Comparação de resultados entre os métodos NGS e ddPCR para detecção de ftDNA em amostras de componentes de urina.

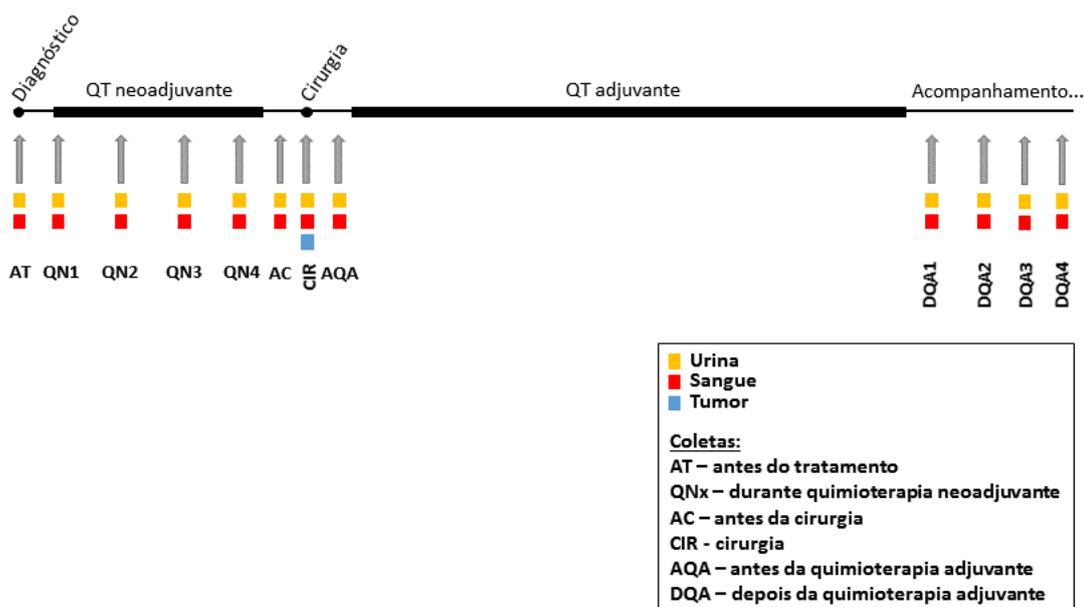
Mutação (gene)	Fluido	Método	AT	DQA1	DQA2	DQA3	DQA4	DQA5	DQA6	DQA7	DQA8	DQA9	DQA10	DQA11	DQA12	DQA13	DQA14	DQA15	DQA16	DQA17	
c.2257G>A ( <i>INTS1</i> )	Sed. urina	ddPCR	19%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
		NGS	46%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Sobr. urina	ddPCR	14%	0%	-	0%	-	0%	0%	0%	0%	-	-	-	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
		NGS	28%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

-, material não disponível para avaliação via ddPCR; AT, amostra coletada antes do tratamento; DQA1-DQA17; amostras coletadas após o tratamento adjuvante.

### **4.3 INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS NOS FLUIDOS CORPÓREOS PARA MONITORAMENTO DE RESPOSTA A QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE E DE PROGRESSÃO TUMORAL EM PACIENTES COM TW**

Para investigar a possibilidade de avaliar mutações somáticas como marca tumoral para monitorar a resposta à quimioterapia neoadjuvante e também para monitoramento de progressão tumoral foram incluídos neste estudo mais 5 pacientes (P02-P06) tratados no departamento de pediatria do A.C.Camargo Cancer Center. As características clínico-patológicas dos pacientes são mostradas na Tabela 1, página 36.

Diferentemente da paciente P01, esses pacientes realizaram coletas de amostras de fluidos corpóreos durante o tratamento neoadjuvante, com o objetivo de avaliar o comportamento das frequências alélicas das mutações somáticas tumorais nos fluidos corpóreos durante esse período do tratamento. Além disso, igualmente ao que foi avaliado com a paciente P01, os dados da frequência alélica foram correlacionados com o desfecho clínico das pacientes. A Figura 10 ilustra a estratégia de coleta de fluidos corpóreos utilizada para essas pacientes.



**Figura 10** - Pontos de coleta de amostras de fluidos corpóreos e tecido tumoral das pacientes com TW. Para os pacientes P02 a P06 também foram realizadas coletas de fluidos corpóreos durante a quimioterapia neoadjuvante.

Os DNAs de tumor e de leucócito das 5 pacientes com TW foram submetidos ao sequenciamento dos genes do painel, de modo a identificar mutações somáticas para serem utilizadas como marcadores tumorais em fluidos corpóreos.

Através do sequenciamento do painel de genes associados com TW pudemos detectar mutações em 3 pacientes (P03, P05 e P06) (Tabela 6), confirmando o valor de aproximadamente 60% (3/5) desse grupo de genes na sensibilidade em detectar mutação somática em TWs.

O tumor da paciente P03 tem uma mutação somática em *DROSHA* (c.3665A>G, p.Glu1222Gly), o da paciente P05 uma mutação no gene *CTNNB1* (c.1147T>G, p.Trp383Gly), e a paciente P06 apresentou 2 mutações somáticas nos genes do painel: uma *missense* em *CTNNB1* (c.1149G>T, p.Trp383Cys, afetando o mesmo códon da paciente P05), e

uma mutação *nonsense* em *WTX* (c.1057C>T, p.Arg353\*), gerando um códon de parada prematuro.

As pacientes que não tiveram uma mutação somática identificada nos genes do painel (P02 e P04) tiveram seu material encaminhado para WES. Além disso, o material da paciente P03 também seguiu para sequenciamento de exoma porque a mutação em *DROSHA* (c.3665A>G, p.Glu1222Gly) não foi detectada na amostra de fluido corpóreo coletada antes do tratamento (resultados estão apresentados em seguida). A cobertura média do sequenciamento de exoma foi de 114x.

Na paciente P03, foram identificadas 7 mutações adicionais além da anteriormente identificada no gene *DROSHA*: mutações *missense* nos genes *SUPT7L* (c.1217G>A, p.Arg406His), *KLHL30* (c.1253C>A, p.Ala418Asp), *EIF4G1* (c.2843C>T, p.Thr948Ile), *RAD50* (c.3835C>T, p.Arg1279Cys), *MTA2* (c.187G>T, p.Ala63Ser) e *PPP2R1A* (c.547C>T, p.Arg183Trp), e uma *INDEL* no gene *TMED9* (c.208\_212delInsTTG, p.Asp70Glnfs\*47)] (Tabela 6).

O tumor da paciente P04 apresentou 3 mutações somáticas: uma mutação *nonsense* no gene *SERBP1* (c.1117C>T, p.Arg373\*) e mutações *missense* nos genes *WTAP* (c.485G>A, p.Arg162Gln) e *PHF5A* (c.305G>A, p.Arg102His).

O DNA de tumor da paciente P02 não teve nenhuma mutação pontual somática detectada, mesmo depois de aumento de cobertura do sequenciamento e mudanças nos critérios de seleção (baixamos o critério de valor mínimo de frequência alélica de 10% para 5%). Assim, para essa paciente não foi possível avaliar marcas tumorais nos DNAs dos fluidos corpóreos.

**Tabela 6 - Mutações somáticas identificadas via Painel de Genes e/ou WES.**

<b>ID</b>	<b>Gene mutado</b>	<b>Tipo de mutação</b>	<b>Alteração no cDNA</b>	<b>Alteração protéica</b>	<b>Freq. alélica no tumor</b>	<b>Cob. no tumor</b>	<b>Freq. alélica no leuc.</b>	<b>Cob. no leuc.</b>	<b>Método</b>	<b>Deteção em fluidos corpóreos</b>
<b>P02</b>	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>P03</b>	<i>SUPT7L</i>	<i>Missense</i>	c.1217G>A	p.Arg406His	43.81%	146x	0%	109x	WES	Não
	<i>KLHL30</i>	<i>Missense</i>	c.1253C>A	p.Ala418Asp	47.56%	123x	0%	157x	WES	Não
	<i>EIF4G1</i>	<i>Missense</i>	c.2843C>T	p.Thr948Ile	39.39%	57x	0%	90x	WES	Sim
	<i>DROSHA</i>	<i>Missense</i>	c.3665A>G	p.Glu1222Gly	32.00%	109x	0%	121x	PG e WES	Não
	<i>RAD50</i>	<i>Missense</i>	c.3835C>T	p.Arg1279Cys	29.52%	178x	0%	179x	WES	Não
	<i>TMED9</i>	<i>Frameshift Del</i>	c.208_209del	p.Asp70Glnfs*47	50.00%	57x	0%	38x	WES	Não
	<i>MTA2</i>	<i>Missense</i>	c.187G>T	p.Ala63Ser	53.01%	118x	0%	135x	WES	Não
	<i>PPP2R1A</i>	<i>Missense</i>	c.547C>T	p.Arg183Trp	55.00%	66x	0%	70x	WES	Não
<b>P04</b>	<i>SERBP1</i>	<i>Nonsense</i>	c.1117C>T	p.Arg373*	97.26%	132x	0%	115x	WES	Não
	<i>WTAP</i>	<i>Missense</i>	c.485G>A	p.Arg162Gln	98.63%	128x	0%	138x	WES	Sim
	<i>PHF5A</i>	<i>Missense</i>	c.305G>A	p.Arg102His	97.22%	60x	0%	92x	WES	Sim
<b>P05</b>	<i>CTNNB1</i>	<i>Missense</i>	c.1147T>G	p.Trp383Gly	48.6%	820x	0%	73x	PG	Sim
<b>P06</b>	<i>CTNNB1</i>	<i>Missense</i>	c.1149G>T	p.Trp383Cys	47.3%	696x	0%	26x	PG	Sim
	<i>WTX</i>	<i>Nonsense</i>	c.1057C>T	p.Arg353*	45.8%	781x	0%	1803x	PG	Sim

ND, não detectado; PG, painel de Genes; WES, sequenciamento de exoma.

Essas mutações foram então usadas para rastreamento de ftDNA nas amostras de fluidos corpóreos, e os genes mutados nessas pacientes serão agregados a futuras versões do painel, aumentando ainda mais sua sensibilidade para detecção de mutações somáticas em TW.

Para detectar as mutações específicas dos tumores nos fluidos corpóreos como forma de monitorar resposta ao tratamento neoadjuvante e recidiva nas 4 pacientes, realizamos o sequenciamento de *amplicon* com alta profundidade. A cobertura média de sequenciamento conseguida para essa análise, considerando todas as amostras de DNA de fluidos corpóreos de todas os pacientes, foi de 1.007.008x.

Surpreendentemente, foi possível detectar ao menos uma marca do tumor em pelo menos um dos fluidos corpóreos coletados antes do tratamento (AT) de todas as pacientes, indicando a presença de ftDNA nos fluidos corpóreos em 100% da nossa casuística. Nas amostras subsequentes, coletadas durante o tratamento neoadjuvante, foi identificada uma significativa diminuição da frequência alélica das mutações detectadas nas amostras coletadas AT em todos os pacientes, sugerindo a resposta do tumor pela ação do quimioterápico. No entanto, em 2 pacientes (P03 e P04), marcas tumorais foram detectadas novamente durante o seguimento (Tabela 7 e Figura 11), conforme descrito a seguir.

A paciente (P04) apresentou, na coleta AT, duas mutações somáticas no sedimento da urina e no plasma [*WTAP* (c.485G>A, p.Arg162Gln) e *PHF5A* (c.305G>A, p.Arg102His)] que sofreram significativa diminuição na coleta seguinte (QN3), realizada durante a quimioterapia neoadjuvante:

*WTAP* (c.485G>A, p.Arg162Gln) passou de 2,2% na coleta AT para 0% no sedimento da urina e de 71,4% para 1,2% no plasma, e a mutação *PHF5A* (c.305G>A, p.Arg102His) passou de 5,8% para 2,2% no sedimento da urina e de 68,7% para 2% no plasma, porém foi identificada pela primeira vez no sobrenadante da urina em baixa frequência, 1%. Curiosamente, na coleta subsequente (QN4), realizada ainda durante a quimioterapia neoadjuvante, houve um aumento considerável nas frequências destas mutações: *WTAP* (c.485G>A, p.Arg162Gln) foi detectada pela primeira vez no sobrenadante da urina com frequência de 7,3% e no plasma passou de 1,2% para 50,2%. Já a mutação *PHF5A* (c.305G>A, p.Arg102His) manteve frequência relativamente baixa no sedimento da urina, de 2,2% para 1,8%, porém sofreu um grande aumento na frequência alélica detectada no sobrenadante da urina e no plasma: de 1% para 77,2% e de 2% para 38,3%, respectivamente. Na coleta de fluidos corpóreos realizada no momento da cirurgia para retirada do TW (CIR), a frequência alélica da mutação *WTAP* (c.485G>A, p.Arg162Gln) sofreu aumento no plasma, de 50,2% para 94,5%, e diminuição no sobrenadante da urina, de 7,3% para 3%. Nessa mesma coleta, a mutação *PHF5A* (c.305G>A, p.Arg102His) sofreu grande aumento no plasma, de 38,3% para 89,2%, e significativa diminuição no sobrenadante da urina, de 77,2% para 7,6%. Na coleta realizada cerca de 15 dias depois, antes da quimioterapia adjuvante (AQA), as mutações que se encontravam em alta frequência nos fluidos corpóreos tornaram-se indetectáveis. Ao fim do tratamento adjuvante (DQA1), na última coleta de fluidos corpóreos realizada antes do óbito, a paciente P04 apresentou novamente um aumento

da mutação *WTAP* (c.485G>A, p.Arg162Gln) no sobrenadante da urina (54,4%), e um ligeiro aumento no plasma: de indetectável para 3,8%. Já a mutação *PHF5A* (c.305G>A, p.Arg102His) passou de 6% para 61% no sobrenadante da urina, e de indetectável para 2,9% no plasma. Essa paciente apresentou metástase pulmonar e evoluiu a óbito por parada cardiorrespiratória após invasão pleural metastática. Surpreendentemente, 2 de suas 3 marcas tumorais foram detectadas em ao menos 1 fluido corpóreo em quase todas as coletas, com frequência alélica mais elevada do que o observado nas outras pacientes.

No caso da paciente P03, a mutação *DROSHA* (c.3665A>G, p.Glu1222Gly), inicialmente identificada através de sequenciamento de painel de genes, não foi detectada em nenhuma das amostras de fluidos corpóreos. Das outras 7 mutações do tumor dessa paciente detectadas por WES, somente a mutação *EIF4G1* (c.2843C>T, p.Thr948Ile) foi detectada na amostra AT e na maior parte das amostras subsequentes. Avaliamos mais 3 coletas de fluidos corpóreos dessa paciente (DQA2, DQA3 e DQA4), e curiosamente a mutação *EIF4G1* (c.2843C>T, p.Thr948Ile) continuou sendo detectada na urina (6.3%, 3.6% e 4.2% no sedimento da urina; 9.9%, 4.8% e 5.7% no sobrenadante da urina, respectivamente). Essa paciente apresentou inicialmente tumor bilateral, e passou por uma nefrectomia radical em um dos rins e nefrectomia parcial no rim contralateral, o que poderia explicar a persistência da mutação na urina caso haja restos tumorais não detectados na cirurgia. A paciente não apresentou metástases, continua em acompanhamento clínico e até o momento teve um desfecho

clínico satisfatório. O significado clínico e biológico da ausência das demais mutações nas amostras de fluidos corpóreos e a persistência de uma única mutação ainda precisa ser investigado.

Os pacientes restantes (P05 e P06) tiveram um bom desfecho clínico, mostrando boa correspondência com os dados do monitoramento das marcas tumorais no cfDNA e celDNA dos fluidos corpóreos, onde houve queda na frequência alélica das mutações após início do tratamento neoadjuvante sem subsequente detecção em alta frequência nas amostras das coletas seguintes.

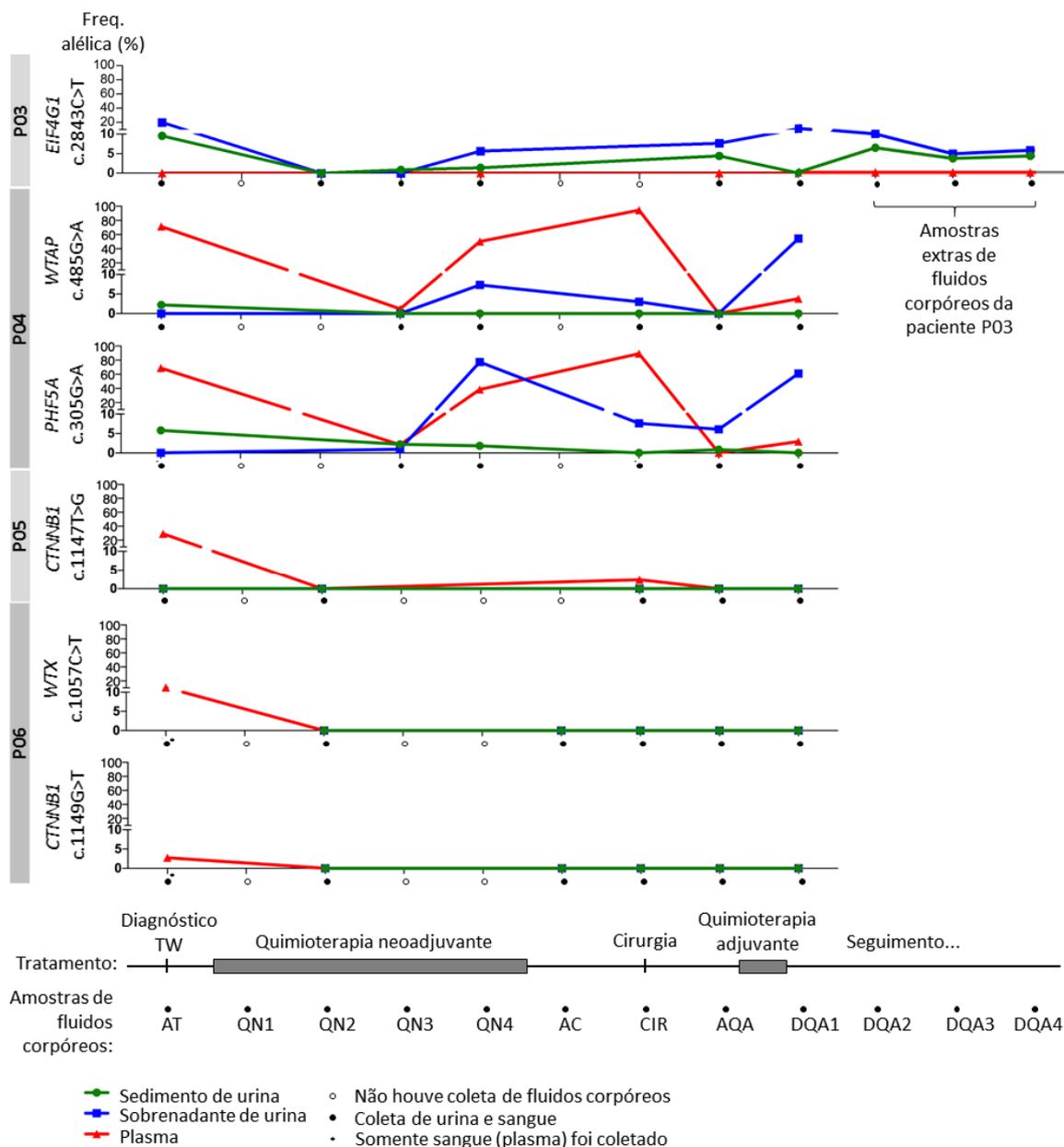
Na paciente P05 detectamos a mutação *CTNNB1* (c.1147T>G, p.Trp383Gly) na amostra de plasma coletada antes do início do tratamento (AT) numa frequência alélica de 29,2%, e novamente em uma única coleta depois do início do tratamento, feita momentos antes da cirurgia para ressecção do TW (CIR) em uma frequência de 2,3%. Nas duas amostras subsequentes essa mutação não foi detectada.

Para a paciente P06, detectamos ambas as mutações somáticas na amostra de plasma coletada antes do tratamento neoadjuvante (AT): 2,7% para a mutação *CTNNB1* (c.1149G>T, p.Trp383Cys) e 10,6% para a mutação *WTX* (c.1057G>T, p.Arg353\*). Não foi possível realizar a coleta de urina antes do tratamento para essa paciente, impossibilitando saber se essas mutações estariam presentes nos componentes da urina. Ambas as mutações não foram detectadas nas amostras de fluidos corpóreos subsequentes.

**Tabela 7 - Detecção de ftDNA em amostras seriadas de fluidos corpóreos.**

ID	Gene	Alteração cDNA	Alteração proteica	ftDNA em...	Coletas seriadas de amostras de fluidos corpóreos									
					AT	QN1	QN2	QN3	QN4	AC	CIR	AQA	DQA1	
P03	DROSHA	c.3665A>G	p.Glu1222Gly	Sed. urina	0%	*	0%	0%	0%	0%	*	*	0%	0%
				Sobr. urina	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
				Plasma	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
	SUPT7L	c.1217G>A	p.Arg406His	Sed. urina	0%	*	0%	0%	0%	0%	*	*	0%	0%
				Sobr. urina	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
				Plasma	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
	KLHL30	c.1253C>A	p.Ala418Asp	Sed. urina	0%	*	0%	0%	0%	0%	*	*	0%	0%
				Sobr. urina	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
				Plasma	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
	EIF4G1	c.2843C>T	p.Thr948Ile	Sed. urina	9.5%	*	0%	1%	1.39%	*	*	4.44%	0%	
				Sobr. urina	20.1%	*	0%	0%	5.67%	*	*	7.64%	11.40%	
				Plasma	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
	RAD50	c.3835C>T	p.Arg1279Cys	Sed. urina	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
				Sobr. urina	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
				Plasma	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
	TMED9	c.208_209del	p.Asp70Glnfs*47	Sed. urina	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
				Sobr. urina	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
				Plasma	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%	
MTA2	c.187G>T	p.Ala63Ser	Sed. urina	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%		
			Sobr. urina	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%		
			Plasma	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%		
PPP2R1A	c.547C>T	p.Arg183Trp	Sed. urina	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%		
			Sobr. urina	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%		
			Plasma	0%	*	0%	0%	0%	*	*	0%	0%		
P04	SERBP1	c.1117C>T	p.Arg373*	Sed. urina	0%	*	*	0%	0%	*	0%	0%	0%	
				Sobr. urina	0%	*	*	0%	0%	*	0%	0%	0%	
				Plasma	0%	*	*	0%	0%	*	0%	0%	0%	
	WTAP	c.485G>A	p.Arg162Gln	Sed. urina	2.2%	*	*	0%	0%	*	0%	0%	0%	
				Sobr. urina	0%	*	*	0%	7.3%	*	3%	0%	54.4%	
				Plasma	71.4%	*	*	1.2%	50.2%	*	94.5%	0%	3.8%	
PHF5A	c.305G>A	p.Arg102His	Sed. urina	5.8%	*	*	2.2%	1.8%	*	0%	1%	0%		
			Sobr. urina	0%	*	*	1.0%	77.2%	*	7.6%	6.0%	61.0%		
			Plasma	68.7%	*	*	2.0%	38.3%	*	89.2%	0%	2.9%		
P05	CTNNB1	c.1147T>G	p.Trp383Gly	Sed. urina	0%	*	0%	*	*	*	0%	0%	0%	
				Sobr. urina	0%	*	0%	*	*	*	0%	0%	0%	
				Plasma	29.2%	*	0%	*	*	*	2.3%	0%	0%	
P06	CTNNB1	c.1149G>T	p.Trp383Cys	Sed. urina	*	*	0%	*	*	0%	0%	0%	0%	
				Sobr. urina	*	*	0%	*	*	0%	0%	0%	0%	
				Plasma	2.7%	*	0%	*	*	0%	0%	0%	0%	
	WTX	c.1057C>T	p.Arg353*	Sed. urina	*	*	0%	*	*	0%	0%	0%	0%	
				Sobr. urina	*	*	0%	*	*	0%	0%	0%	0%	
				Plasma	10.6%	*	0%	*	*	0%	0%	0%	0%	

\*, material não coletado



**Figura 11** - Avaliação seriada de ftDNA em fluidos corpóreos antes, durante e após o tratamento. Na imagem estão representadas as 4 pacientes que realizaram coleta de fluidos corpóreos durante a quimioterapia neoadjuvante que tiveram uma mutação somática identificada no TW (P03, P04, P05 e P06). As frequência da detecção das mutações somáticas identificadas em fluidos corpóreos estão alinhadas com o desenvolvimento do tratamento. Pode-se observar que inicialmente todas as pacientes apresentaram uma queda na frequência da mutação somática em fluidos corpóreos durante a quimioterapia neoadjuvante. Para as duas pacientes que tiveram um bom desfecho clínico (P05 e P06), as mutações tornaram-se indetectáveis após fim do tratamento. A paciente P03, que sofreu nefrectomia radical como tratamento para o primeiro tumor e nefrectomia parcial para o segundo tumor, apresentou uma mutação somática em ambos os componentes da urina mesmo após a cirurgia. A paciente P04, que evoluiu a óbito, apresentou duas mutações somáticas em alta frequência mesmo após a cirurgia e após o tratamento adjuvante, mostrando uma persistência das mutações principalmente no plasma e no sobrenadante da urina.

## 5 DISCUSSÃO

O repertório mutacional de TW ainda não foi completamente definido na literatura, e cerca de 50% dos casos ainda não são associados a genes já descritos como mutados nesta neoplasia (TORREZAN et al. 2014). No presente estudo, colaboramos com uma melhor definição do repertório de genes mutados em TW com a identificação de 2 novos genes, *INTS1* e *TNRC18*, e definimos sua ocorrência mutacional em nossa coorte de 37 amostras de TW. Na literatura, esses genes constam como mutados em TW em dois estudos que realizaram WES de um grande número de amostras. WEGERT et al. (2015) realizaram o sequenciamento de exoma de 58 amostras de TW e encontraram uma mutação somática missense em *INTS1* (c.3703G>A, p.Ala1235Thr) e uma deleção em *TNRC18* (c.1793\_1800del, p.598\_600del) em duas diferentes amostras. Já GADD et al. (2017), após o sequenciamento de exoma de 107 amostras de TW, detectaram 2 mutações somáticas no gene *TNRC18* em 2 diferentes amostras: uma mutação do tipo nonsense (c.3273C>A, p.Tyr1091\*) e uma deleção *frameshift* (c.3318delC, p.Asp1106Glyfs\*53). Esses resultados mostram uma incidência de mutação em TW de 1,7% para *INTS1* e 1,7% para *TNRC18* no trabalho de WEGERT et al. (2015), e 1,9% para *TNRC18* no trabalho de GADD et al (2017), valores menores do que os encontrados no presente estudo (5,4% para *INTS1* e 8% para *TNRC18*). Essa

diferença pode ser justificada pela impossibilidade de determinar a natureza somática ou germinativa das mutações em algumas das amostras na nossa coorte, das quais só há o DNA de tecido tumoral disponível.

Os genes *INTS1* e *TNRC18* também parecem fazer parte do processo tumorigênico de outros tumores embrionários. O estudo de LASORSA et al. (2016) teve 17 amostras de neuroblastoma submetidas à WES, detectando uma mutação somática missense em *INTS1* (c.5885T>G, p.Phe1962Cys) em uma amostra (5.8%). Em outro estudo, PUGH et al. (2013) submeteram 221 amostras de neuroblastoma à WES e identificaram 4 amostras com mutação somática em *INTS1* (1,8%) e 1 amostra com mutação em *TNRC18* (0,5%). MOLENAAR et al. (2012) sequenciaram 87 amostras de neuroblastoma e identificaram 1 amostra (1,1%) com mutação em *INTS1* (c.701C>T p.Ser234Leu). Além disso, mutações em *TNRC18* também já foram identificadas em 1,6% das 125 amostras de meduloblastoma analisadas por JONES et al. (2012).

Além dos tumores embrionários, *INTS1* e *TNRC18* também encontram-se mutados em tumores de adultos, igualmente em baixa frequência. Estudos que realizaram análise completa de exoma ou de genoma revelaram que *TNRC18* está mutado em 2,7% dos adenocarcinomas de pulmão (IMIELINSKI et al. 2012), 3,3% dos adenocarcinomas esofágicos (DULAK et al. 2013) e 3% dos carcinomas de células escamosas cutâneas (SOUTH et al. 2014). Já *INTS1* encontra-se mutado em 0,9% dos carcinomas de ovário (BELL et al. 2011), 2,7%

dos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (STRANSKY et al. 2011), 3,3% dos casos de câncer de próstata (GRASSO et al. 2012) e 2,3% dos carcinomas renais de células claras (SATO et al. 2013).

*TNRC18 (trinucleotide repeat containing 18)* está localizado na região cromossômica 7p22.1 e codifica uma proteína de 2968 aminoácidos, membro da família de proteínas *trinucleotide repeat containing*. Esse gene é pouco caracterizado e há poucos relatos na literatura sobre sua função, no entanto, parece estar associado com o processo biológico de silenciamento de cromatina. Já o *INTS1 (integrator complex subunit 1)* está localizado na região cromossômica 7p22.3 e codifica uma proteína de 2190 aminoácidos. Essa proteína é uma subunidade do Complexo Integrador, o qual se associa ao domínio C-terminal da subunidade grande da enzima RNA Polimerase II (POLR2A) e media o processamento da região 3' dos pequenos RNAs nucleares U1 e U2 (BAILLAT et al. 2005). Essas moléculas, U1 e U2, são membros do complexo spliceossomo, responsável pelo processamento das moléculas de RNA mensageiro.

A estratégia de avaliar o exoma de amostras negativas para mutação somática nos genes do painel parece bastante promissora para identificar outros genes potencialmente importantes para a manifestação do TW. Através dessa metodologia, visamos aumentar ainda mais a sensibilidade do painel de genes para detecção de mutação somática em TW, diminuindo conseqüentemente o custo por paciente para detecção da marca tumoral. Os demais genes identificados nesse trabalho, tais como

*SUPT7L*, *KLHL30*, *EIF4G1*, *RAD50*, *TMED9*, *MTA2*, *PPP2R1A*, *SERBP1*, *WTAP* e *PHF5A*, necessitam ser avaliados em uma coorte de amostras para definir a incidência de mutação em TW. O aumento na taxa de detecção de mutação somática do nosso painel de genes pode auxiliar no estabelecimento de plataformas de diagnóstico por biópsia líquida além de contribuir com a descoberta de novas vias relacionadas à tumorigênese do TW, que poderão ser testadas como novos alvos terapêuticos.

O trabalho de TORREZAN et al. (2014) foi importante nesse sentido, sendo o primeiro estudo a identificar a via de processamento de microRNAs como alterada nos TWs ao identificar uma mutação recorrente no gene *DROSHA* em 10% das amostras tumorais. O gene *DROSHA* codifica uma proteína chave para o processamento de microRNAs maduros. Avaliando também outros genes dessa via concluímos que eles se encontram mutados em cerca de 33% dos TW, demonstrando que defeitos na via de biogênese de microRNAs podem contribuir para o desenvolvimento do TW. Esses resultados foram posteriormente confirmados por outros estudos (RAKHEJA et al. 2014; WALZ et al. 2015; WEGERT et al. 2015).

Quanto ao uso de biópsia líquida em pacientes oncológicos, estudos já demonstraram que maiores taxas de ftDNA nos fluidos corpóreos em indivíduos com tumores geniturinários estão relacionados com progressão da doença. No estudo de BIRKENKAMP-DEMTRÖDER et al. (2016), pacientes com câncer de bexiga com doença progressiva apresentaram níveis significativamente maiores de ftDNA no plasma e na

urina antes da progressão da doença, em comparação aos pacientes com doença estável. Além disso, o ftDNA deixou de ser detectável em pacientes que se tornaram livre de doença. Em outro estudo, EISENBERGER et al. (1999) avaliou a urina e o plasma de pacientes com massa renal não invasiva, tanto casos de tumores malignos quanto casos de tumores de baixo potencial de malignidade, além de casos sem malignidades geniturinárias como controle. Dos pacientes com tumor maligno, 76% apresentaram mutações relativas ao tumor no DNA de urina, e 60% apresentaram alterações no plasma. Dos pacientes com tumor de baixa malignidade, 60% apresentaram alterações na urina. Nenhum dos controles apresentou essas alterações tanto na urina quanto no plasma.

Alguns estudos tiveram como objetivo caracterizar o DNA presente em fluidos corpóreos, elucidando as diferenças entre os DNAs provenientes de diferentes fontes, como plasma e urina. As amostras de urina são compostas pelo sedimento, composto de células esfoliantes do trato geniturinário e seu DNA praticamente intacto (celDNA) (BOTEZATU et al. 2000; SU et al. 2004), e sobrenadante, contendo DNA altamente degradado da circulação após filtração glomerular (cfDNA) (SU et al. 2004). O plasma geralmente apresenta DNA proveniente do processo de apoptose e/ou necrose das células tumorais e, portanto, é tipicamente fragmentado (cfDNA) (JAHR et al. 2001; MOULIERE et al. 2011).

O uso de plasma como biópsia líquida vem sendo largamente explorado na literatura. Porém, no caso do uso de urina, seus diferentes

componentes ainda apresentam controvérsias. BRYZGUNOVA e LAKTIONOV (2015) afirmam que a maior parte do ftDNA na urina de pacientes com câncer do trato urogenital não vem do sangue e é, aparentemente, o resultado do transporte direto de células tumorais ou seus produtos de degradação na urina, sendo o sedimento das amostras de urina o melhor componente para detecção de ftDNA nestes tipos de câncer. No presente estudo, o sobrenadante da urina foi mais representativo quanto à detecção de ftDNA, principalmente nos pacientes P03 (caso em que houve nefrectomia parcial) e P04 (paciente que evoluiu a óbito). Similar aos nossos resultados, TOGNERI et al. (2016) afirmam que em casos de câncer de bexiga urotelial, o cfDNA do sobrenadante de urina permite uma melhor análise do perfil do tumor, possuindo maior carga de ftDNA do que o celDNA extraído do sedimento da urina, e mostra uma maior sensibilidade analítica para a detecção de biomarcadores genômicos importantes presentes no genoma tumoral.

No presente estudo, foi possível identificar ftDNA em pelo menos um fluido corpóreo de todos os pacientes com TW cujo tumor apresentou uma mutação pontual passível de ser rastreada. Mesmo considerando que nossa casuística é extremamente pequena, por conta do TW ser um tumor relativamente raro, os dados desse estudo apontam para perspectivas bastante promissoras do ponto de vista clínico e biológico.

No Brasil, que segue o protocolo de tratamento para TW estabelecido pela SIOP, a biópsia tecidual do TW não é indicada por estar relacionada a um risco maior de recidiva local e aumento do estadiamento

do tumor (SHAMBERGER et al. 1999). O regime terapêutico neoadjuvante é escolhido de acordo com exames de imagem e sintomatologia do paciente (DAVIDOFF 2012), porém o diagnóstico preciso do TW é feito quando uma amostra de tecido tumoral passa por análise histológica após cirurgia (ZOELLER et al. 1994). Nesse sentido, a utilização da biópsia líquida tanto para monitorar resposta à quimioterapia neoadjuvante como para monitoramento de recidiva pode ser de enorme valia.

A princípio e de acordo com os nossos resultados iniciais (paciente P01), a urina parecia ser o fluido corpóreo mais representativo para análise de biópsia líquida em pacientes com TW, principalmente antes do início do tratamento. No entanto, ao avaliarmos mais pacientes (P03 - P06), concluímos que a nem a urina e nem o plasma são totalmente informativos da presença de doença residual ou de resposta ao tratamento, sugerindo ser necessário avaliar os dois fluidos corpóreos para a obtenção de informações de serventia clínica para os pacientes com TW. Por outro lado, nem todas as mutações pontuais identificadas no tumor foram detectadas nos fluidos corpóreos. Quais variáveis morfológicas, anatômicas ou clínicas podem estar interferindo nesses dados necessitam de um estudo com casuística maior.

Do ponto de vista de utilização de biópsia líquida para detecção de ftDNA em fluidos corpóreos nossos resultados apresentaram grande correspondência com o desfecho clínico. A avaliação de amostras seriadas mostrou que para a paciente P04, que teve pior prognóstico e

evoluiu a óbito, duas marcas tumorais [*WTAP* (c.485G>A p.Arg162Gln) e *PHF5A* (c.305G>A p.Arg102His)] mostraram-se persistentes e em alta frequência alélica durante o tratamento, mesmo após uma queda inicial durante o tratamento neoadjuvante. Quanto à paciente P03, o único caso de TW bilateral da nossa casuística e que passou por nefrectomia parcial, uma marca tumoral [*EIF4G1* (c.2843C>T p.Thr948Ile)] continua presente nas amostras de urina mesmo após o fim do tratamento adjuvante, em frequência alélica constante, podendo indicar a presença de doença residual estável. As outras 3 pacientes (P01, P05 e P06) apresentaram bom desfecho clínico e suas marcas tumorais tornaram-se indetectáveis nos fluidos corpóreos após início do tratamento.

A paciente P01 apresentou a mutação *TTI1* (c.1516G>A p.Asp506Asn) exclusivamente no DNA do tecido metastático. Curiosamente, essa mutação foi detectada no sedimento da urina da primeira coleta, realizada antes do tratamento para TW, 9 meses antes do diagnóstico da metástase pulmonar. Como comentado anteriormente, esses resultados indicam uma heterogeneidade tumoral do TW e confirmam que a biópsia líquida pode ser mais representativa do tumor como um todo, o que já vem sendo demonstrado em outros estudos (DE MATTOS-ARRUDA et al. 2014; FORSHEW et al. 2012; MURTAZA et al. 2015; PERKINS et al. 2012). Além disso, a detecção da mutação *TTI1* (c.1516G>A p.Asp506Asn) no plasma em frequência alélica significativa (2,6% e 4,2%) logo após o término das sessões de quimioterapia adjuvante tanto para o TW quanto para a metástase pode estar

relacionado à um possível mecanismo de resistência. *TT11* é um regulador da resposta ao dano no DNA, sendo parte do complexo TTT, envolvido na resistência celular a estresses como radiação ionizante, ultravioleta e mitomicina C. A mitomicina C é um antibiótico antineoplásico que se liga ao DNA, causando interrupção dos processos de duplicação e transcrição (VERWEIJ e PINEDO 1990). Esse mecanismo de ação é similar ao da actinomicina D, quimioterápico utilizado pela paciente em ambos os tratamentos adjuvantes (SOBELL 1985), e da doxorubicina utilizada para o tratamento adjuvante da metástase pulmonar (CUMMINGS et al. 1991).

Nossos resultados abrem uma real possibilidade de uso de biópsia líquida para monitoramento da doença em tempo real. Para isso, no futuro, pretendemos testar o sequenciamento dos genes do painel diretamente no cfDNA de fluidos corpóreos coletados durante a quimioterapia neoadjuvante, antes da cirurgia para retirada do tumor e continuaremos trabalhando no aumento da sensibilidade do painel de genes para detecção de mutação somática em TW. Também será necessária uma adaptação desse painel de genes para uso em cfDNA através de primers que geram *amplicons* menores, ideais para DNA em estado degradado. Essa modificação pode impactar nos dados de detecção de mutação somática nos fluidos corpóreos, melhorando a detecção principalmente no sobrenadante da urina, que parece ter cfDNA ainda mais fragmentado que o cfDNA do plasma por conta do processo de filtração glomerular e da atividade relativamente mais alta de nucleases (NADANO et al. 1993; WAN et al. 2017). Acreditamos que

assim poderemos detectar ftDNA em amostras seriadas de fluidos corpóreos para monitoramento da quimioterapia neoadjuvante antes do acesso às informações genômicas obtidas através do sequenciamento do DNA de tecido tumoral.

Reconhecemos que esse estudo apresenta algumas limitações, como o número baixo de amostras devido à baixa incidência desse tumor na população. Também há uma certa limitação na detecção de mutações em baixa frequência (menor do que nosso limite de detecção de 1%). Além disso, o momento da coleta de urina também pode interferir na detecção de DNA tumoral nesse fluido corpóreo. Esses e outros fatores podem estar influenciando nos resultados desse estudo e precisam ser mais detalhadamente investigados.

## 6 CONCLUSÃO

Nesse estudo identificamos dois novos genes, *INTS1* e *TNRC18*, mutados em 5,4% e 8% dos TW, respectivamente. Com a inclusão desses genes no nosso painel, aumentamos sua sensibilidade para detecção de mutações somáticas em TW de 50% para 61,5%.

Com esse estudo, conseguimos estabelecer uma plataforma de detecção de ftDNA em urina e plasma de pacientes com TW. Através da avaliação de urina e plasma, foi possível detectar ao menos uma mutação somática em ao menos um dos fluidos corpóreos em 100% dos pacientes avaliados, demonstrando a necessidade da avaliação conjunta de urina e plasma.

Nossos resultados mostram ainda que há concordância entre a dinâmica dos níveis de ftDNA em amostras seriadas de fluidos corpóreos com o desfecho clínico. Níveis de ftDNA persistentes ao longo de todo o tratamento sendo detectados em fluidos corpóreos parecem ser indicadores de pior prognóstico. Por outro lado, pacientes que apresentaram desfecho clínico favorável tiveram ftDNA indetectável nas amostras seriadas de fluidos corpóreos após o início do tratamento.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R.  $\beta$ -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. **EMBO J** 1997; 16:3797-804.

Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2013; 14:475-88.

Astuti D, Morris MR, Cooper WN, et al. Germline mutations in DIS3L2 cause the Perlman syndrome of overgrowth and Wilms tumor susceptibility. **Nat. Genet.** 2012; 44:277-84.

Atanda A, Anyanwu L-J, Atanda O, Mohammad A, Abdullahi L, Farinyaro A. Wilms' tumour: Determinants of prognosis in an African setting. **African J Paediatr Surg** 2015a; 12:171.

Atanda A, Atanda J, Anyanwa L-J, Atanda JO. Wilms' tumour in African children: Can an institutional approach improve outcome? **African J Paediatr Surg** 2015b; 12:7.

Baillat D, Hakimi MA, Näär AM, Shilatifard A, Cooch N, Shiekhattar R. Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. **Cell** 2005; 123:265-76.

Bardeesy N, Falkoff D, Petruzzi MJ, et al. Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. **Nat Genet** 1994; 7:91-7.

Beckwith JB. Histopathological aspects of renal tumors in children. **Prog Clin Biol Res** 1982; 100:1-14.

Beckwith JB. Wilms Tumor and Other Renal Tumors of Childhood: An Update. **J Urol** 1986; 136:320-4.

Bell D, Berchuck A, Birrer M, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. **Nature** 2011; 474:609-15.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. **Sci Transl Med** 2014; 6:224ra24.

Birch JM, Breslow N. Epidemiologic features of Wilms tumor. **Hematol Oncol Clin North Am** 1995; 9:1157-78.

Birkenkamp-Demtröder K, Nordentoft I, Christensen E, et al. Genomic Alterations in Liquid Biopsies from Patients with Bladder Cancer. **Eur Urol** 2016; 70:75-82.

Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: A new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. **Clin Chem** 2000; 46:1078-84.

Braig F, Voigtlaender M, Schieferdecker A, et al. Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget** 2016; 7:42988-95.

Breslow N, Olshan A, Beckwith JB, Green DM. Epidemiology of Wilms tumor. **Med Pediatr Oncol** 1993; 21:172-81.

Bryzgunova OE, Laktionov PP. Extracellular nucleic acids in urine: sources, structure, diagnostic potential. **Acta Naturae** 2015 ;7:48-54.

Carpinetti P, Donnard E, Bettoni F, et al. The use of personalized biomarkers and liquid biopsies to monitor treatment response and disease recurrence in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation. **Oncotarget** 2015; 6:38360-71.

Chagtai T, Zill C, Dainese L, et al. Gain of 1q As a Prognostic Biomarker in Wilms Tumors (WTs) Treated With Preoperative Chemotherapy in the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) WT 2001 Trial: A SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study. **J Clin Oncol** 2016; 34:3195-203.

Chedgy ECP, Annala M, Beja K, et al. Moving Toward Personalized Care: Liquid Biopsy Predicts Response to Cisplatin in an Unusual Case of BRCA2-Null Neuroendocrine Prostate Cancer. **Clin Genitourin Cancer** 2016; 14:e233-e6.

Cummings J, Anderson L, Willmott N, Smyth JF. The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. **Eur J Cancer** 1991; 27:532-5.

Davidoff AM. Wilms Tumor. **Adv Pediatr** 2012; 59:247-67.

Dawson S-J, Tsui DWYY, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. **N Engl J Med** 2013; 368:1199-209.

De Camargo B, Franco EL. A randomized clinical trial of single-dose versus fractionated-dose dactinomycin in the treatment of Wilms' tumor. Results after extended follow-up. Brazilian Wilms' Tumor Study Group. **Cancer** 1994; 73:3081-6.

De Camargo B, Melaragno R, Saba e Silva N, et al. Phase II study of carboplatin as a single drug for relapsed Wilms' tumor: experience of the Brazilian Wilms' Tumor Study Group. **Med Pediatr Oncol** 1994; 22:258-60.

De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. **Ann Oncol** 2014; 25:1729-35.

Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. **Nat Med** 2008; 14:985-90.

Dome JS, Fernandez C V, Mullen EA, et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: renal tumors. **Pediatr Blood Cancer** 2013; 60:994-1000.

Dulak AM, Stojanov P, Peng S, et al. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. **Nat Genet** 2013; 45:478-86.

Eisenberger CF, Schoenberg M, Enger C, et al. Diagnosis of renal cancer by molecular urinalysis. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:2028-32.

Faria P, Beckwith JB, Mishra K, et al. Focal versus diffuse anaplasia in Wilms tumor--new definitions with prognostic significance: a report from the National Wilms Tumor Study Group. **Am J Surg Pathol** 1996; 20:909-20.

Ferreira EN, Barros BDF, De Souza JE, et al. A genomic case study of desmoplastic small round cell tumor: comprehensive analysis reveals insights into potential therapeutic targets and development of a monitoring tool for a rare and aggressive disease. **Hum Genomics** 2016; 10:36.

Forsheo T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive Identification and Monitoring of Cancer Mutations by Targeted Deep Sequencing of Plasma DNA. **Sci Transl Med** 2012; 4:136ra68-136ra68.

Foulkes WD, Bahubeshi A, Hamel N, et al. Extending the phenotypes

associated with DICER1 mutations. **Hum Mutat** 2011; 32:1381-4.

Gadd S, Huff V, Walz AL, et al. A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. **Nat Genet** 2017; 49:1487-94.

Ghahhari NM, Babashah S. Interplay between microRNAs and WNT/ $\beta$ -catenin signalling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in cancer. **Eur J Cancer** 2015; 51:1638-49.

Gleason JM, Lorenzo AJ, Bowlin PR, Koyle MA. Innovations in the management of Wilms' tumor. **Ther Adv Urol** 2014; 6:165-76.

Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. **Nature** 2012; 487:239-43.

Gratias EJ, Dome JS, Jennings LJ, et al. Association of Chromosome 1q Gain With Inferior Survival in Favorable-Histology Wilms Tumor: A Report From the Children's Oncology Group. **J Clin Oncol** 2016; 34:3189-94.

Grundy PE, Telzerow PE, Breslow N, Moksness J, Huff V, Paterson MC. Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome. **Cancer Res** 1994; 54:2331-3.

Guo N, Lou F, Ma Y, et al. Circulating tumor DNA detection in lung cancer patients before and after surgery. **Sci.Rep** 2016; 6:33519.

Hohenstein P, Pritchard-Jones K, Charlton J. The yin and yang of kidney development and Wilms' tumors. **Genes Dev** 2015; 29:467-82.

Huff V, Jaffe N, Saunders GF, Strong LC, Villalba F, Ruteshouser EC. WT1 exon 1 deletion/insertion mutations in Wilms tumor patients, associated with

di- and trinucleotide repeats and deletion hotspot consensus sequences. **Am J Hum Genet** 1995; 56:84-90.

Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, et al. Mapping the Hallmarks of Lung Adenocarcinoma with Massively Parallel Sequencing. **Cell** 2012; 150:1107-20.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. **Cancer Res** 2001; 61:1659-65.

Jones DTW, Jäger N, Kool M, et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. **Nature** 2012; 488:100-5.

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2005; 6:376-85.

Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, et al. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. **Cancer Res** 1999; 59:3880-2.

Krepischi AC V, Maschietto M, Ferreira EN, et al. Genomic imbalances pinpoint potential oncogenes and tumor suppressors in Wilms tumors. **Mol Cytogenet** 2016; 9:20.

Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nat Rev Genet** 2010; 11:597-610.

Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. **Nat Genet** 2007; 39:673-7.

Lasorsa VA, Formicola D, Pignataro P, et al. Exome and deep sequencing of clinically aggressive neuroblastoma reveal somatic mutations that affect key pathways involved in cancer progression. **Oncotarget** 2015; 7:21840-52.

Li C-M, Guo M, Borczuk A, et al. Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. **Am J Pathol** 2002; 160:2181-90.

Liu X-R, Tian W-H, Dong X-Y, Wu X-Z, Lv J-X, Wu X-B. [Effects of Lin28a and Lin28b on let-7 family activity] [abstract]. **Chinese J Virol** 2011; 27:533-41.

Maschietto M, De Camargo B, Brentani H, et al. Molecular profiling of isolated histological components of wilms tumor implicates a common role for the wnt signaling pathway in kidney and tumor development. **Oncology** 2008; 75:81-91.

Maschietto M, Piccoli FS, Costa CML, et al. Gene expression analysis of blastemal component reveals genes associated with relapse mechanism in Wilms tumour. **Eur J Cancer** 2011a; 47:2715-22.

Maschietto M, Trapé AP, Piccoli FS, et al. Temporal blastemal cell gene expression analysis in the kidney reveals new Wnt and related signaling pathway genes to be essential for Wilms' tumor onset. **Cell Death Dis** 2011b; 2:e224.

Messahel B, Williams R, Ridolfi A, et al. Allele loss at 16q defines poorer prognosis Wilms tumour irrespective of treatment approach in the UKW1-3 clinical trials: a Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG) Study. **Eur J Cancer** 2009; 45:819-26.

Millholland JM, Li S, Fernandez CA, Shuber AP. Detection of low frequency

FGFR3 mutations in the urine of bladder cancer patients using next-generation deep sequencing. **Res Rep Urol** 2012; 4:33-40.

Molenaar JJ, Koster J, Zwiijnenburg DA, et al. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. **Nature** 2012; 483:589-593.

Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. **PLoS One** 2011; 6:e23418.

Murtaza M, Dawson S-J, Pogrebniak K, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. **Nat Commun** 2015; 6:8760.

Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. **Nature** 2013; 497:108-12.

Nadano D, Yasuda T, Kishi K. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. **Clin Chem** 1993; 39:448-52.

Njuguna F, Martijn HA, Kuremu RT, et al. Wilms Tumor Treatment Outcomes: Perspectives From a Low-Income Setting. **J Glob Oncol** 2017; 3:555-562.

Ohlsson R, Nyström A, Pfeifer-Ohlsson S, et al. IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith-Wiedemann syndrome. **Nat Genet** 1993; 4:94-97.

Pastore G, Znaor A, Spreafico F, Graf N, Pritchard-Jones K, Steliarova-Foucher E. Malignant renal tumours incidence and survival in European

children (1978-1997): Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. **Eur J Cancer** 2006; 42:2103-14.

Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, et al. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. **Cell** 1991; 67:437-47.

Perkins G, Yap TA, Pope L, et al. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. **PLoS One** 2012; 7:e47020.

Piskounova E, Polytarchou C, Thornton JE, et al. Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. **Cell** 2011; 147:1066-79.

Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. **Curr Opin Genet.Dev** 2007; 17:45-51.

Pritchard-Jones K. Controversies and advances in the management of Wilms' tumour. **Arch Dis Child** 2002; 87:241-4.

Provenzi VO, Rosa RFM, Rosa RCM, et al. Wilms tumor: Experience of a hospital in southern Brazil. **Pediatr Int** 2014; 56:534-40.

Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. **Nat Genet** 2013; 45:279-84.

Rabeh W, Akel S, Eid T, et al. Wilms tumor: Successes and challenges in management outside of cooperative clinical trials. **Hematol Oncol Stem Cell Ther.**2016; 9:20-5.

Raffensperger J. Max Wilms and his tumor. **J Pediatr Surg** 2015; 50:356-9.

Rakheja D, Chen KS, Liu Y, et al. Somatic mutations in DROSHA and

DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. **Nat Commun** 2014; 2:4802.

Reinhard H, Schmidt A, Furtwängler R, et al. Outcome of relapses of nephroblastoma in patients registered in the SIOP/GPOH trials and studies. **Oncol Rep** 2008; 20:463-7.

Riediger AL, Dietz S, Schirmer U, et al. Mutation analysis of circulating plasma DNA to determine response to EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy of lung adenocarcinoma patients. **Sci Rep** 2016; 6:33505.

Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. **Science** 2007; 315:642-5.

Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: Mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. **Genes Chromosom Cancer** 2008; 47:461-70.

Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. **Nat. Rev Cancer** 2010; 10:389-402.

Sarin YK, Bhatnagar SN. Wilms' Tumor- Roadmaps of Management. **Indian J Pediatr** 2012; 79:776-86.

Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. **Nat.Genet** 2013; 45:860-7.

Schmidt-Ott KM, Barasch J. WNT/ $\beta$ -catenin signaling in nephron progenitors and their epithelial progeny. **Kidney Int.**2008; 74:1004-8.

Schumacher V, Schneider S, Figge A, et al. Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of

stromal-predominant histology. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:3972-7.

Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:426-37.

Shamberger RC, Guthrie KA, Ritchey ML, et al. Surgery-related factors and local recurrence of Wilms tumor in National Wilms Tumor Study 4. **Ann Surg** 1999; 229:292-7.

Sharpe CR, Franco EL. Use of dipyron during pregnancy and risk of Wilms' tumor. Brazilian Wilms' Tumor Study Group. **Epidemiology** 1996; 7:533-5.

Sharpe CR, Franco EL, De Camargo B, et al. Parental exposures to pesticides and risk of Wilms' tumor in Brazil. **Am J Epidemiol** 1995; 141:210-7.

Sharpe CR, Franco EL, De Camargo B, et al. The influence of parental age on the risk of Wilms' tumour. **Paediatr Perinat Epidemiol** 1999; 13:138-43.

Shi S, Yu L, Chiu C, et al. Podocyte-Selective Deletion of Dicer Induces Proteinuria and Glomerulosclerosis. **J Am Soc Nephrol** 2008; 19:2159-69.

Sobell HM. Actinomycin and DNA transcription. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1985; 82:5328-31.

South AP, Purdie KJ, Watt SA, et al. NOTCH1 mutations occur early during cutaneous squamous cell carcinogenesis. **J Invest Dermatol** 2014; 134:2630-8.

Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al. The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Science** 2011; 333:1157-60.

Stuart RO, Bush KT, Nigam SK. Changes in global gene expression patterns during development and maturation of the rat kidney. **Proc Natl Acad Sci U SA** 2001; 98:5649-54.

Su Y-H, Wang M, Block TM, et al. Transrenal DNA as a diagnostic tool: important technical notes. **Ann N Y Acad Sci** 2004a; 1022:81-9.

Su Y-H, Wang M, Brenner DE, et al. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. **J Mol Diagn** 2004b; 6:101-7.

Togneri FS, Ward DG, Foster JM, et al. Genomic complexity of urothelial bladder cancer revealed in urinary cfDNA. **Eur J Hum Genet** 2016; 24:1167-74.

Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM, et al. Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. **Nat Commun** 2014; 5:4039.

Van den Heuvel-Eibrink MM, Hol JA, Pritchard-Jones K, et al. Position paper: Rationale for the treatment of Wilms tumour in the UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 protocol. **Nat Rev Urol** 2017; 14:743-52.

Varanasi R, Bardeesy N, Ghahremani M, et al. Fine structure analysis of the WT1 gene in sporadic Wilms tumors. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91:3554-8.

Verma N, Kumar A. Clinicoepidemiological Profile and Outcome of Children With Wilms Tumor in a Developing Country. **J Pediatr Hematol Oncol** 2016; 38:e213-e6.

Verweij J, Pinedo HM. Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and

limitations. **Anticancer Drugs** 1990; 1:5-13.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. **Science** 2013; 339:1546-58.

Vujanic GM, Sandstedt B. The pathology of Wilms' tumour (nephroblastoma): the International Society of Paediatric Oncology approach. **J Clin Pathol** 2010; 63:102-9.

Vujančić GM, Sandstedt B, Harms D, et al. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. **Med Pediatr Oncol** 2002; 38:79-82.

Walz AL, Ooms A, Gadd S, et al. Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX homeodomain mutations in favorable histology Wilms tumors. **Cancer Cell** 2015; 27:286-97.

Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. **Nat Rev Cancer** 2017; 17:223-38.

Wegert J, Ishaque N, Vardapour R, et al. Mutations in the SIX1/2 Pathway and the DROSHA/DGCR8 miRNA Microprocessor Complex Underlie High-Risk Blastemal Type Wilms Tumors. **Cancer Cell** 2015; 27:298-311.

Weirich A, Leuschner I, Harms D, et al. Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. **Ann Oncol** 2001; 12:311-9.

Williams RD, Al-Saadi R, Chagtai T, et al. Subtype-specific FBXW7 mutation and MYCN copy number gain in Wilms' tumor. **Clin Cancer Res** 2010; 16:2036-45.

Wu MK, Sabbaghian N, Xu B, et al. Biallelic DICER1 mutations occur in Wilms tumours. **J Pathol** 2013; 230:154-64.

Zhdanova O, Srivastava S, Di L, et al. The inducible deletion of Drosha and microRNAs in mature podocytes results in a collapsing glomerulopathy. **Kidney Int** 2011; 80:719-30.

Zoeller G, Pekrun A, Lakomek M, Ringert RH. Wilms tumor: the problem of diagnostic accuracy in children undergoing preoperative chemotherapy without histological tumor verification. **J Urol** 1994; 151:169-71.

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



A.C. Camargo  
Cancer Center

Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP

### APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **09/08/2016**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 21/06/2016, aprovaram a realização do projeto nº **2222/16** intitulado: “Uso de Urina como biópsia líquida para a detecção de DNA tumoral livre em paciente com Tumor de Wilms: Estratégia não invasiva para diagnóstico e monitoramento de resposta à quimioterapia”.

Pesquisador responsável: Dra. Dirce Maria Carraro.  
Aluna: Ana Carolina Kerekes Miguez (Mestrado).

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

São Paulo, 17 de Agosto de 2016.

Atenciosamente,

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

1/1

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

### RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

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

---

1. NOME DO PARTICIPANTE: .....

SEXO : M F DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL: .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO : M F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº .....

APTO: .....

BAIRRO: .....CIDADE: .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

---

#### **II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**

##### 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Uso de Urina como biópsia líquida para a detecção de DNA tumoral circulante em paciente com Tumor de Wilms: Estratégia não invasiva para diagnóstico e monitoramento de resposta à quimioterapia.

##### 2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Dra. Dirce Maria Carraro

##### 3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:

- Dra. Cecília Maria Lima da Costa - Diretora do Núcleo de Oncologia Pediátrica
- Ana Carolina Kerekes Miguez - Aluna de Mestrado do A.C. Camargo Cancer Center

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

#### 4. DURAÇÃO DA PESQUISA:

24 meses

---

### III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Uso de Urina como biópsia líquida para a detecção de DNA tumoral circulante em paciente com Tumor de Wilms: Estratégia não invasiva para diagnóstico e monitoramento de resposta à quimioterapia”, que será realizada no A.C.Camargo Cancer Center.

### IV - OBJETIVOS DA PESQUISA

Este estudo visa verificar se o DNA circulante extraído de urina de pacientes com tumor de Wilms é capaz de identificar marcas exclusivas do DNA do tumor. O DNA é a molécula que contém toda a informação genética de uma pessoa, e está presente nas células do corpo. O DNA presente nas células do tumor (chamado DNA tumoral circulante) contém informações específicas das células doentes (tumor). O sequenciamento de partes destes DNAs, poderiam servir como um marcador do tumor. Assim este projeto vai testar se a avaliação do DNA presente na urina pode ser usado como ferramenta para diagnóstico e acompanhamento da evolução do tratamento, ajudando os médicos, no futuro, para ter um diagnóstico da doença menos invasivo e também para monitorar a resposta ao tratamento. Além disso, com este estudo pretendemos identificar novos genes que quando estão alterados podem levar ao aparecimento do tumor de Wilms.

### V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

O tumor de Wilms é um tumor que acontece no rim, um órgão que filtra o nosso sangue e joga fora as impurezas na forma de urina. Este tumor surge por causa de alterações que ocorrem no DNA nas células do rim e que podem ser identificadas por sequenciamento. Assim, nós pretendemos identificar as possíveis marcas no DNA do tumor de Wilms presentes na urina antes de sua retirada por cirurgia através do DNA tumoral circulante presente na urina do paciente. Mostrando-se

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

efetiva, esta técnica pode vir a ajudar o médico a tomar decisões quanto ao melhor tratamento, aumentando assim a efetividade da terapia e diminuindo possíveis efeitos colaterais.

Além disso, a definição de um catálogo de alterações genéticas presentes em tumores de Wilms é importante não somente para o diagnóstico da doença, mas também para a elaboração de novos tratamentos através do entendimento das características moleculares deste tipo de tumor.

## **VI - DESENHO DA PESQUISA**

Esta pesquisa contará com participantes voluntários cujo critério clínico para inclusão é ser portador de tumor de Wilms, com até 5 anos de idade. No total, 5 participantes terão o DNA de suas amostras de sangue, urina e tumor sequenciados e analisados. O sequenciamento de DNA consiste na determinação da ordem em que os blocos de informação genética são dispostos, identificando assim possíveis blocos trocados ou fora de ordem.

Cada participante irá coletar 10 amostras de urina e 1 amostra de sangue ao longo do tratamento do tumor de Wilms, além de uma amostra de tumor no dia da cirurgia para a retirada do mesmo.

## **VII - DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS**

As amostras de urina e sangue serão coletadas nos dias de suas visitas ao hospital para realização do tratamento para o tumor de Wilms. Você não precisará vir ao hospital só para a coleta de amostras. Pretendemos reunir 10 amostras de sua urina, sendo a primeira antes do início do tratamento, mais três amostras durante as sessões de quimioterapia antes da cirurgia, uma amostra no dia da cirurgia, quatro amostras durante as sessões de quimioterapia após a cirurgia e uma última amostra na consulta após o final do tratamento. A urina será coletada em um tubo coletor com capacidade para 50ml. A coleta de urina não apresenta nenhum desconforto ao paciente.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

A amostra de sangue será coletada antes do início do tratamento, junto com a primeira amostra de urina. Serão coletados 4ml de sangue por profissionais capacitados.

A amostra de tumor será coletada quando o mesmo for removido cirurgicamente. As amostras coletadas serão processadas e armazenadas pelo Banco de Macromoléculas do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, e o material que sobrar e não for 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.

Após a assinatura deste consentimento (autorização para o teste), caso você aceite participar desta pesquisa, faremos o sequenciamento genético das amostras do seu DNA (de urina, sangue e tumor) armazenados no nosso Biobanco. Atualmente o A.C.Camargo Cancer Center conta com sequenciadores que permitem que a sua amostra seja analisada de forma detalhada e segura, usando os protocolos padrões testados e validados nesta instituição.

Após a etapa de preparação de sua amostra, as sequências geradas do seu genoma serão comparadas com sequências disponíveis do genoma humano para identificação das variações, ou seja, das diferenças entre o DNA do paciente e do DNA padrão. Algumas dessas variações serão selecionadas e validadas, ou seja, serão sequenciadas novamente por outra técnica para vermos se estas variações realmente existem. Num primeiro momento somente o DNA da sua urina e do seu sangue serão sequenciados - o DNA do tumor será sequenciado assim que este material esteja disponível para os pesquisadores, após parte do tratamento e cirurgia.

Então, as alterações selecionadas serão verificadas em suas diferentes amostras de urina, para ver se elas estão presentes no DNA presente em sua urina. Estas diferentes amostras de urina serão coletadas durante o seu tratamento, nos momentos descritos acima.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

## **VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO**

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

## **IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS**

Os participantes não se beneficiarão diretamente com a realização nesse estudo. Contudo, o estudo contribuirá para um melhor entendimento dos fatores que podem causar o aparecimento e a evolução do tumor de Wilms. Desta forma, pode ajudar no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamento mais eficazes.

## **X - CONFIDENCIALIDADE**

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

Seus registros médicos poderão ser consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos neste estudo. Os dados obtidos pela análise do seu sangue, tumor e urina são confidenciais, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante ainda que informações do registro médico sejam utilizadas para publicação. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter seu anonimato. Os pesquisadores comprometem-se a manter a confidencialidade dos dados do estudo e do paciente, porém há um risco mínimo de perda desta confidencialidade.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

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. TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO: (11) 2198-5023 - Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do AC Camargo Cancer Center, contato com Dra. Dirce Maria Carraro.

## **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. 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.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

( ) 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:

( ) Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

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

Nome: \_\_\_\_\_

Grau de Parentesco: \_\_\_\_\_

Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Grau de Parentesco: \_\_\_\_\_

Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

( ) Não cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

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;

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: Dra. Dirce Maria Carraro.

Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C.Camargo Cancer Center - São Paulo.

Telefones para contato: (11) 2198-5023.

Endereço: Rua Taguá, 400 - 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.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

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

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Assinatura do responsável pela pesquisa

(Dra. Dirce Maria Carraro)

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

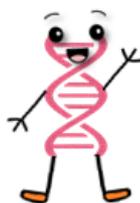
## Apêndice 2 - Termo de Assentimento (TA)



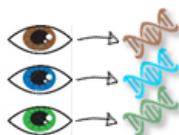
### Termo de Assentimento para crianças não alfabetizadas.

Título do projeto: *Uso de Urina como biópsia líquida para a detecção de DNA tumoral circulante em paciente com Tumor de Wilms: Estratégia não invasiva para diagnóstico e monitoramento de resposta à quimioterapia.*

Este documento deve ser lido para a criança por um adulto.



**Este é o DNA!**



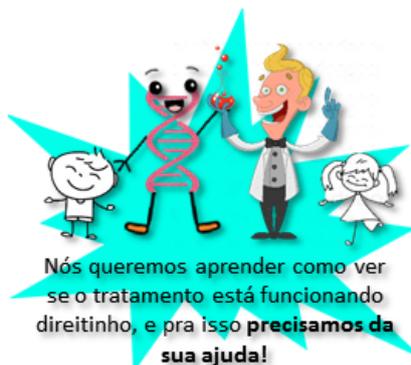
Ele está presente em todas as suas células e define a cor dos seus olhos, cabelo, etc!



Mas as vezes o DNA fica com defeito, daí as nossas células ficam doentinhas e temos câncer!



Com o tratamento, as células podem voltar a ficar saudáveis!



Nós queremos aprender como ver se o tratamento está funcionando direitinho, e pra isso **precisamos da sua ajuda!**



Quando você vier fazer o tratamento no hospital, só precisa fazer xixi num potinho!



Vamos olhar o DNA que sai no seu xixi e ver o quanto ele ainda está com defeito durante o seu tratamento!



Também precisamos de um pouquinho do seu sangue, então vamos fazer uma picadinha no seu braço!



Quando você fizer a cirurgia para retirar as células doentinhas do seu corpo, também vamos querer um pouquinho delas!

Você gostaria de nos ajudar?     SIM     NÃO

Nome da criança: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome da pessoa que obteve o consentimento: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Rúbrica do pesquisador responsável: